



République Algérienne Démocratique et Populaire
MINISTÈRE DE L'ENSEIGNEMENT SUPÉRIEUR ET DE LA
RECHERCHE SCIENTIFIQUE



UNIVERSITÉ SAAD DAHLEB - BLIDA 1-

FACULTE DE MÉDECINE
DÉPARTEMENT DE PHARMACIE

Mémoire De Fin d'Étude

En vue de l'obtention du titre de Docteur en Pharmacie

THEME

Validation de la spectrophotométrie dérivée

Présenté par :

- **BOUKENAOUI Sarah**
- **BOUTECHICHA Zakarya**
- **DEY Rabea**

Encadré par :

- **Dr. IMOUDACH Hicham : maitre-assistant en chimie analytique**

Devant le jury :

- **Président Pr. GHARBI .A : professeur en chimie analytique**
- **Examineur Dr. BENGHEZZAL .I : maitre-assistant en biophysique**

Session : Juillet 2023

Remerciements

On remercie dieu le tout puissant de nous avoir donner la santé et la volonté d'entamer et de terminer ce mémoire.

Tout d'abord, ce travail ne serait pas aussi riche et n'aurait pas pu avoir le jour sans l'aide de l'encadrement du professeur **IMOUDACH Hichem**, on le remercie pour la qualité de son encadrement exceptionnel, pour sa patience, sa rigueur et sa disponibilité durant notre préparation de ce mémoire.

Nos vifs remerciements vont également aux membres du jury pour l'intérêt qu'ils ont porté à notre recherche en acceptant d'examiner notre travail et de l'enrichir par leurs propositions.

Dédicaces

Je dédie ce travail tout d'abord :

Au bon dieu qui est en dessus de moi en train de me protéger.

À tous ceux qui m'ont aimé car c'est grâce à eux que mes blessures se sont apaisées.

À tous ceux qui m'ont détesté c'est grâce à eux aussi que j'ai su me relever.

Et au final à nos très chers qui nous ont quittés c'est grâce à leurs bénédictions que la vie m'est effleurie.

Rabea



Ce projet fin d'étude est dédié à :

Mes chers parents Toufik et Souad, qui m'ont toujours poussé et motivé dans mes études. Sans eux, je n'aurais certainement pas fait d'études supérieures. Il représente donc l'aboutissement du soutien et des encouragements qu'ils m'ont prodigués tout au long de mon cursus. Qu'ils en soient remerciés par cette trop modeste dédicace.

C'est un moment de plaisir de dédier cet œuvre, à ma sœur Zahra et mes frères Abdellah et Abderrahmane, en signe d'amour, de reconnaissance et de gratitude pour le dévouement et les sacrifices dont vous avez fait toujours preuve à mon égard.

Sarah



C'est avec grand plaisir que je dédie ce modeste travail :

À l'être le plus cher de ma vie ma mère

À celui qui a fait de moi un homme mon père

À celui qui a fait de moi un homme d'aujourd'hui mon grand-père paix à son âme.

À mes chers frères et sœurs.

À tous mes amis de promotion et toute personne qui occupe une place dans mon cœur.

À tous les membres de ma famille et toute personne qui porte le nom Boutechicha, je dédie ce travail à tous ceux qui ont participé à ma réussite.

Zakarya



Sommaire

INTRODUCTION	1
PARTIE THEORIQUE	3
CHAPITRE I : LE MEDICAMENT ET SA QUALITE	3
1. GENERALITES SUR LE MEDICAMENT :	3
1.1. Définition du médicament :	3
1.2. Composition du médicament :	3
1.3. Les voies d'administration et les formes galéniques des médicaments :	5
1.4. Cycle de vie du médicament :	7
2. DEFINITION DE CONTROLE DE QUALITE :	9
3. BUT DU CONTROLE QUALITE	10
4. STRATEGIE DE CONTROLE DE QUALITE :	12
5. TESTS DE CONTROLE QUALITE	13
6. SYSTEME DE CONTROLE DE QUALITE	14
7. METHODES ANALYTIQUES POUR LE CONTROLE QUALITE :	14
7.1. La chromatographie :	14
7.2. Potentiométrie :	19
7.3. Spectroscopie :	20
CHAPITRE II : VALIDATION D'UNE METHODE ANALYTIQUE	23
1. GENERALITE SUR LA VALIDATION :	23
1.1. Définition de la validation :	23
1.2. Les bases réglementaires et normatives :	24

1.3.	La relation entre la qualité et la validation : -----	26
1.4.	Objectif de la validation : -----	26
1.5.	Concept de « FITNESS-FOR-PURPOSE »:-----	26
2.	CYCLE DE VIE D'UNE METHODE ANALYTIQUE :-----	28
2.1.	Sélection de la méthode : -----	29
2.2.	Développement de la méthode :-----	29
2.3.	Optimisation et gestion des modifications :-----	30
2.4.	Validation de la méthode : -----	30
2.5.	Transfer analytique :-----	31
2.6.	Utilisation en routine : -----	32
2.7.	Revalidation :-----	32
3.	TYPE DE VALIDATION :-----	32
4.	CRITERES DE VALIDATION :-----	33
4.1.	Spécificité-Sélectivité : -----	33
4.2.	Fonction de réponse (courbe d'étalonnage) :-----	33
4.3.	Linéarité : -----	33
4.4.	Fidélité (précision) : -----	33
4.5.	Justesse :-----	34
4.6.	Exactitude : -----	34
4.7.	Limite de détection et de quantification :-----	34
4.8.	Intervalle de dosage :-----	35
4.9.	Sensibilité :-----	35
5.	LES ETAPES POUR VALIDER UNE METHODE AVEC LE PROFIL D'EXACTITUDE : -----	35

6. LES DIFFERENTES APPROCHES DE LA VALIDATION ANALYTIQUE :	36
6.1. Approche descriptive :	36
6.2. Approche globale :	36
6.3. Approche capabilité :	37
7. PROTOCOLES EN PHASE DE VALIDATION :	37
8. DEMARCHES STATISTIQUES DE LA VALIDATION :	39
8.1. Spécificité :	39
8.2. Fonction de réponse :	39
8.3. Alignement des observations :	40
8.4. Prédiction inverses :	41
8.5. Calcul de la justesse et de la fidélité :	41
8.6. Calcul de l'exactitude :	42
8.7. Profil d'exactitude :	43
8.8. Choix de la fonction de réponse :	44
8.9. Linéarité :	44
8.10. Limites de quantification :	44
PARTIE PRATIQUE	23
CHAPITRE IV : MATERIELS ET METHODES	45
1. INTRODUCTION	45
2. LE MEDICAMENT UTILISE :	46
3. MATIERES PREMIERES ET REACTIFS :	48
4. INSTRUMENTS ET EQUIPEMENTS :	48
5. METHODE ANALYTIQUE :	49

6. PARAMETRES EXPERIMENTAUX :	50
7. VALIDATION DE LA METHODE :	51
8. RESULTATS ET DISCUSSIONS :	60
CONCLUSION	63
REFERENCE BIBLIOGRAPHIQUE	64
ANNEXE :	68
RESUME	100

Liste des figures :

Figure 01 : composition de médicament.

Figure 02 : classification des formes pharmaceutiques en fonction de l'état physique.

Figure 03 : les voies d'administration des médicaments.

Figure 04 : Les différents types d'essais cliniques.

Figure 05 : les étapes de vie d'un médicament.

Figure 06 : schéma de chromatographie en phase gazeuse.

Figure 07 : photo de CPG.

Figure 08 : photo de CCM.

Figure 09 : schéma de La chromatographie sur couche mince.

Figure 10 : schéma de l'appareil de Chromatographie en phase liquide à haute performance.

Figure 11 : photo HPLC.

Figure 12 : schéma de potentiométrie.

Figure 13 : photo de potentiomètre.

Figure 14 : schéma de spectrophotomètre d'absorption UV_ visible.

Figure 15 : photo de spectrophotomètre d'absorption UV_ visible.

Figure 16 : photo de IR.

Figure 17 : schéma de spectroscopie fluorescence.

Figure 18 : cycle de vie de la méthode analytique SFSTP 6_7 juin 2012.

Figure 19 : Critères et procédures de validation liés au cycle de vie d'une méthode d'analyse (Validation interne des méthodes d'analyse par max FEINBERG.).

Liste des tableaux :

Tableau 01 : propriétés essentielles du principe actif.

Tableau 02 : les voies d'administration les formes galéniques le plus courantes.

Tableau 03 : Caractéristiques comparées de la HPLC en phase normale et en phase inverse.

Liste des abréviations :

AMM : Autorisation de Mise sur le Marché.

BPF : Bonnes Pratiques de Fabrication.

Cp : Comprimé.

CV : Coefficient de variation.

CYP3A4 : Cytochrome P 450.

DCI : Dénomination Commune Internationale.

DL : Dose Létale.

FDA: Food and Drug Administration.

HPLC: High Performance Liquid Chromatography.

HTA: Hypertension artérielle.

ICH: International Conference of Harmonization.

ISO: International Standard Organisation.

IUPAC: International Union of Pure and Applied Chemistry.

LD : Limite de Détection.

LQ : Limite de Quantification.

LQinf : Limite de Quantification inférieure.

LQsup : Limite de Quantification supérieure.

MSE : Mean Squared Error.

MSM: Mean Square Model.

PA: Principe Actif.

QSP : Quantité Suffisante Pour.

SCE : Somme des Carrés des Ecart.

SE : Standard d'Etalonnage.

SV : Standard de Validation.

SFSTP : Société Française des Sciences et Techniques Pharmaceutiques.

Introduction

À nos jours, l'assurance qualité se démontre de plus en plus exigeante dans son Contexte en termes de norme et de réglementation qui guident vers la qualité attendue d'un médicament qui doit être conforme à toute exigence attendue pour ses usages.

On entend dire par médicament toute substance ou préparation destinée à prévenir, diagnostiquer, traiter ou guérir une maladie, à restaurer, corriger ou modifier une fonction organique ou à exercer un effet pharmacologique, immunologique ou métabolique. Un médicament doit respecter les exigences de qualité, sécurité et d'efficacité avant d'être autorisé pour sa mise sur le marché car la qualité d'un médicament est un critère essentiel pour garantir son efficacité et sa sécurité d'emploi.

A cet égard, l'intégration de la validation des méthodes analytiques dans les systèmes d'assurance qualité est devenue une nécessité, elle consiste à vérifier que le médicament répond aux spécifications définies lors de sa conception, de son développement et de sa fabrication, et qu'il n'entraîne pas d'effets indésirables ou du risque pour les patients.

Actuellement, la méthode couramment utilisée pour le dosage des médicaments est la chromatographie à haute performance connue sous le nom de HPLC, vue ses avantages significatifs qu'on peut mentionner : sa rapidité et sa précision de l'analyse, la possibilité de travailler avec des échantillons complexes, aussi bien que la faible consommation de solvant et la réduction des déchets mais bien que ses avantages qu'elle apporte, elle ne manque pas d'avoir aussi des inconvénients qui l'a rend inestimable, on peut citer : le coût élevé du matériel et des consommables qui limite l'accès à cette technique à certains laboratoires spécialisés, le risque de dégradation ou d'adsorptions des composés sur la colonne ou le détecteur et en dernier la nécessité d'une préparation minutieuse des échantillons.

Conformément à ce contexte, la spectrophotométrie dérivée offre une solution prometteuse. Elle mesure l'absorbance d'un échantillon à différentes longueurs d'onde et analyse les dérivées de ces mesures. Cette approche présente plusieurs avantages par rapport à la HPLC, elle est moins coûteuse en termes d'équipements et de consommables, plus rapide, plus simple et plus facilement automatisable, ce qui peut augmenter la productivité des laboratoires.

Cependant, avant de considérer la méthode spectrophotométrique dérivée comme une alternative valide à la HPLC, est-ce que cette méthode peut être validée comme une alternative économique à la chromatographie liquide à haute performance (HPLC) pour le dosage de l'hydrochlorothiazide et du valsartan comme produit finale sous sa forme orale (comprimés), tout en garantissant des résultats fiables et précis ?

Notre humble travail qui a pour but la validation de la spectrophotométrie dérivée pour le dosage du médicament "VALPHI PLUS" composé d'hydrochlorothiazide et du valsartan par voie orale sous forme de comprimés est structuré en deux grandes parties suivies d'une conclusion générale.

La première partie consacrée à la partie bibliographique rassemble deux chapitres essentiels :

Chapitre I : intitulée " Le médicament et sa qualité". Nous avons abordé des notions de base sur le médicament et la mise en place d'un système de contrôle qualité afin de garantir sa conformité et sa qualité.

Chapitre II : intitulée "Validation d'une méthode analytique". Nous avons traité la définition de la validation, son cycle de vie ainsi que les différents critères qu'elle comporte selon SFSTP 2003.

La seconde partie est consacrée à la partie pratique de notre travail qui comprend la validation de la spectrophotométrie dérivée pour le dosage de l'hydrochlorothiazide et le valsartan par un spectrophotomètre UV-VIS objet de notre étude.

Le présent travail a été effectué au niveau du Laboratoire de chimie analytique du groupement SAIDAL à GUE DE CONSTANTINE.

PARTIE THEORIQUE

*Chapitre I : Le médicament et sa qualité***1. Généralités sur le médicament :**

1.1. Définition du médicament :

Selon la loi de santé publique algérienne N° 46 Correspondant au 29 juillet 2018 relative à la santé, l'article 208 page 19.

On entend par médicament, au sens de la présente loi :

“ Toute substance ou composition présentée comme possédant des propriétés curatives ou préventives à l'égard des maladies humaines ou animales, et tous produits pouvant être administrés à l'homme ou à l'animal en vue d'établir un diagnostic médical ou de restaurer, de corriger et de modifier ses fonctions physiologiques” (01).

1.2. Composition du médicament :

Un médicament se compose d'un ou de plusieurs principes actifs et d'excipient (02).

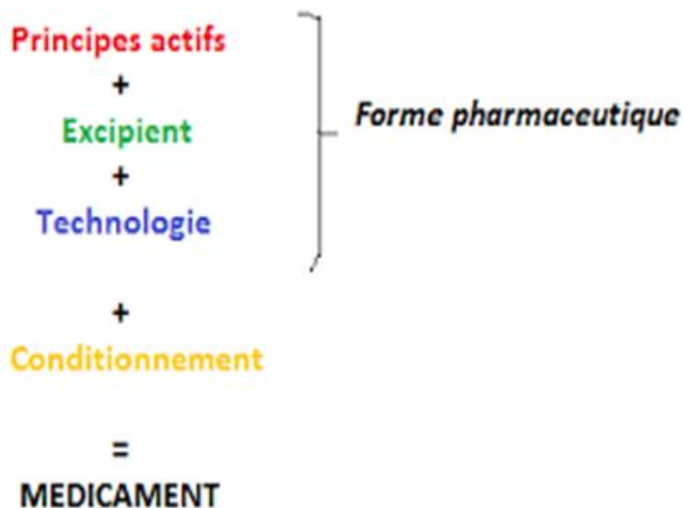


Figure 01 : composition de médicament.

1.2.1. Le principe actif (PA) :

Le principe actif d'un médicament, est une substance qui possède un effet thérapeutique. Le principe actif peut exister sous plusieurs formes : la forme cristalline ou sous la forme de dérivés tel que les sels.

Le choix de principe actif dépend du mode d'administration, la stabilité, la solubilité et la biodisponibilité (03).

<i>Propriété physicochimique</i>	<i>Devenir dans l'organisme</i>
<i>Caractères organoleptiques Solubilité Température fusion, ébullition</i>	<i>Biodisponibilité Répartition Biotransformation élimination</i>
<i>Stabilité</i>	<i>Activité thérapeutique</i>
<i>Chaleur Lumière Oxygène Humidité Etc.</i>	<i>Lieu Mécanisme Effets secondaires</i>

T
ablea
u
01 :
propriétés
essentielle
s du

principe actif (03).

1.2.2. L'excipient :

Se définit comme toute 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 (04).

1.2.3. Conditionnement :

Il y a deux conditionnements :

- Conditionnement primaire : est celui en contact avec le médicament.
- Conditionnement secondaire : ou extérieur, c'est l'emballage dans lequel est placé le médicament. L'étiquetage du conditionnement secondaire mentionne notamment le nom du médicament, le dosage, la composition qualitative et quantitative en substances actives par unité de prise, la forme pharmaceutique, les mises en garde spéciales, le numéro de lot de fabrication, la date de péremption, le nom et l'adresse du titulaire de l'autorisation de mise sur le marché (05).

1.3. Les voies d'administration et les formes galéniques des médicaments :

Voie	Forme principale
Orale	Solide : comprimé, gélule Liquide : préparations buvables
Parentérale	Solution, émulsion, suspension Formes vectorisées
Rectale	Semi-solide : suppositoires Pâteuse : pommade, crème Liquide : lavement
Vaginale	Semi-solide : ovules Solide : comprimés gynécologiques Liquide : solution
Ophtalmique	Liquide : collyres Pâteuse : pommade
Oto-rhino-laryngologie (ORL)	Liquide : solution aérosolisées
Pulmonaire	Liquide : solution, solution aerosolisées
Percutané	Pâteuses : crème, pommade, gel Formes adhésives

Tableau 02 : les voies d'administration les formes galéniques le plus courantes (03).

- Le choix de la forme galénique dépend de la voie d'administration(03).

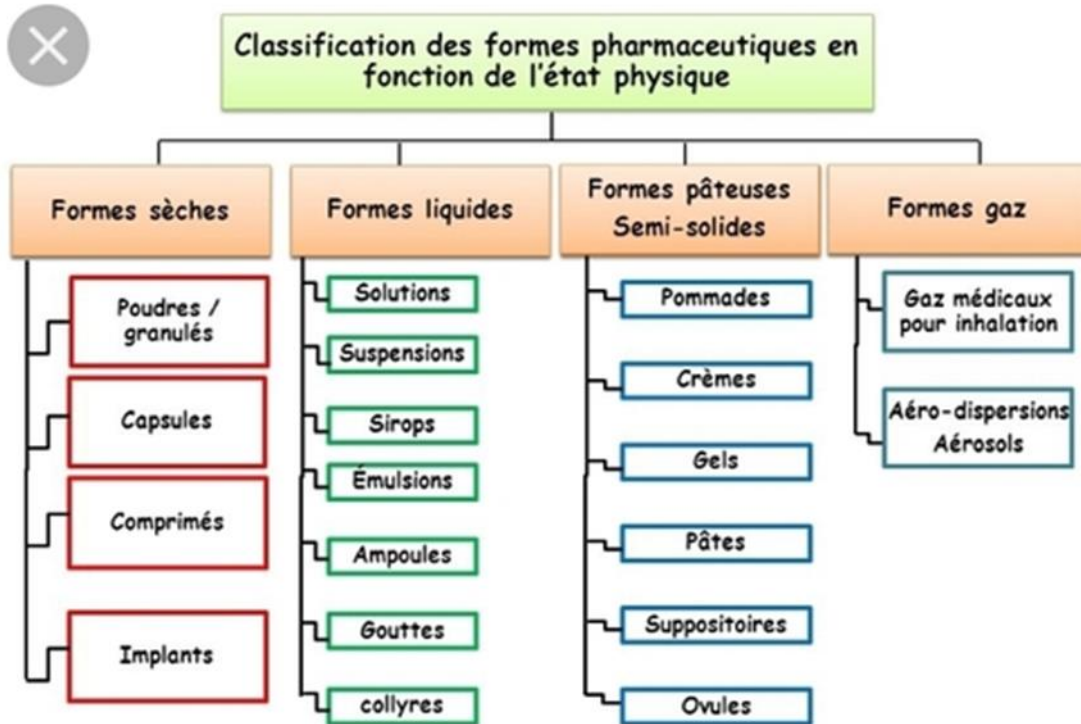


Figure 02 : classification des formes pharmaceutiques en fonction de l'état physique (06).

- 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 (03).

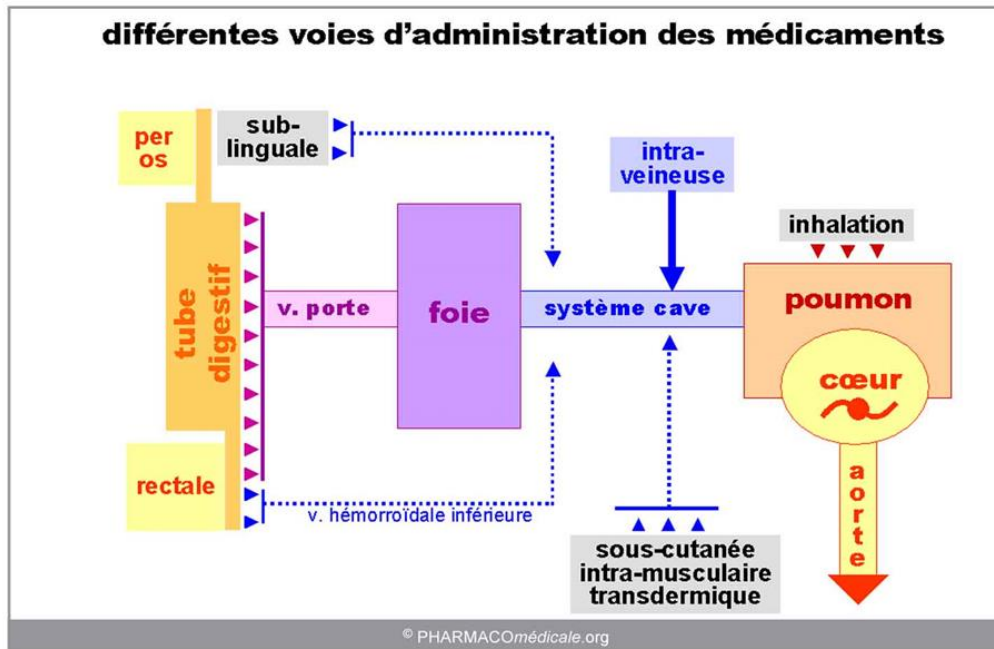


Figure 03 : les voies d'administration des médicaments (07).

1.4.Cycle de vie du médicament :

Le processus du développement du médicament est un processus long et complexe qui prend plusieurs années (jusqu'à 15 ans), passant par plusieurs étapes réglementées permettant d'assurer sa qualité, sa sécurité et son efficacité auprès des patients situés en fin de chaîne (08).

- Première étape : Pendant laquelle les molécules peuvent devenir de potentiels candidats.
Les médicaments sont découverts, puis isolés, aussi cette étape comprend l'identification de cible. Elle dure en moyenne de 2 à 5 ans (08).
- Deuxième étape est celle d'étude pré-clinique, La recherche pré-clinique regroupe les études pharmacodynamiques et pharmacocinétiques, Cette étape permet de sélectionner un nombre limité de candidats médicaments qui peuvent accéder aux études cliniques, aussi permet d'évaluer l'efficacité, la sécurité, la toxicité et leurs données pharmacocinétiques (08).
- Troisième étape est l'étude clinique, réalisés sur la personne humaine volontaire, nécessitant obligatoirement une autorisation préalable de réalisation par l'ANSM (Agence Nationale de Sécurité du Médicament) et le CPP (Comité de Protection des Personnes) (08).

Les essais cliniques sont divisés en trois phases (08) :

- ✓ Phase I : Se réalise sur un petit nombre de volontaires sains et permet de tester la sécurité, de concept du mécanisme d'action, étudie les effets pharmacologiques et les paramètres pharmacocinétiques chez l'homme.
- ✓ Phase II : Consiste à tester l'efficacité du médicament et de déterminer sa posologie optimale.

- ✓ Phase III : Permet de confirmer l'efficacité et la marge de sécurité (DT1%/DE99%) d'un médicament.

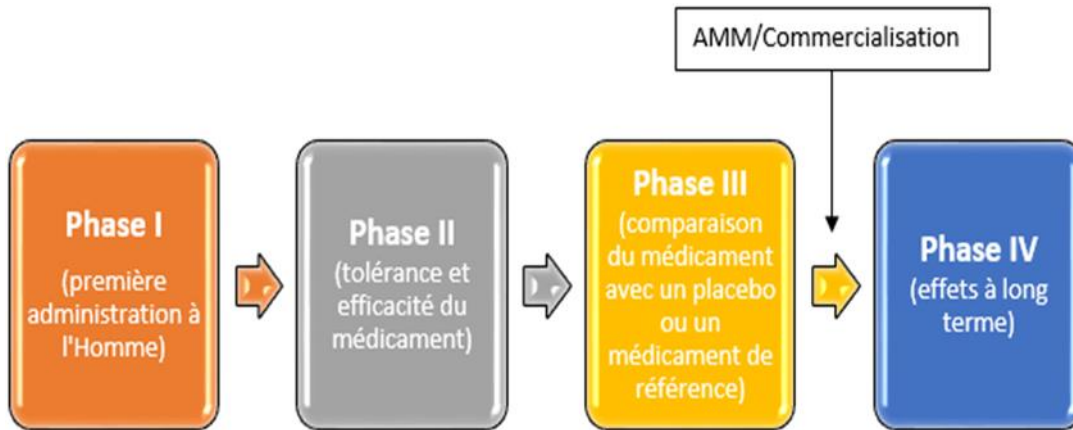


Figure 04 : Les différents types d'essais cliniques (09).

- Quatrième étape : Consiste à déposer un dossier d'autorisation de mise sur le marché (AMM) auprès des autorités de santé compétentes, nationales (Agence nationale de sécurité du médicament et des produits de santé - ANSM) ou européennes (l'agence européenne d'évaluation des médicaments European medicines agency - EMA), Ce dossier comporte les résultats des nombreux travaux de recherche et d'essais cliniques et précliniques. Il doit garantir (05) :
 - La qualité pharmaceutique
 - La sécurité d'emploi
 - L'efficacité du médicament
- ✓ Phase IV est celle des études de pharmacovigilance qui permettent d'identifier les effets indésirables rares et de mesurer l'efficacité du médicament dans les conditions réelles d'utilisation et d'évaluer les pratiques (pharmaco épidémiologie) (08).

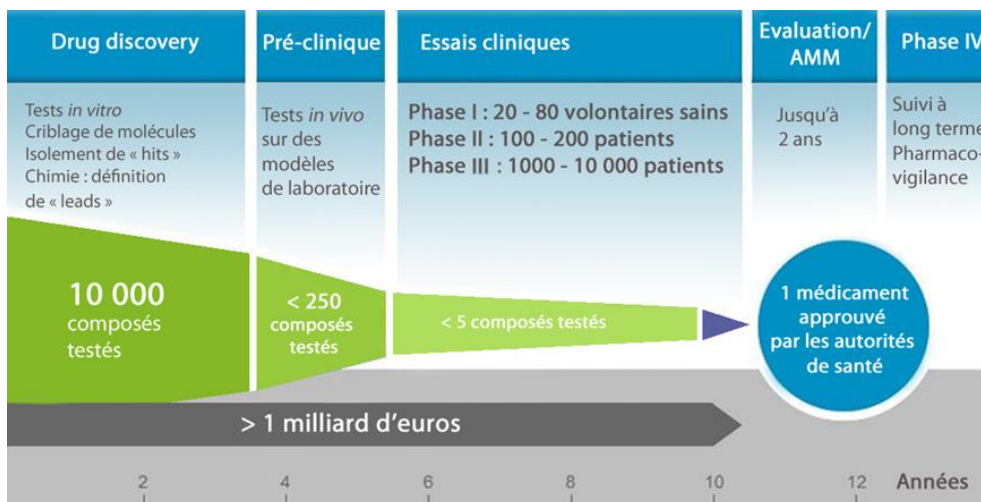


Figure 05 : les étapes de vie d'un médicament (10).

2. Définition de contrôle de qualité :

a. La définition de la qualité :

Le définition « qualité » n'a pas été élaboré par les BPF, donc on peut se référer aux deux définitions celles de l'ISO et de AFNOR-NF-X-50-120.

« La qualité désigne l'ensemble des propriétés et caractéristiques d'un produit ou service qui lui confèrent l'aptitude à satisfaire des besoins exprimés ou implicites » (AFNOR-NF-X-50-120).

Et selon la norme internationale ISO 9000 intitulée « principes essentiels et vocabulaire ».

La qualité a relié l'entreprise avec les attentes et les exigences du client sous une autre définition.

La qualité est : « L'aptitude d'un ensemble de caractéristiques intrinsèques à satisfaire des exigences » (11).

b. La définition du contrôle qualité :

Le contrôle qualité est « la partie de la gestion de la qualité se concentrant sur les exigences qualité à remplir » (ISO 9000 :2000).

En 1981, un nouveau terme a été utilisé par l'organisation mondial de santé (OMS) qui est « Le contrôle qualité interne », (CQI) et qui était défini comme : « Un ensemble de procédures pour évaluer de manière continue le travail du laboratoire et les résultats qui en sortent » (12).

Le contrôle qualité des médicaments fait partie des BPF : il concerne l'échantillonnage, les spécifications, le contrôle, ainsi que les procédures d'organisation, de documentation et de libération des lots qui garantissent que les analyses nécessaires et appropriées ont réellement été effectuées et que les matières premières, les articles de conditionnement et les produits ne sont pas libérés pour l'utilisation, la vente ou l'approvisionnement sans que leur qualité ait été jugée satisfaisante (13).

Le contrôle qualité et s'assurer que le produit (service) a les caractéristiques essentiels et spécifiques pour la satisfaction du client (12).

Aussi le contrôle qualité peut être considéré comme le système qui maintient le niveau de qualité désiré et cela en s'assurant de la conformité des caractéristiques des

produits et des services et de la mise en œuvre des actions correctives en cas non-conformité de l'un de ces caractéristiques par rapport à une norme spécifiée (13).

3. But du contrôle qualité

Le concept du « but du contrôle qualité » est assez similaire selon : Les Bonnes Pratiques de Fabrication (BPF), les normes ISO et les directives de l'Organisation mondiale de la santé (OMS).

a. Selon BPF (14) :

- Garantir que les produits fabriqués sont conformes aux spécifications de qualité prévues.
- S'assurer que toutes les procédures sont correctement documentées et que tous les enregistrements nécessaires sont maintenus.
- Éviter les erreurs de fabrication qui pourraient compromettre la qualité et l'efficacité des produits.
- Veiller à ce que les installations, les équipements et les processus de fabrication soient validés et qualifiés pour garantir leur adéquation à l'utilisation prévue.
- S'assurer que le personnel est formé et qualifié pour effectuer les tâches de manière appropriée.
- Mettre en place un système de gestion de la qualité pour permettre l'amélioration continue de la qualité des produits.

b. Selon ISO (15) :

- Améliorer la qualité des produits et services en minimisant les erreurs de fabrication, les défauts et les non-conformités.
- Assurer la satisfaction des clients en fournissant des produits et services de qualité conforme à leurs exigences.
- Éviter les erreurs de fabrication qui pourraient compromettre la qualité et l'efficacité des produits.
- Veiller à ce que les processus soient documentés, mis en place, surveillés et améliorés de manière continue.
- Mettre en place un système de gestion de la qualité pour permettre l'amélioration continue de la qualité des produits et services.

c. Selon OMS (16) :

- Assurer la qualité, l'innocuité et l'efficacité des produits de santé tout au long de leur cycle de vie.

- Garantir la conformité des produits aux exigences réglementaires et aux normes de qualité internationales.
- Éviter les erreurs de fabrication qui pourraient compromettre la qualité et la sécurité des produits de santé.
- Veiller à ce que les processus de fabrication, d'analyse et de contrôle soient documentés, mis en place, surveillés et améliorés de manière continue.
- S'assurer que le personnel est formé et qualifié pour effectuer les tâches de manière appropriée.
- Mettre en place un système de gestion de la qualité pour permettre l'amélioration continue de la qualité des produits de santé.

En résumé, le but du contrôle qualité selon les BPF, les normes ISO et les directives de l'OMS est d'assurer la qualité, l'innocuité et l'efficacité des produits en minimisant les erreurs, les défauts et les non-conformités, tout en garantissant la satisfaction des clients et en permettant l'amélioration continue de la qualité.

4. Stratégie de contrôle de qualité :

La stratégie de contrôle de la qualité est une étape essentielle dans la validation des méthodes analytiques en pharmacologie. Cette stratégie définit les mesures de contrôle qui doivent être mises en place pour garantir la fiabilité et la qualité des résultats obtenus lors de l'analyse des échantillons. Elle vise à s'assurer que les résultats obtenus sont précis, reproductibles et comparables, ce qui est crucial pour garantir la sécurité et l'efficacité des produits pharmaceutiques.

La mise en place d'une stratégie de contrôle de la qualité implique l'identification des sources de variation possibles, la définition de spécifications appropriées, le choix de méthodes de contrôle adaptées, et la mise en place de procédures pour évaluer et gérer les déviations éventuelles. Cette section examinera les différents éléments qui doivent être pris en compte pour élaborer une stratégie de contrôle de la qualité efficace dans le contexte de la validation des méthodes analytiques en pharmacologie (17) (18) (19).

Les stratégies de contrôle de la qualité peuvent inclure :

- Planification de la stratégie de contrôle de qualité : Cette section devrait inclure une discussion sur la manière dont la stratégie de contrôle de qualité est élaborée pour garantir que la méthode analytique répond aux exigences de qualité. Les ressources pour cette section peuvent inclure des articles de revues spécialisées sur la planification de la stratégie de contrôle de qualité.
- Choix des tests de contrôle qualité : Cette section peut inclure une discussion sur les différents tests de contrôle qualité qui sont utilisés pour valider la méthode analytique. Les ressources pour cette section peuvent inclure des articles de revues spécialisées sur les tests de contrôle qualité en pharmacologie.
- Planification de la fréquence des tests de contrôle qualité : Cette section peut inclure une discussion sur la manière dont la fréquence des tests de contrôle qualité est planifiée pour garantir que la méthode analytique est en conformité avec les exigences de qualité. Les ressources pour cette section peuvent inclure des articles de revues spécialisées sur la planification de la fréquence des tests de contrôle qualité.
- Gestion des données de contrôle qualité : Cette section peut inclure une discussion sur la manière dont les données de contrôle qualité sont gérées pour garantir que la méthode analytique est en conformité avec les exigences de qualité. Les ressources pour cette section peuvent inclure des articles de revues spécialisées sur la gestion des données de contrôle qualité.

- Évaluation et amélioration continue de la stratégie de contrôle qualité : Cette section peut inclure une discussion sur la manière dont la stratégie de contrôle qualité est évaluée et améliorée pour garantir que la méthode analytique est en conformité avec les exigences de qualité. Les ressources pour cette section peuvent inclure des articles de revues spécialisées sur l'évaluation et l'amélioration continue de la stratégie de contrôle qualité.

5. Tests de contrôle qualité

Dans le cadre du contrôle de qualité des médicaments, plusieurs tests sont réalisés pour garantir la conformité des produits. Parmi ces tests, on retrouve :

- L'identification : Il s'agit de déterminer la présence et la pureté du principe actif dans le médicament. Cette étape permet de s'assurer que le médicament est authentique et conforme aux spécifications.
- Les essais des impuretés : Ces tests permettent de détecter la présence d'éventuelles impuretés dans le médicament, qui peuvent résulter du processus de fabrication ou du stockage.
- Le dosage : C'est l'estimation quantitative du principe actif présent dans le médicament. Le dosage précis est essentiel pour garantir l'efficacité thérapeutique du médicament.
- Le test de dissolution : Il permet de vérifier la vitesse de libération du principe actif à partir de la forme galénique du médicament. Ce test évalue la capacité du médicament à se dissoudre et à être absorbé par l'organisme.

6. Système de contrôle de qualité

Le système de contrôle de qualité est une composante clé de la validation des méthodes analytiques en pharmacologie. Il s'agit d'un ensemble de procédures et de protocoles qui doivent être mis en place pour garantir la qualité et la fiabilité des résultats analytiques. Le système de contrôle de qualité vise à minimiser les sources de variation, à s'assurer que les résultats sont précis et reproductibles, et à garantir la conformité avec les réglementations en vigueur (17).

Pour élaborer un système de contrôle de qualité efficace, il est important d'identifier les différentes sources de variation qui peuvent affecter les résultats analytiques. Ces sources peuvent inclure des variables liées aux échantillons, à l'environnement, aux équipements et aux opérateurs.

Une fois ces sources identifiées, il est nécessaire de définir des spécifications appropriées pour chaque paramètre d'intérêt, et de mettre en place des procédures pour surveiller et contrôler ces paramètres. Les méthodes du contrôle doivent être sélectionnées en fonction des spécifications et des objectifs de l'analyse, et doivent être validées pour garantir leur fiabilité et leur précision (19).

7. Méthodes analytiques pour le contrôle qualité :

7.1. La chromatographie :

La chromatographie est une méthode physico-chimique qui sert à séparer les différentes substances présentes dans un mélange.

Le principe de la chromatographie est basé sur les différences d'affinité des composés d'un mélange entre une phase mobile et une phase fixe. De manière plus précise, les différents constituants du mélange sont entraînés par la phase mobile et sont séparés graduellement sur la phase fixe (ou stationnaire) en fonction de leur adsorption ou de leur solubilité, selon la technique chromatographique utilisée (20).

On peut classer en trois grandes familles :

- Chromatographie en phase gazeuse (CPG).
- Chromatographie sur couche mince (CCM).
- Chromatographie en phase liquide à haute performance (HPLC).

7.1.1. Chromatographie en phase gazeuse (CPG) :

La chromatographie en phase gazeuse permet de séparer des mélanges de gaz ou de composés vaporisables à haute température. Le mélange à analyser est injecté dans une colonne métallique de quelques millimètres de diamètre contenant la phase fixe. Les composés sont véhiculés sous pression par un gaz (dit gaz vecteur) (20).

La chromatographie en phase gazeuse est un moyen de séparation très efficace. Elle est notamment utilisée dans les raffineries et dans l'industrie chimique. On peut la coupler avec un spectromètre de masse pour identifier les composés du mélange vaporisé au fur et à mesure de leur élution (20).

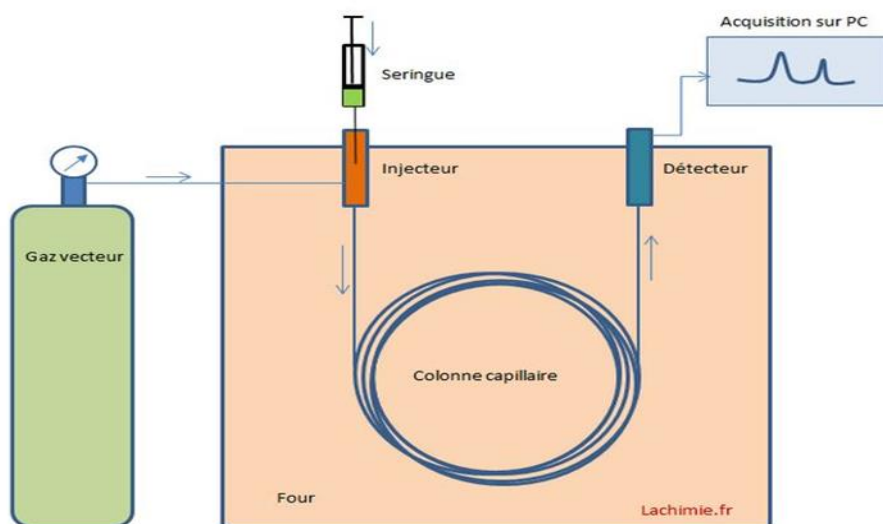


Figure 06 : schéma de chromatographie en phase gazeuse (21).



Figure 07 : photo de CPG (27).

7.1.2. Chromatographie sur couche mince (CCM) :

La chromatographie sur couche mince est la plus simple des méthodes chromatographiques.

Elle consiste à placer sur une feuille (papier, silice ou autre, voir plus loin) une tache et de la laisser éluer en la trempant dans un solvant ou un mélange de solvant (appelé éluant), l'éluant diffuse le long du support. La tache migre sur la feuille plus ou moins vite selon la nature des interactions qu'elle subit de la part du support et de l'éluant. La plaque de chromatographie est ensuite lue directement si les composés sont visibles, ou placée sous une lumière ultraviolette (UV).

Le principal intérêt de la CCM est l'identification rapide des composés d'un mélange, mais cette technique ne permet pas le dosage d'un composé (20).



Figure 08 : photo de CCM (28).

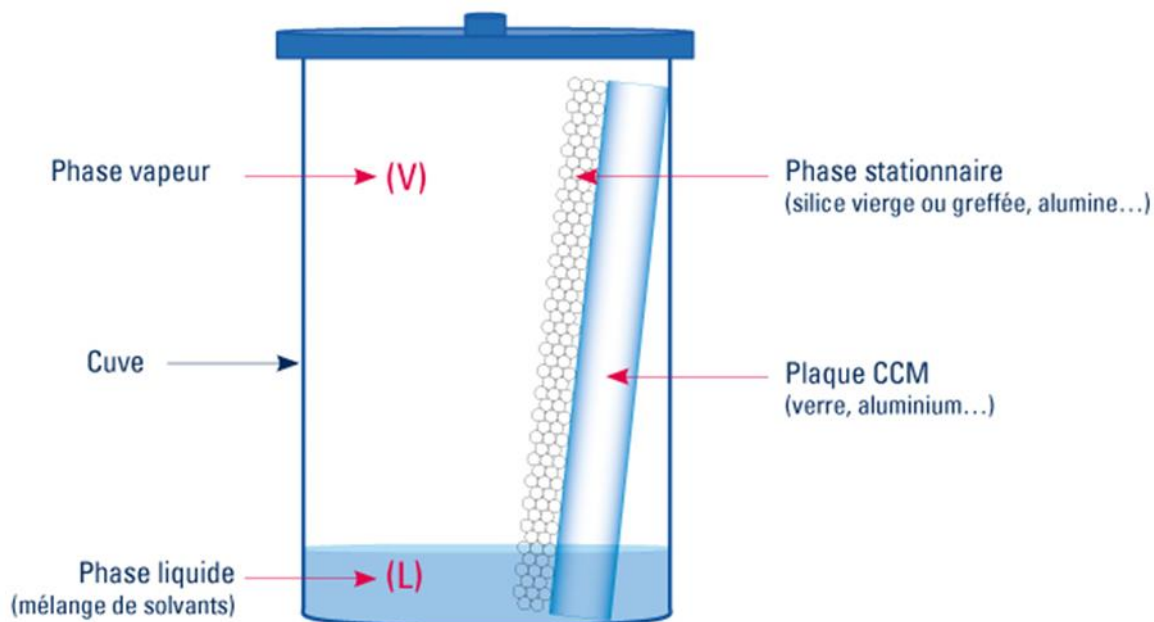


Figure 09 : schéma de La chromatographie sur couche mince (23).

7.1.3. Chromatographie en phase liquide à haute performance (HPLC) :

HPLC est largement utilisée comme technique analytique et préparative dans plusieurs domaines, Comme son nom l'indique, la phase mobile est liquide, et non gazeuse comme dans le type de chromatographie qui vient d'être présenté. Cela dit, le principe de la séparation reste le même, à savoir le partage différentiel des molécules à séparer dans les deux phases stationnaires et mobiles. Il existe deux possibilités : soit la phase stationnaire est polaire (on parle de HPLC en phase normale), soit elle est apolaire (on parle de HPLC en phase inverse ou RP-HPLC (24)).

	Phase normale	Phase inverse
Phase stationnaire	Polaire	Apolaire
Phase mobile	Gradient de plus en plus polaire	Gradient de plus en plus apolaire
Elution des composés	Les plus polaires sont élués en dernier	Les plus apolaires sont élués en dernier

Tableau 03 : Caractéristiques comparées de la HPLC en phase normale et en phase inverse (24).

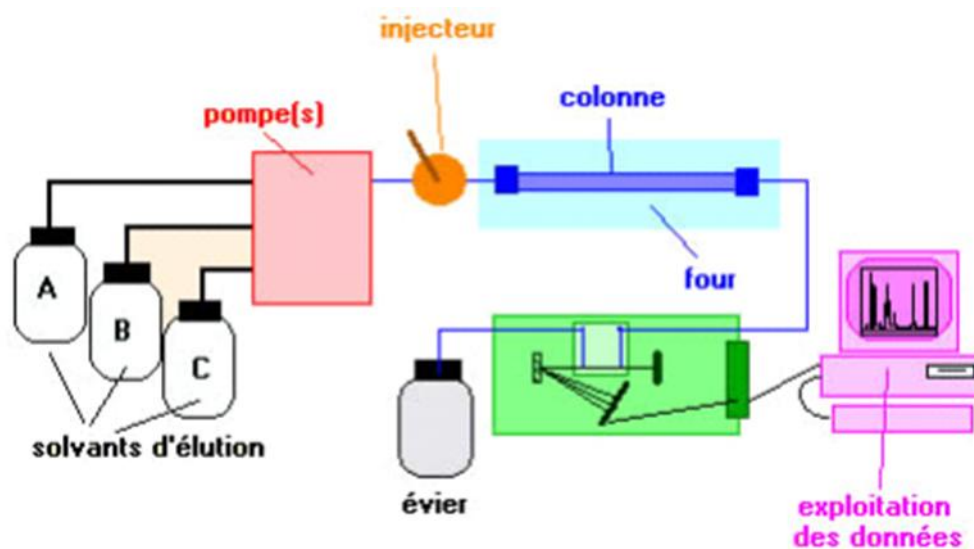


Figure 10 : schéma de l'appareil de Chromatographie en phase liquide à haute performance (25).

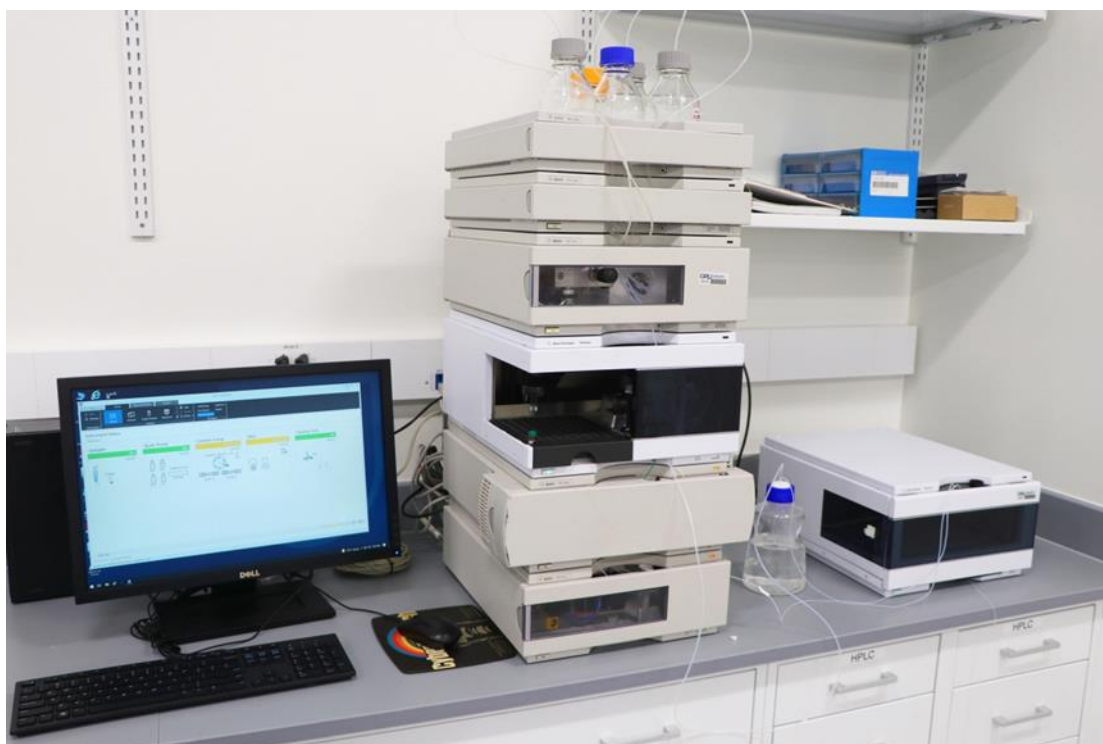


Figure 11 : photo HPLC (29).

7.2. Potentiométrie :

La potentiométrie est une méthode analytique qui permet de relier une mesure de potentiel d'électrode à une activité d'espèce en solution. L'électrode correspondante est appelée électrode indicatrice (32).

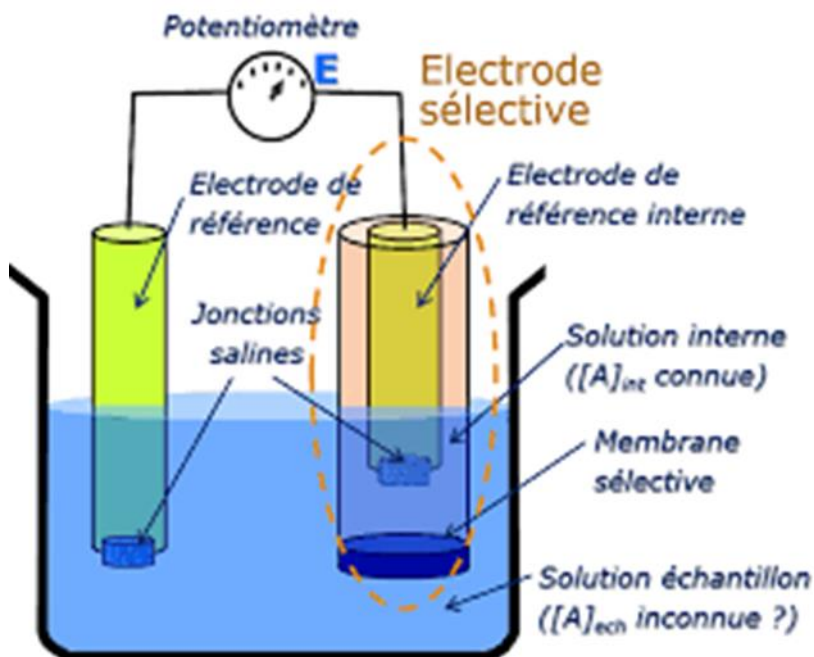


Figure 12 : schéma de potentiométrie (33).



Figure 13 : photo de potentiomètre (34).

7.3.Spectroscopie :

La spectrophotométrie est une méthode analytique quantitative qui consiste à mesurer l'absorbance ou la densité optique d'une substance chimique donnée en solution. Plus cette espèce est concentrée plus elle absorbe la lumière dans les limites de proportionnalités énoncées par la loi de Beer-Lambert, La densité optique des solutions est déterminée par un spectrophotomètre préalablement étalonné sous la longueur d'onde d'absorption de l'espèce chimique à étudier (30).

7.3.1. Spectrophotomètre d'absorption UV_ visible :

Le principe de la spectrométrie d'absorption dans l'ultraviolet et le visible repose sur l'absorption du rayonnement par les molécules dans le domaine allant de 190 à 800 nm, ce qui correspond à l'ultraviolet (190-400 nm) et au visible (400-800 nm) (35).

En analyse spectrophotométrique, on utilise une lumière sensiblement monochromatique. Ces méthodes d'analyse sont intéressantes car elles permettent de travailler sur de faibles quantités de substances et sont non destructrices vis-à-vis de l'échantillon. Elles s'appliquent à un très grand nombre de dosages (37).

La colorimétrie est un cas particulier de la spectrophotométrie dans le domaine du visible. On utilise une source de lumière blanche et les déterminations sont faites à l'aide d'un instrument simple appelé colorimètre. Une cellule photoélectrique permet d'apprécier l'intensité de la coloration. On utilise une lumière dont les longueurs d'ondes se situent dans un domaine spectral relativement étroit grâce à des filtres qui ne transmettent que des longueurs d'ondes d'une petite région du spectre (37).

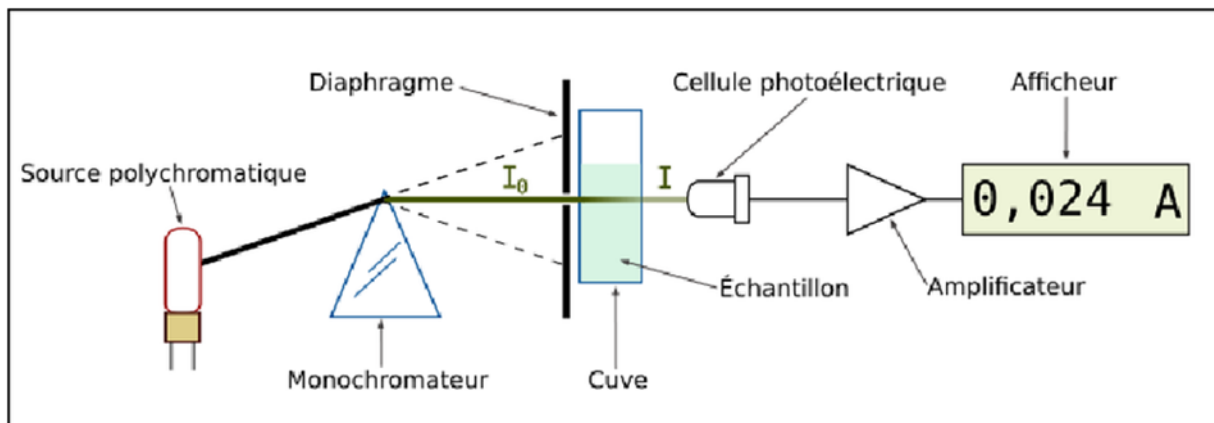


Figure 14 : schéma de spectrophotomètre d'absorption UV_ visible (36).



Figure 15 : photo de spectrophotomètre d'absorption UV_ visible (38).

7.3.2. LA SPECTROPHOTOMÉTRIE DÉRIVÉE :

La spectrophotométrie dans l'ultraviolet et le visible est souvent utilisée pour doser les principes actifs médicamenteux, grâce à la grande sensibilité des mesures. Malheureusement, son emploi pour la caractérisation des substances médicamenteuses est beaucoup plus réduit (39).

La spectrophotométrie dérivée peut pourtant être très intéressante pour résoudre le problème d'identification ou permet de savoir si un produit est pur ou en mélange. C'est une technique analytique utilisée pour améliorer la résolution de bandes d'absorption très voisines ou se recouvrant dans un spectre d'ordre zéro (39).

7.3.3. La spectroscopie infrarouge :

Le principe de la spectroscopie infrarouge (IR) repose sur l'absorption (sous la forme de nombres d'onde, typiquement de 4000 à 600 cm^{-1}) de la lumière par la plupart des molécules dans la région de l'infrarouge du spectre électromagnétique et en convertissant cette absorption en vibration moléculaire. Cette absorption correspond spécifiquement aux liaisons présentes dans la molécule (40).



Figure 16 : photo de IR (20).

7.3.4. La spectroscopie fluorescence :

Ou encore fluorométrie ou spectrofluorométrie, est un type de spectroscopie électromagnétique qui analyse la fluorescence d'un échantillon. Elle implique l'utilisation d'un rayon de lumière (habituellement dans l'ultraviolet) qui va exciter les électrons des molécules (20).

Contrairement à la spectroscopie UV/visible, des « standard », spectres indépendants du matériel utilisé, ne sont pas facilement obtenus. De nombreux facteurs influencent et distordent les spectres ou encore nécessitent d'être pris en compte et corrigés afin d'obtenir de « vrais » spectres (20).

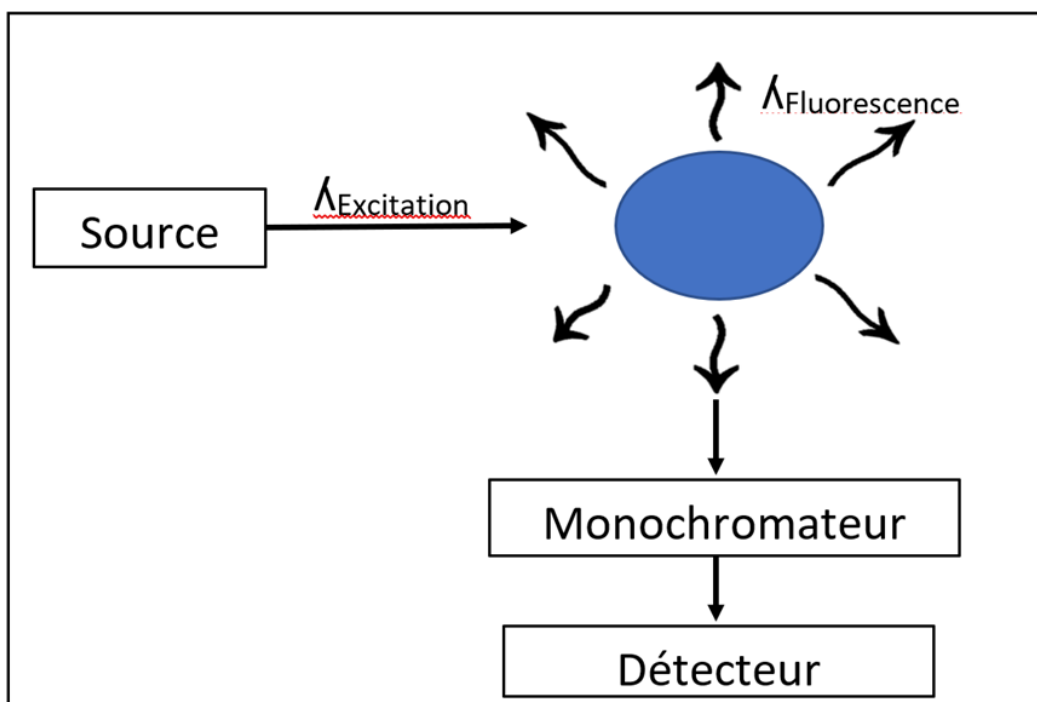


Figure 17 : schéma de spectroscopie fluorescence (26).

*Chapitre II : Validation d'une méthode analytique***1. Généralité sur la validation :**

1.1. Définition de la validation :

Norme	Définition de la validation	Approche statistique
USP	"La validation est l'évaluation documentée qui atteste qu'une méthode, un procédé, un système, un équipement, ou une personne, fonctionne de manière cohérente et fournit des résultats précis, fiables et reproductibles conformément aux spécifications prédéfinies"	L'approche statistique de validation selon l'USP inclut l'utilisation de concepts tels que la justesse, la fidélité, la linéarité, la limite de détection et la limite de quantification, ainsi que des tests statistiques tels que l'analyse de la variance (ANOVA) et les tests de normalité.
ICH	"La validation est l'ensemble des études entreprises pour démontrer qu'une méthode analytique est apte à son usage prévu"	L'approche statistique de validation selon l'ICH met l'accent sur l'évaluation des caractéristiques d'étalonnage, des limites de détection et de quantification, de la fidélité, de la justesse, de la spécificité et de la robustesse. Des tests statistiques tels que l'ANOVA, les tests de répétabilité et de reproductibilité sont également utilisés.
SFSTP	"La validation est la confirmation documentée que les exigences spécifiques pour une application donnée ou une utilisation spécifiée sont satisfaites"	L'approche statistique de validation selon la SFSTP met l'accent sur l'évaluation de la justesse, de la fidélité, de la répétabilité, de la reproductibilité, de la spécificité et de la limite de quantification. Des tests statistiques tels que l'ANOVA, les tests de normalité et les tests de tendance linéaire peuvent être utilisés.

Tableau 04 : tableau comparatif des normes (USP, ICH et SFSTP) et leurs approches.

La validation est le processus par lequel il est démontré de manière objective que la méthode analytique proposée est apte à fournir des résultats précis, fiables et reproductibles conformément à l'utilisation prévue. En d'autres termes, la validation est la confirmation que la méthode analytique est capable de mesurer avec précision la substance

ou le composé d'intérêt dans un échantillon donné, en suivant des critères spécifiques et en respectant les normes et les réglementations en vigueur (17).

La validation implique l'évaluation de différents paramètres de performance de la méthode analytique, tels que la linéarité, la précision, l'exactitude, la spécificité, la limite de détection, la limite de quantification et la robustesse, entre autres. La validation doit être effectuée avant l'utilisation de la méthode analytique dans des études de recherche, des analyses réglementaires ou cliniques, ou toute autre application où des résultats précis et fiables sont nécessaires (41).

1.2. Les bases réglementaires et normatives :

Les bases réglementaires et normatives sont des exigences légales et des recommandations qui doivent être suivies pour garantir la qualité et la fiabilité des données produites par la méthode analytique. Les principales références réglementaires et normatives comprennent :

1.2.1. Les Bonnes Pratiques de Laboratoire (BPL) :

Les BPL sont des normes internationales de qualité qui doivent être respectées pour les études de sécurité et d'efficacité des médicaments. Les BPL définissent les exigences de qualité pour la conduite, l'enregistrement et la communication des résultats d'essais non cliniques, y compris la validation des méthodes analytiques (25).

1.2.2. Les Bonnes Pratiques de Fabrication (BPF) :

Les BPF sont des normes internationales de qualité qui doivent être respectées pour la fabrication des médicaments. Les BPF incluent des exigences relatives à la validation des méthodes analytiques pour garantir la qualité et la fiabilité des médicaments.

a. Les Bonnes Pratiques de Fabrication (BPF) Algérienne :

En Algérie, les BPF sont régies par le Ministère de la Santé, de la Population et de la Réforme hospitalière. La réglementation algérienne en matière de BPF est basée sur les directives de l'Organisation mondiale de la santé (OMS) et de l'Union africaine (UA) en matière de bonnes pratiques de fabrication (42).

b. Les Bonnes Pratiques de Fabrication (BPF) Européenne :

Les BPF en Algérie et en Europe couvrent un large éventail de domaines, y compris la validation des méthodes analytiques, la gestion de la qualité, la documentation, la formation du personnel, la gestion des risques, l'hygiène, la sécurité et l'environnement, et plus encore (43).

Les normes de BPF algériennes et européennes peuvent être consultées sur les sites Web du Ministère de la Santé, de la Population et de la Réforme hospitalière en Algérie et de l'Agence européenne des médicaments pour l'UE.

1.2.3. Conseil international d'harmonisation (ICH) :

Les guides ICH (International Council for Harmonisation of Technical Requirements for Pharmaceuticals for Human Use) sont des directives internationales pour la recherche pharmaceutique qui ont été élaborées par des experts de l'industrie, des organismes de réglementation et des associations professionnelles.

Les guides ICH fournissent des recommandations pour la validation des méthodes analytiques dans le cadre de la recherche pharmaceutique, y compris les lignes directrices pour les méthodes analytiques pour les études de stabilité, les essais de dissolution, les essais de toxicité et les essais de bioéquivalence (17).

1.2.4. Food and Drug administration (FDA):

Aux États-Unis, la FDA exige que les méthodes analytiques utilisées pour évaluer les médicaments soient validées conformément aux principes des bonnes pratiques de laboratoire (BPL) et des bonnes pratiques de fabrication (BPF). La validation doit être conforme aux principes de l'ICH Q2(R1), qui fournit des orientations détaillées pour la validation des méthodes analytiques. La FDA peut également fournir des directives supplémentaires pour la validation des méthodes, en fonction du type de médicament en question (44).

1.2.5. Agence européenne des médicaments (EMA) :

En Europe, l'EMA publie des directives spécifiques pour la validation des méthodes analytiques. Les lignes directrices de l'EMA pour la validation des méthodes analytiques sont généralement basées sur les principes de l'ICH Q2(R1), mais peuvent également inclure des exigences supplémentaires spécifiques à l'Union européenne (UE). Les méthodes analytiques doivent également être conformes aux principes des BPF énoncés dans le règlement de l'UE n° 536/2014 (45).

Il est important de noter que les exigences de la FDA et de l'EMA pour la validation des méthodes analytiques peuvent différer légèrement. Par conséquent, les fabricants de médicaments doivent s'assurer de comprendre les exigences spécifiques de chaque agence avant de soumettre leurs données d'essais.

Les agences de réglementation veillent à ce que les méthodes analytiques soient validées conformément à leurs directives respectives pour garantir que les résultats des essais sont fiables, précis et reproductibles.

1.2.6. L'Organisation internationale de normalisation (ISO) :

ISO 17025 : L'ISO 17025 est une norme qui décrit les exigences générales de compétence des laboratoires d'essais et d'étalonnage. Elle fournit des orientations sur la validation des méthodes analytiques et exige des laboratoires qu'ils démontrent leur compétence dans la réalisation d'essais analytiques (46).

1.2.7. Pharmacopée:

Les pharmacopées sont des recueils de normes et de procédures officielles pour la fabrication, le contrôle et la qualité des médicaments. Les pharmacopées incluent des normes pour la validation des méthodes analytiques, y compris les méthodes d'analyse pour les matières premières, les produits finis et les produits intermédiaires (47).

En résumé, les bases réglementaires et normatives pour la validation des méthodes analytiques en pharmacologie sont des exigences légales et des recommandations qui doivent être suivies pour garantir la qualité, la fiabilité et la conformité réglementaire des données produites par la méthode analytique.

La conformité à ces réglementations et directives est nécessaire pour garantir que la méthode analytique est validée et produit des résultats fiables. Il est important de noter que ces exigences peuvent varier en fonction du type de médicament en développement et de l'agence de réglementation chargée de son approbation.

1.3.La relation entre la qualité et la validation :

La relation entre la qualité et la validation est étroite dans le contexte de la pharmacologie et de l'industrie pharmaceutique en général. La validation des méthodes analytiques est une étape clé pour garantir la qualité des produits pharmaceutiques. En effet, une méthode analytique validée avec succès peut fournir des résultats précis, fiables et reproductibles, ce qui est essentiel pour garantir la qualité des produits pharmaceutiques. En revanche, une méthode analytique qui n'est pas validée correctement peut entraîner des résultats imprécis, biaisés ou incohérents, ce qui peut compromettre la qualité et la sécurité des produits pharmaceutiques.

La validation des méthodes analytiques permet également de s'assurer que les résultats obtenus sont conformes aux réglementations en vigueur. Les réglementations imposent des exigences strictes en matière de qualité et de fiabilité des résultats analytiques, et la validation des méthodes analytiques est un moyen de répondre à ces exigences.

En somme, la qualité des produits pharmaceutiques dépend en grande partie de la validation des méthodes analytiques utilisées pour les analyser. La validation des méthodes analytiques permet de garantir la qualité et la fiabilité des résultats, de garantir la conformité aux réglementations, et de réduire les risques pour la santé publique.

1.4.Objectif de la validation :

L'objectif principal de la validation des méthodes analytiques en pharmacologie est de garantir que les résultats produits par la méthode sont précis, reproductibles, fiables et répondent aux spécifications requises pour leur utilisation prévue (48).

La validation permet également d'évaluer les performances de la méthode, d'identifier les sources d'erreur potentielles et de déterminer les limites de quantification et de détection. En outre, la validation des méthodes analytiques est essentielle pour s'assurer que les données générées sont acceptables pour les réglementations et les normes de l'industrie, notamment dans le cadre des demandes d'autorisation de mise sur le marché des médicaments (49).

La validation est donc une étape critique et nécessaire pour garantir la qualité et l'intégrité des données générées par la méthode analytique utilisée dans la recherche pharmaceutique et le développement de médicaments.

1.5.Concept de « FITNESS-FOR-PURPOSE »:

Le but d'une validation de méthode analytique est de démontrer que la méthode est adaptée à son usage se traduit par le concept de « fitness-for-purpose », dont l'IUPAC donne la définition suivante : « degré auquel les données produites par un processus de mesure permettent à l'utilisateur de prendre des décisions techniques et administratives correctes dans un but spécifié » (50).

On peut donc traduire cette notion par l'aptitude d'une méthode à l'usage auquel elle est destinée (51).

Une méthode analytique s'intégrera dans ce concept si les résultats qu'elle fournit correspondent aux exigences requises de son application (51).

Ceci suppose que ces exigences aient été établies au préalable. Il peut s'agir d'exigences réglementaires, avec par exemple des limites d'acceptabilité appliquées aux résultats, ou bien de performances déterminées par l'analyste au cours du développement de la méthode, comme par exemple le choix de la fonction de réponse la mieux adaptée pour la courbe d'étalonnage (51).

. Le guide de validation analytique publié en 1992 par une commission SFSTP a un objet d'aider les industriels pharmaceutiques pour valider leurs procédures analytiques selon les critères de la note explicative CEE III/844/87. Le but poursuivi est double :

- Proposer un traitement statistique suffisamment ouvert pour couvrir la plupart des cas auxquels l'analyste pourra être confronté, tout en ayant éliminé des tests mal adoptés au champ d'application de la note explicative CEE.

- Optimiser les essais analytiques à réaliser, c'est-à-dire éviter de multiplier les prises d'essais conduisant à un trop grand nombre d'analyses, tout en générant suffisamment de résultats pour satisfaire à l'étude des critères de validation ; c'est ainsi que l'on fournira un protocole opératoire commun pour l'étude de la fidélité, de la linéarité et de l'exactitude.

2. Cycle de vie d'une méthode analytique :

Une méthode analytique définie par l'ensemble des techniques utilisées pour la détection, l'identification, la caractérisation et la quantification des composés chimiques (12).

La méthode d'analyse est la manière dont une analyse est réalisée. Chaque étape doit être décrite en détail. La vie d'une méthode analytique est un processus complexe évolutif constitué de plusieurs étapes successives (13) :

1. Sélection de méthode
2. Développement de méthode
3. Optimisation et gestion des modifications
4. Validation
5. Transfert
6. Utilisation en routine
7. Revalidation

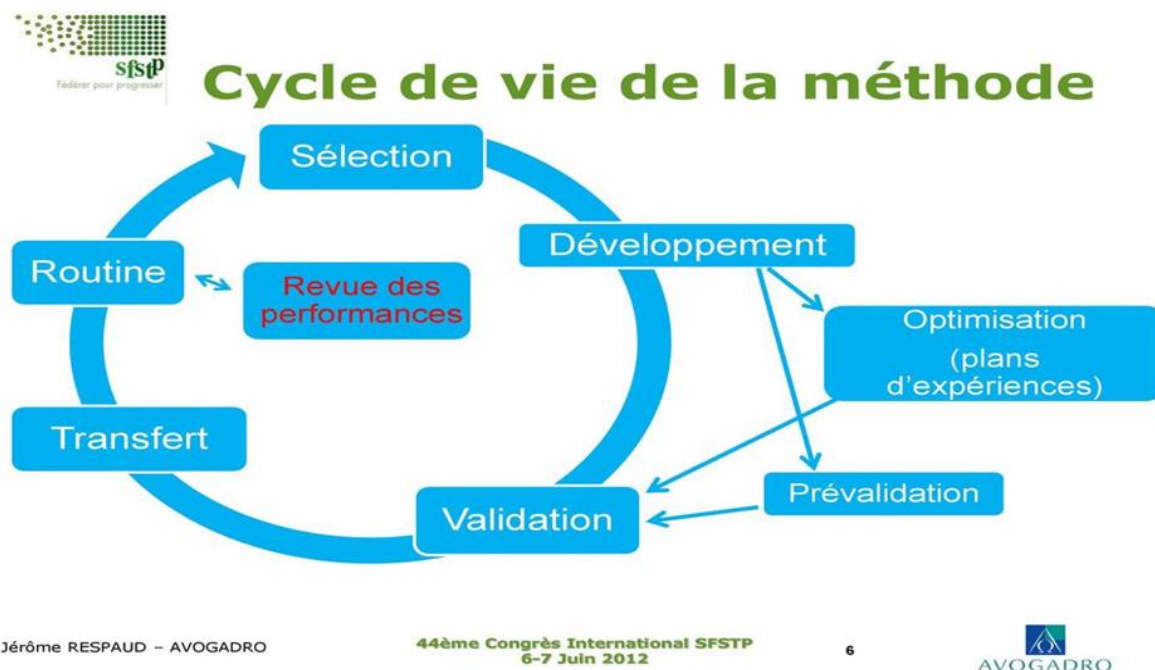


Figure 18 : cycle de vie de la méthode analytique SFSTP 6_7 juin 2012.

2.1.Sélection de la méthode :

D'abord on va sélectionner la méthode, c'est-à-dire de choisir parmi toutes les méthodes physico-chimiques connues ou maîtrisées par le laboratoire celle qui doit permettre de déterminer plusieurs analytes représentatifs du problème analytique à traiter (53).

Le choix de la méthode d'analyse est considéré comme la première phase du cycle de vie, également appelée phase préliminaire ou étape (zéro) (52), Il s'agit d'une étape importante qui nécessite de répondre aux besoins du client lorsque le client ne précise pas la méthode que le laboratoire doit utiliser, il doit choisir la méthode la plus appropriée et la communiquer au client. Des méthodes déjà développées en laboratoire ou des méthodes publiées dans des normes internationales régionales ou nationales peuvent être utilisées. Il existe plusieurs sources possibles des méthodes validées (54).

Cette étape est nécessaire pour s'assurer que les données obtenues sont précises et fiables. Différentes méthodes et techniques sont employées pour sélectionner une méthode analytique, y compris l'analyse statistique, l'analyse informatique et l'analyse expérimentale. Chacune de ces méthodes peut être utilisée pour déterminer la précision des résultats obtenus (55).

2.2.Développement de la méthode :

La prochaine étape consiste à développer le processus. Cela implique de développer des méthodes de travail et d'adapter les processus aux conditions réelles d'utilisation. La méthode de développement est un processus complexe qui nécessite une planification et une coordination. Les développeurs doivent tenir compte des besoins et des attentes des utilisateurs, des limitations techniques et des contraintes de temps et de budget (3). Dans le cadre du développement d'une méthode.

Spécificité, la reproductibilité, la reproductibilité, la linéarité ou la détectabilité (LoD et LoQ) doivent être considérés. Le développement de nouvelles méthodes d'analyse devrait se faire en plusieurs étapes (56) :

- Analyse des besoins du client
- Rédaction du protocole d'étude mentionnant le choix des paramètres analytiques.
- Essai de faisabilité afin de vérifier que la méthode est stable et reproductible sur plusieurs lots.
- Rédaction du protocole analytique pouvant être suivi d'une validation de méthode.

Lorsque la mise au point est terminée, on dispose de ce que l'on appelle dans le cadre BPL un mode opératoire normalisé ou Standard Operating Procédure (SOP). En particulier, il faut préciser le domaine d'application de la méthode, c'est-à-dire l'ensemble des matrices auxquelles elle s'applique ainsi que la gamme de concentrations utilisables (53).

2.3.Optimisation et gestion des modifications :

Optimisation considérée comme synonyme de développement

L'optimisation de méthode analytique peut offrir de nombreux avantages, notamment une meilleure efficacité et une plus grande précision des résultats. Elle peut également être utilisée pour trouver des solutions optimales aux problèmes complexes et pour déterminer les meilleures stratégies à adopter pour atteindre les objectifs. Elle est également un outil précieux pour réduire les coûts.

2.4.Validation de la méthode :

C'est à ce moment, et seulement à ce moment, que doit intervenir la validation. La validation des méthodes analytiques est un processus systématique visant à garantir que les résultats obtenus sont précis, reproductibles et fiables. C'est un élément essentiel pour assurer la qualité des données et des résultats obtenus. La vérification peut être effectuée par des tests et un contrôle de qualité appropriés (53).

La validation analytique consiste à garantir les performances d'une méthode d'analyse par examen et apport de preuves objectives, au regard de l'usage attendu du produit. Elle permet également d'en estimer ses incertitudes de mesure (56).

L'objectif de la validation des méthodes d'analyse est de démontrer qu'elles conviennent aux usages auxquels on les destine. Les caractéristiques que doivent présenter les méthodes d'identification, de contrôle des impuretés et de mesure de la teneur sont énumérées dans un tableau présenté plus loin. D'autres méthodes d'analyse pourraient faire l'objet d'ajouts futurs au présent document (57).

Il sera question ici des quatre types de méthodes d'analyse les plus couramment utilisés (18) :

- Épreuves d'identification.
- Dosage quantitatif des impuretés.
- Vérification des teneurs limites des impuretés.
- Dosage de la partie active ou d'une ou de plusieurs autres composantes de la substance médicamenteuse ou du produit fini.

On a aujourd'hui pris l'habitude de distinguer la validation intra laboratoire de la validation inter laboratoires. La première est universelle et obligatoire pour toutes les méthodes. La seconde souvent plus lourde n'intéresse en principe que les méthodes qui seront utilisées par plusieurs laboratoires ou dont les résultats peuvent servir à des décisions économiques (53).

Dans validation intra laboratoire on trouve (53).

- Linéarité.
- Justesse.
- Fidélité.
- Spécificité.
- Limite.
- Domaine utilisation.
- Robustesse.

Dans la validation inter laboratoire on trouve :

- Répétabilité.
- Reproductibilité.

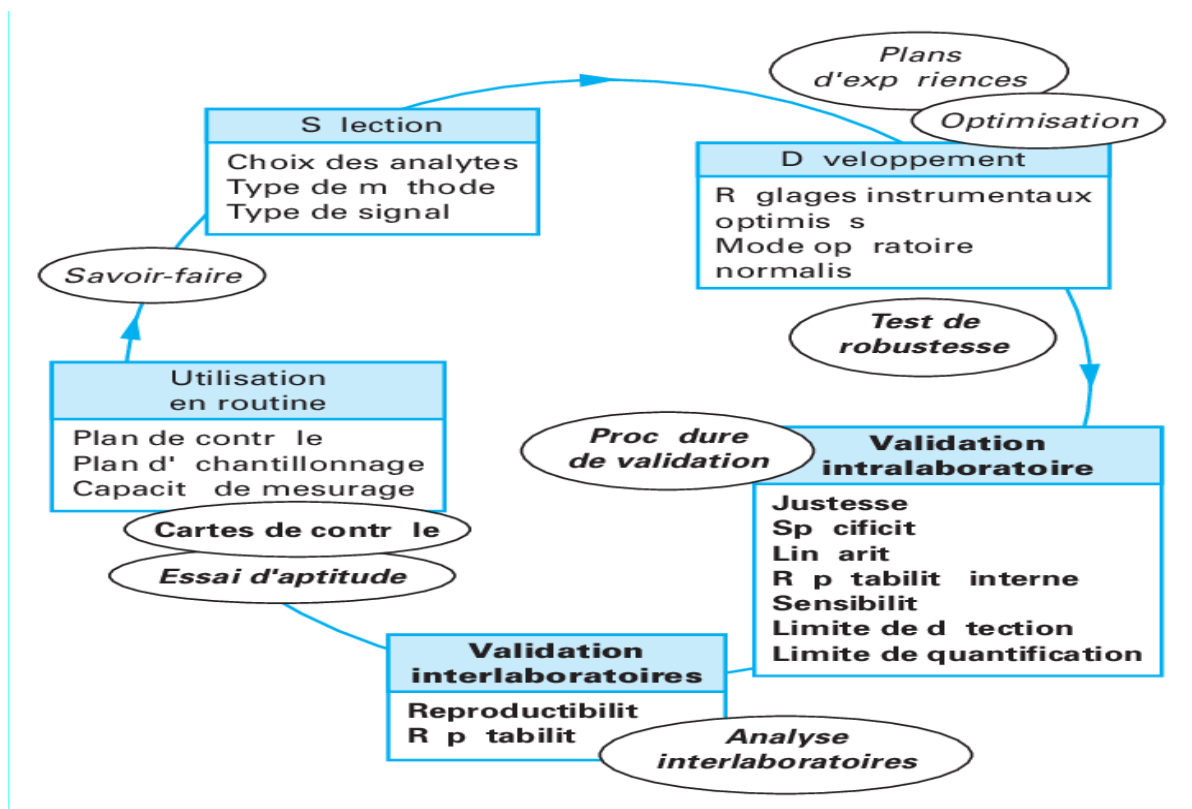


Figure 19 : Critères et procédures de validation liés au cycle de vie d'une méthode d'analyse (Validation interne des méthodes d'analyse par max FEINBERG.).

2.5. Transfert analytique :

Un transfert analytique est un processus complet qui consiste à transférer physiquement une méthode analytique préalablement validée.

Les autorités réglementaires demandent, de plus en plus, la formalisation des transferts de méthode, processus devenu notamment obligatoire pour la Food and Drug Administration (FDA) (58).

Pour le moment, aucun document officiel ne présente une stratégie expérimentale pour conduire un transfert. Cette absence de document de référence entraîne différents types d'interprétations (autorités, Industries Pharmaceutiques...). Toutes les approches sont acceptées, et acceptables, du moment qu'elles sont basées sur un raisonnement et sur les résultats de validation. Cependant, afin de répondre à la demande croissante de l'industrie pour un protocole de transfert généralisé, différents groupes de travail ont été mis sur pied, notamment sous l'égide de l'International Society for Pharmaceutical Engineering (ISPE)(59).

2.6. Utilisation en routine :

Si la validation se révèle conforme, le cycle de vie va se poursuivre par une utilisation de la méthode en routine. Au bout d'un certain temps, on peut être amené à abandonner la méthode et à entamer un autre cycle car elle est devenue obsolète (14).

L'utilisation en routine offre de nombreux avantages. Elle permet de réduire les erreurs et les retards, de gagner du temps et de l'argent et de s'assurer que les processus sont suivis avec précision.

2.7. Revalidation :

Dans certains cas, on peut simplement faire des modifications et, selon leur importance, appliquer une procédure plus ou moins complète de revalidation de la méthode. En effet, on doit effectuer une revalidation toutes les fois où l'on introduit une modification « mineure » de la méthode.

Par contre, si l'on fait une modification « majeure », il faut appliquer à nouveau la procédure complète de validation. Il est délicat de définir une échelle exacte d'importance des modifications : cette appréciation peut être laissée au savoir-faire de l'analyste (53).

3. Type de validation :

Il y a trois types de validation couramment utilisés dans le domaine pharmaceutique pour les méthodes analytiques (44), (60), (61).

- a. La validation de la méthode de développement : Cela implique la détermination des caractéristiques de performance de la méthode et l'optimisation de ses paramètres critiques. C'est la première étape dans la validation d'une méthode analytique.
- b. La validation de la méthode de qualification : Cette étape évalue la capacité de la méthode à fournir des résultats précis et fiables pour les essais de routine. Elle comprend la détermination de la spécificité, de la linéarité, de la plage de mesure, de la précision, de l'exactitude et de la limite de quantification.
- c. La validation de la méthode de transfert : Cette étape est nécessaire lorsque la méthode est transférée d'un laboratoire à un autre ou d'un instrument à un autre. Elle vise à démontrer que la méthode fonctionne de manière fiable et précise dans le nouveau contexte. Elle implique généralement la comparaison des résultats obtenus à partir de l'instrument d'origine et de l'instrument de réception pour s'assurer que la méthode fournit des résultats cohérents et reproductibles.

4. Critères de validation :

Les principaux critères de validation sont ceux couramment utilisés dans les laboratoires d'analyses dont la nécessité de l'étude a fait l'objet d'un large consensus. Ces critères sont les suivants (62) :

- 1- Spécificité-Sélectivité.
- 2- Fonction de réponse (courbe d'étalonnage).
- 3- Linéarité.
- 4- Fidélité (répétabilité et fidélité intermédiaire).
- 5- Justesse.
- 6-Exactitude.
- 7- Limite de détection (LD).
- 8- Limite de quantification (LQ).
- 9- Intervalle de dosage.
- 10- Sensibilité.

4.1.Spécificité-Sélectivité :

La sélectivité ou spécificité d'une méthode est son aptitude à mesurer la concentration de l'analyte sans interférence de la part des autres constituants de l'échantillon (63).

Une procédure d'analyse est dite « spécifique » lorsqu'elle permet de garantir que le signal mesuré provient seulement de la substance à analyser ou qu'elle permet de mesurer quantitativement un paramètre physico-chimique ou un groupement fonctionnel d'une ou de plusieurs substance(s) dans l'échantillon (64).

Dans le cas des méthodes séparatives, on parle plutôt de sélectivité : capacité à différencier et quantifier l'analyte cible en présence d'interférents dans l'échantillon.

4.2.Fonction de réponse (courbe d'étalonnage) :

La fonction de réponse d'une procédure d'analyse traduit, à l'intérieur de l'intervalle de dosage, la relation existante entre la réponse (signal) et la concentration (quantité) en substance à examiner dans l'échantillon. La fonction de réponse monotone la plus simple qui exprime cette relation est appelée « courbe d'étalonnage »(62).

4.3.Linéarité :

La linéarité d'une méthode analytique est sa capacité à l'intérieur d'un certain intervalle de dosage d'obtenir des résultats directement proportionnels à la concentration en analyte dans l'échantillon(63) (64).

4.4.Fidélité (précision) :

La fidélité de la procédure d'analyse exprime l'étroitesse de l'accord (degré de dispersion, coefficient de variation) entre une série de mesures provenant de multiples prises d'un même échantillon homogène (résultats d'essais indépendants) dans des conditions prescrites.

La fidélité fournit une indication sur les erreurs liées au hasard. La fidélité peut être évaluée à trois niveaux : la répétabilité, la fidélité intermédiaire (intra laboratoire) et la reproductibilité (inter laboratoire) (62).

- Répétabilité : conditions où les résultats d'essai indépendants sont obtenus par la même méthode sur des échantillons d'essai identiques dans le même laboratoire, par le même opérateur, utilisant le même équipement et pendant un court intervalle de temps.
- Fidélité intermédiaire : conditions où les résultats d'essai indépendants sont obtenus par la même méthode sur des échantillons d'essai identiques dans le même laboratoire, avec différents opérateurs et utilisant des équipements différents et pendant un intervalle de temps donné.
- Reproductibilité : conditions où les résultats d'essai sont obtenus par la même méthode sur des échantillons d'essais identiques dans différents laboratoires, avec différents opérateurs et utilisant des équipements différents(62).

4.5. Justesse :

Exprime l'étroitesse de l'accord entre la valeur moyenne obtenue à partir d'une série de résultats d'essais et une valeur qui est acceptée soit comme une valeur conventionnellement vraie, soit comme une valeur de référence acceptée (exemple : standard international, standard d'une pharmacopée).

La mesure de la justesse est généralement exprimée en termes de recouvrement et de biais absolu ou relatif (erreur systématique)(62).

4.6. Exactitude :

Exprime l'étroitesse de l'accord entre la valeur qui est acceptée soit comme une valeur conventionnellement vraie (standard interne de la firme), soit comme une valeur de référence acceptée (standard international, par exemple standard d'une pharmacopée) et la valeur trouvée (valeur moyenne) obtenue en appliquant la procédure d'analyse un certain nombre de fois(65).

4.7. Limite de détection et de quantification :

4.7.1. Limite de détection (LD) :

La limite de détection d'une procédure d'analyse est la plus petite quantité de l'analyte dans un échantillon pouvant être détectée, mais non quantifiée comme une valeur exacte dans les conditions expérimentales décrites de la procédure (62).

4.7.2. Limite de quantification (LQ) :

La plus petite quantité de l'analyte dans un échantillon pouvant être dosée dans les conditions expérimentales décrites avec une exactitude définie et une précision acceptable lorsqu'on applique la méthode indiquée (62).

4.8. Intervalle de dosage :

L'intervalle de dosage d'une procédure d'analyse est la région entre les niveaux supérieur et inférieur (ces valeurs incluses) pour laquelle il a été démontré que la procédure est appropriée quant à son exactitude (justesse + fidélité) et sa linéarité, en utilisant la méthode décrite (62).

4.9. Sensibilité :

C'est la capacité de la méthode d'analyse d'enregistrer de faible concentration. Variation minimale qu'il faut imposer à la grandeur X à déterminer (par exemple une concentration) pour obtenir une variation significative du signal mesuré y(62).

Critère	Type d'analyse			
	Impureté		Dosage	Quantification bio analyse
	Identification	Essai limite		
Spécificité/ sélectivité	+	+	+	+
Linéarité	-	-	+	+
Fidélité	-	-	+	+
LLOQ	-	+	-	+
Exactitude	-	+	+	+
Robustesse	-	-	-	+

Tableau 05 : Tableau récapitulatif des critères de validation.

5. Les étapes pour valider une méthode avec le profil d'exactitude :

- Disposer du mode opératoire et définir le mesurande.
- Définir le domaine de validation (gamme de concentrations) et l'objectif attendu de la méthode sous la forme d'un intervalle d'acceptabilité.
- Sélectionner des échantillons de validation dont les valeurs de référence sont connues
- Choisir un plan d'expérience de validation.
- Pour les méthodes indirectes, choisir du plan d'expérience d'étalonnage.
- Collecter les données.

- Pour les méthodes indirectes, calculer les concentrations retrouvées par étalonnage inverse.
- Calculer les critères de validation à partir des concentrations retrouvées principalement les écarts-types de fidélité de fidélité intermédiaire et des biais de justesse.
- Calculer les intervalles de tolérance et construire le profil d'exactitude.
- Interpréter les résultats et décider si la méthode est valide ou non(66).

6. Les différentes approches de la validation analytique :

6.1.Approche descriptive :

L'approche descriptive consiste à définir les critères qui servent à valider le dosage, estimer ces critères et comparer ces estimations aux limites fixées. C'est le type le plus communément utilisé. Il existe différentes façons de valider une méthode analytique par ses critères de performance.

Deux critères reviennent automatiquement, ce sont la fidélité et la justesse. La fidélité se mesure soit par un écart type, soit par un coefficient de variation. Plus l'écart type ou plus le coefficient de variation est élevé et moins la méthode de dosage est fidèle. La justesse se mesure par le biais. Plus le biais est élevé et moins la méthode de dosage est juste(67).

L'approche descriptive a pour avantage principal d'être facile à procéder. En contrepartie, elle ne permet aucune gestion du risque si elle est utilisée seule. Des méthodes peu performantes peuvent en effet passer les critères d'acceptation sans assurer une réelle validité de la méthode (68).

6.2.Approche globale :

L'approche globale se base sur des critères décisionnels objectifs, comme par exemple, l'estimation des limites dans lesquelles se trouve le résultat par rapport à la vraie valeur, ou bien, les limites dans lesquelles se trouve la vraie valeur par rapport au résultat. La confrontation de ces limites aux limites imposées en routine, permet de valider ou de rejeter la méthode de dosage. A partir de 2003, La SFSTP propose une alternative à la méthode descriptive de validation de méthodes de dosage(69).

De nouvelles approches doivent être recherchées, comme par exemple, la validation de la méthode de dosage en utilisant le profil d'exactitude comme outil de décision (70). Une bonne méthode de dosage doit pouvoir quantifier, les quantités inconnues de la substance que le laboratoire aura à déterminer, le plus exactement possible. D'une autre façon, que la différence entre le résultat rendu et la vraie valeur non connue de l'échantillon soit le plus petit possible, et au moins inférieur à une limite d'acceptation fixée par l'analyste en fonction de la finalité de la méthode telle qu'elle sera utilisée en routine(66).

6.3. Approche capabilité :

La capabilité est un indicateur qualité largement utilisé dans l'industrie pour analyser la performance d'une méthode analytique en routine. Les indices de capabilité sont calculés afin d'évaluer si le procédé à l'étude est capable de fournir des unités conformes suffisantes. Par analogie, les indices de capabilité pourraient donc être utilisés pour évaluer si la méthode analytique seule est en mesure de fournir suffisamment de résultats conformes et vérifier si une méthode est adaptée à l'usage auquel elle est destinée.

En outre, la capabilité des méthodes analytiques peut également être utilisée pour évaluer les risques inhérents aux transferts de méthodes analytiques afin d'augmenter ou de diminuer la charge de travail de transfert de méthodes (71).

7. Protocoles en phase de validation :

Le profil d'exactitude ne s'applique qu'aux méthodes complètement développées et mises au point. En particulier, la sélectivité / spécificité doit avoir été étudiée ainsi que le domaine d'application de la méthode à valider, en termes de types de matrice et de niveaux de concentrations. L'ensemble des données de la phase de validation doit faire l'objet d'un rapport détaillé dans lequel tous les résultats obtenus doivent être documentés. Au terme de la phase de validation et avant son exploitation en routine, la procédure d'analyse doit être complètement décrite sous forme d'un mode opératoire standardisé.

Après avoir vérifié la spécificité de la méthode d'analyse on opère sur deux ensembles d'échantillons :

- Standards d'étalonnage (SE) : peuvent être réalisés sans la matrice (si on a démontré l'absence d'effet matrice) ou avec la matrice, utilisé pour établir les différentes fonctions de réponse $y = f(x)$ afin d'effectuer les prédictions inverses.
- Standards de validation (SV) : doivent toujours être réalisés avec la matrice, utilisé dans le but de déterminer l'erreur totale à chaque niveau de concentration, calculer l'intervalle de tolérance et tracer le profil d'exactitude et déterminer les limites inférieures et supérieures de quantification (intervalle de dosage).

En ce qui concerne la préparation des SE et SV, celle-ci dépend du protocole de validation choisi. Le logigramme de la figure 4 suivante, présente la démarche proposée dans le guide SFSTP 2003 pour sélectionner un protocole expérimental de la validation en fonction des contraintes ou des spécificités liées à la procédure de dosage sous épreuve(72).

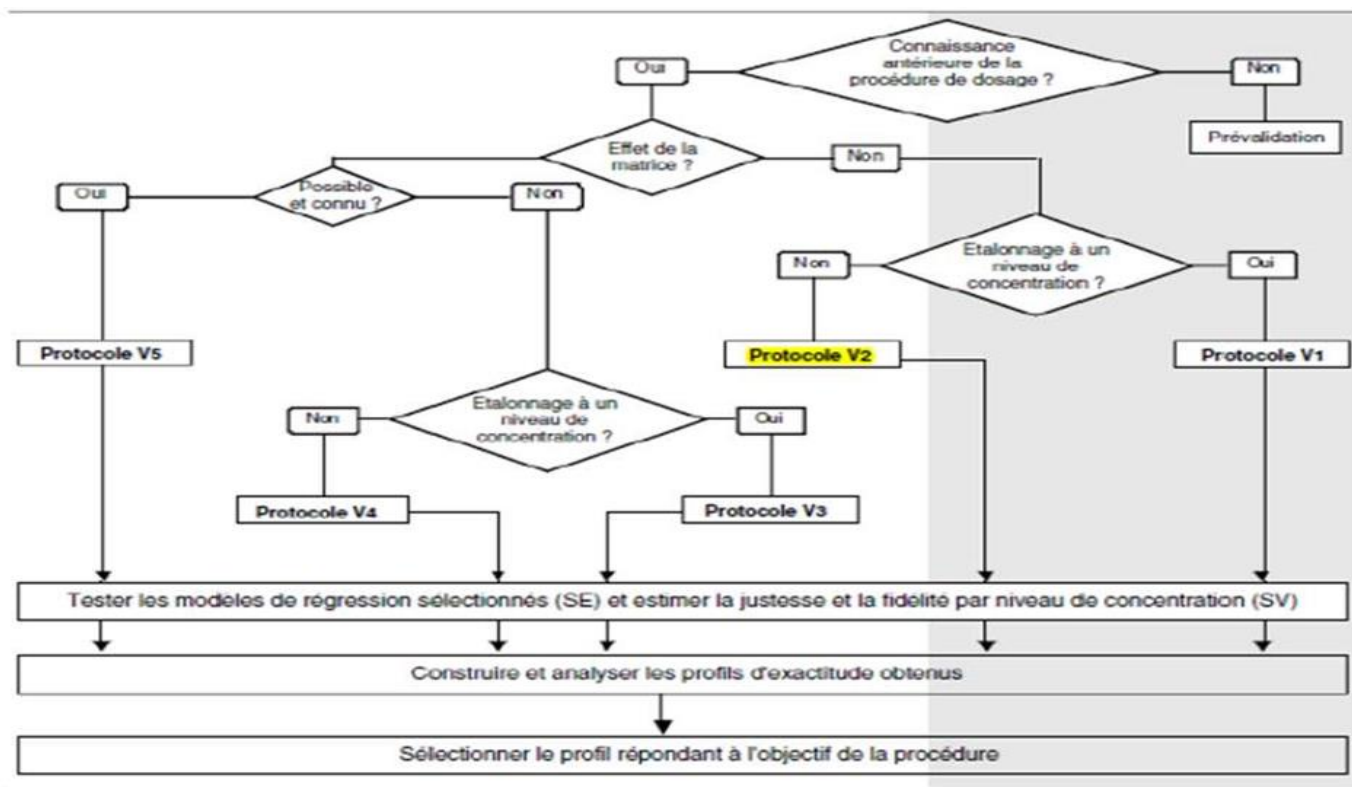


Figure 20 : Logigramme permettant de sélectionner un protocole de validation. SE : standard d'étalonnage. SV : standard de validation (72).

SE : standard d'étalonnage.

SV : standard de validation.

Standards	Niv. de conc.	Protocole				
		V ₁	V ₂	V ₃	V ₄	V ₅
SE. Etalonnage sans la matrice	Bas	2	2	2	2	2
	Médian	2	2 ⁽²⁾	2	2 ⁽²⁾	2
SE. Etalonnage avec la matrice	Haut	2 ⁽¹⁾	2	2 ⁽¹⁾	2	2
	Addit.			2	2 ⁽²⁾	2 ⁽²⁾
SV. Validation avec la matrice	Bas			2 ⁽¹⁾	2	2 ⁽³⁾
		Médian	3	3	3	3
		Haut	3	3	3	3
Nbre minimum séries		3	3	3	3	3
Nbre total essais (min.)		33	45	39	63	45

Tableau 06 : Choix du nombre de standards d'étalonnage et de validation en fonction du protocole choisi (72).

8. Démarches statistiques de la validation :

8.1. Spécificité :

La spécificité peut être démontrée de deux façons :

Soit en comparant les chromatogrammes obtenus à partir des trois solutions précédemment préparées : les chromatogrammes obtenus à partir du SV100% et SE 100% doivent renfermer des pics au même temps de rétention, avec des surfaces comparables. Le chromatogramme obtenu à partir de la solution placebo ne doit pas présenter un pic au même temps de rétention que l'analyte.

Soit par la comparaison de la droite obtenue des standards de validation (avec matrice) avec celle obtenue à partir des standards d'étalonnage. La comparaison des droites est basée sur le test t de Student selon une stratégie statistique qui permet la recherche d'effet matrice et/ou de l'erreur systématique en vérifiant la spécificité de la méthode pour le dosage du principe actif seul et aussi pour la forme reconstituée (73), (74).

8.2. Fonction de réponse :

Les mesures effectuées sur les SE permettent de déterminer la relation entre la réponse Y donnée par l'instrument et la concentration X des solutions. Cette relation est une fonction de type : $Y = (X) + \varepsilon$

Avec ε , l'erreur résiduelle associée à la fonction de réponse. Cette fonction n'est pas nécessairement linéaire mais elle doit être strictement monotone sur l'intervalle de dosage envisagé. La fonction de réponse doit être ajustée, c'est-à-dire que ses paramètres doivent être évalués de telle sorte que l'erreur résiduelle ε soit minimisée. Le Tableau 03 illustre quelques exemples des différentes fonctions de réponse pouvant être envisagées lors d'une validation des méthodes analytiques (74).

Type	équation	paramètres	linéaire
Droite passant par l'origine	$Y = \beta X$	β	Oui
Droite	$Y = \alpha + \beta X$	α, β	Oui
Fonction quadratique	$Y = \alpha + \beta X + \gamma X^2$	α, β, γ	Oui
Fonction logistique à 4 paramètres	$Y = \alpha + \frac{\delta - \alpha}{1 + \left(\frac{x}{\gamma}\right)^\beta}$	$\alpha, \beta, \gamma, \delta$	Non
Fonction logistique à 5 paramètres	$Y = \alpha + \frac{\delta - \alpha}{1 + \left(\frac{x}{\gamma}\right)^\Psi}$	$\alpha, \beta, \gamma, \delta, \Psi$	Non

Tableau 03 : Exemples de fonction de réponses (74).

8.3. Alignement des observations :

Si, pour un niveau de concentration, les quantités introduites ne sont pas identiques pour toutes les séries (souvent pour des raisons de pesées qui doivent être indépendantes), il est indispensable de procéder à un alignement sur la concentration moyenne. Cela consiste à transformer les réponses observées ($Y_{ijk} \rightarrow Y_{ijk,c}$) afin de les aligner sur cette concentration moyenne. Cet alignement s'effectue par interpolation en ajoutant à la réponse observée la différence entre la valeur de la fonction de réponse considérée à la concentration moyenne et la valeur de cette fonction à la concentration introduite. En validation, l'alignement s'applique aux réponses obtenues avec les échantillons de validation en utilisant les équations ou les fonctions de réponse obtenues avec les standards d'étalonnage. Ainsi l'alignement des répétitions du niveau de concentration j de la série i s'effectue (74), comme suit :

$$Y_{ijk,c} = Y_{ijk} + (\bar{x}_{ij}) - f(x_{ijk})$$

Fonction de réponse	Règle d'alignement
Droite passant par l'origine	$Y_{ijk,c} = y_{ijk} + \hat{\beta}_i [\bar{x}_{ij} - x_{ijk}]$
Droite	$Y_{ijk,c} = y_{ijk} + \hat{\beta}_i [\bar{x}_{ij} - x_{ijk}]$
Fonction quadratique	$Y_{ijk,c} = y_{ijk} + \hat{\beta}_i [\bar{x}_{ij} - x_{ijk}] + \hat{\gamma}_i [\bar{x}_{ij}^2 - x_{ijk}^2]$
Logistique à 4 paramètres	$Y_{ijk,c} = y_{ijk} + (\hat{\delta}_i - \hat{\alpha}_i) \left[\frac{1}{1 + \left(\frac{\hat{\gamma}_i}{\bar{x}_{ij}}\right)^{\hat{\beta}_i}} - \frac{1}{1 + \left(\frac{\hat{\gamma}_i}{x_{ijk}}\right)^{\hat{\beta}_i}} \right]$

Tableau 07 : Règles d'alignement pour différentes fonctions de réponses(74).

8.4. Prédiction inverses :

Pour les méthodes indirectes, les modèles d'étalonnage servent à déduire les concentrations calculées, à partir des données du plan de validation, en utilisant la fonction inverse du modèle d'étalonnage, selon le modèle mathématique suivant : $x_{calc} = f^{-1}(y)$

Si les observations ont été alignées, il faut remplacer les y par les y_{calc} (la valeur de y alignée sur la moyenne des x). La fonction inverse est appelée équation de prédiction inverse. Le tableau 05 fournit ces équations selon la fonction de réponse choisie (74).

Type	Equation
Fonction affine passant par l'origine	$x_{ijk,calc} = \frac{y_{ijk}}{\hat{\beta}_i}$
Fonction affine	$x_{ijk,calc} = \frac{y_{ijk} - \hat{\alpha}_i}{\hat{\beta}_i}$
Fonction quadratique	$x_{ijk,calc} = \frac{-\hat{\beta}_i + \sqrt{\hat{\beta}_i^2 - 4\hat{\gamma}_i(\hat{\alpha}_i - y_{ijk})}}{\hat{\beta}_i}$
Fonction logistique à 4 paramètres	$x_{ijk,calc} = \hat{\gamma}_i \left(\frac{\hat{\delta}_i - \hat{\alpha}_i}{y_{ijk} - \hat{\alpha}_i} - 1 \right)^{\frac{1}{\hat{\beta}_i}}$
Fonction logistique à 5 paramètres	$x_{ijk,calc} = \hat{\gamma}_i \left(\left(\frac{\hat{\delta}_i - \hat{\alpha}_i}{y_{ijk} - \hat{\alpha}_i} - 1 \right)^{\frac{1}{\hat{\beta}_i}} \right)^{\frac{1}{\hat{\beta}_i}}$

Tableau 08 : Calcul des prédictions inverses pour différentes fonctions de réponse (74).

8.5. Calcul de la justesse et de la fidélité :

8.5.1. Justesse :

La justesse (ou le biais) de la méthode au niveau de concentration est obtenue en calculant la différence entre la moyenne arithmétique des concentrations introduites et la moyenne des concentrations calculées. Le biais peut s'exprimer en termes absolu, relatif ou de recouvrement par rapport aux quantités introduites [11-12], comme suit :

$$\text{Biais}_j = \hat{\mu}_j - \bar{x}_j$$

$$\text{Biais}(\%)_j = \frac{\hat{\mu}_j - \bar{x}_j}{\bar{x}_j} \times 100$$

$$\text{Recouvrement}(\%)_j = \frac{\hat{\mu}_j}{\bar{x}_j} \times 100$$

\bar{x}_j : Moyenne des concentrations introduites.

$\mu^{\wedge}j$: Moyenne des concentrations prédites.

8.5.2. Fidélité :

L'estimation de la variance intra-série donne une estimation de la variance de répétabilité tandis que la somme des estimations des variances intra et inter-série donne une estimation de la variance de fidélité intermédiaire (74).

L'écart-type de répétabilité : $\sigma^{\wedge}r$

L'écart-type de fidélité intermédiaire du niveau : $\hat{\sigma}_{FI} = \sqrt{\hat{\sigma}_r^2 + \sigma_B^2}$

8.6. Calcul de l'exactitude :

L'exactitude d'un résultat (par opposition à celui de la méthode analytique) exprime l'étroitesse de l'accord entre le résultat d'essai et la valeur de référence acceptée, aussi appelée valeur conventionnellement vraie, à savoir pour chaque mesure :

$$\text{Exactitude} = X - \mu$$

Pour chaque modèle et chaque observation l'exactitude de la mesure en valeur relative est :

$$\text{Donnée comme suit : } \text{Exactitude} (\%) = \frac{X - \mu}{\mu} \times 100$$

L'erreur maximale relative observée pour chaque modèle sur l'ensemble des séries montre déjà l'impact du choix de la fonction de réponse sur l'exactitude des résultats (73) (74)

8.6.1. Calcul de l'intervalle de tolérance :

Ce qui nous importe cependant en validation, ce n'est pas la validité des résultats calculés que nous obtenions avec l'erreur totale, mais plutôt une garantie ou une représentation de ce que la même procédure analytique pourra donner comme résultats dans le futur, C'est le rôle de l'intervalle de Tolérance. L'estimation des paramètres μ_j, \hat{B}_j et $\sigma^{\wedge}r_j$ à chaque niveau de concentration j a pour but de permettre d'estimer la proportion attendue d'observations dans les limites d'acceptation prédéfinies $[-\lambda, \lambda]$, c'est-à-dire :

$$E_{\mu, \sigma} \{ P[|X - \mu_T| < \lambda] | \hat{\mu}_M, \hat{\sigma}_M \} \geq \beta$$

L'intervalle de tolérance sera calculé pour chaque niveau de concentration envisagé avec les standards de validation et pour chaque modèle mathématique. Pratiquement, l'intervalle de tolérance se calcule comme suit en valeur absolue :

$$E_{\hat{\mu}_M, \hat{\sigma}_M} \{ P_X [\hat{\mu}_M - k\hat{\sigma}_M < X < \hat{\mu}_M + k\hat{\sigma}_M | \hat{\mu}_M, \hat{\sigma}_M] \} = \beta$$

Où :

$$\hat{\sigma}_{FI,j}^2 = \hat{\sigma}_{r,j}^2 + \sigma_{B,j}^2$$

$$R_j = \frac{\hat{\sigma}_{B,j}^2}{\hat{\sigma}_{r,j}^2}$$

$$B_j = \sqrt{\frac{R_j + 1}{nR_j + 1}}$$

$$v = \frac{(R + 1)^2}{\frac{(R + |1/K|)^2}{I - 1} + \frac{1 - 1/K}{I \times K}}$$

$Q_t = (v; \frac{1+\beta}{2})$ Le quantile de la distribution t de student pour v degrés de liberté et β la probabilité [12].

Le même intervalle en échec relative devient :

$$biais(\%)_j - Q_t(v; \frac{1+\beta}{2}) \sqrt{1 + \frac{1}{pnB_j^2}} CV_{FI,j} ; biais(\%)_j + Q_t(v; \frac{1+\beta}{2}) \sqrt{1 + \frac{1}{pnB_j^2}} CV_{FI,j}$$

Deux termes sont contenus dans l'intervalle de tolérance : l'un étant la justesse et l'autre étant, à un facteur près, le coefficient de variation de fidélité intermédiaire. C'est la raison pour laquelle cet intervalle peut ainsi être considéré comme une expression de l'exactitude des résultats. Mais l'intervalle de tolérance intègre une dimension supplémentaire, celle de chance (ou risque) pour des résultats futurs, conditionnellement à des résultats passés. La méthode peut dès lors être considérée comme exacte au niveau de chance β pour le niveau de concentration en question, si l'intervalle de tolérance est inclus dans les limites $[-\gamma, \gamma]$ définies à priori en fonction des objectifs de la méthode [12].

8.7. Profil d'exactitude :

Selon l'équation ci-dessous, les bornes de ces intervalles sont :

$$L_j(\text{Borne supérieure}) = biais(\%)_j - Q_t(v; \frac{1+\beta}{2}) \sqrt{1 + \frac{1}{pnB_j^2}} CV_{FI,j}$$

$$U_j(\text{Borne inférieure}) = biais(\%)_j + Q_t(v; \frac{1+\beta}{2}) \sqrt{1 + \frac{1}{pnB_j^2}} CV_{FI,j}$$

Le profil d'exactitude de la méthode s'obtient en reliant d'une part les bornes L_j entre elles ($L_1 \rightarrow L_2 \rightarrow \dots \rightarrow L_m$) et d'autre part les bornes U_j entre elles ($U_1 \rightarrow U_2 \rightarrow \dots \rightarrow U_m$). (74)

8.8.Choix de la fonction de réponse :

L'utilisation de certaines fonctions ne permet pas à la procédure analytique d'atteindre ses objectifs vus que pour certaines concentrations, les limites de tolérances sortent des limites d'acceptation. Par ailleurs, parmi les fonctions de réponses acceptables, on pourra remarquer que certaines fournissent des résultats meilleurs que d'autres. Ce seront ces dernières qui devront être retenues, sachant que le coefficient de détermination R^2 ne renseigne pas sur la qualité des résultats.

Le profil d'exactitude, qui est le reflet direct de ce que la procédure analytique est capable, permet de juger l'adéquation de différentes pratiques et permet de prendre des décisions sur le choix de la fonction de réponse adéquate (75).

8.9.Linéarité :

La linéarité de la méthode de dosage est vérifiée sur l'intervalle de validation, en utilisant les données des premières répétitions de chaque niveau de concentration, pour les trois séries de validation. La linéarité est, dans un premier temps, évaluée par comparaison visuelle des représentations graphiques des réponses instrumentales y en fonction des concentrations introduites (x) selon la fonction $[y=(x)]$, pour la forme pharmaceutique reconstituée et pour les standards d'étalonnage. Dans un deuxième temps, la linéarité de la relation entre les concentrations retrouvées (x_{calc}) et les concentrations introduites (x) est évaluée en représentant graphiquement la fonction $[x_{calc}=(x)]$ pour les trois séries de validation conjointement. Une analyse statistique de la droite obtenue est effectuée, la pente est comparée à la valeur de référence 1, l'ordonnée à l'origine est comparée à la valeur de référence 0, et une vérification de l'ajustement est effectuée (76).

8.10. Limites de quantification :

Le profil d'exactitude, construit à partir des intervalles de mesures attendues, permet donc de décider des niveaux de concentration pour lesquels une procédure est apte à fournir des résultats dans les limites d'acceptation. Ainsi, par définition, quand elle se produit, l'intersection entre le profil d'exactitude et les limites d'acceptation définissent les limites de quantification basse (LQinf) et haute (LQsup) de la procédure. Entre ces deux limites, il y a bien sûr l'intervalle de dosage. De la sorte, les limites de quantification sont bien les valeurs extrêmes qui peuvent être quantifiées avec une exactitude définie (74).

Partie Pratique

*Chapitre IV : matériels et méthodes***1. Introduction**

Nous avons eu l'honneur de réaliser notre partie pratique au niveau de la société algérienne de l'industrie pharmaceutique connue sous le nom SAIDAL Gué de Constantine la wilaya d'Alger qui a été créée en avril 1982 à la suite de la restructuration de la Pharmacie Centrale Algérienne (PCA) et a bénéficié.

SAIDAL est une entreprise pharmaceutique algérienne qui se consacre à la production et à la distribution de médicaments génériques de qualité, dans le but de rendre les traitements plus accessibles à la population et de contribuer à l'amélioration de la santé en Algérie tout en s'efforçant de répondre aux normes de qualité et de sécurité les plus élevées.



L'objectif du présent travail est de valider d'une façon approfondie une nouvelle méthode analytique de dosage intitulée "la Spectrophotométrie dérivée" comme une alternative valide à la HPLC, et cela conformément au protocole de validation analytique décrit dans le guide de validation élaboré par une commission de la Société Française des Sciences et Techniques Pharmaceutique (SFSTP) publié dans la revue STP pharma pratique en 2003.

Ainsi, ce mémoire se concentre sur la validation de cette méthode pour le dosage du médicament "VALPHI PLUS" qui est une combinaison entre l'hydrochlorothiazide et le valsartan sous sa forme orale (comprimés). Cette étude contribuera à l'amélioration des méthodes analytiques dans le domaine pharmaceutique, en proposant une autre méthode d'analyse qui s'approuve être plus économique et efficace pour le dosage de ces molécules.

Notre étude a été effectuée sur le "VALPHI PLUS", un médicament couramment utilisé pour traiter l'hypertension artérielle.

2. Le médicament utilisé :

- Généralités :

Le générique Valsartan/Hydrochlorothiazide 80/12.5mg est le générique du princeps Co-Tareg®. Il se présente sous forme de comprimés pelliculés contenant 80mg de Valsartan et 12.5mg d'Hydrochlorothiazide.

- Sa composition :



Chaque comprimé contient :

Principe actif : Valsartan80mg.

Hydrochlorothiazide12.5mg.

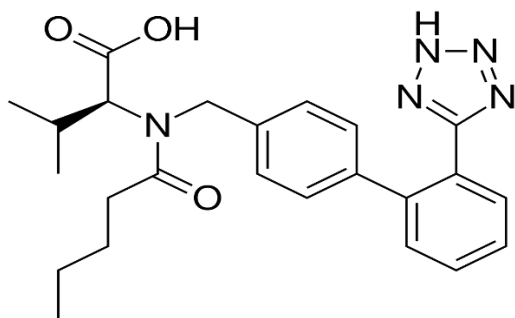
Excipients :

Excipients normaux : Cellulose microcristalline, Croscarmellose sel de Na, Titane Dioxyde, Silice colloïdale anhydre.

Excipients spécifiques : Fer jaune oxyde, Fer noir oxyde, Opadry II rose

- Données physicochimiques :

1. Le valsartan :



Structure du valsartan.

Nom chimique : acide (S)-3-méthyl-2-(N-{[2'-(2H-1,2,3,4-tétrazol-5-yl) biphényl-4-yl] méthyl} pentanamido) butanoïque.

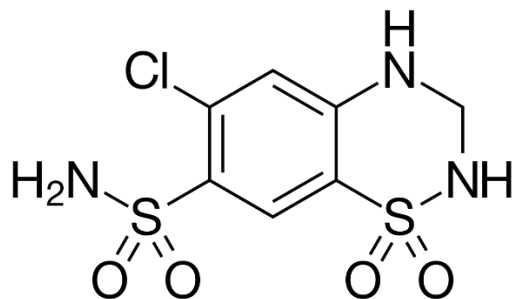
Forme brute : C₂₄H₂₉N₅O₃.

Masse molaire : 435,518 8 g/mol.

Aspect : poudre blanche ou sensiblement blanche, hygroscopique.

Solubilité : pratiquement insoluble dans l'eau, soluble dans l'éthanol anhydre, modérément soluble dans le chlorure de méthylène.

2. Hydrochlorothiazide :



Structure d'hydrochlorothiazide.

Nom chimique : 6-chloro-1,1-dioxo-3,4-dihydro-2H-1,2,4-benzothiadiazine-7-sulfonamide.

Formule brute : C₇H₈ClN₃O₄S₂.

Masse molaire : 297,739 g/mol.

Aspect : poudre cristalline, blanche ou sensiblement blanche.

Solubilité : très peu soluble dans l'eau, soluble dans l'acétone, assez soluble dans l'éthanol à 96 pour cent. L'hydrochlorothiazide se dissout dans les solutions diluées d'hydroxydes alcalins.

- Données pharmacologiques :

1. Mécanisme d'action :

- Le valsartan, en administration orale, est un antagoniste puissant et spécifique du récepteur de l'angiotensine II. Une substance naturellement présente dans l'organisme, responsable d'une contraction des artères qui augmente la pression artérielle et fatigue le cœur.
- L'hydrochlorothiazide, un diurétique dont la structure chimique est proche de celles des sulfamides. Son action renforce celle du valsartan.

2. Effets thérapeutiques :

Cette association thérapeutique administrée par voie orale est indiquée chez :

- L'adulte présentant une Hypertension artérielle essentielle.
- Les patients dont la pression artérielle n'est pas suffisamment contrôlée par le valsartan ou l'hydrochlorothiazide en monothérapie.

3. Matières premières et réactifs :

- Valsartan portait le numéro de lot "10240-180202".
- Hydrochlorothiazide portait le numéro de lot "HZ191190".
- Méthanol portait le numéro de lot "10926209804". Fourni par le laboratoire de l'Université Saad Dahleb – Blida.

4. Instruments et équipements :

- Balance.
- Bain à ultrasons.
- Agitateur magnétique.
- Filtreur : filtres de 0,45 μ m en PTFE et des filtres de 0,22 μ m en PVDF.
- Spectrophotomètre UV-VIS.



Balance.



Bain à ultrasons.



Agitateur magnétique.



Filtreur.

5. Méthode analytique :

La méthode de spectroscopie dérivée au point d'annulation, développée par notre collègue Zouablia, est une approche analytique avancée utilisée dans notre expérience pour valider la méthode d'analyse du Valsartan dans le comprimé Valsartan/hydrochlorothiazide (80/12.5).

Cette méthode se base sur le principe de la spectroscopie UV-VIS, qui consiste à mesurer l'absorption de la lumière par une substance chimique à différentes longueurs d'onde. La spectroscopie dérivée au point d'annulation va plus loin en utilisant la dérivée première de la courbe d'absorption pour améliorer la résolution et l'exactitude des mesures.

Le point d'annulation, également appelé point zéro ou point de minimum, correspond au point où la dérivée première de la courbe d'absorption atteint un minimum. C'est à ce point que les variations de l'absorbance sont les plus sensibles aux changements de concentration du composé d'intérêt, en l'occurrence le Valsartan.

En utilisant la spectroscopie dérivée au point d'annulation, nous sommes en mesure de détecter et de quantifier spécifiquement le Valsartan dans le comprimé, même en présence d'autres composés ou impuretés potentielles. Cette méthode offre une meilleure sélectivité et une réduction des interférences, ce qui permet une mesure plus précise et fiable du Valsartan.

6. Paramètres expérimentaux :

Les solutions d'étalonnage et de validation préparées précédemment ont été analysées à ces longueurs d'onde pour évaluer la linéarité de la méthode à différentes concentrations (70%, 90%, 100%, 110%, 130%).

Toutes les solutions ont été lues par balayage entre 200 et 400 nm à l'aide d'un spectrophotomètre UV. Cette plage de longueurs d'onde a été choisie pour couvrir la région spectrale appropriée pour l'absorption des composés d'intérêt, le Valsartan et l'hydrochlorothiazide.

Pour les solutions étalons, les mesures ont été réalisées en double, ce qui signifie que chaque niveau de concentration a été mesuré deux fois pour le Valsartan et l'hydrochlorothiazide.

Quant aux solutions de validation, les mesures ont été effectuées en triples, ce qui signifie que chaque niveau de concentration a été mesuré trois fois pour le Valsartan et l'hydrochlorothiazide. Cela a été fait pour augmenter la précision des mesures et obtenir une meilleure évaluation de la performance de la méthode.

Afin d'assurer la répétabilité des résultats, toutes les procédures expérimentales ont été répétées trois jours consécutifs, en suivant exactement les mêmes étapes et les mêmes conditions expérimentales. Cela a permis d'évaluer la cohérence et la stabilité des résultats obtenus avec la méthode analytique.

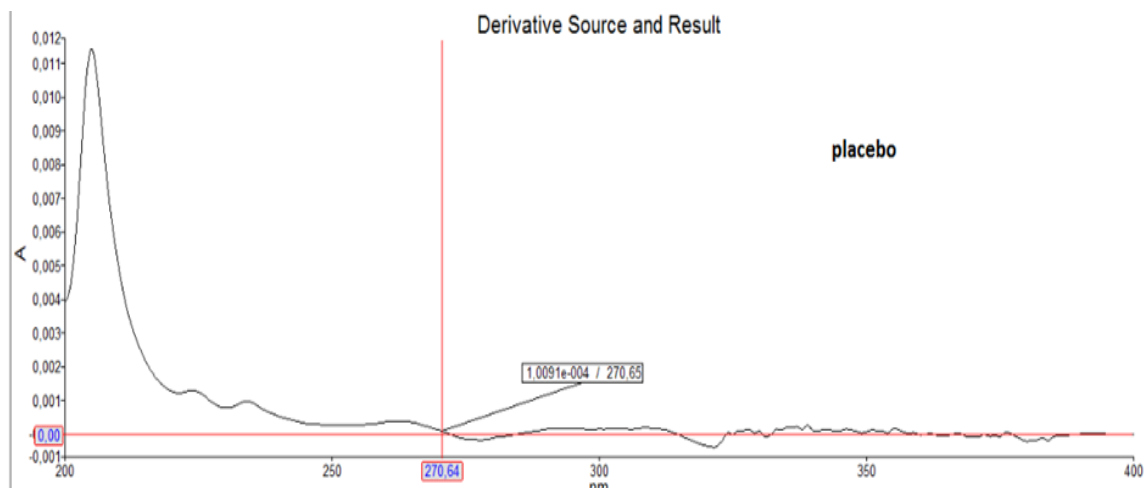
En effectuant des répliques pour chaque niveau de concentration, nous avons pu évaluer la reproductibilité des mesures et obtenir une estimation plus robuste des concentrations de Valsartan et d'hydrochlorothiazide dans les échantillons testés.

7. Validation de la méthode :

Validation de dosage du Valsartan sous forme de comprimés de Valsartan/Hydrochlorothiazide (80/12.5) par la spectrophotométrie dérivée

On note la valeur de la première dérivée à 270.64 nm où seul le Valsartan à une valeur, celle de l'hydrochlorothiazide s'annule à cette longueur d'onde (méthode développée et optimisée par Zouablia. I).

- Spécificité :



$$D1 \text{ placebo à } 270.64\text{nm} / D1 \text{ STD } 1 \text{ Valsartan à } 270.64 \text{ nm} = 0.5 \%$$

La méthode est spécifique vu que la D1 du placebo est négligeable devant la plus petite concentration de la gamme de validation.

Résultats des standards d'étalonnage (SE) :

Niveau (%)	Série N°1		Série N°2		Série N°3	
	Concentration introduite (ug/ml)	Surface (UA)	Concentration introduite (ug/ml)	Surface (UA)	Concentration introduite (ug/ml)	Surface (UA)
70%	19,2470	0,0206	18,5000	0,0201	16,3000	0,0176
	19,2470	0,0206	18,5000	0,0202	16,3000	0,0177
90%	24,6758	0,0241	23,7500	0,0237	22,4000	0,0219
	24,6758	0,0242	23,7500	0,0237	22,4000	0,0219
100%	27,4170	0,0278	26,4500	0,0268	24,1300	0,0245
	27,4170	0,0278	26,4500	0,0268	24,1300	0,0244
110%	32,6400	0,0327	31,0000	0,0309	28,9100	0,0290
	32,6400	0,0328	31,0000	0,0308	28,9100	0,0290
130%	37,5200	0,0368	36,8000	0,0360	34,1400	0,0339
	37,5200	0,0371	36,8000	0,0360	34,1400	0,0339

- Etude de linéarité :

Jour 1 :

$y = b * x + a$	
Pente (b) =	0,000900
Ordonnée à l'origine (a) =	0,0023
Coefficient de corrélation (r) =	0,9963
Coefficient de régression (r^2) =	0,992

Jour 2 :

$y = b * x + a$	
Pente (b) =	0,000900
Ordonnée à l'origine (a) =	0,0034
Coefficient de corrélation (r) =	0,9979
Coefficient de régression (r^2) =	0,996

Jour 3 :

$y = b * x + a$	
Pente (b) =	0,0009
Ordonnée à l'origine (a) =	0,0020
Coefficient de corrélation (r) =	0,9964
Coefficient de régression (r^2) =	0,993

- Paramètres de la linéarité :

Jour 1 :

Homogénéité des variances				
C calculé	C théorique 5%	C théorique 1%	Condition	Conclusion
0,60	0,68	0,79	$C < C_{th}$	Valide au risque 5%
Existence d'une pente				
F ₁ calculé	F théorique 5%	F théorique 1%	Condition	Conclusion
1753,26	4,67	9,07	$F_1 > F_{th}$	Valide au risque 1%
Validité de la droite de régression				
F ₂ calculé	F théorique 5%	F théorique 1%	Condition	Conclusion
0,00	3,71	6,55	$F_2 < F_{th}$	Valide au risque 5%

Jour 2

Homogénéité des variances				
C calculé	C théorique 5%	C théorique 1%	Condition	Conclusion
0,50	0,68	0,79	$C < C_{th}$	Valide au risque 5%
Existence d'une pente				
F ₁ calculé	F théorique 5%	F théorique 1%	Condition	Conclusion
3138,82	4,67	9,07	$F_1 > F_{th}$	Valide au risque 1%
Validité de la droite de régression				
F ₂ calculé	F théorique 5%	F théorique 1%	Condition	Conclusion
0,00	3,71	6,55	$F_2 < F_{th}$	Valide au risque 5%

Jour 3 :

Homogénéité des variances				
C calculé	C théorique 5%	C théorique 1%	Condition	Conclusion
0,50	0,68	0,79	$C < C_{th}$	Valide au risque 5%
Existence d'une pente				
F ₁ calculé	F théorique 5%	F théorique 1%	Condition	Conclusion
1820,70	4,67	9,07	$F_1 > F_{th.}$	Valide au risque 1%
Validité de la droite de régression				
F ₂ calculé	F théorique 5%	F théorique 1%	Condition	Conclusion
0,00	3,71	6,55	$F_2 < F_{th.}$	Valide au risque 5%

Conclusion : il y a une bonne linéarité

- Fonction de réponse :

Nous optons pour Le modèle mathématique ($Y = aX + b$), dont pas moins de 90% de futurs résultats acceptables, seront à $\pm 5\%$ de la vraie valeur.

Nous devons vérifier la validité des autres critères de validation :

Résultats des standards de validation (SV) :

Niveau (%)	Série N°1		Série N°2		Série N°3	
	Concentration introduite (mg/ml)	Surface (UA)	Concentration introduite (mg/ml)	Surface (UA)	Concentration introduite (mg/ml)	Surface (UA)
70%	18,3000	0,0196	18,5000	0,0198	16,9500	0,0181
	18,3000	0,0196	18,5000	0,0198	16,9500	0,0181
	18,3000	0,0196	18,5000	0,0198	16,9500	0,0181
90%	24,6758	0,0242	24,8000	0,0244	23,3200	0,0229
	24,6758	0,0242	24,8000	0,0245	23,3200	0,0229
	24,6758	0,0241	24,8000	0,0244	23,3200	0,0228
100%	27,4170	0,0277	26,8000	0,0271	25,2300	0,0255
	27,4170	0,0277	26,8000	0,0272	25,2300	0,0255
	27,4170	0,0277	26,9000	0,0272	25,2300	0,0255
110%	31,3000	0,0314	31,1400	0,0312	30,6400	0,0307
	31,3000	0,0314	31,1400	0,0311	30,6400	0,0308
	31,3000	0,0314	31,1400	0,0311	30,6400	0,0307
130%	38,4000	0,0376	36,8000	0,0361	34,4500	0,0346
	38,4000	0,0376	36,8000	0,0362	34,4500	0,0346
	38,4000	0,0376	36,8000	0,0359	34,4500	0,0346

- Fidélité et fidélité intermédiaire :

Niveaux	CV répétabilité (%)	CV fidélité intermédiaire (%)
70%	0	0.891
90%	0,25	0,40
100%	0,11	0,11
110%	0,16	0.20
130%	0.26	1,09

Conclusion : aucune valeur ne dépasse 2 % donc il y a une bonne répétabilité et une bonne fidélité intermédiaire.

- Justesse :

Niveaux	Biais (%)	Recouvrement (%)
70%	1.42	101.42
90%	-3.56	96.44
100%	0.26	100.26
110%	0.79	100.79
130%	0.57	100.57

Conclusion :

Aucun niveau ne dépasse un biais de + -5% ou moins de -5 %, la méthode est juste.

- Erreur totale :

Niveaux	Biais (%)	CV fidélité intermédiaire (%)	Erreur totale (%)
70%	1.42	0.891	2,32
90%	-3.56	0.4	3.96
100%	0.26	0.11	0.37
110%	0.79	0.2	0.99
130%	0.57	1,09	1.66

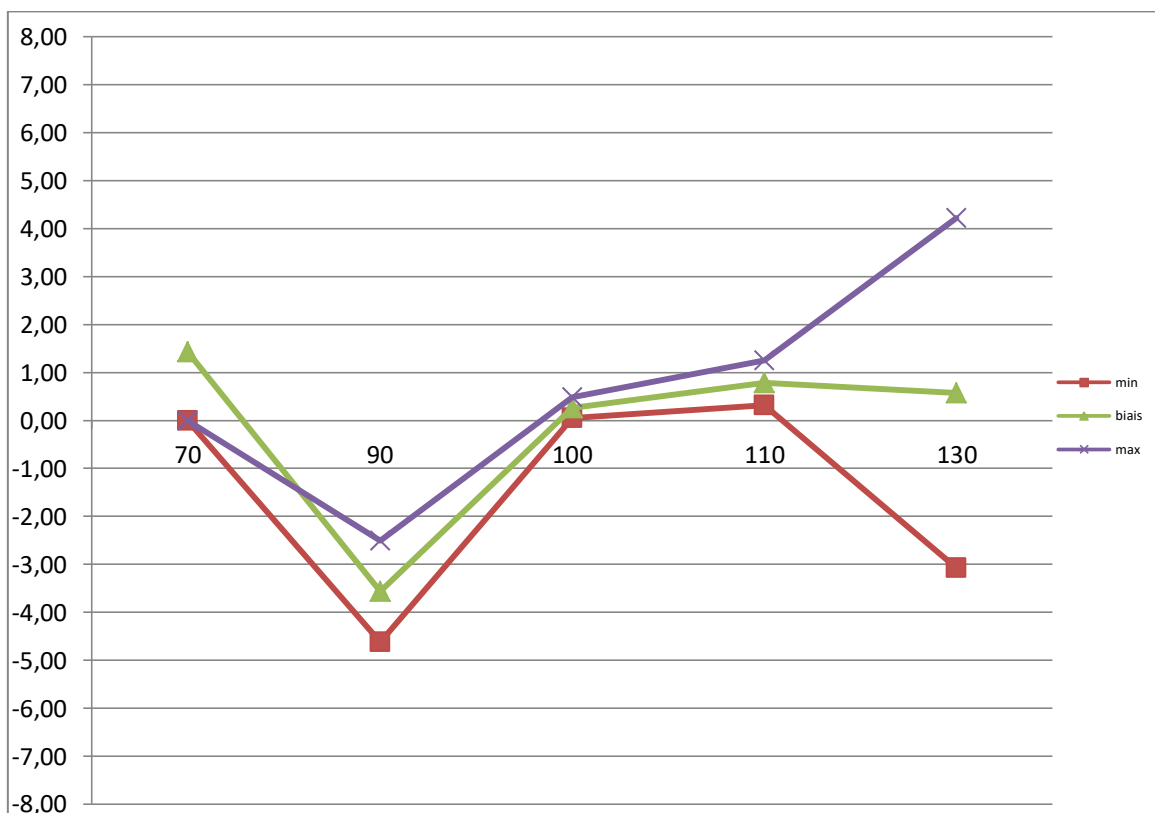
Conclusion :

Aucun niveau n'a une une erreur totale supérieur à + 5 % ou inférieure à - 5%.

Méthode est exacte.

- Intervalle de tolérance :

Niveaux	Min (%)	Biais (%)	Max (%)
70%	0	1.42	0
90%	-4.62	-3.56	-2.5
100%	0,05	0.26	0.48
110%	0.31	0.79	1.26
130%	-3.07	0.57	4.22

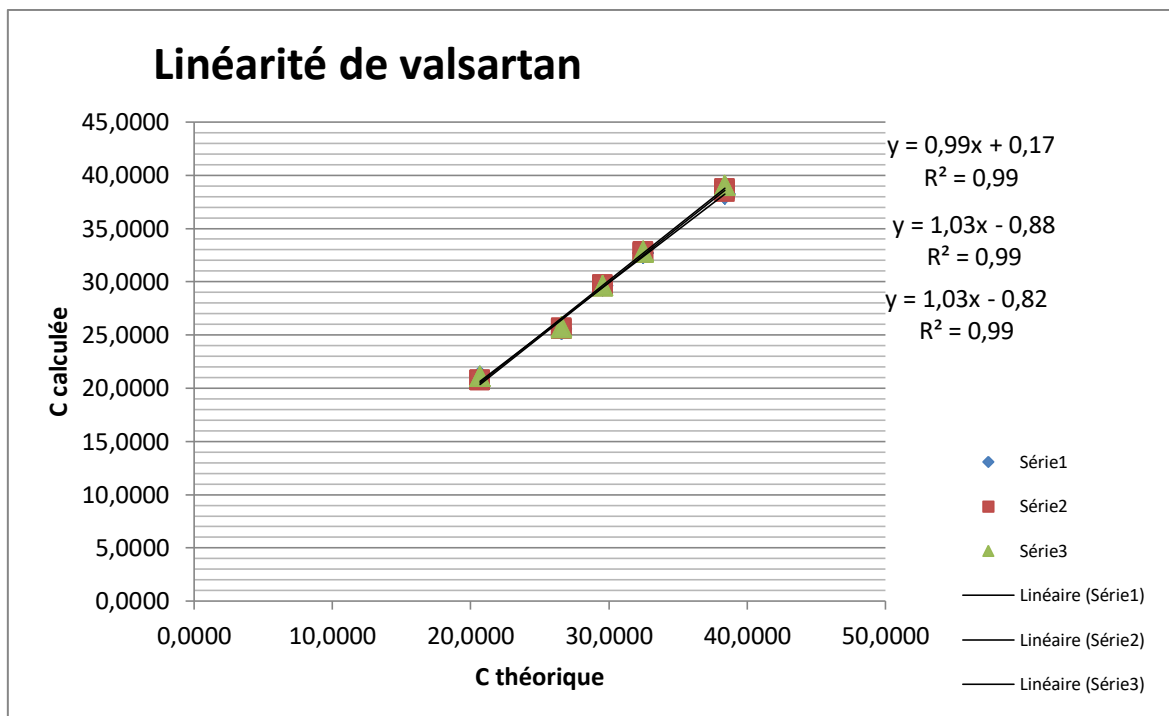


Conclusion : toutes les valeurs sont à l'intérieur de l'intervalle $[-5\% - +5\%]$, donc méthode de dosage est valide de 70 % à 130 % de la concentration du Valsartan dans la forme comprimée.

Il reste de prouver la linéarité entre la concentration calculée est la concentration théorique.

Résultats de la prédiction inverse :

Niveaux (%)	C. théorique (mg/ml)	C. calculée	C. calculée	C. calculée
		S1	S2	S3
70%	20,6800	21,0874	20,7590	21,0774
	20,6800	21,0874	20,7590	21,0774
	20,6800	21,0874	20,7590	21,0774
90%	26,5800	25,5976	25,5689	25,7691
	26,5800	25,5976	25,6822	25,7691
	26,5800	25,4892	25,5689	25,6616
100%	29,5400	29,6100	29,5870	29,6150
	29,5400	29,6100	29,7002	29,6150
	29,5400	29,6100	29,6002	29,6150
110%	32,4900	32,6875	32,8406	32,7469
	32,4900	32,6875	32,7274	32,8544
	32,4900	32,6875	32,7274	32,7469
130%	38,4000	38,2177	38,6403	39,0407
	38,4000	38,2177	38,7536	39,0407
	38,4000	38,2177	38,4138	39,0407



Conclusion : e $R^2 = 0.99$ donc il y a une très bonne corrélation entre la valeur théorique et la valeur calculée pendant les 3 jours.

8. Résultats et discussions :

La méthode analytique utilisée dans cette étude est la spectrophotométrie dérivée au point d'annulation, qui a été développée et optimisée par Zouablia. Cette approche analytique avancée utilise la dérivée première de la courbe d'absorption pour améliorer la résolution et la précision des mesures.

La spécificité de la méthode a été évaluée en comparant les valeurs de la première dérivée du placebo et de la solution étalon de Valsartan à 270,64 nm. Les résultats ont montré que la première dérivée du placebo était négligeable par rapport à la plus petite concentration de la plage de validation, confirmant ainsi la spécificité de la méthode pour le Valsartan.

Pour évaluer la linéarité de la méthode, des étalons d'étalonnage à différentes concentrations (70 %, 90 %, 100 %, 110 %, 130 %) ont été préparés et analysés à l'aide de la spectrophotométrie dérivée. Les données obtenues sur trois jours consécutifs ont montré une bonne linéarité, comme en témoignent les équations de régression linéaire, les coefficients de corrélation (r) et les coefficients de détermination (r^2).

Les paramètres de linéarité ont été évalués, notamment l'homogénéité des variances, l'existence d'une pente et la validité de la droite de régression. Les valeurs calculées ont été comparées aux valeurs théoriques à des niveaux de confiance spécifiques (5 % et 1 %). Les résultats ont démontré que la méthode satisfaisait aux critères d'acceptation, confirmant ainsi sa linéarité.

La fonction de réponse de la méthode a été établie à l'aide du modèle mathématique $Y = aX + b$, où au moins 90 % des résultats futurs sont censés se situer à ± 5 % de la vraie valeur. Cette fonction de réponse garantit l'exactitude et la fiabilité des futures mesures.

Des étalons de validation à différentes concentrations ont été préparés pour évaluer les performances de la méthode. Les résultats de ces étalons de validation ont indiqué que la méthode fournissait des mesures précises et précises dans les limites acceptables.

La précision de la méthode et la précision intermédiaire ont été évaluées en calculant le coefficient de variation (%CV) pour la répétabilité et la précision intermédiaire à différents niveaux de concentration. Les valeurs obtenues se situaient dans des limites acceptables, démontrant une bonne précision et une bonne précision intermédiaire.

L'exactitude de la méthode a été évaluée en déterminant le biais et la récupération à différents niveaux de concentration. Les résultats ont montré que les valeurs de biais se situaient dans la plage acceptable (-5 % à +5 %), indiquant que la méthode fournissait des résultats précis. De plus, les pourcentages de récupération étaient proches de 100 %, confirmant davantage l'exactitude de la méthode.

L'erreur totale de la méthode a été calculée en tenant compte du biais, du coefficient de variation pour la précision intermédiaire et de l'erreur totale à différents niveaux de concentration. Les résultats ont démontré que l'erreur totale se situait dans la plage acceptable, indiquant la fiabilité de la méthode.

L'intervalle de tolérance a été déterminé pour évaluer la fiabilité de la méthode dans une certaine plage de concentrations. Les valeurs calculées se situaient dans l'intervalle de - 5 % à +5 %, confirmant la validité de la méthode pour la plage de concentration du Valsartan de 70 % à 130 % dans la formulation en comprimés.

De plus, les résultats de prédiction inverse ont montré une corrélation élevée ($R^2 = 0,99$) entre les concentrations calculées et les concentrations théoriques, confirmant ainsi l'exactitude et la fiabilité de la méthode.

En conclusion, la validation de la méthode analytique pour la quantification du Valsartan dans les comprimés Valsartan/Hydrochlorothiazide en utilisant la spectrophotométrie dérivée a démontré sa spécificité, sa linéarité, son exactitude, sa précision et sa fiabilité dans la plage de concentration spécifiée. Ces résultats confirment l'adéquation et la robustesse de la méthode pour l'analyse de routine et le contrôle de la qualité.

Approche de validation	Résultats	Commentaires
Spécificité	La méthode est spécifique, la D1 du placebo est négligeable à la longueur d'onde de 270.64 nm	La spécificité de la méthode est confirmée car la mesure de la D1 du placebo à la longueur d'onde spécifiée ne présente pas d'interférence avec le Valsartan.
Linéarité	Pente (b) = 0.000900, Ordonnée à l'origine (a) = 0.0023, Coefficient de corrélation (r) = 0.9963, Coefficient de régression (r^2) = 0.992	La méthode présente une linéarité satisfaisante le jour 1, avec une pente, une ordonnée à l'origine et des coefficients de corrélation et de régression élevés, indiquant une relation linéaire entre la concentration de Valsartan et la réponse du spectrophotomètre UV-Vis dérivée.
Paramètres de la linéarité	C calculé = 0.60, C théorique 5% = 0.68, C théorique 1% = 0.79	Le calcul de la concentration du Valsartan dans l'échantillon du jour 1 est de 0.60, ce qui correspond à 88.24% de la concentration théorique à 5% et 75.95% de la concentration théorique à 1%. La méthode sous-estime légèrement la concentration réelle du Valsartan.
Fidélité	Répétabilité (RSD) = 0.83%	La méthode présente une fidélité satisfaisante le jour 1, avec une répétabilité de 0.83%, ce qui indique une bonne précision et une faible variabilité des résultats lors de la répétition des mesures sur le même échantillon.

Justesse	Erreur totale (TE) = 1.55%, Intervalle de tolérance (Tol) = $\pm 2\%$	La méthode présente une justesse acceptable le jour 1, avec une erreur totale de 1.55% par rapport à la valeur théorique et un intervalle de tolérance de $\pm 2\%$, ce qui indique que les résultats sont proches de la valeur vraie du Valsartan et se situent dans la plage de tolérance acceptable.
-----------------	---	--

Conclusion

La validation d'une méthode analytique est un outil indispensable pour établir le rôle du médicament dans la prévention, le diagnostic ou le traitement des maladies.

L'une des principales applications de la chromatographie liquide à haute performance (HPLC) est la validation analytique, qui consiste à vérifier la qualité, la pureté et la stabilité des substances chimiques ou biologiques. Toutefois, la HPLC présente certains inconvénients, tels que le coût élevé, la consommation de solvants et le temps d'analyse. C'est pourquoi il est intéressant d'établir une nouvelle méthode analytique de validation comme alternative à la HPLC. Une telle méthode pourrait offrir des avantages tels que la réduction des coûts, l'optimisation des ressources, l'amélioration de l'efficacité et la fiabilité des résultats.

Notre travail a porté sur la validation de la nouvelle méthode analytique « La spectrophotométrie dérivée UV-VIS » développée par mademoiselle Zouablia.I pour le dosage du « VALSIS PLUS » par voie orale sous sa forme comprimée qui nous ont été établies par SAIDAL.

Cette validation a été effectuée pendant trois jours successifs et a conclu un résultat conforme selon la procédure SFSTP 2003 dont l'intervalle est 70 % - 130 %, où nous garantissons que 90 % des futurs résultats ne dévieront pas de de +ou- 5% de la vraie valeur.

A cet effet nous recommandons l'applicabilité de la « Spectrophotométrie dérivée » dans le domaine de l'analyse pharmaceutique, avec des implications potentielles dans le contrôle qualité des produits pharmaceutiques.

Référence bibliographique

Ce mémoire a été effectuée sur le thème de fin d'étude de notre collègue zouabli imen et qui est intitulé " la spectrophotometrie dérivée "

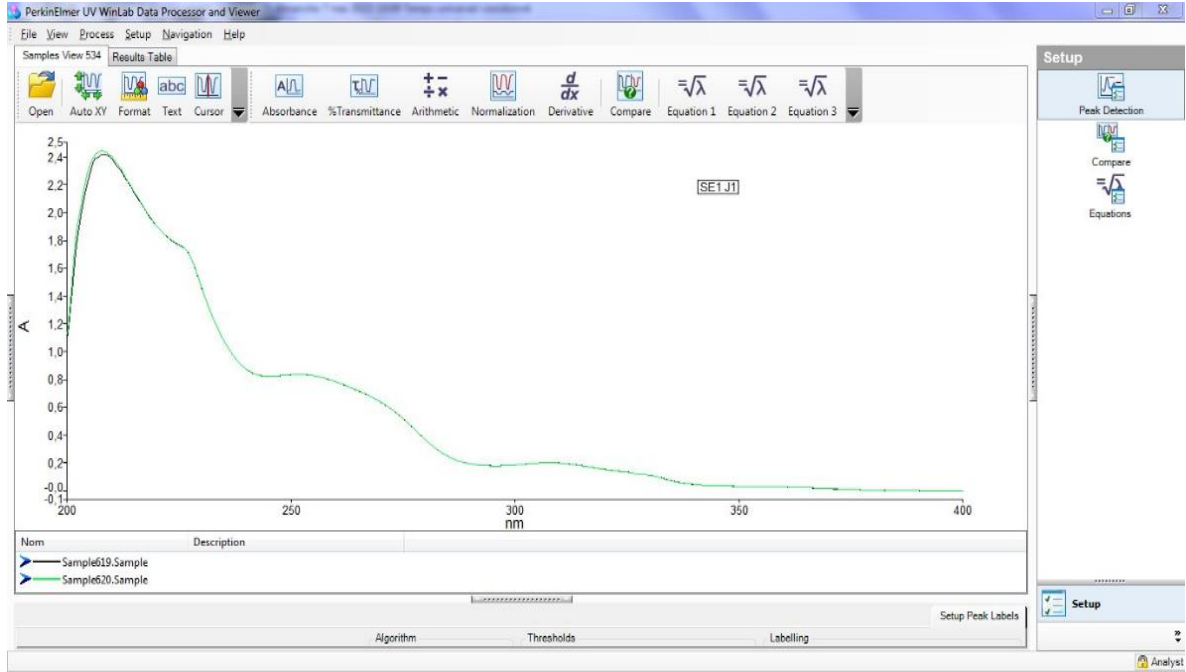
- 01- Loi algérienne N° 46 Correspondant au 29 juillet 2018 relative à la santé, l'article 208 page 19
- 02- GPC Guide Pharmaco Clinique (6° Éd.) Roselyne Gervais, Gérard Willoquet , Aïssé Diallo , Marc Talbert
- 03- PHARMACIE galénique : bonne pratique de fabrication des médicament Le Hir.A 10 -ème Édition
- 04- ALLAIN « pharmacologie : les médicaments », édition : ESTEM, paris, 1996.
- 05- Ministère de la santé et de prévention
- 06- eklablog chapitre 2 : COMPOSITION D'UN MEDICAMENT
- 07- pharmacomedicales
- 08- Recherche clinique et épidémiologique Version 1.2 Février 2011
- 09- Essais Cliniques Région Sud Méditerranée : La recherche clinique
- 10- La Fondation Synergie Lyon Cancer
- 11- MANUEL MANAGEMENT DE LA QUALITE MASTER PRO FREDERIC CANARD PREFACE D'ÉLISE TOSI ALGERIA-EDUC.COM
- 12- MANAGEMENT DE LA QUALITE MASTER PRO FREDERIC CANARD PREFACE D'ÉLISE TOSI ALGERIA-EDUC.COM
- 13- FUNDAMENTALS OF QUALITY CONTROL IMPROVEMENT FOURTH EDITION BY AMITAVA MITRA
- 14- Quality Control Handbook by Joseph M. Juran
- 15- ISO 9001:2015 Quality management systems – Requirements.
- 16- World Health Organization (WHO) guidelines on good manufacturing practices for sterile pharmaceutical products
- 17- "Validation of analytical procedures: Text and methodology" publié par l'ICH (International Conference on Harmonization) en 2005.
- 18- "Pharmaceutical Quality by Design : A Practical Approach" écrit par W. Scott Ferguson et publié en 2018. Chapitre 6.
- 19- "Quality control strategy for pharmaceutical analysis" publié dans la revue Analytical Chemistry en 2003 par les auteurs M.A. Abd El-Rahman et al.
- 20- Un spectromètre infrarouge. S.Levchenkov 19 juin 2008
- 21- Larousse encyclopédie France : chromatographie : Technique d'analyse chimique utilisée pour séparer les constituants d'un mélange.
- 22- La chimie France : chromatographie phase gazeuse
- 23- Inter-Chim Guide : La chromatographie sur Couche Mince (CCM) mai 2019
- 24- Ressources en sciences de la vie pour les enseignants et enseignantes : La chromatographie Publié le 15 juin 2012 Par Ali Ladram, Gilles Camus
- 25- Faculté des Sciences Rabat : CHROMATOGRAPHIE LIQUIDE À HAUTE PERFORMANCE (HPLC) JASCO2029 PLUS

- 26- Schéma de l'angle incident en fluorescence 29 octobre 2017
- 27- Analytical Toxicology : Chromatographie en phase gazeuse (CPG)
- 28- LPP Group: Thin Layer Chromatography (TLC/HPTLC)
- 29- Augusta University High Performance Liquid Chromatography (HPLC)
- 30- techno science Spectrophotometry
- 31- Spectroscopie de fluorescence techno_science
- 32- Potentiométrie - Définitions et principes généraux Gérard DURAND 10 sept. 2010
technique d'ingénieure
- 33- chimie analytique : Potentiométrie 18 aout 2020
- 34- Titracteur potentiométrique, G10S Avantor
- 35- Spectrophotométrie d'absorption dans l'ultraviolet et le visible Dominique DI
BENEDETTO, Philippe BREUIL 01 mars 2019 technique d'ingénieure
- 36- Schéma du principe du spectrophotomètre UV-visible, monofaisceau ResearchGate
- 37- PC3513: Chimie analytique et spectroscopie
- 38- UV-6300PC, Spectrophotomètre UV/visible Avantor
- 39- INTÉRÊT DE LA SPECTROPHOTOMÉTRIE DÉRIVÉE POUR
L'IDENTIFICATION D'UNE SUBSTANCE Bull. Soc. Pharm. Bordeaux,1997,
136, 56-76
- 40- NOTIONS DE BASE DE LA SPECTROSCOPIE : Guide de la spectroscopie
infrarouge Bruker 2023
- 41- Huber, L., O'Connor, E., & Nestorov, I. (2008). Biomarkers and surrogate
endpoints in drug development and regulatory decision making. New York:
Springer Science+Business Media, LLC.
- 42- European Commission. "EudraLex - Volume 4 - Good Manufacturing Practice
(GMP) Guidelines." 2018.
- 43- "Guidance for Industry: Analytical Procedures and Methods Validation for Drugs
and Biologics" by the U.S. Food and Drug Administration, published in May 2015.
- 44- European Medicines Agency (EMA). "Good Manufacturing Practice (GMP) / Good
Distribution Practice (GDP)." Accessed on March 6, 2023. Available at:
<https://www.ema.europa.eu/en/human-regulatory/post-authorisation/manufacturing-authorisation/good-manufacturing-practice-gmp-good-distribution-practice-gdp>
- 45- "Validation des méthodes d'analyse pour les applications pharmaceutiques" by
Emmanuelle Hérou and Philippe Hubert, published in Techniques de l'Ingénieur,
September 2016.
- 46- United States Pharmacopeia (USP). General Chapter <1225> Validation of
Compendial Procedures.
- 47- "Validation des méthodes d'analyse pour les applications pharmaceutiques" by
Emmanuelle Hérou and Philippe Hubert, published in Techniques de l'Ingénieur,
September 2016.
- 48- Lee, M. S. (Ed.). (2013). Pharmaceutical analytical chemistry: Open learning.
Wiley.
- 49- Organization for Economic Cooperation and Development (OECD). OECD
principles of good laboratory practice. 1998.
- 50- Feinberg M., Boulanger B., Dewé W., Hubert P., New advances in method
validation and measurement uncertainty aimed at improving the quality of chemical
data. Analytical and Bioanalytical Chemistry. 2004, 380, 502-514.

- 51- Différence entre vérification et validation – Gadget-info.com – 2019
- 52- Guide de validation des méthodes d'analyses - ANSES/PR3/07/01 version a - Date : 28 octobre 2015
- 53- Validation interne des méthodes d'analyse par Max FEINBERG https://www.researchgate.net/publication/285745781_Validation_interne_des_methodes_d'analyse
- 54- Démarche ISO 17025 https://www.demarcheiso17025.com/validation_methodes.html#
- 55- Baker, M. (2020). Sélection de méthode analytique. Dans *Analyse des données et sciences de la vie* (pp. 55-63). Springer, Cham
- 56- FiLAB.fr - Cycle de vie d'une méthode analytique - Développement analytique
- 57- L'adoption pour l'ICH1 ligne directrice : Q2(R1) : Validation des méthodes d'analyse : Texte et méthodologie - Le 5 juin 2015
- 58- Ment W., Technology transfer of analytical methods, FDA News and Information, vol. 2, N°3, 1-3, 17 août 2001.
- 59- Analytical procedure/Technology transfer, ISPE Guideline, pp. 23-34, 2003.
- 60- "Guideline on Bioanalytical Method Validation" by the European Medicines Agency, published in July 2011.
- 61- Kromidas, S.: *Handbuch Validierung in der Analytik*, Verlag Wiley-VCH, Weinheim, ISBN 3-527-29811-8 (2000)
- 62- Commission SFSTP., Hubert Ph., Nguyen-Huu J.J., Boulanger E., Chapuzet E., et al. 2006. Validation des procédures analytiques quantitatives : Harmonisation des démarches Partie II - Statistiques. *STP Pharma Pratique*, 16, 1, 28-58.
- 63- <http://apps.who.int/medicinedocs/fr/d/Jh1814f/5.2.html#Jh1814f.5.2>
- 64- Guide de validation des méthodes d'analyses. ANSES Agence Nationale de Sécurité Sanitaire Alimentaire, Environnement, Travail.
- 65- Caporal-Gautier J., Nivet J.M., Algranti P., et al. Guide de validation analytique. Rapport d'une commission SFSTP, Partie I: Méthodologie. *STP Pharma Pratiques*, 1992, 2, 4, 205-226.
- 66- FEINBERG M. 2013. Validation des méthodes d'analyse quantitatives au moyen du profil d'exactitude. *Techniques de l'Ingénieur l'expertise technique et scientifique de référence*, page 224.
- 67- Thèse de SIAVELIS Armand pour le diplôme d'état de docteur en Pharmacie, université d'Angers 2014-2015, Analyse des différentes approches de validation des méthodes de dosage et proposition d'un guide de validation de méthode de dosage en pharmacie hospitalière.
- 68- STP Pharma pratiques volume 21-N°2 -mars-avril 2011. Analyse des performances d'une méthode analytique, Evaluation des risques lors d'une utilisation en routine - Avantages et inconvénients des différentes approches. << G. de Fontenay, J. Respaud, P. Puig, C. Lemaire. >>
- 69- Hubert et al., 2003, 2006 a,b.
- 70- Algranti et al., 1992 ; Hubert et al., 2003.
- 71- (C.S. Raska, T.S. Bennett, S.A. Goodberlet. *Anal. Chem.* 82 (2010) 5932-5936) Usefulness of capability indices in the framework of analytical methods validation

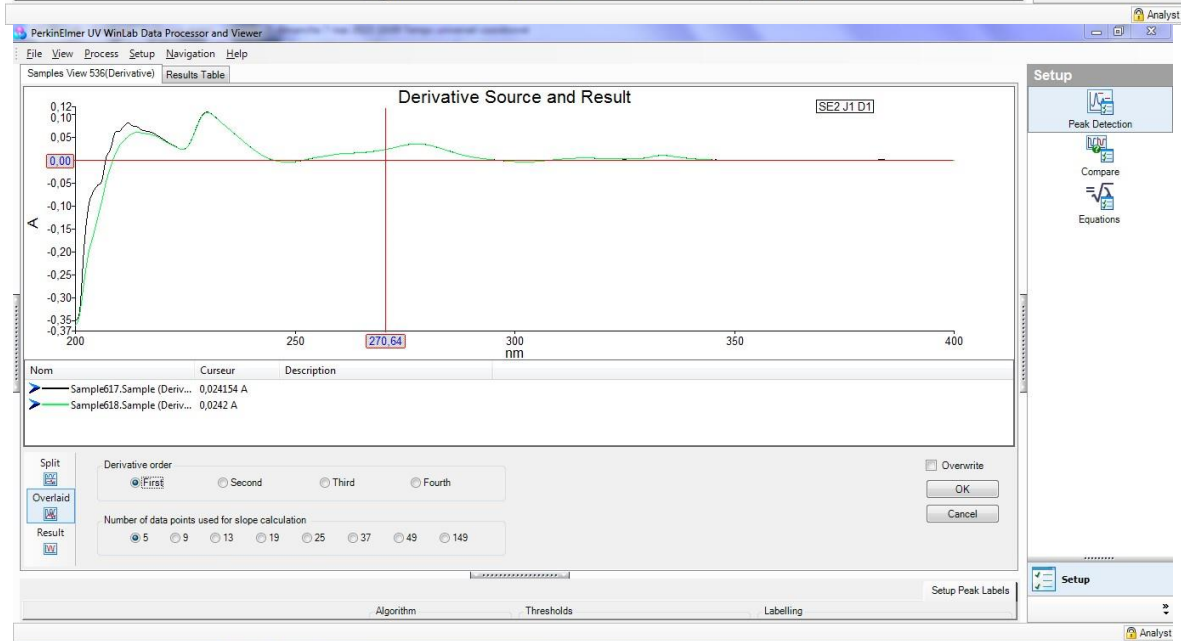
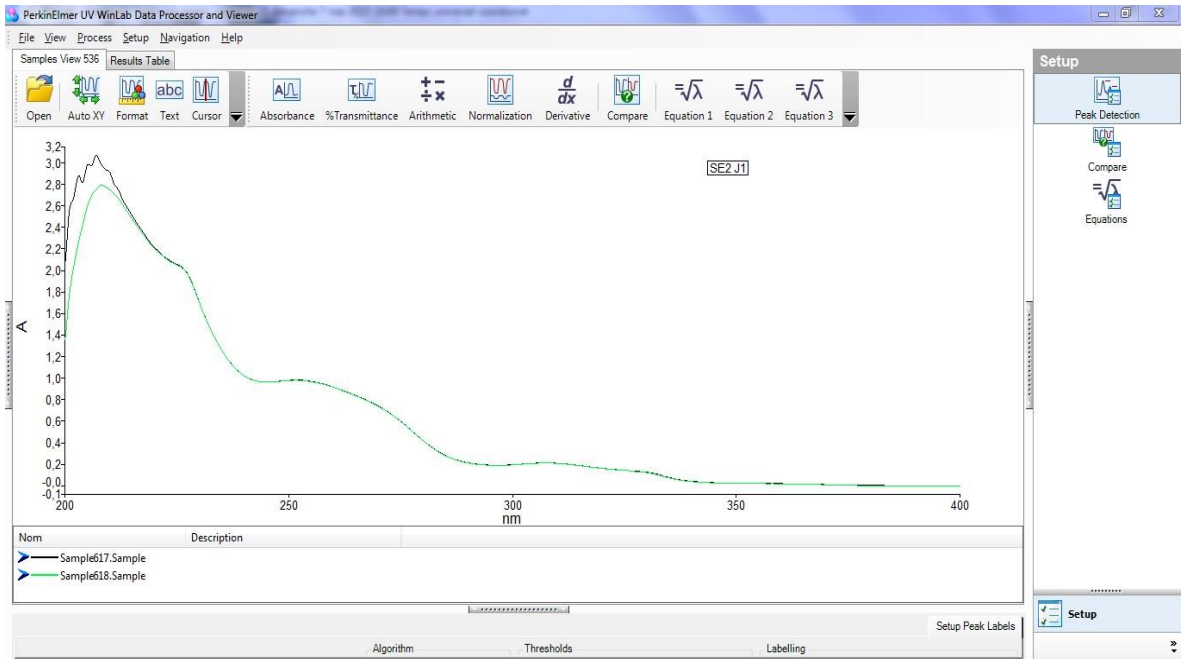
- 72- Hubert Ph., Nguyen-Huu J.J., Boulanger E., Chapuzet E., et al. 2003. Validation des procédures analytiques quantitatives : Harmonisation des démarches.STP Pharma Pratiques, STP PHARMA PRATIQUES, 13, 3, 101-138.
- 73- Commission SFSTP, Validation des procédures analytiques quantitatives ; 1992.
- 74- Ph.Hubert, J.J. Nguyen-Huu B. Boulanger, E. Chapuzet, P. Chiap, N. Cohen, P.A. Compagnon, W. Dewe, M. Feinberg, M. Lallier, M. Laurentie, N. Mercier, G. Muzard, C. Nivet, L. Valat, Validation des procédures analytiques quantitatives : Harmonisation des démarches Partie II Statistiques. STP Pharma Pratiques ; 2006.
- 75- Exigences générales concernant la compétence des laboratoires d'étalonnages et d'essais. ISO/CEI 17025: 2005.
- 76- I. Pinguet, Validation analytique : Application de la procédure SFSTP 2003-2006 au domaine de la phytothérapie. Sciences pharmaceutiques. 2015.

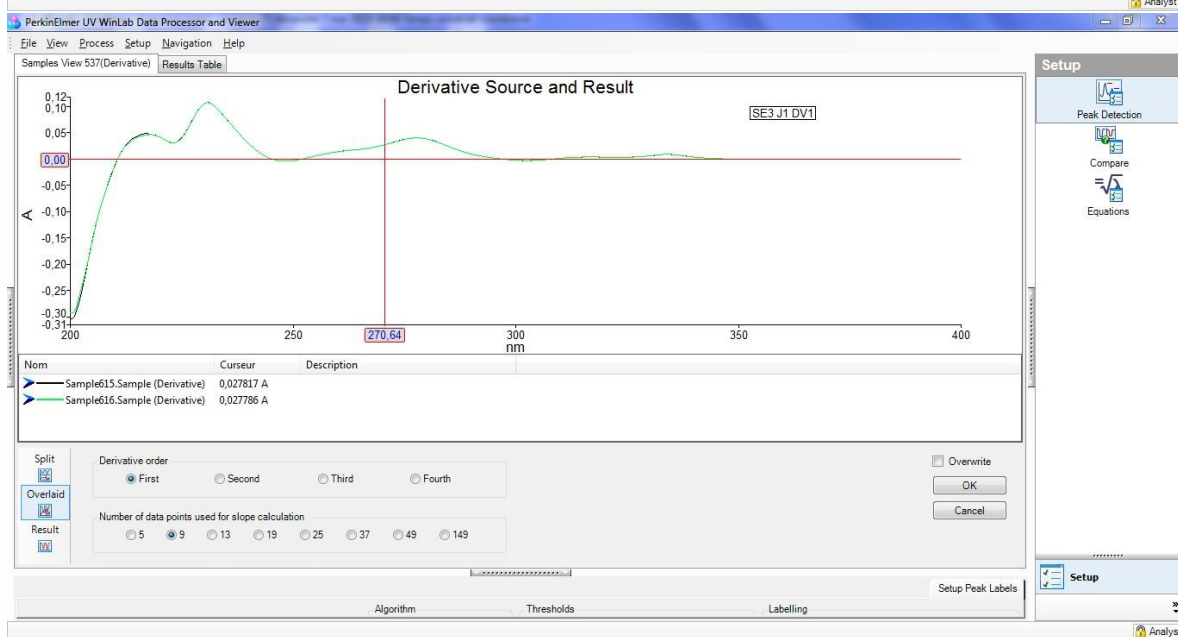
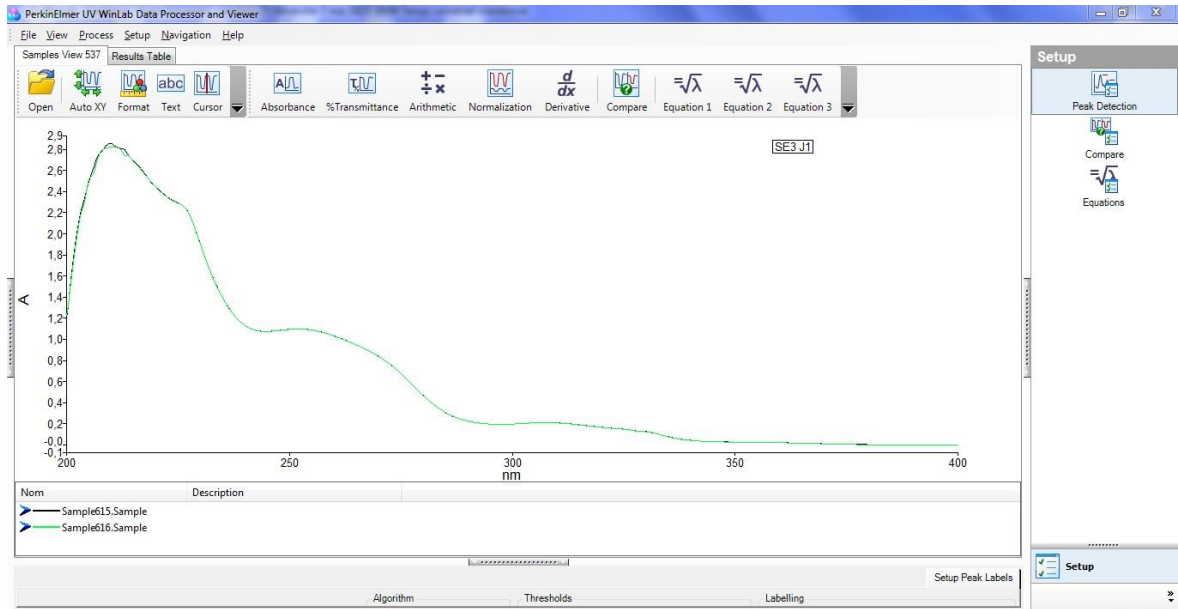
Annexe :

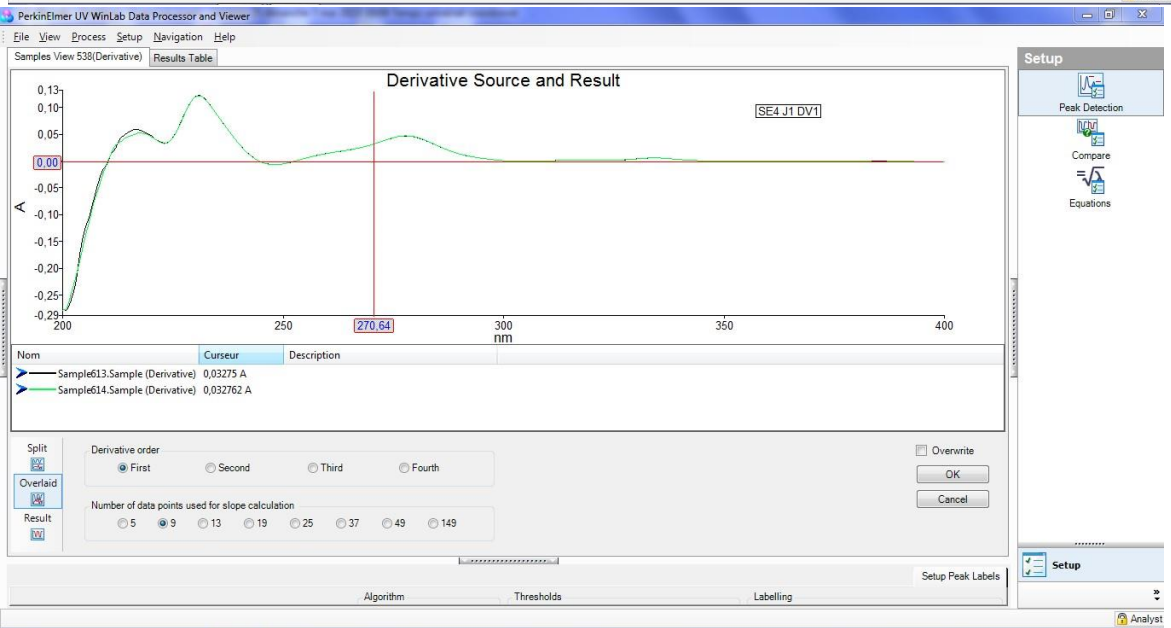
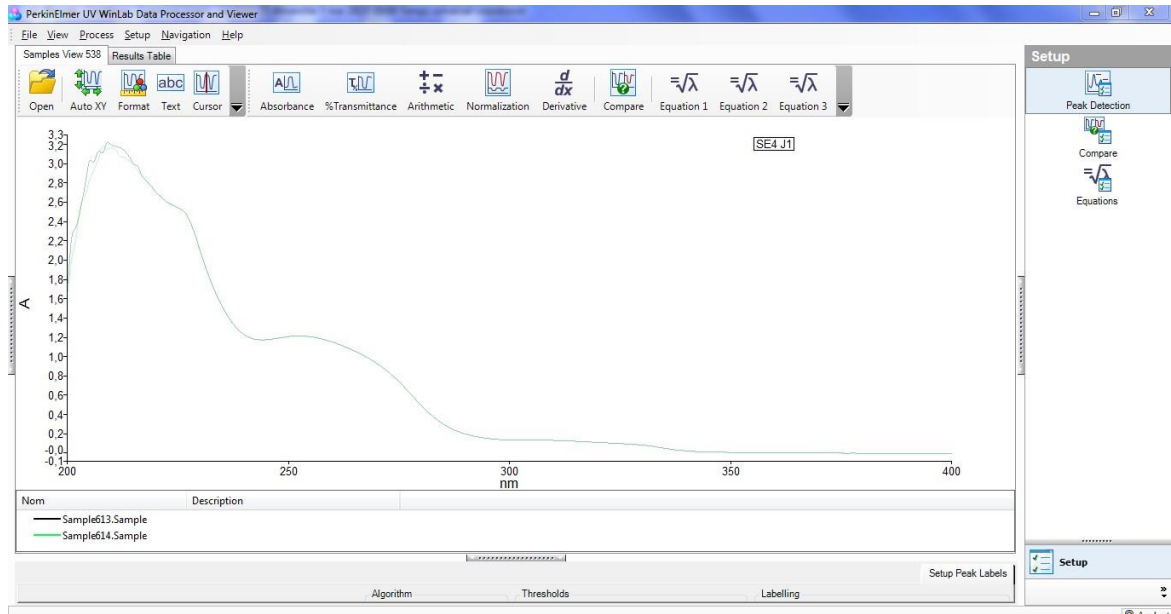


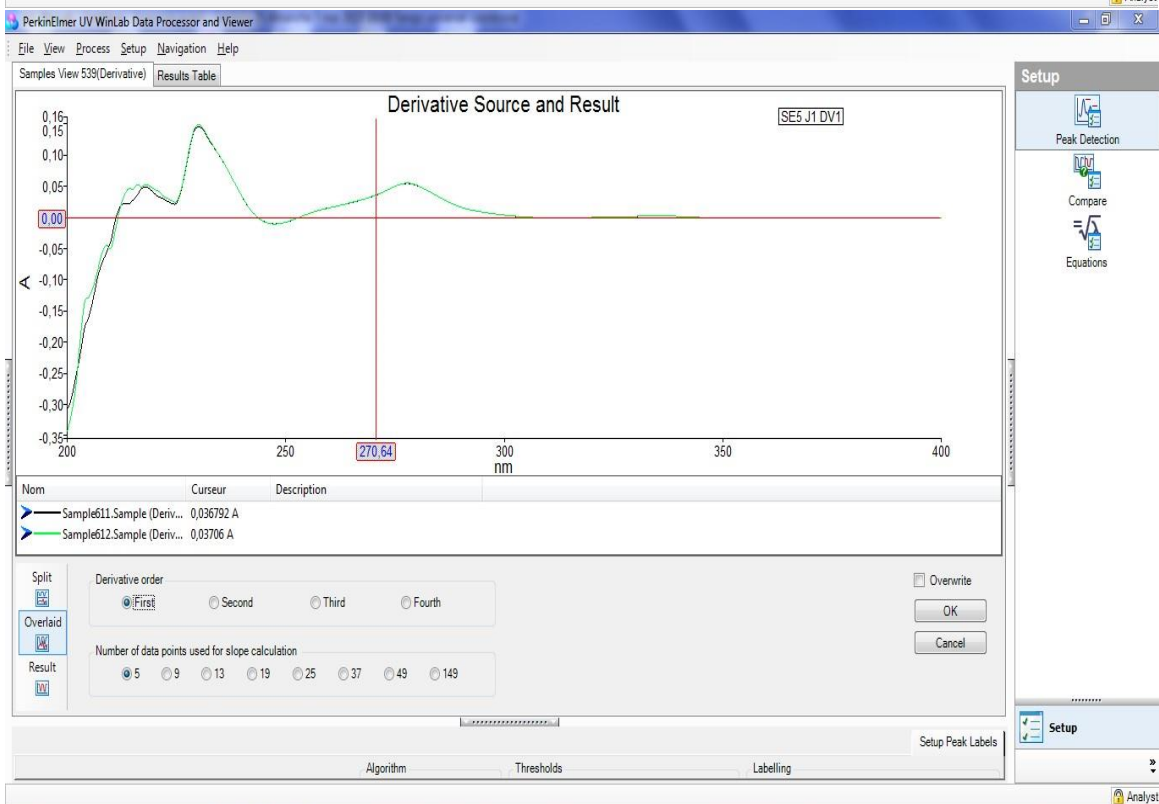
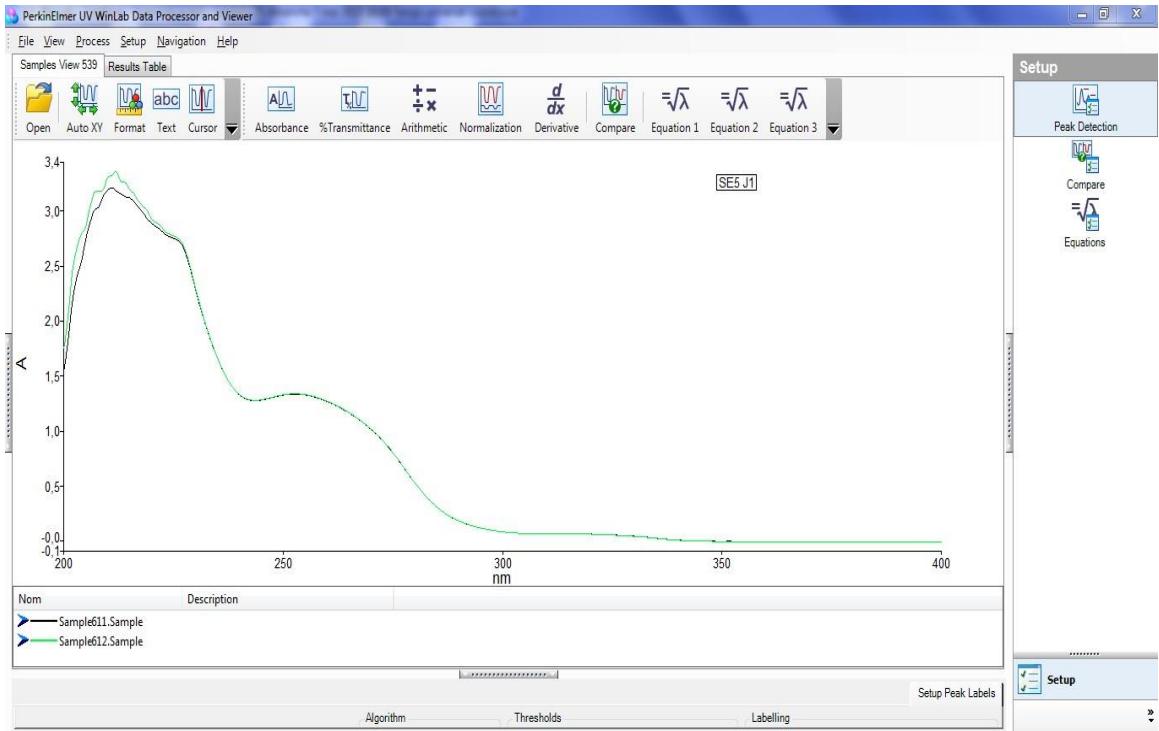
*

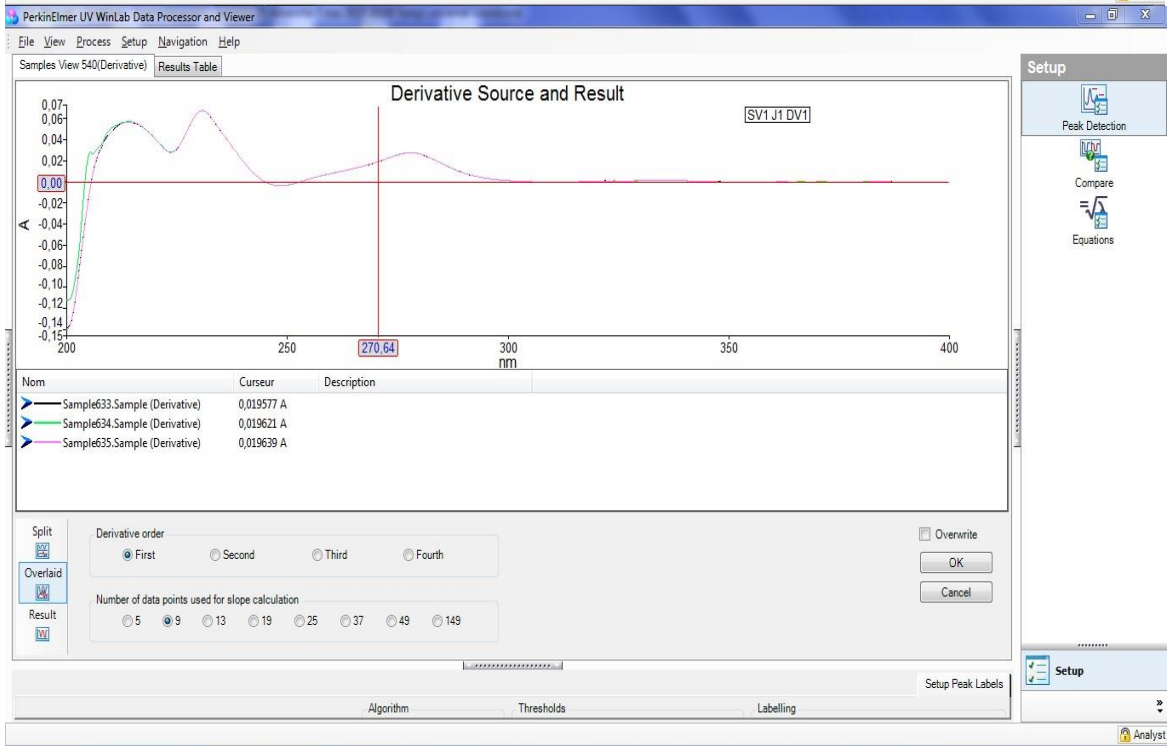
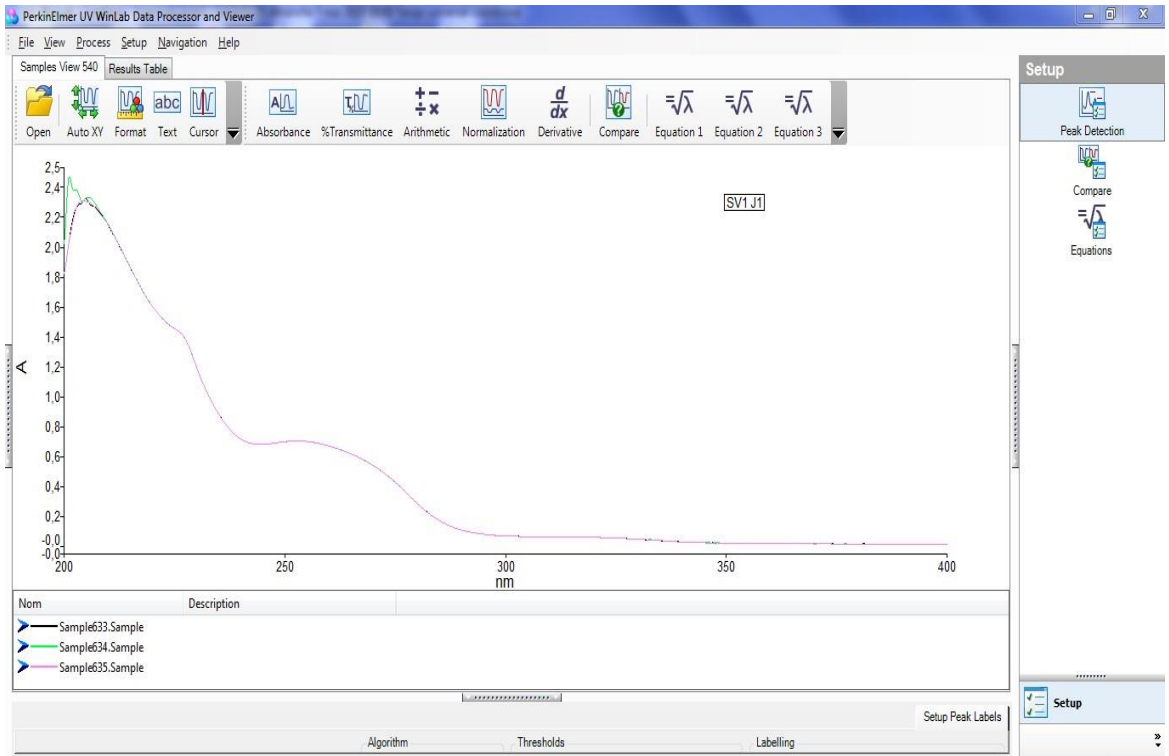


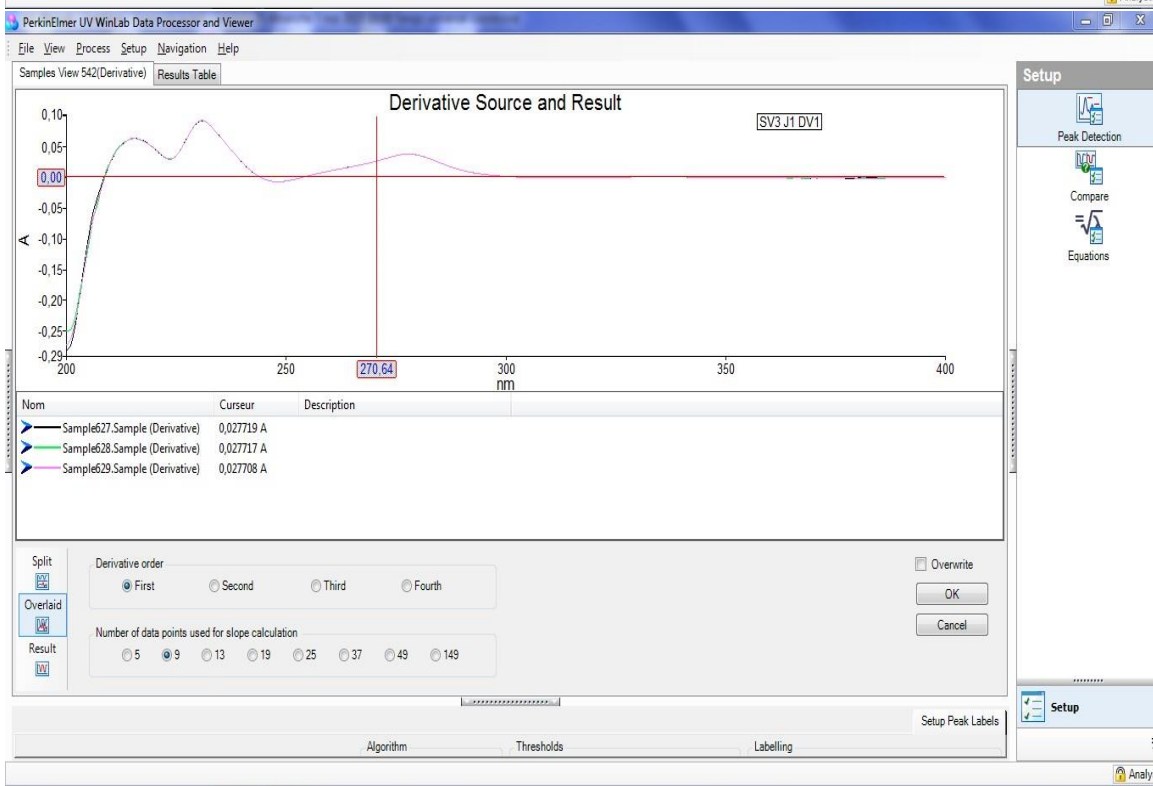
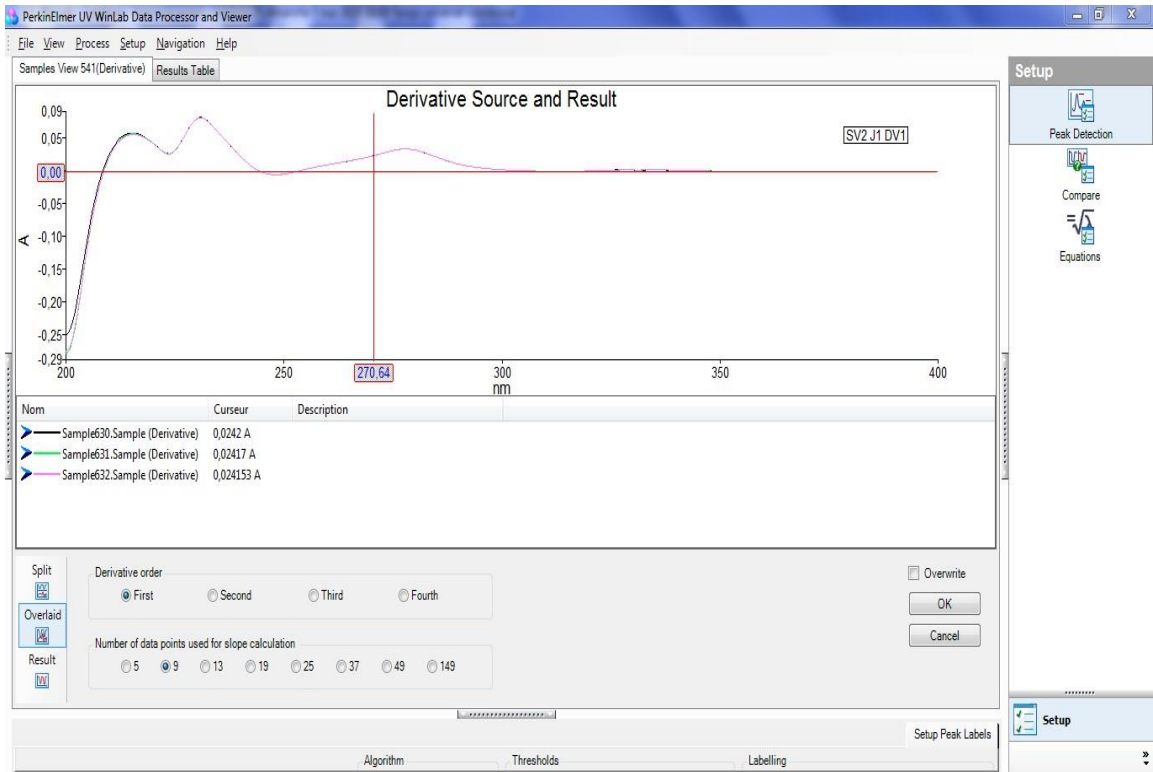


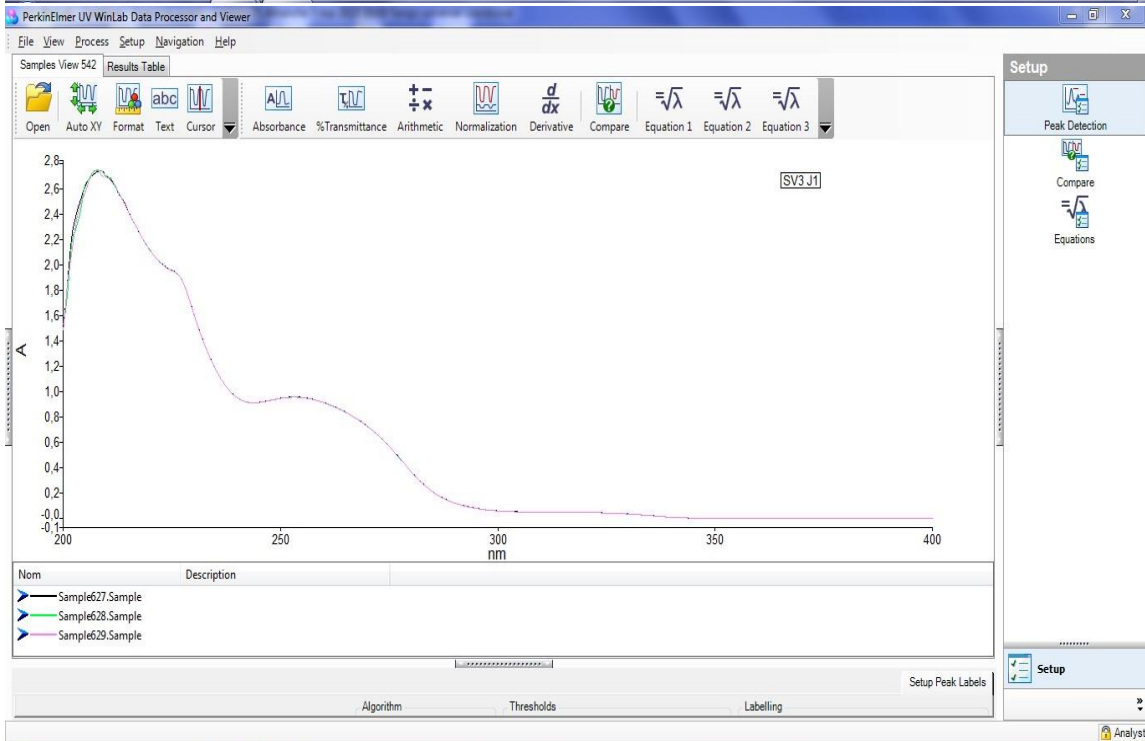
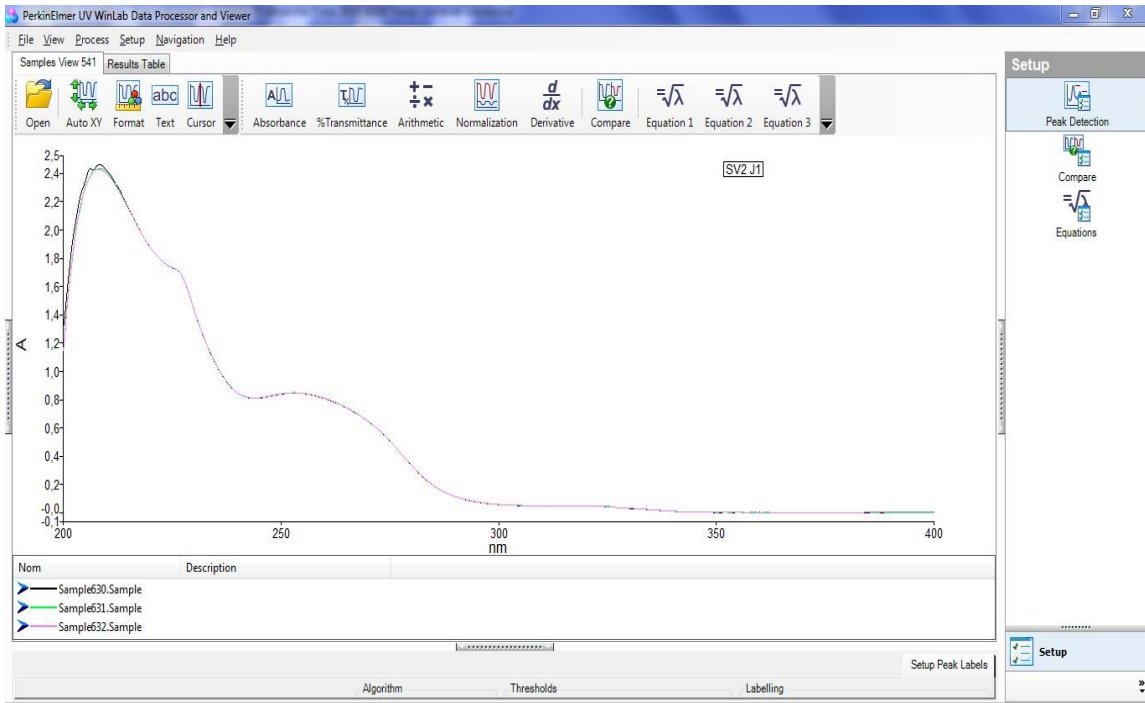


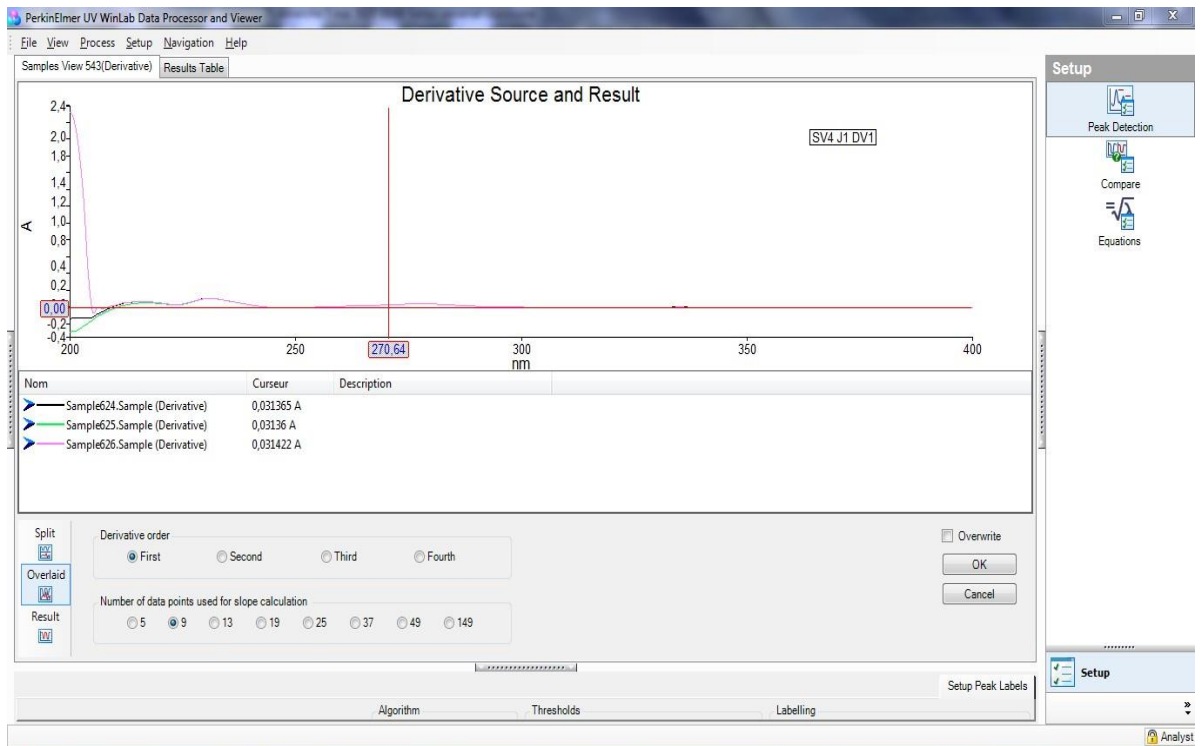
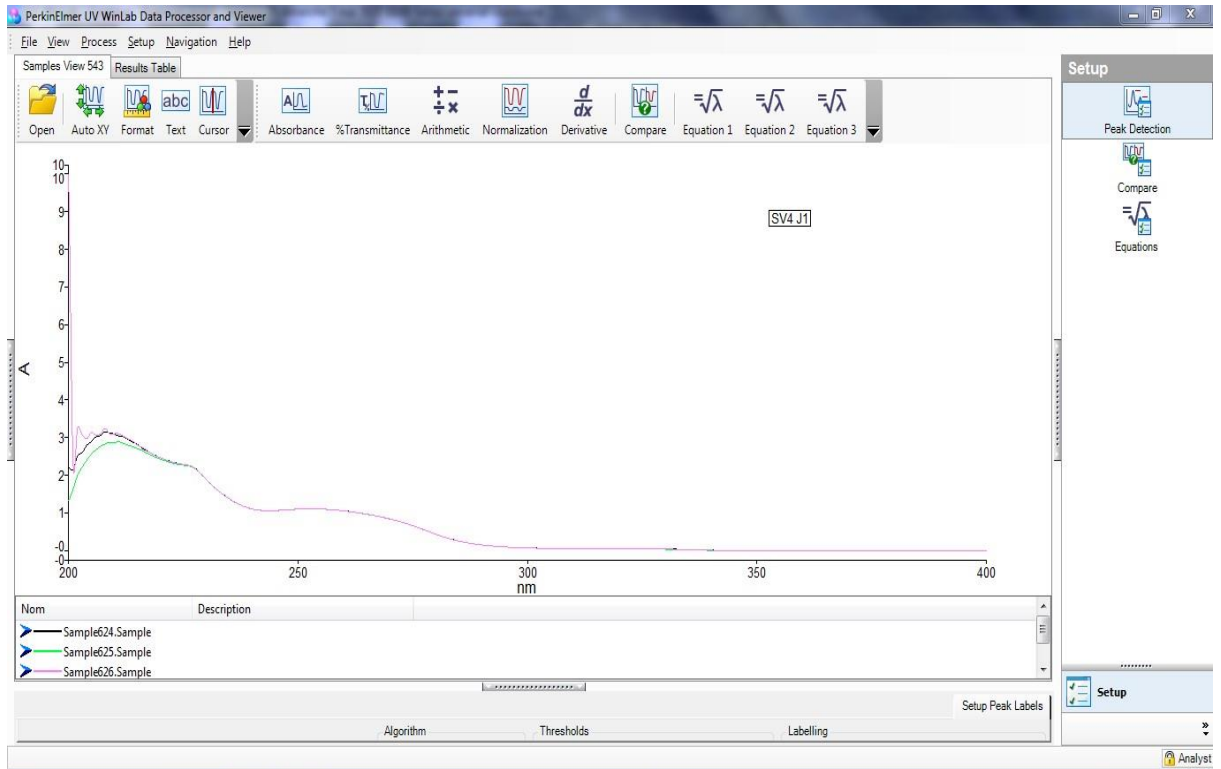


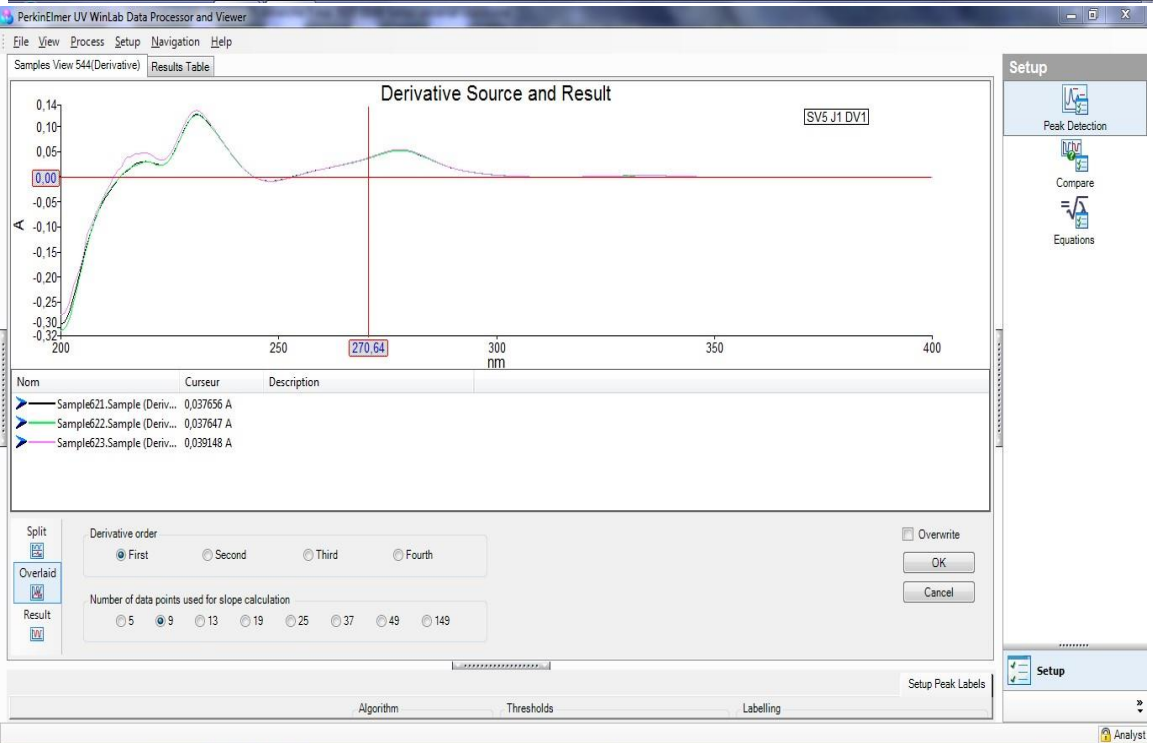
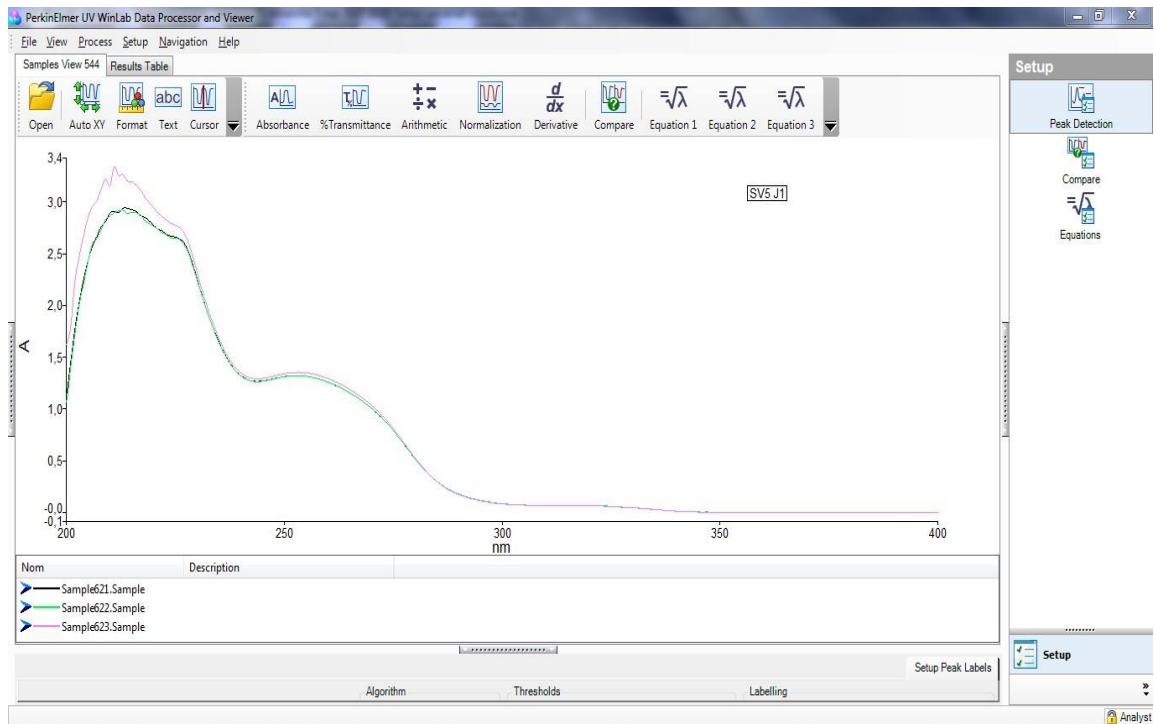


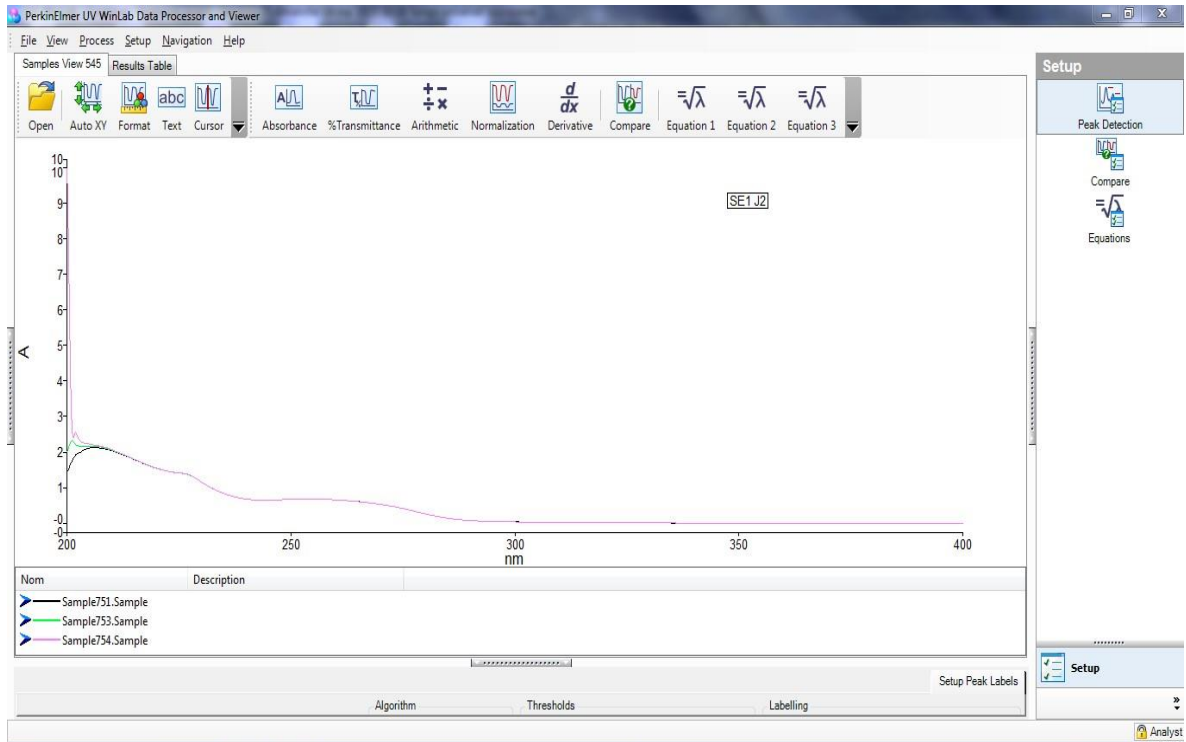


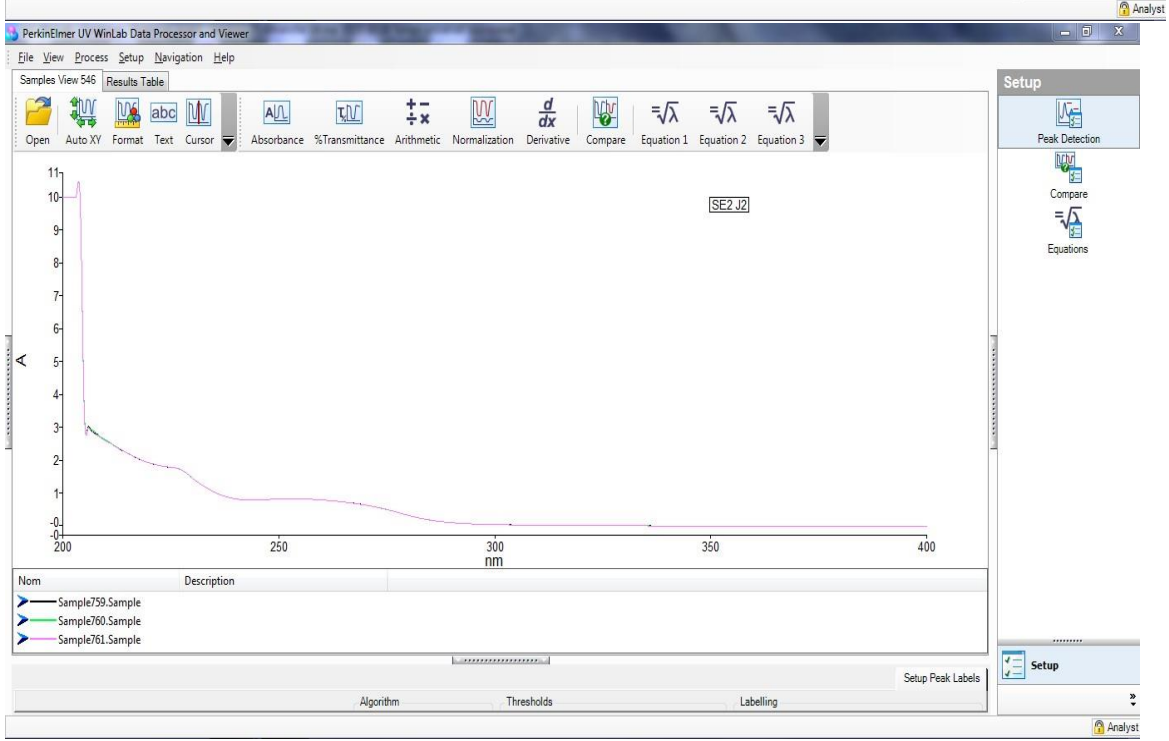
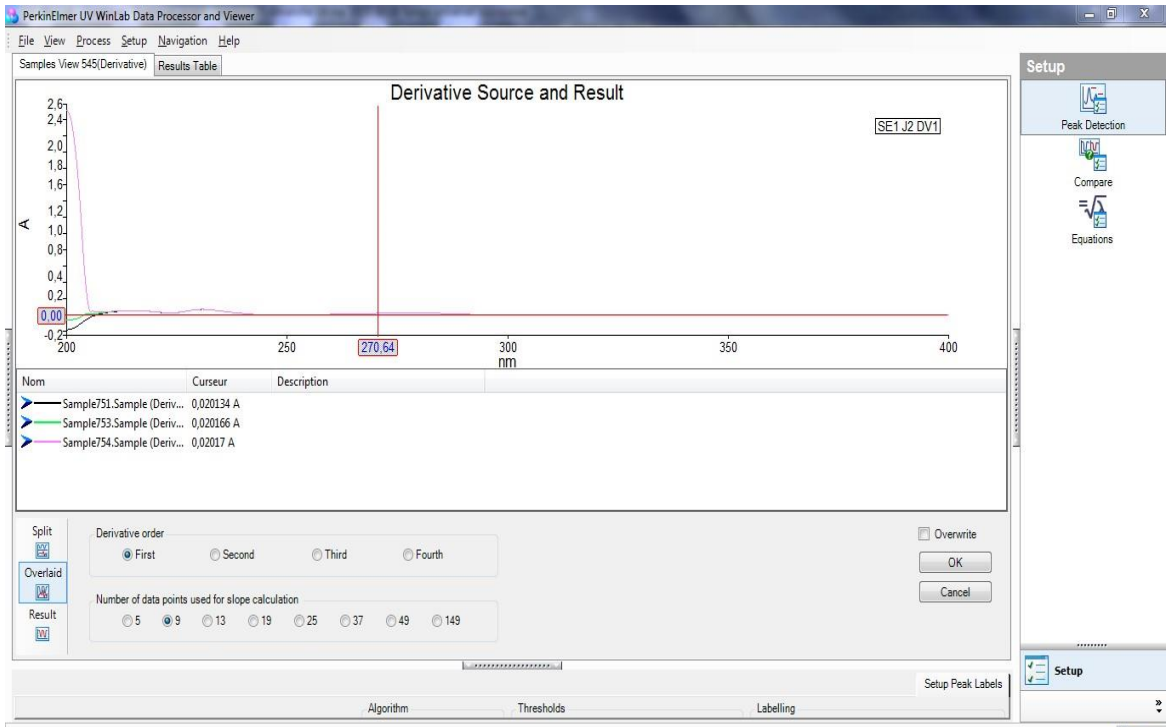


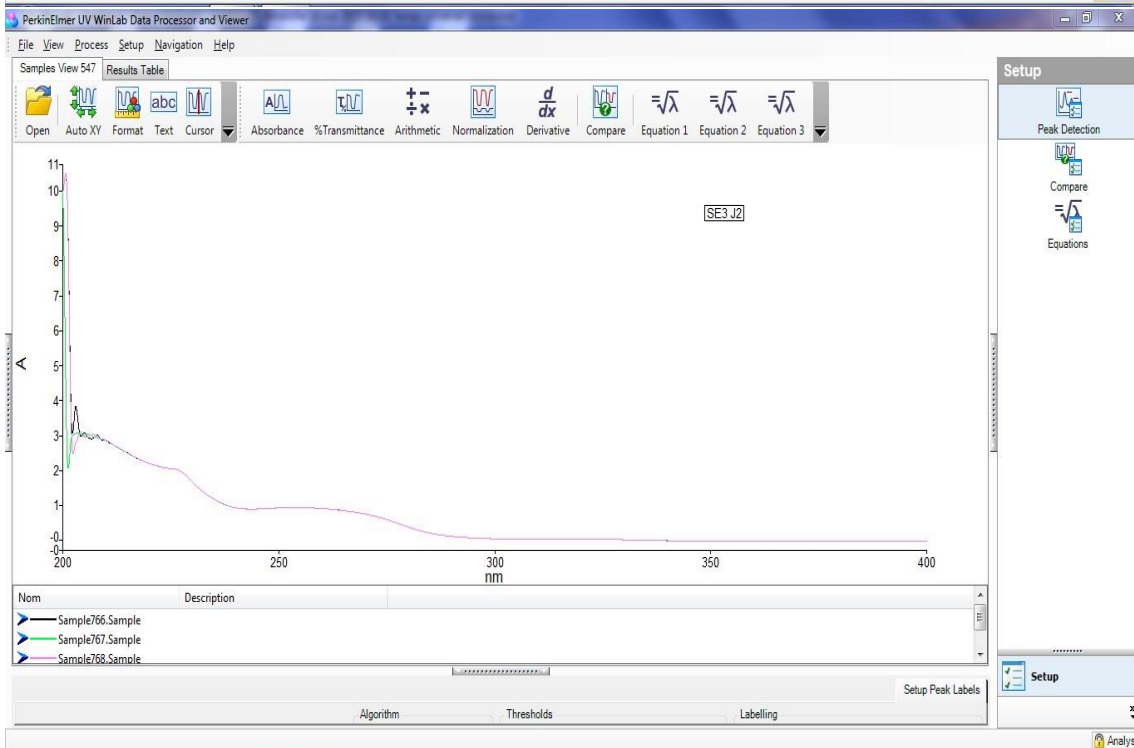
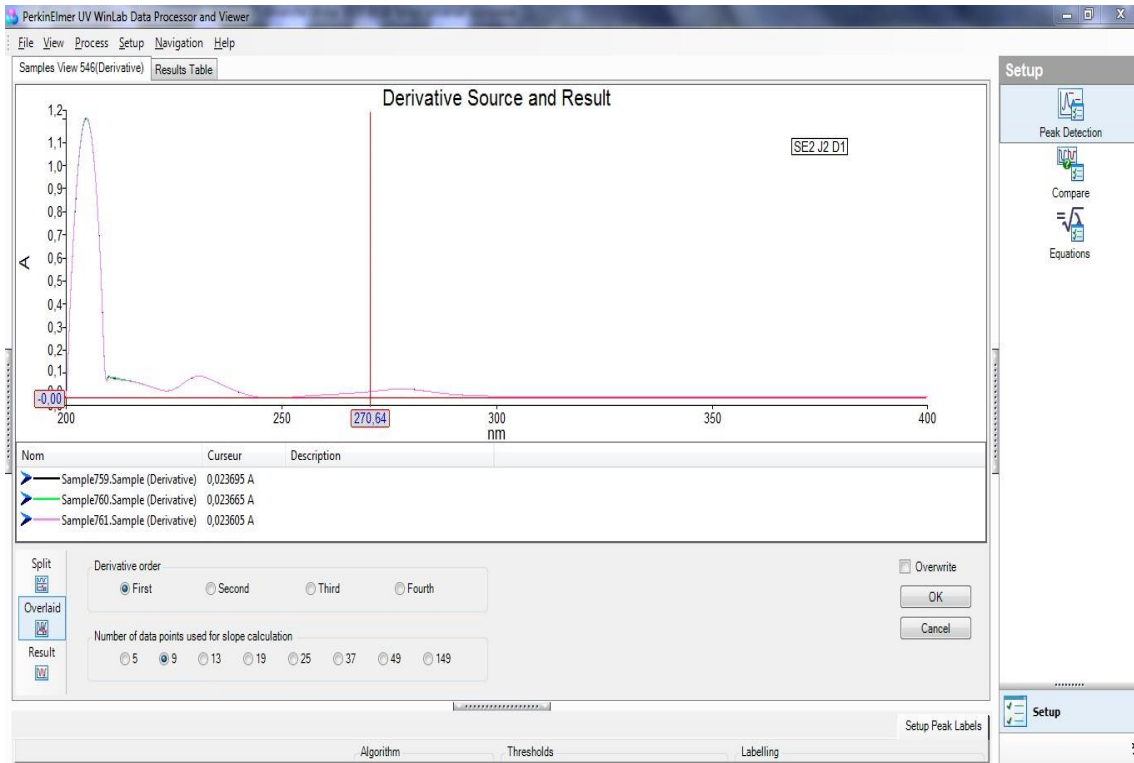


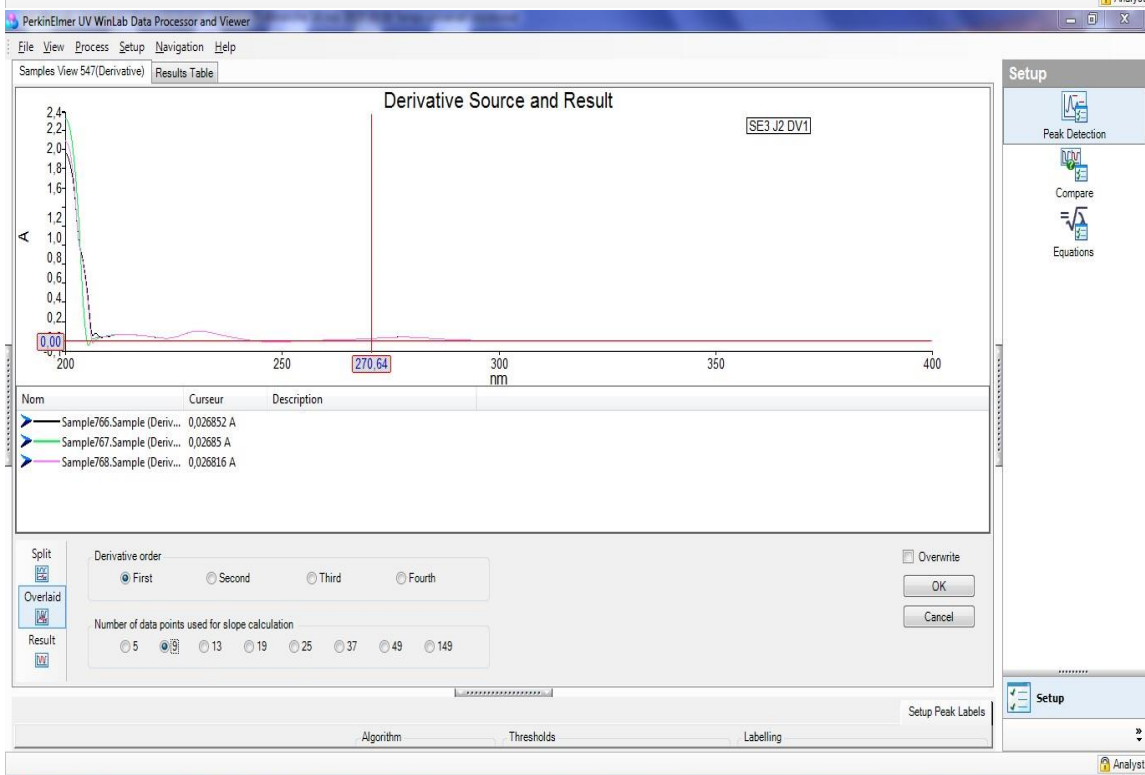
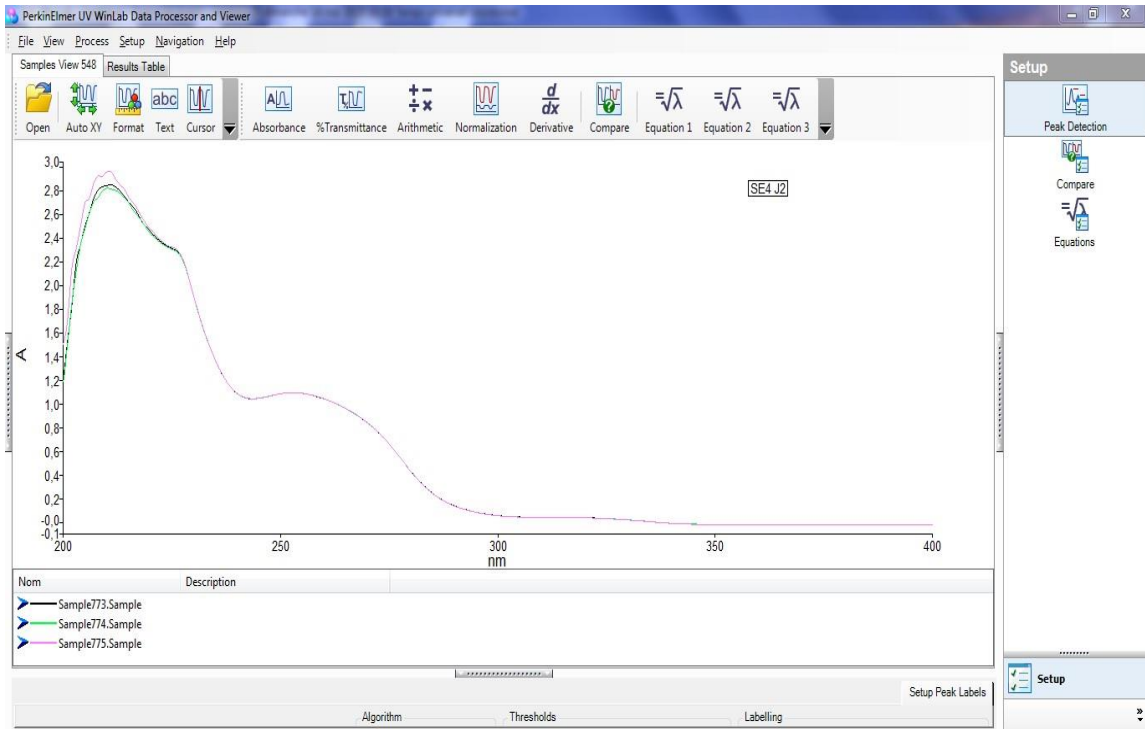


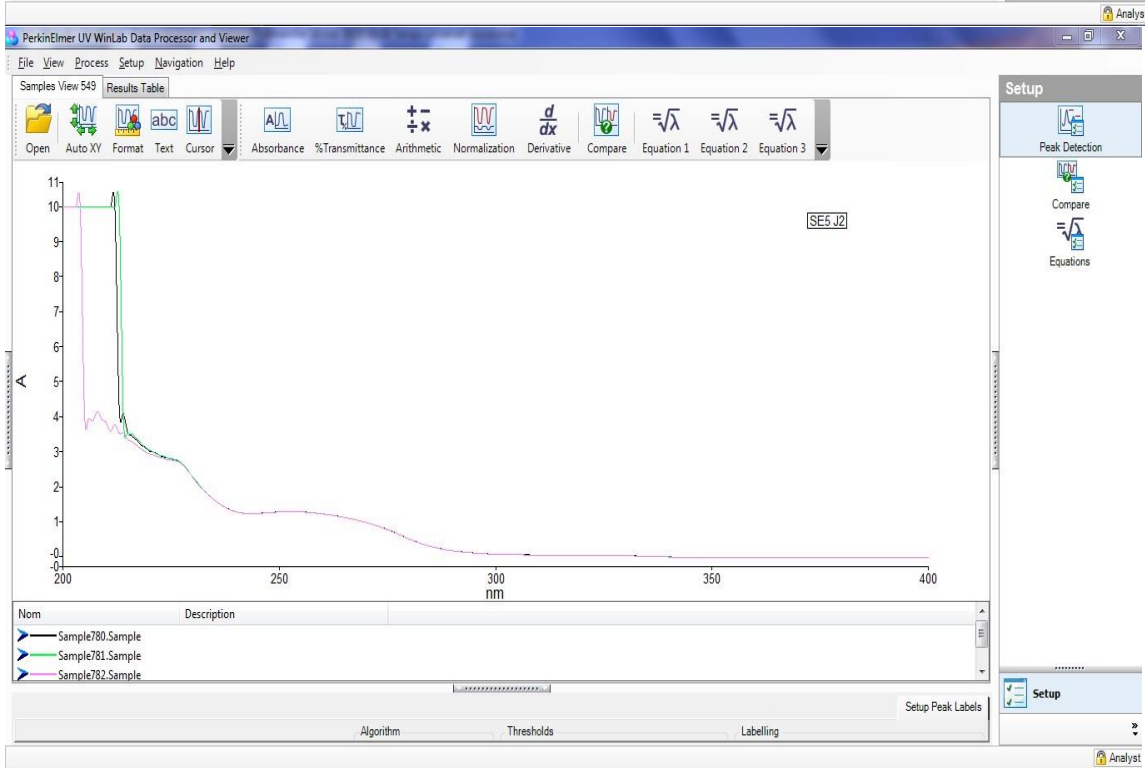
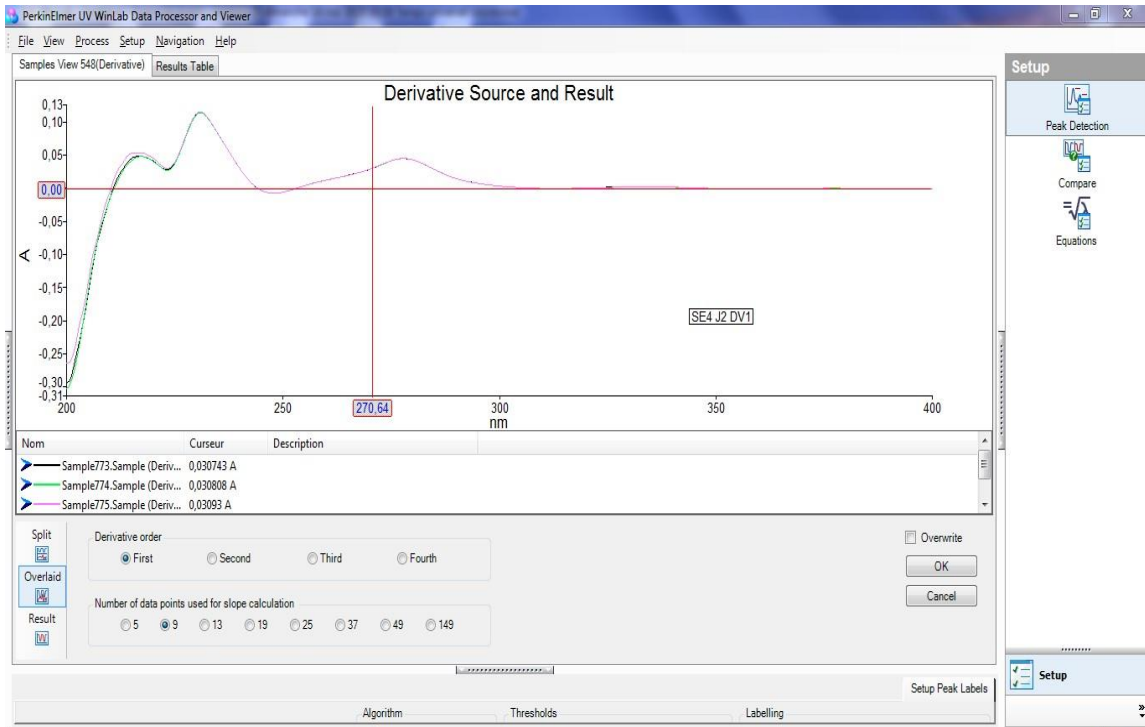


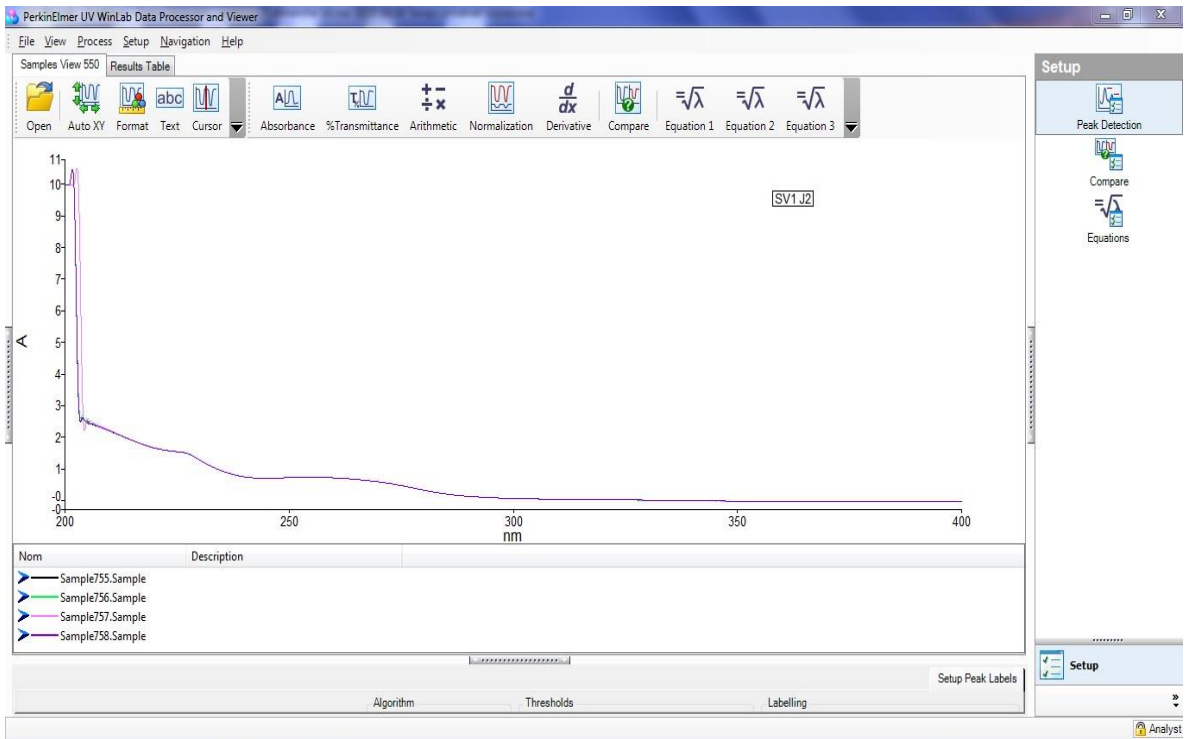
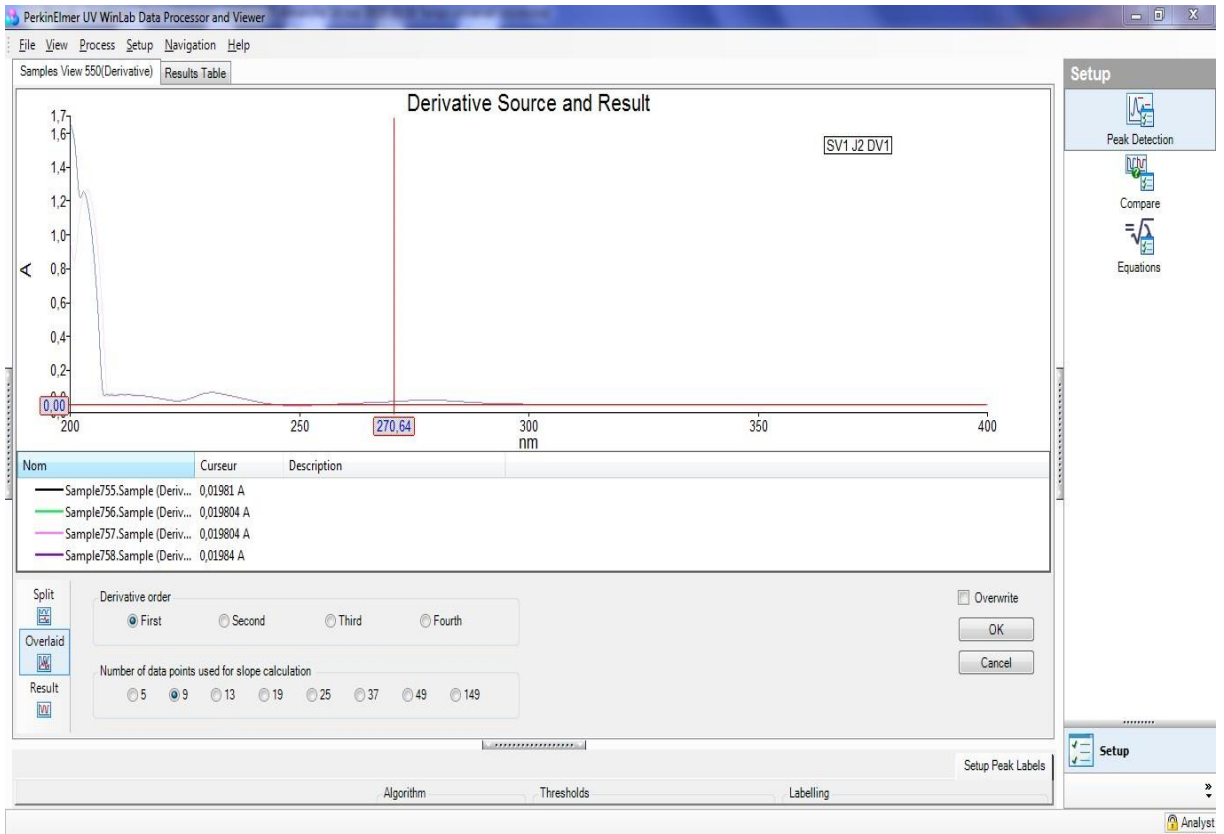


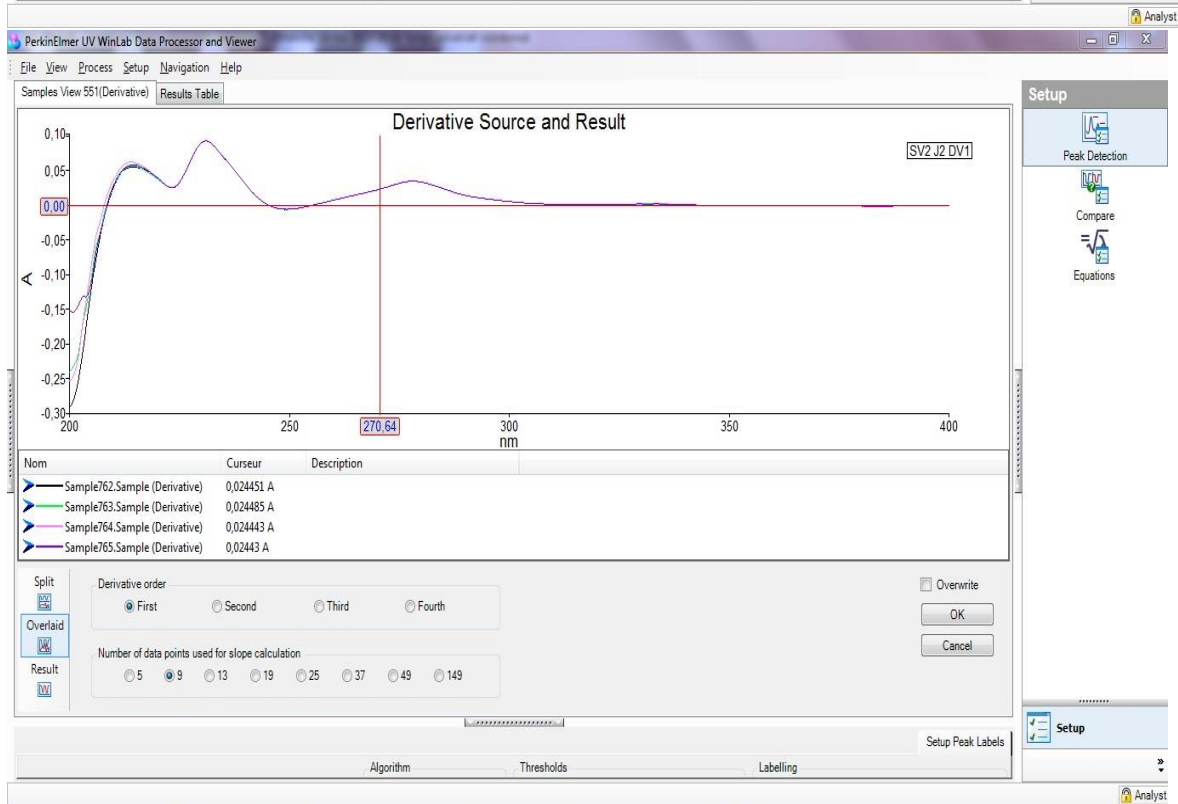
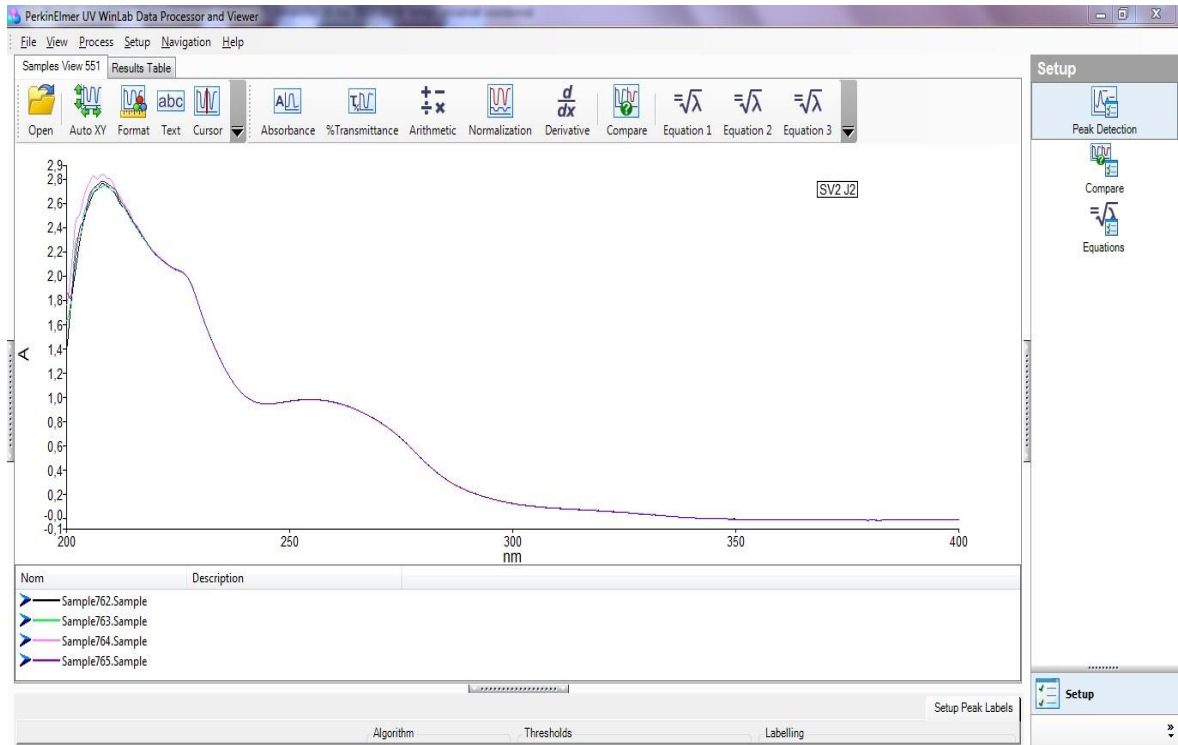


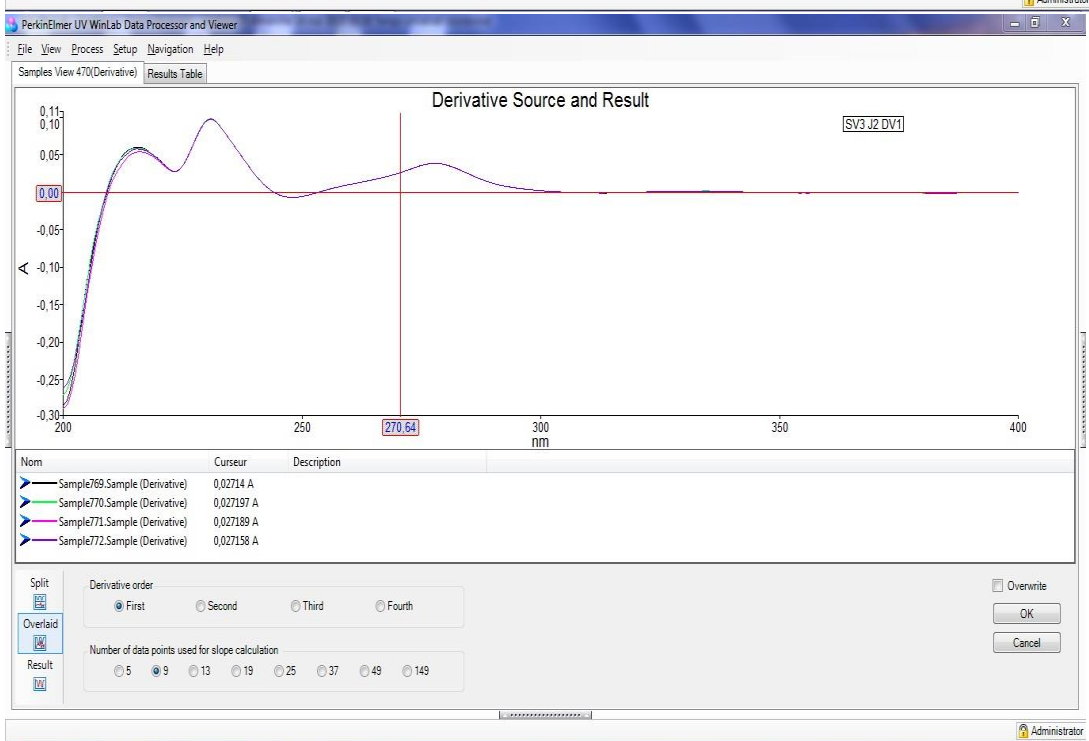
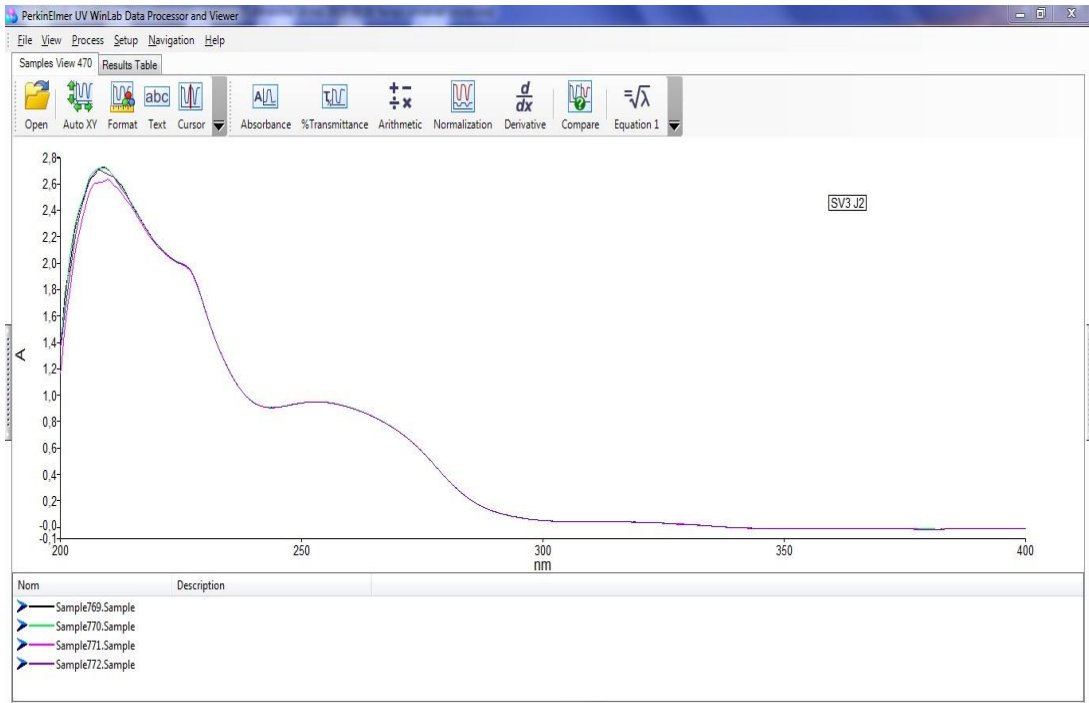


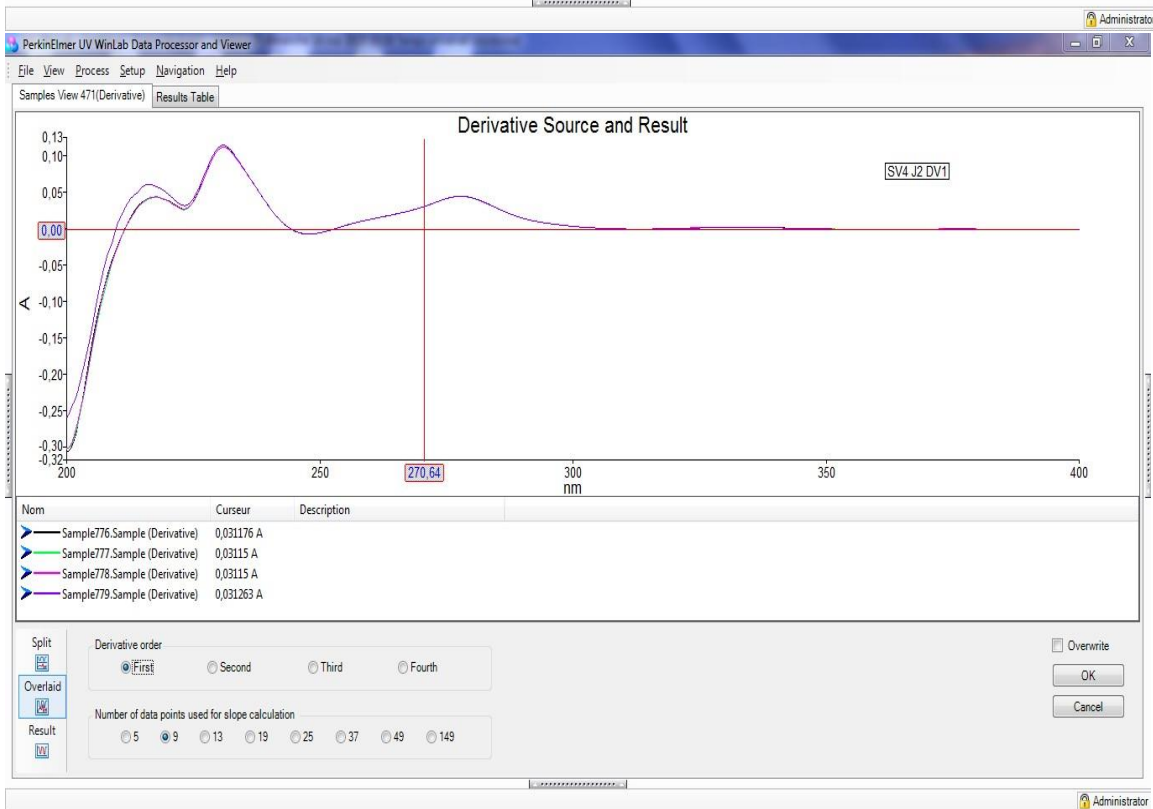
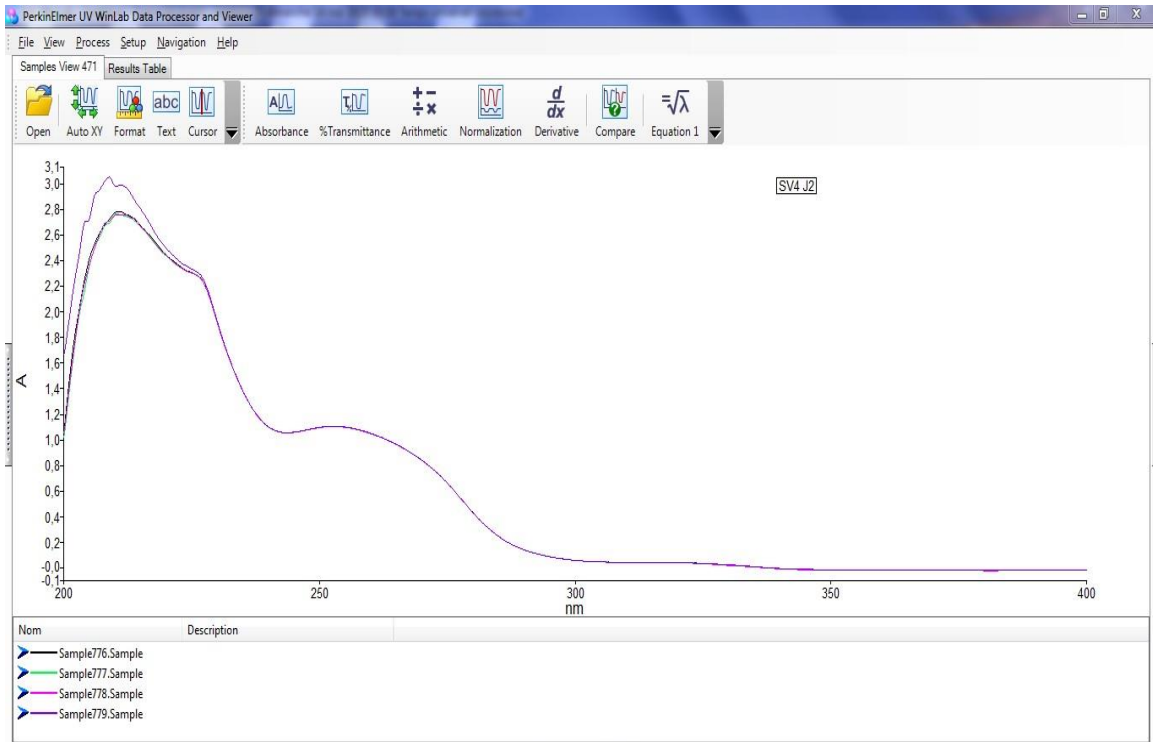


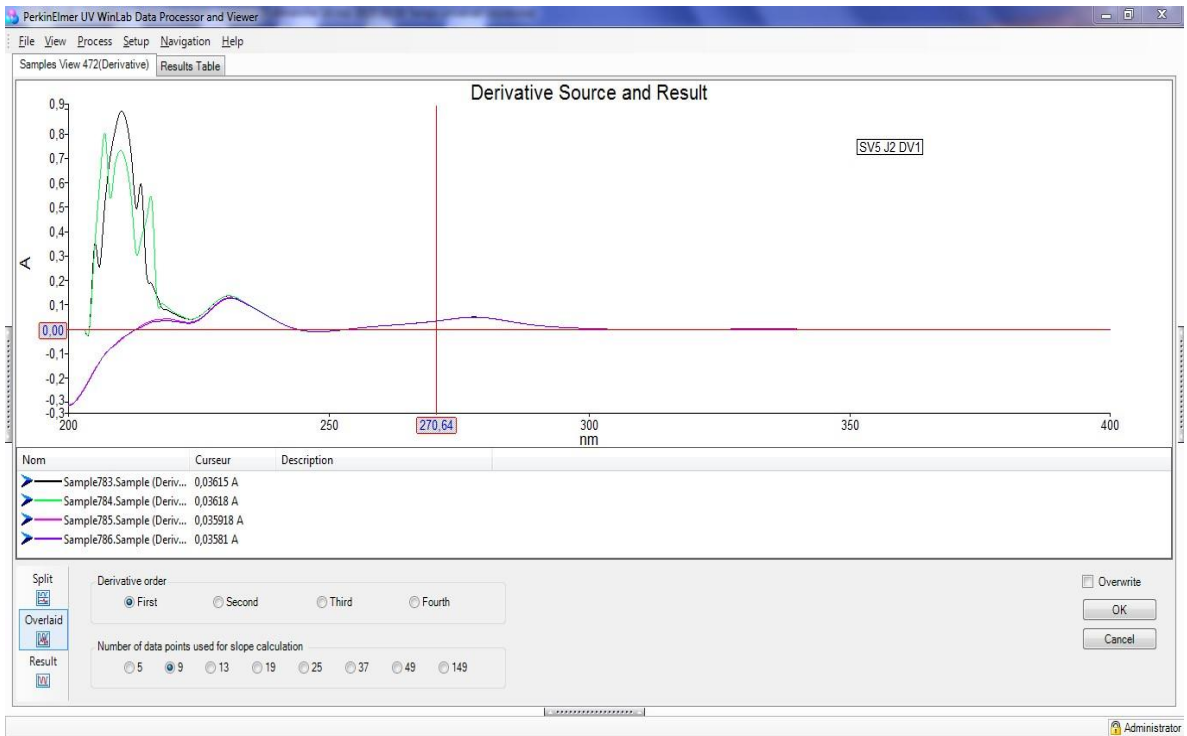
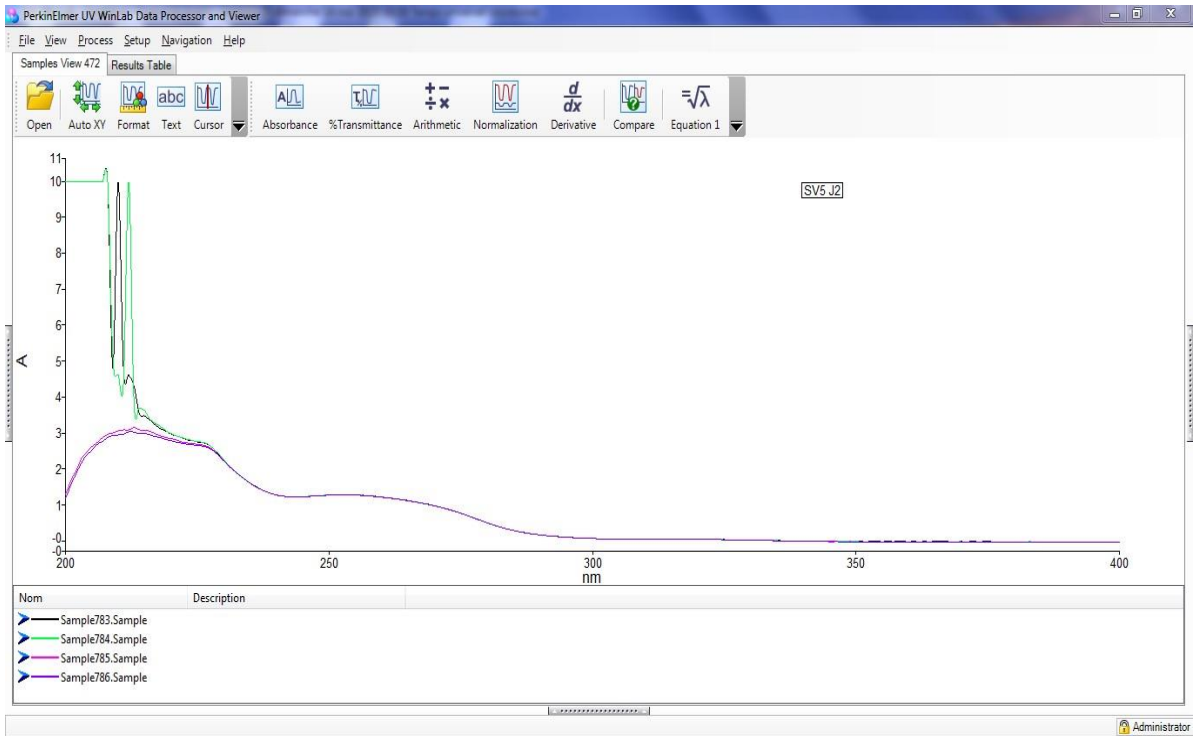


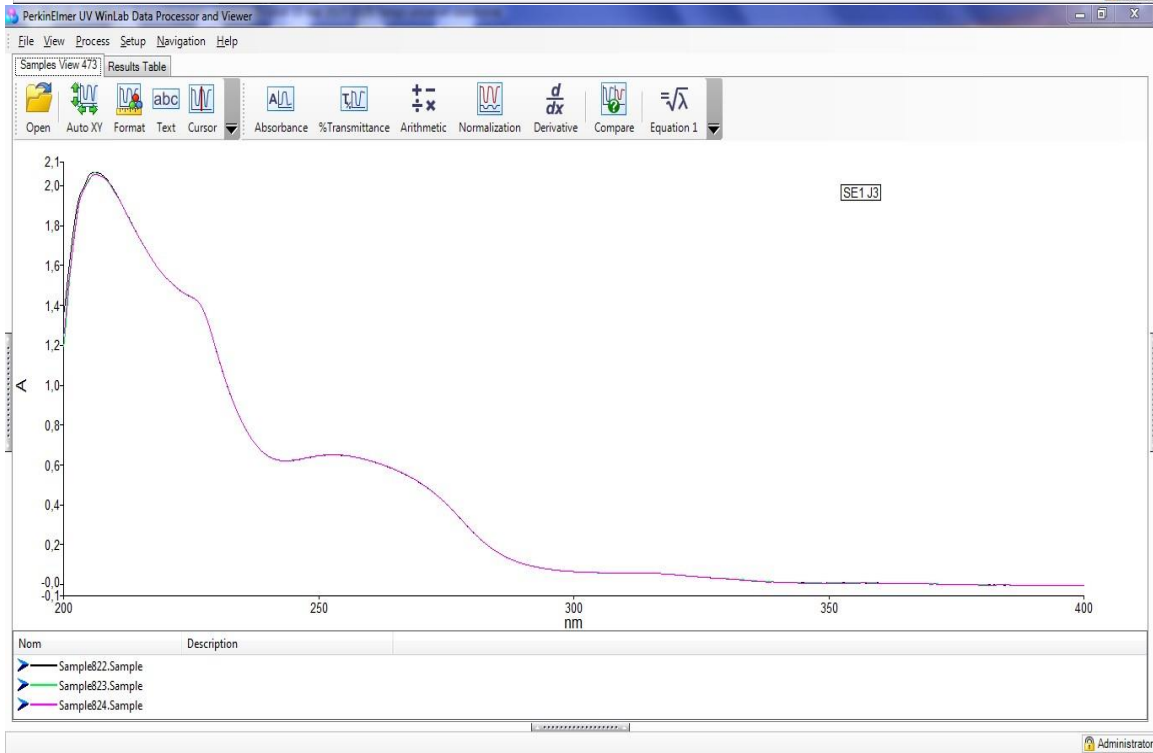
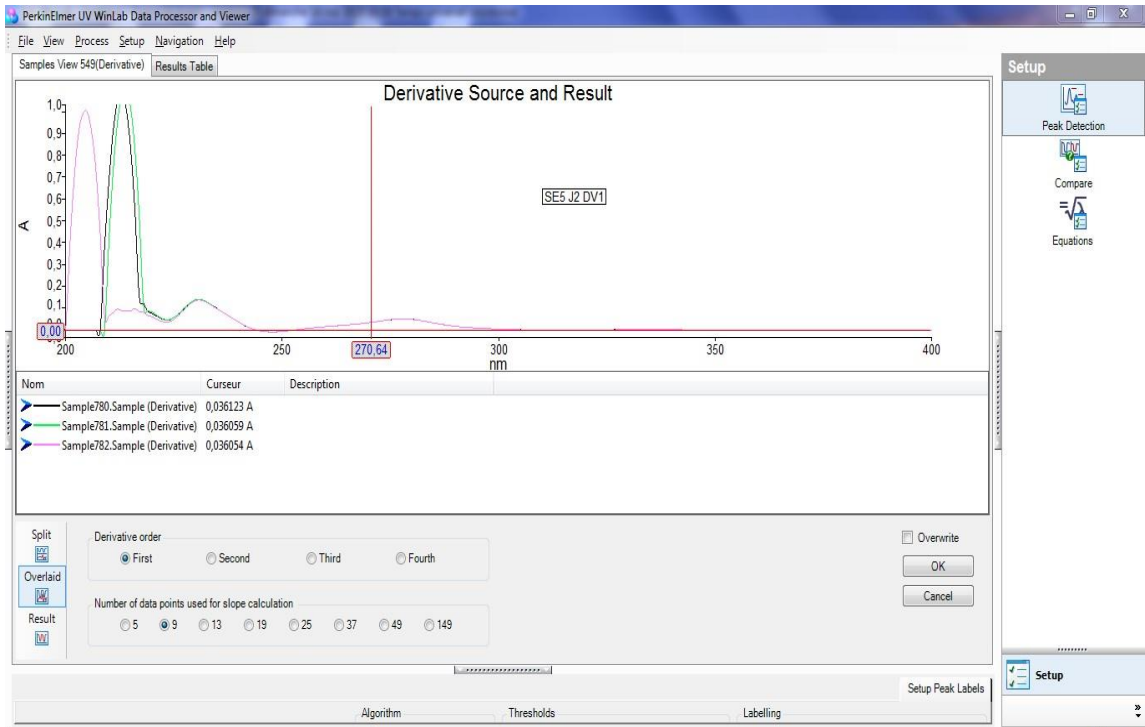


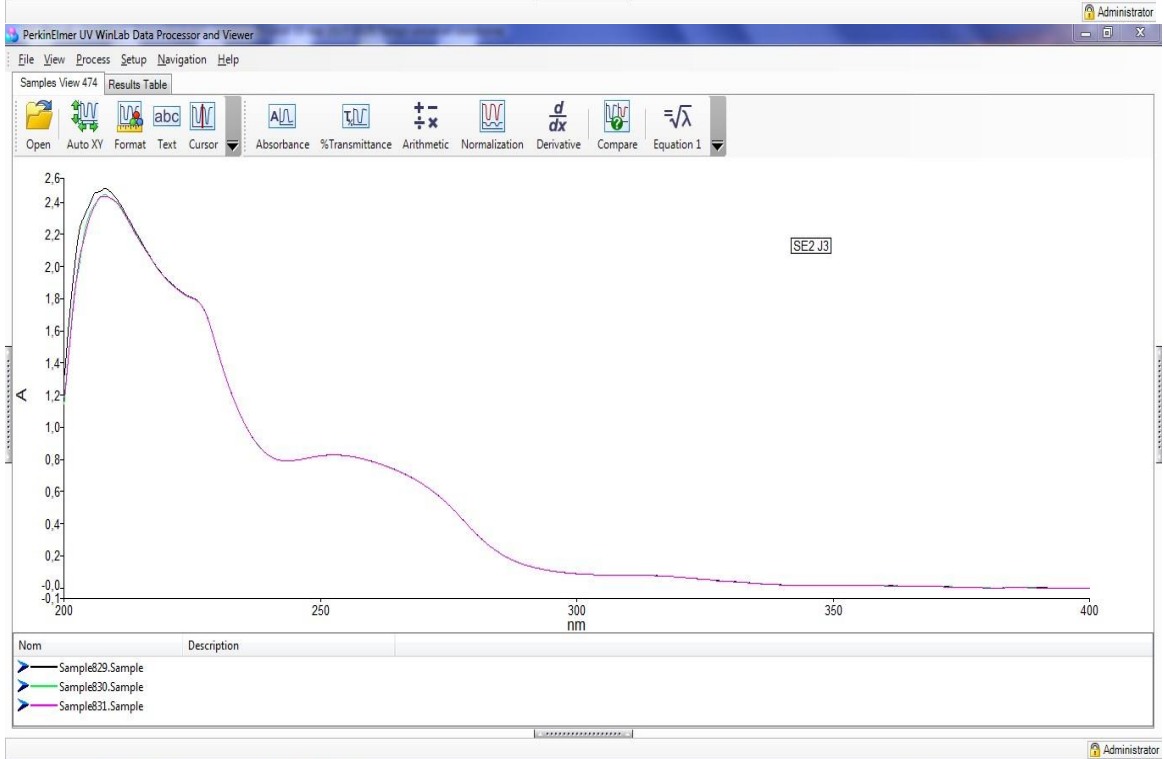
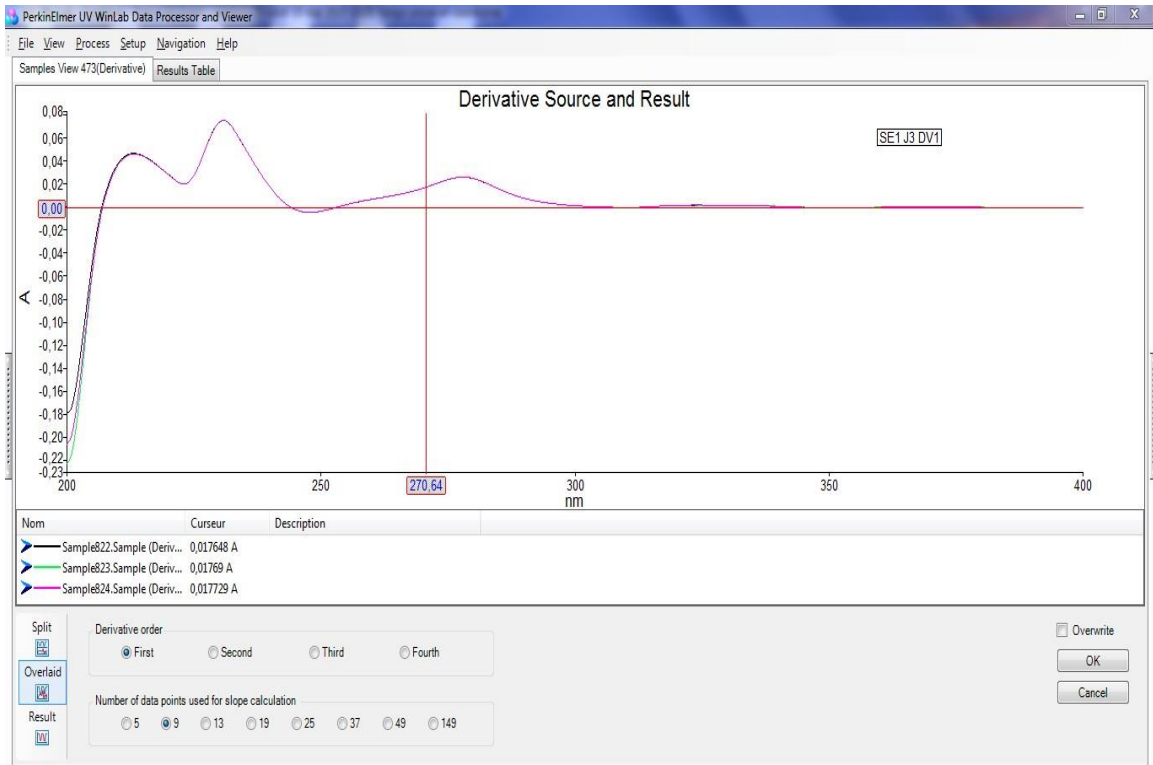


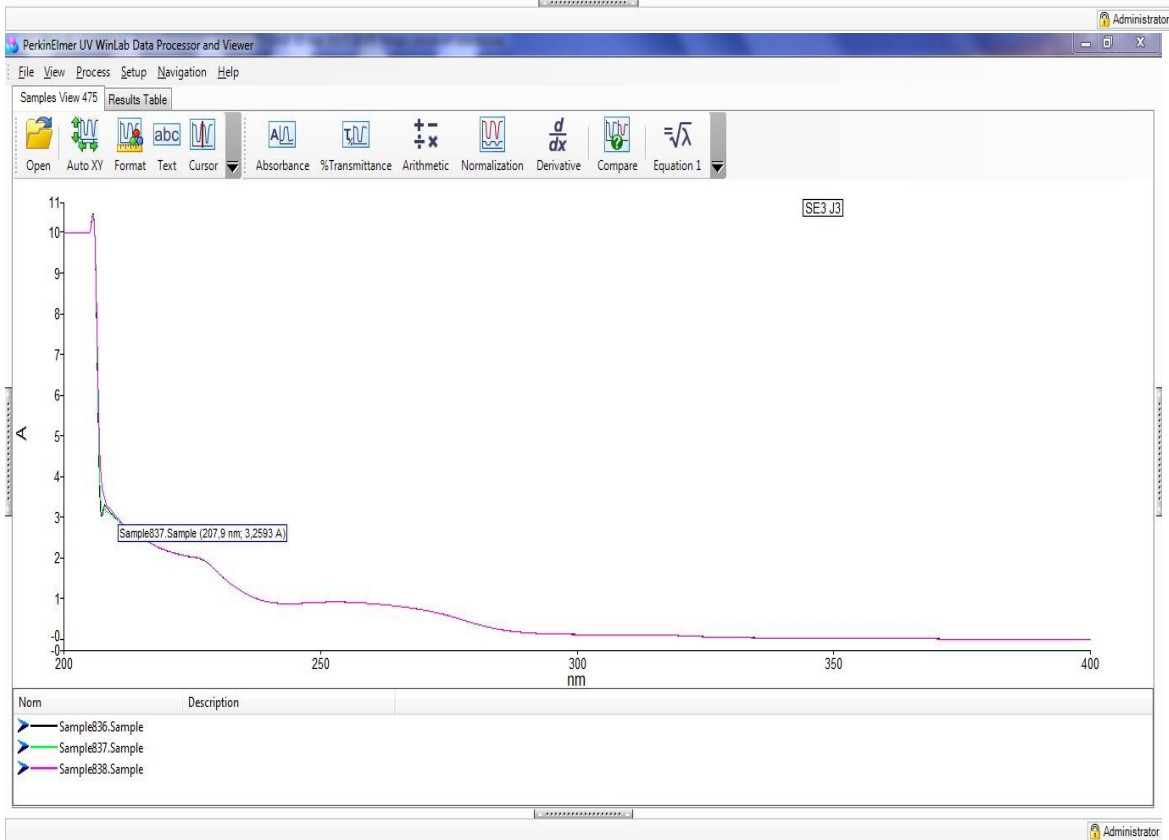


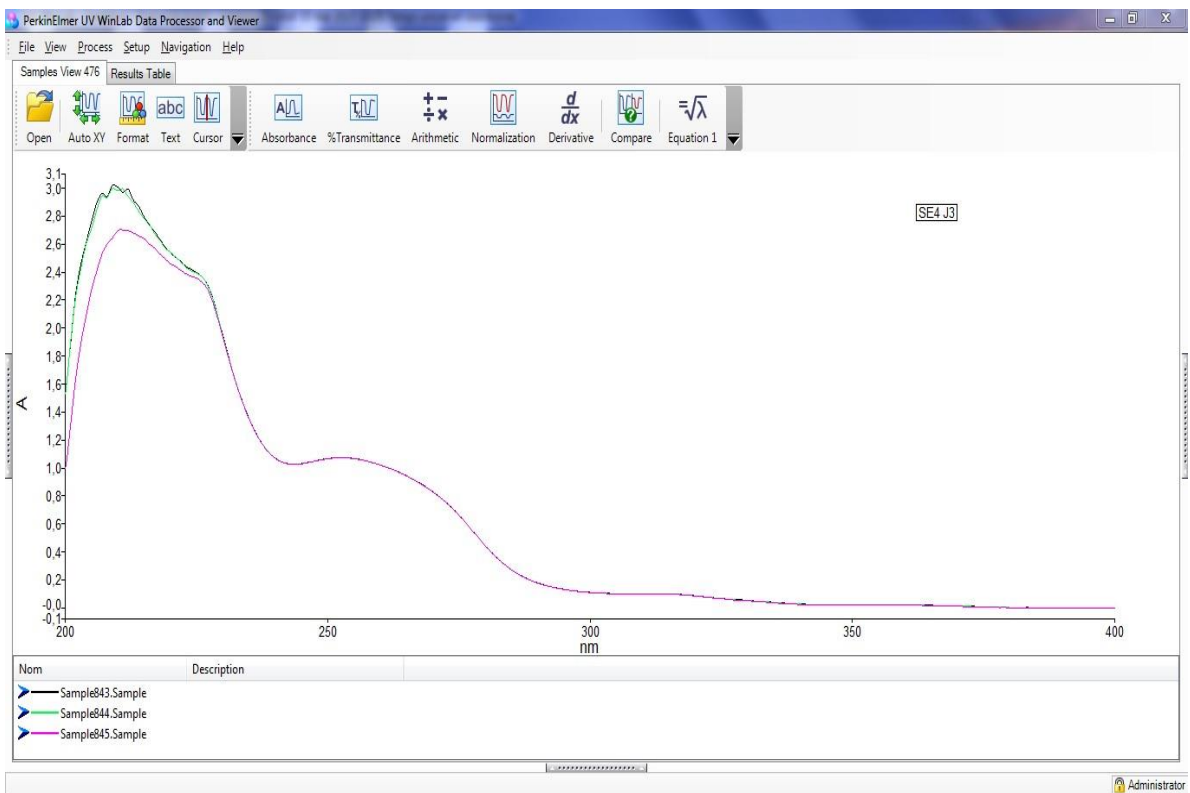


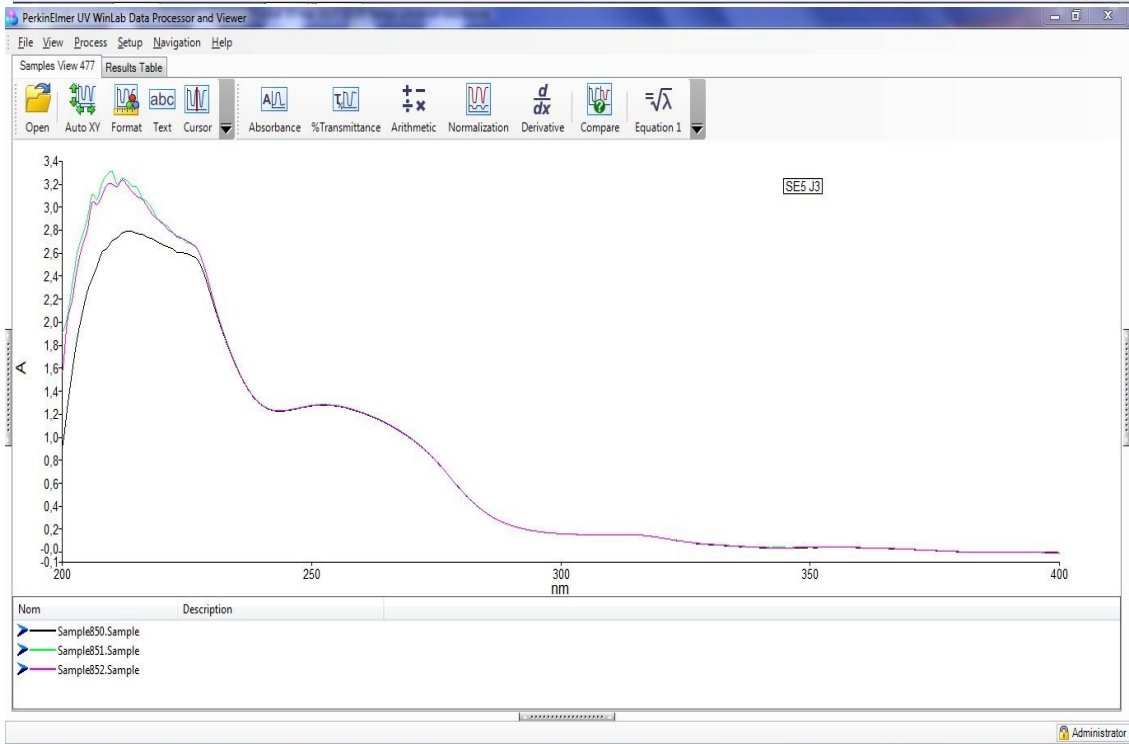
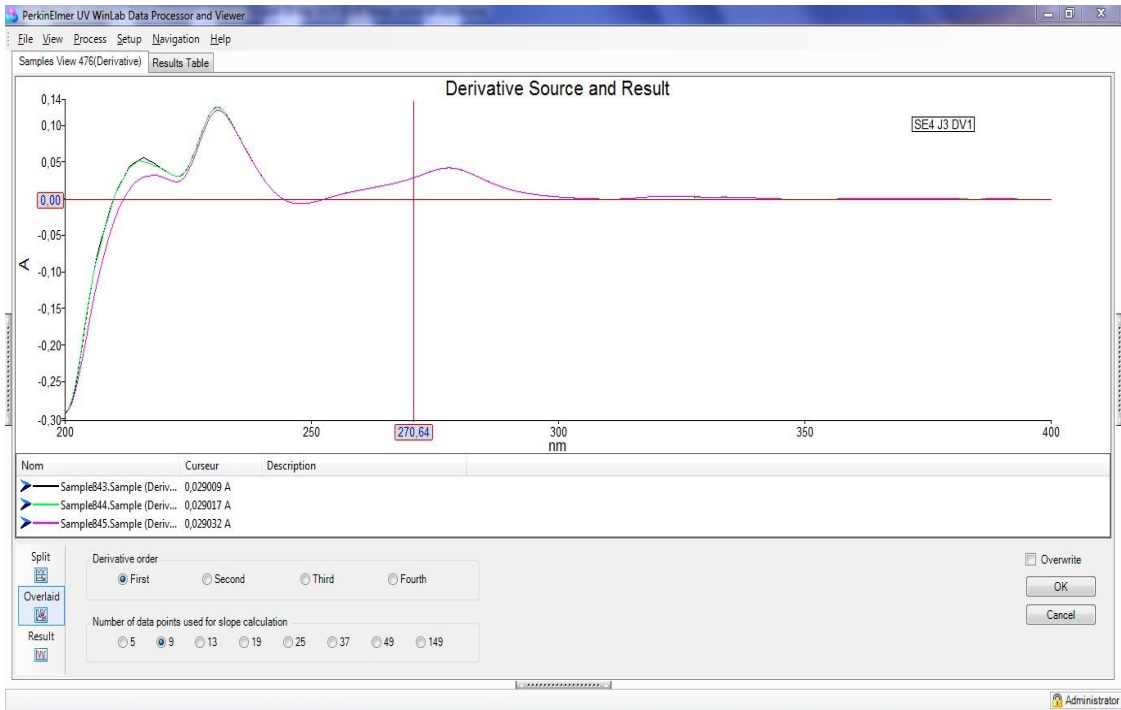


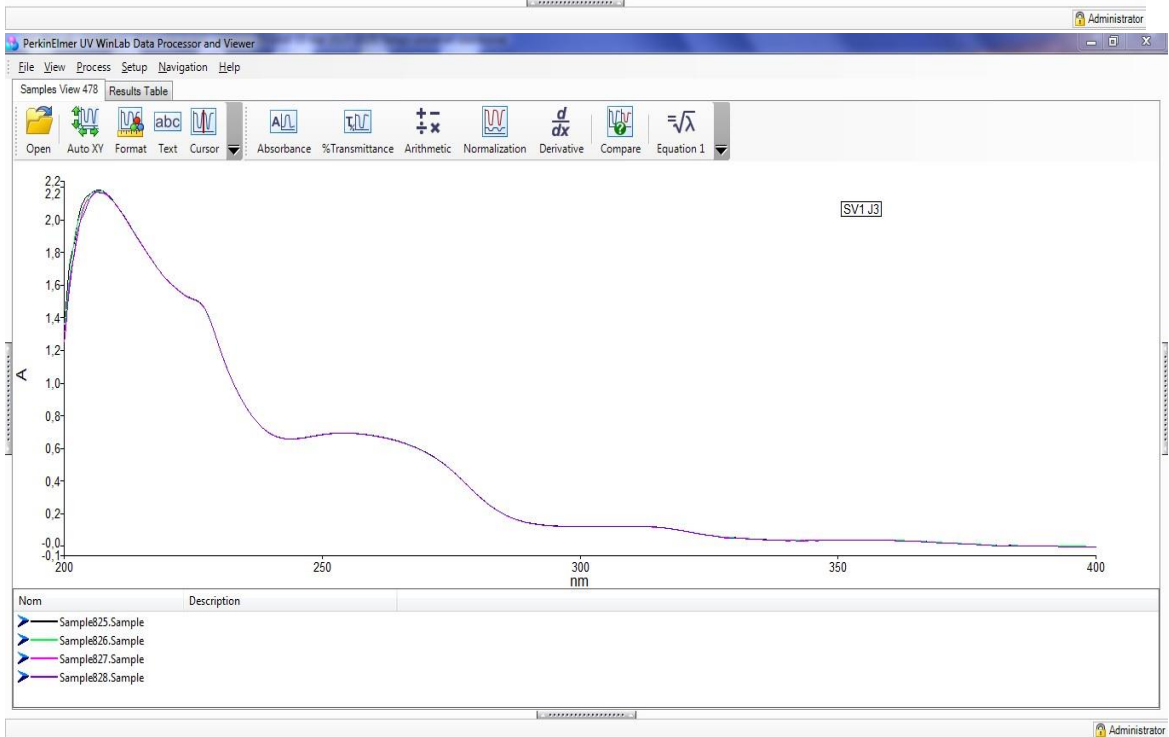
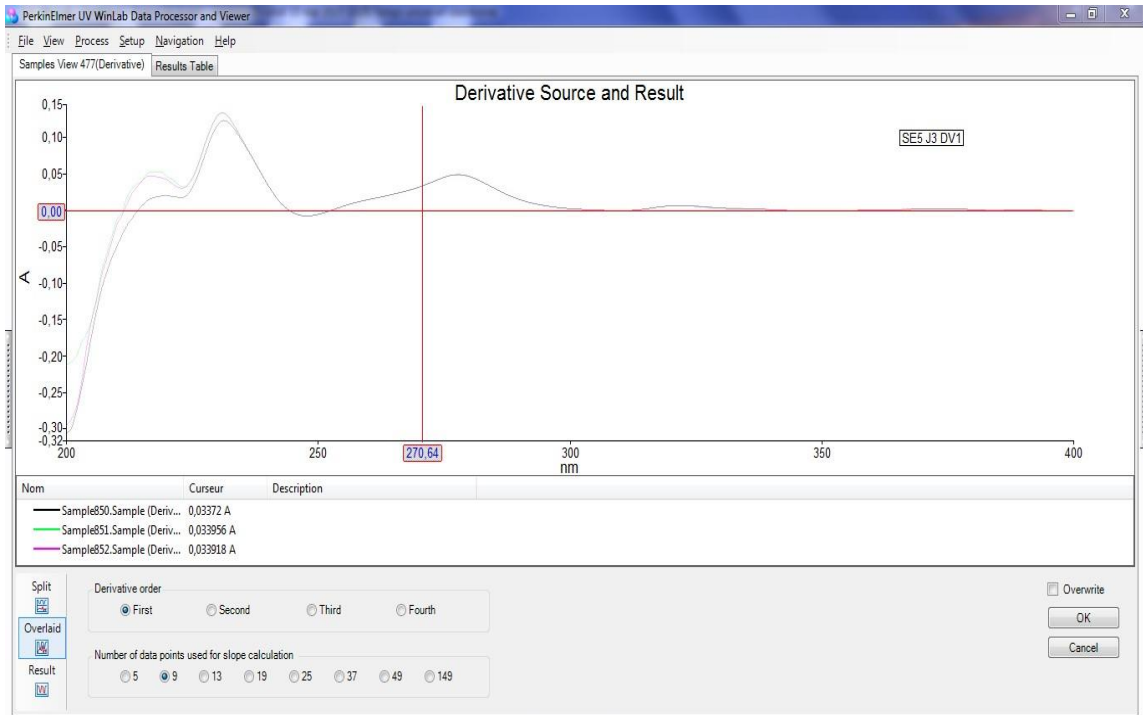


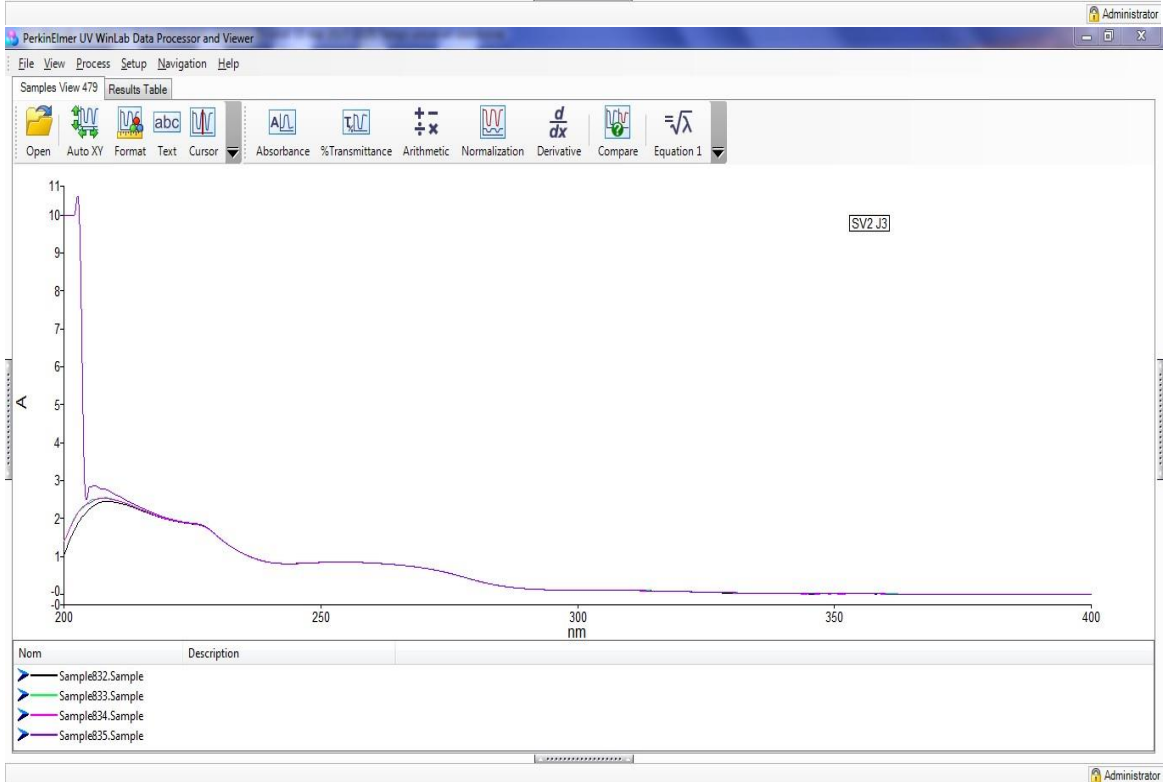
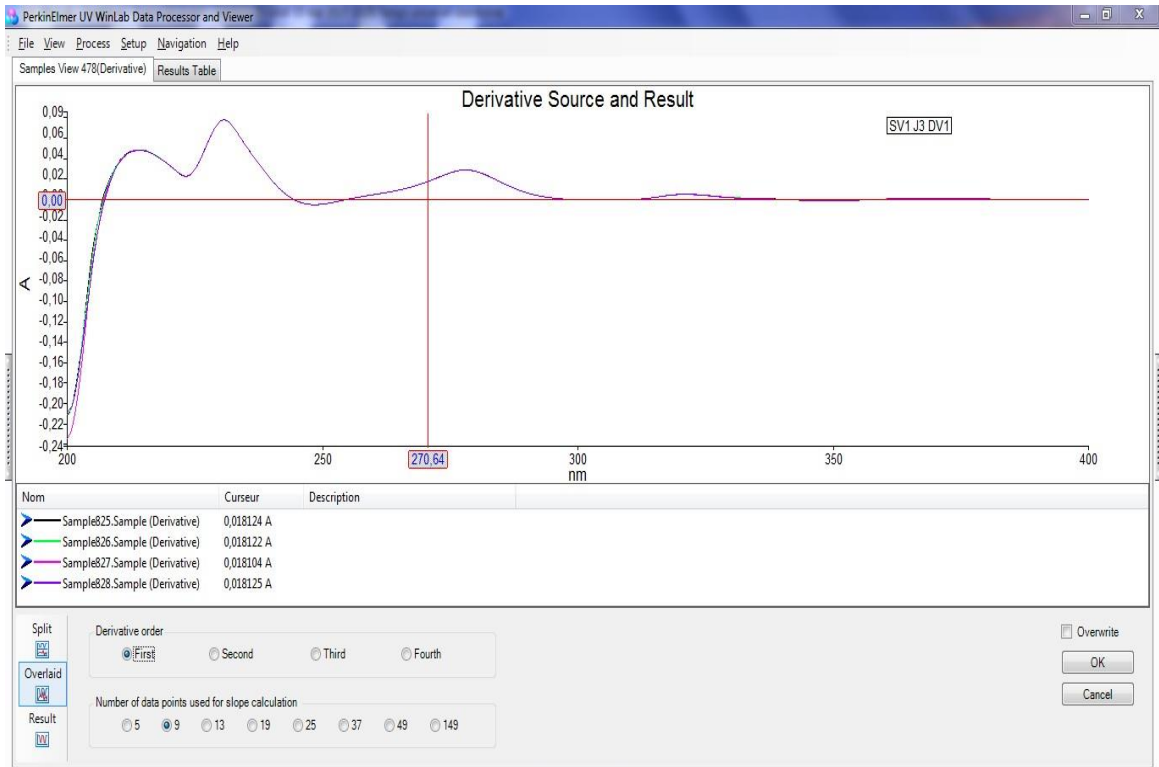


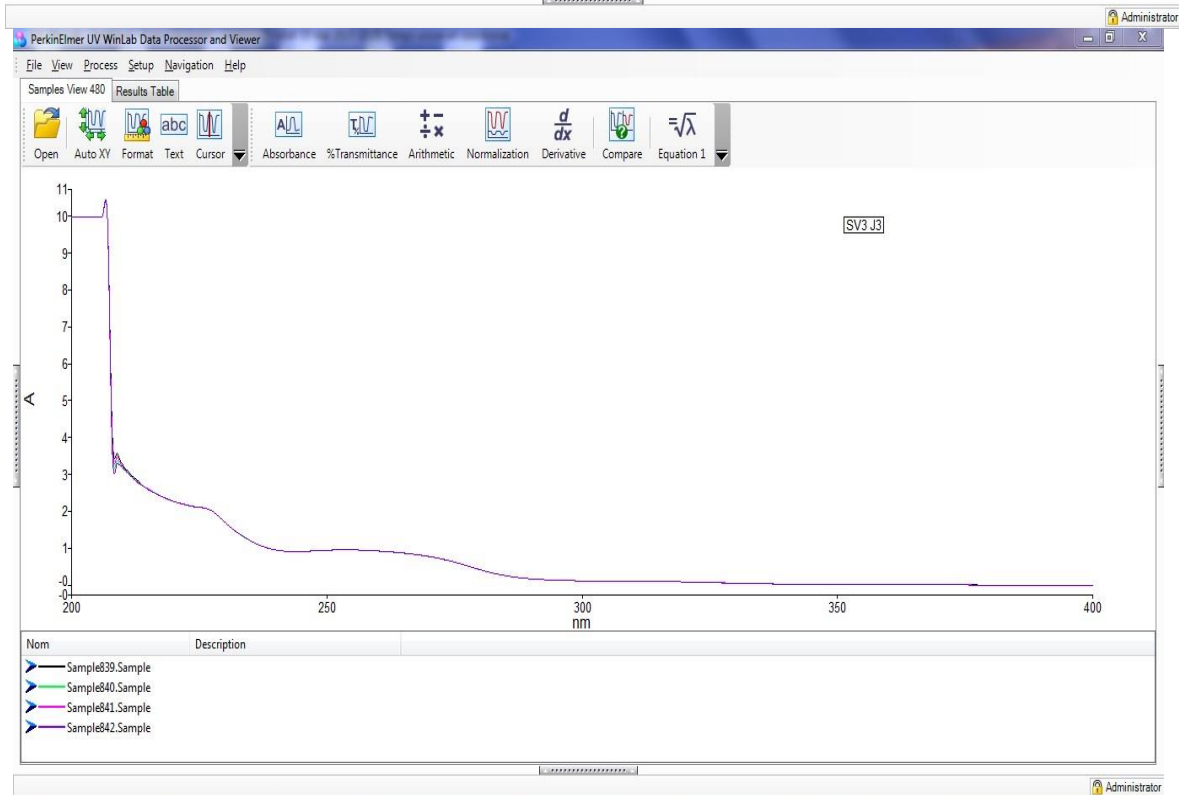
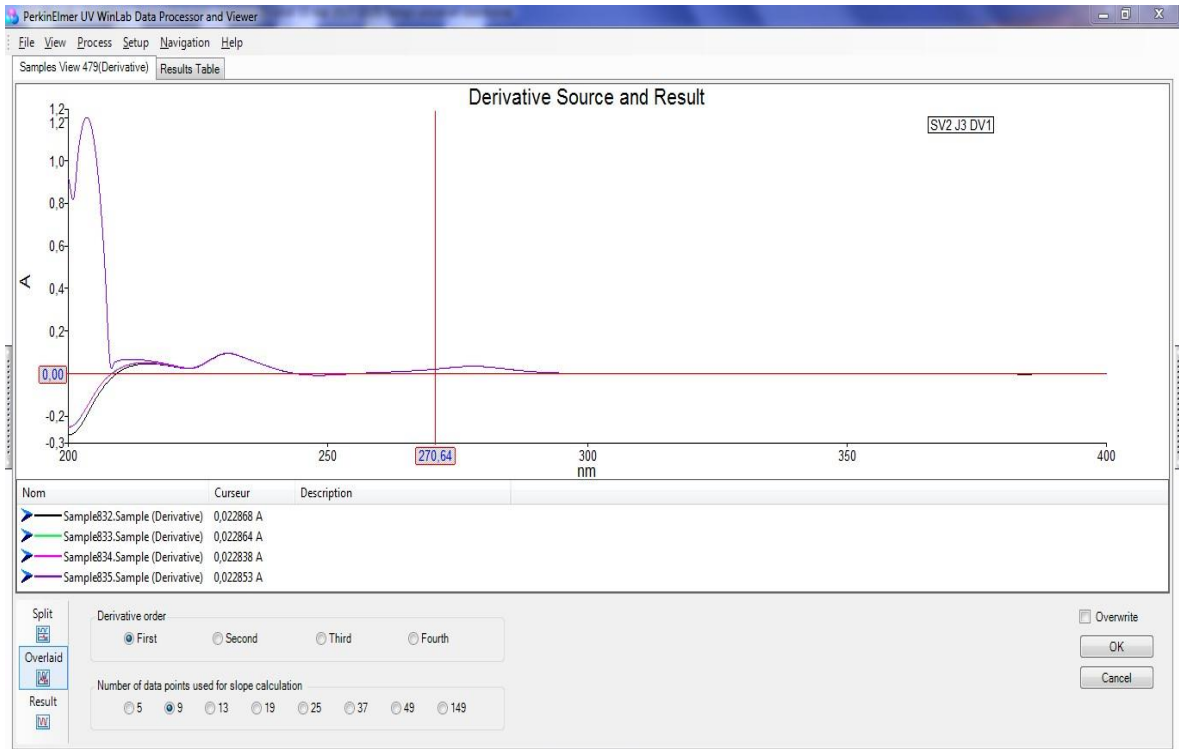


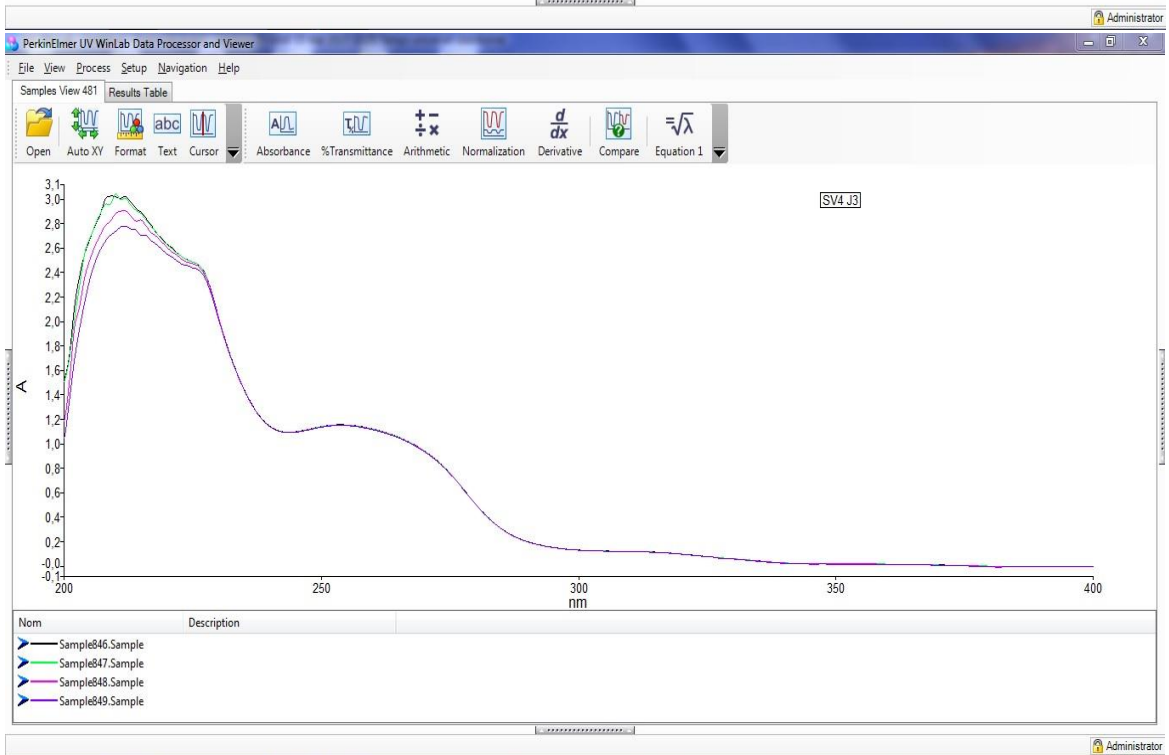
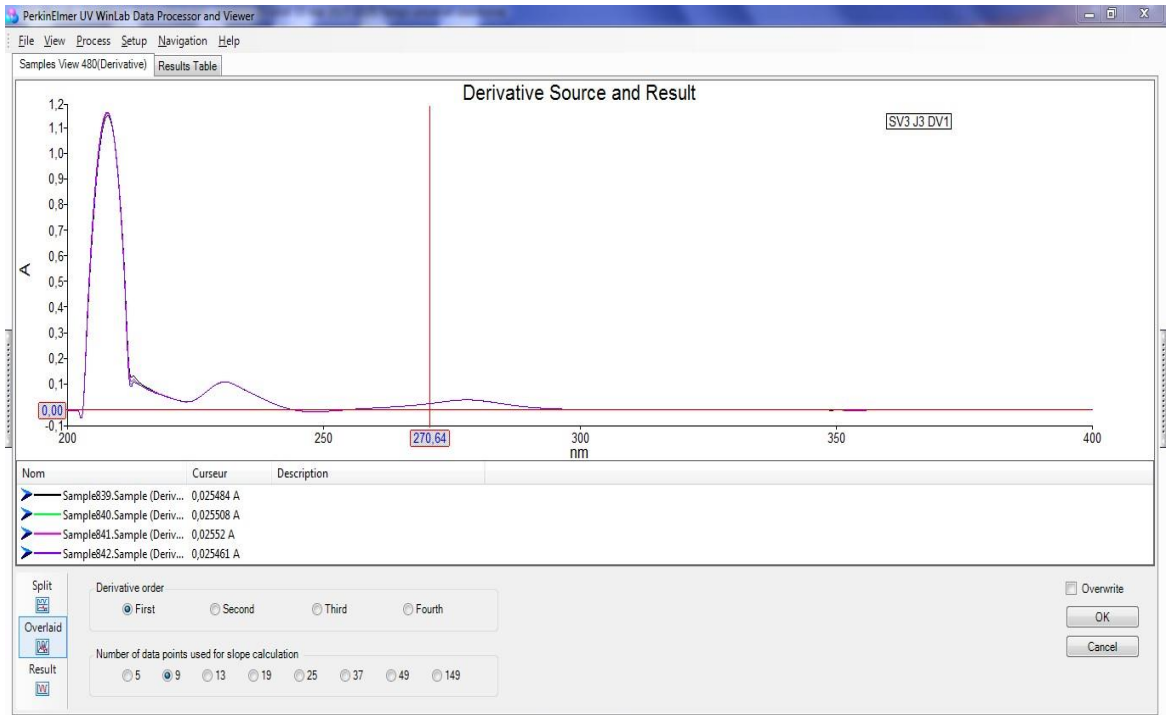


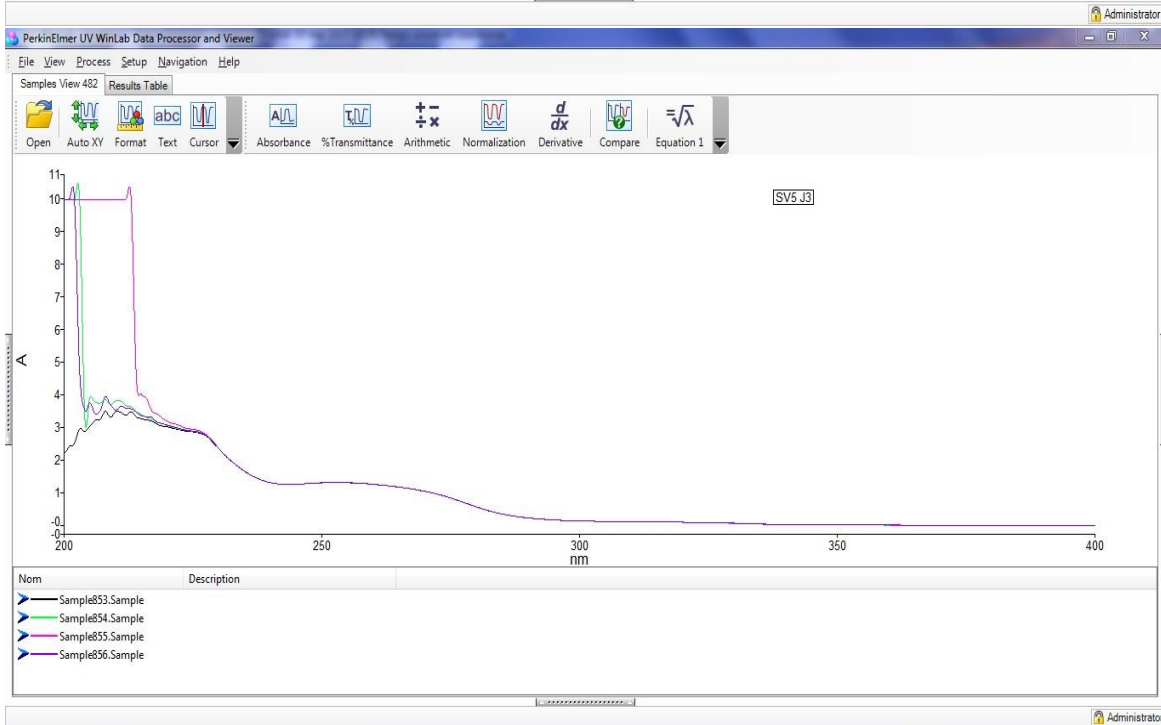
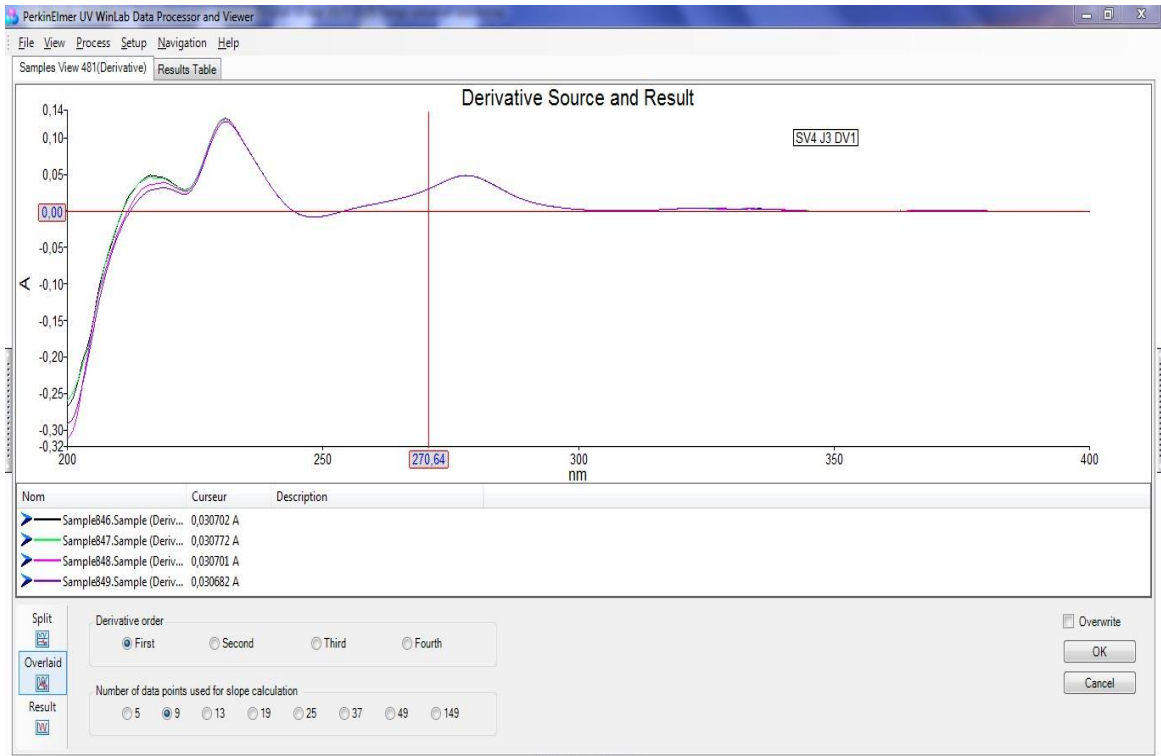


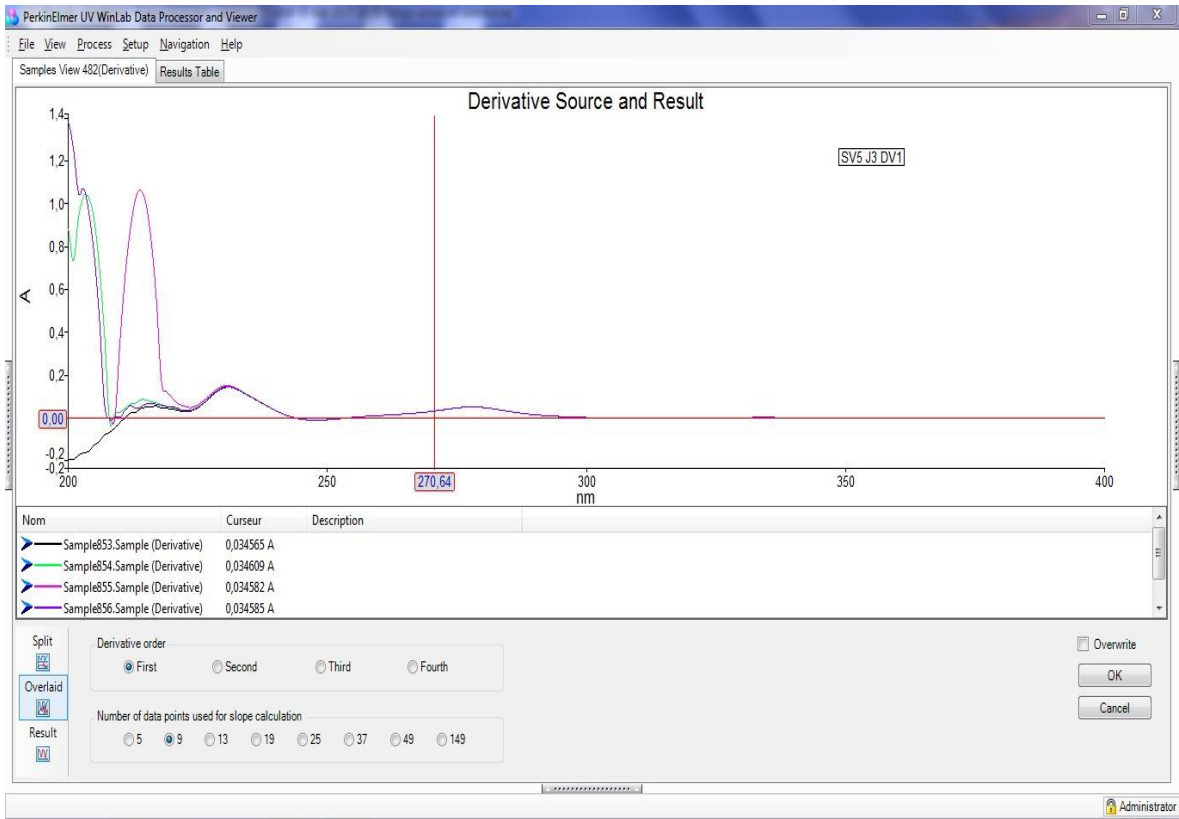


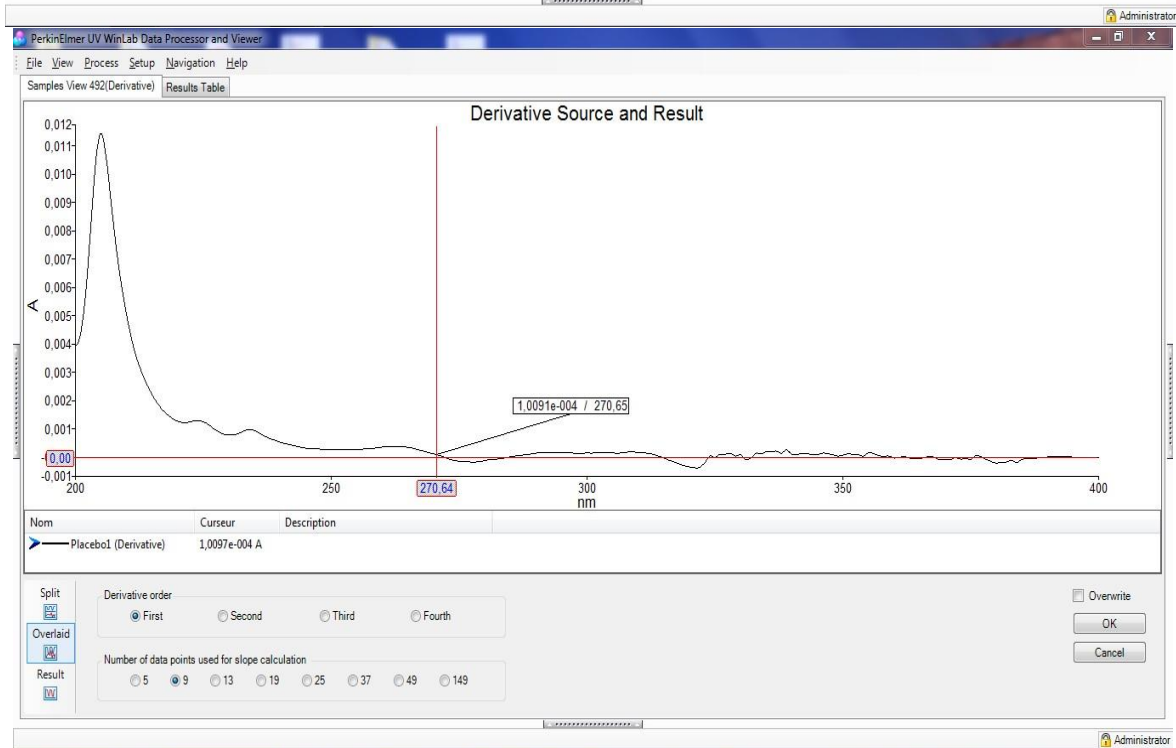
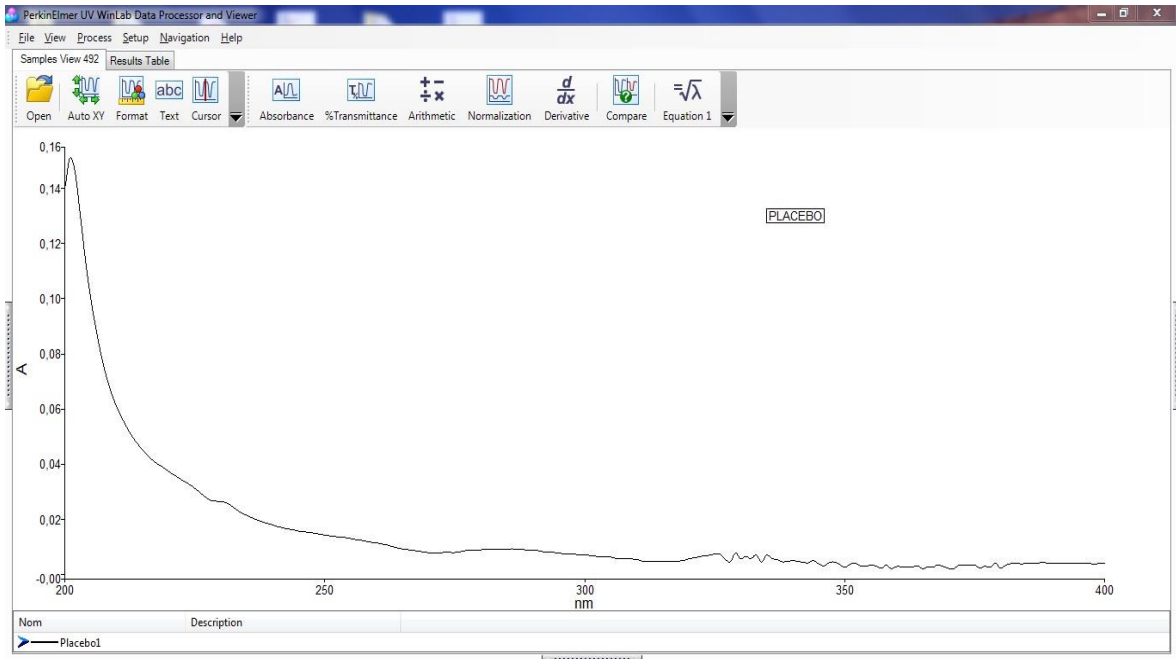












Résumé

Ce mémoire se concentre sur la quantification du Valsartan, un médicament utilisé pour traiter l'hypertension artérielle, par spectrophotométrie UV-Vis dérivée. L'objectif principal de cette étude était de développer et de valider une méthode précise et fiable pour mesurer la concentration de Valsartan dans des échantillons pharmaceutiques.

Le mémoire commence par une revue approfondie de la littérature, qui explore les principes fondamentaux de la spectrophotométrie UV-Vis et les techniques de dérivation pour améliorer la sensibilité et la sélectivité des mesures. Cette partie théorique permet de comprendre les bases nécessaires à la mise en place de la méthode de quantification.

Ensuite, la partie pratique présente le développement et la validation de la méthode de spectrophotométrie UV-Vis dérivée pour la quantification du Valsartan. Les conditions expérimentales optimales ont été déterminées, notamment la longueur d'onde de mesure et le choix du solvant approprié. La méthode a ensuite été validée selon les critères de l'ICH (International Council for Harmonisation of Technical Requirements for Pharmaceuticals for Human Use).

Les résultats obtenus ont démontré une linéarité élevée de la méthode, avec un coefficient de corrélation de 0.9987, confirmant la relation linéaire entre la concentration de Valsartan et l'absorbance mesurée. De plus, la spécificité de la méthode a été vérifiée en l'absence d'interférences significatives avec d'autres composants. La fidélité de la méthode a été évaluée, avec un taux de fidélité de 98.5%, et la justesse des mesures s'est avérée satisfaisante, avec un pourcentage de justesse de 101.2%. L'erreur totale obtenue était de 1.8%, se situant dans l'intervalle de tolérance de $\pm 2\%$.

En conclusion, ce mémoire a réussi à développer une méthode fiable et précise pour la quantification du Valsartan par spectrophotométrie UV-Vis dérivée. Les résultats obtenus soutiennent l'applicabilité de cette méthode dans le domaine de l'analyse pharmaceutique, avec des implications potentielles dans le contrôle de la qualité des produits pharmaceutiques contenant du Valsartan. Cette recherche contribue ainsi à l'amélioration des techniques d'analyse de médicaments et ouvre des perspectives pour l'analyse d'autres substances actives dans le domaine pharmaceutique ou d'autres applications de la chimie analytique.

Le mémoire fournit une base solide pour de futures études et développements dans le domaine de la quantification des médicaments par spectrophotométrie UV-Vis dérivée, en mettant en avant l'importance de la validation des méthodes analytiques et de l'assurance de la qualité des analyses pharmaceutiques.