

RÉPUBLIQUE ALGÉRIENNE DÉMOCRATIQUE ET POPULAIRE

Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique

Université Saad DAHLAB BLIDA 1

Faculté de Technologie

Département Génie des Procédés



Mémoire

En vue de l'obtention du diplôme de

MASTER EN GENIE DES PROCEDES

Spécialité : Pharmacie industrielle

Intitulé du mémoire

**Validation analytique d'une méthode de
recherche des impuretés inconnues et
vérification d'une méthode de dosage par HPLC
d'un gel anti-inflammatoire**

Présenté par :

- MOULOUDJ AMINA
- TAIB EZZRAIMI FARAH

Encadré par :

- Mme AIT MESBAH Z.
- Mme DJILALI KHADIDJA

Promotion 2023/2024

ملخص

تضمنت الدراسة التي أجريناها في مختبر BIOPHARM R&D التحقق من صحة طرق كروماتوغرافيا HPLC للكشف عن الشوائب غير المعروفة وللتحقق من جرعة هلام مضاد للالتهابات وفقاً للمتطلبات التنظيمية الصيدلانية. أظهرت النتائج التي تم الحصول عليها أنه تم استيفاء جميع المتطلبات المحددة المنصوص عليها في هذا النهج المنسق، أي أن طرق HPLC المقترحة تفي بمعايير الخصوصية والخطية والدقة والدقة والمتانة والثبات فيما يتعلق بتحديد المادة الفعالة في الجل المضاد للالتهابات والكشف عن الشوائب غير المعروفة. وتعتبر موثوقة وبالتالي يمكن استخدامها كطرق مراقبة روتينية.

Abstract

The study we carried out at the BIOPHARM R&D laboratory involved validating HPLC chromatographic methods for the detection of unknown impurities and for checking the dosage of an anti-inflammatory gel in accordance with pharmaceutical regulatory requirements.

The results obtained demonstrated that all the specific requirements set out in this harmonised approach have been met, i.e. that the HPLC methods proposed meet the criteria of specificity, linearity, precision, accuracy, robustness and stability with regard to the determination of the active ingredient in the anti-inflammatory gel and the detection of unknown impurities. They are considered reliable and can therefore be used as routine control methods.

Résumé

L'étude que nous avons effectuée au niveau du laboratoire de recherche et développement de BIOPHARM consiste en une validation de méthodes chromatographiques HPLC pour la recherche d'impuretés inconnues et pour la vérification de dosage d'un gel anti-inflammatoire selon les exigences règlementaires pharmaceutiques.

Les résultats obtenus ont démontré que toutes les exigences spécifiques élaborées dans cette approche harmonisée sont remplies, c'est-à-dire que les méthodes HPLC proposées répondent aux critères de spécificité, linéarité, fidélité, justesse, exactitude, robustesse et stabilité en ce qui concerne le dosage du principe actif dans le gel anti-inflammatoire ainsi que la recherche des impuretés inconnues. Elles sont considérées fiables et peuvent ainsi être utilisées comme des méthodes de contrôle de routine.

Mots clés

HPLC

Impuretés inconnues

Validation analytique

REMERCIEMENTS

*Tout d'abord, nous tenons à remercier **LE BON DIEU** le tout puissant et miséricordieux, de nous avoir donné la force et la patience afin d'accomplir ce modeste travail.*

*Nous tenons aussi à remercier notre promotrice, **Mme Ait mesbah Z.***

Nous avons eu la chance de travailler avec vous et de bénéficier de vos connaissances et votre compétence, nous vous remercions pour les précieux conseils que vous nous avez prodigués pour votre aide votre orientation durant toute la période de travail.

Nous voudrions également vous témoigner notre gratitude pour votre confiance, votre patience qui ont constitué un apport considérable sans lequel ce travail n'aurait pas pu être mené au bon part.

*Nous remercions énormément **la doctorante Mme Djilali khadidja** pour sa disponibilité, ses conseils précieux tout au long de ce travail ainsi que pour sa grande patience. Nous n'oublierons pas votre gentillesse et soutien, votre caractère très accueillant qui nous a permis de surmonter les difficultés rencontrées*

*Nos profonds remerciements à notre encadreur au niveau du laboratoire de développement analytique **BIOPHARM SADOUDI ABDELKADER** pour sa disponibilité, et pour nous avoir fait profiter de ses expériences et de faire partager ses connaissances, nus remercions aussi sincèrement, toute l'équipe du laboratoire de développement.*

Merci aux membres de jury pour l'honneur qu'ils nous font en acceptant d'évaluer et examiner notre travail.

Dédicaces

C'est avec une profonde gratitude avec des mots sincère que,

Je dédie ce modeste travail de fin d'études

A mes très chers parents qui ont toujours été là pour moi, aucune dédicace ne saurait exprimer mon respect, mon amour éternel et ma considération pour les sacrifices qu'ils ont consentis pour mon instruction et mon bien-être.

Je les remercie pour tout le soutien et l'amour qu'ils m'ont portés depuis mon enfance.

A mes très chers frères et mes belles sœurs

A ma chère nièce DANIA

Et mon cher neveu ZAID

A toute ma famille, et mes amis

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

A tous ceux qui me sont chers.

AMINA

Dédicaces

J'ai l'honneur de didier ce modeste travail à mes très chers parents, pour leurs efforts, leur amour et leurs sacrifices durant toute ma vie, leurs encouragements et soutien durant toute la période de mes études, .

A mes très chers frères et sœurs pour leur présence à mes cotés

A mes grand-parents et ceux qui ont partagé avec moi tous les moments d'émotion lors de la réalisation de ce travail,

A mes amis et mes proches pour leur présence dans ma vie, leur disponibilité à tous les moments difficiles et pour tous les moments que nous avons partagés ensemble.

A ma promotrice pour avoir accepté de m'encadrer, sa bonne humeur et sa patience qui m'ont données la volonté à accomplir ce travail.

Farah

Liste des abréviations

a : la pente

AMM : Autorisation Mise au Marché

API: Active pharmaceutical ingredient

b : ordonnée à l'origine

BPF : bonne pratique de fabrication

BP : british pharmacopée

CLHP ou HPLC : chromatographie liquide à haute performance

D : droite

éch : échantillon

FDA : Food and Drug Administration

ISO : Organisation internationale de normalisation

ICH : International conférence on harmonisation

LOQ: Limite of quantification

LOD: Limite of detection

M 1 : manipulateur 1

M2 : manipulateur 2

Moy: Moyenne

NPT : NOMBRE de Plateaux Théoriques

OMS : Organisation mondiale de la santé

PA : Principe Actif.

PR (y)% : recouvrement moyen

PE : prise d'essai

pH : potentiel hydrogène

RSD : standard de déviation relatif

R : coefficient de corrélation

R² : Le coefficient de variation

Si : Ecart type des réponses

STD : Standard

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

SFSTP : Société Française des Sciences et Techniques Pharmaceutiques

TR : temps de rétention

USP : Pharmacopée américaine

UV : Ultra- Violet

UV-Visible : Ultra-violet Visible.

WS: Working standard

Yi : Moyenne des réponses

Y: signal mesuré

Ø m : phases mobiles

Liste de figures

Figure 1.1 : Les voix d'administration les plus courantes selon la forme galénique.....	4
Figure 2.1: Cycle de vie d'une méthode d'analyse.....	17
Figure 3.1.: Chromatographe HPLC.....	22
Figure 3.2. : principaux paramètres d'un chromatogramme.....	26
Figure 4.1 : Appareil de HPLC (pour les impuretés inconnues).....	30
Figure 4.2 : Appareil de HPLC (pour le dosage).....	31
Figure 5.1 : chromatogramme de performance de la colonne.....	49
Figure5.2. : Chromatogramme du blanc et placebo.....	49
Figure 5.3. : Chromatogramme de PA.....	50
Figure 5.4. : Droite de régression du signal en fonction de la concentration de l'analyte (linéarité sur le PA).....	51
Figure 5.5 : Droite de régression du signal en fonction de la concentration de l'analyte (linéarité sur le placebo chargé).....	52
Figure5.6. : Chromatogramme de conformité de système.....	59
Figure5.7. : Chromatogramme de standard par détecteur PDA.....	59
Figure 5.8.: Chromatogramme de PC chargé à 100% Par Détecteur PDA.....	60
Figure 5.9.: chromatogramme de blanc.....	60
Figure 5.10.: chromatogramme de placebo.....	60
Figure 5.11. : Chromatogramme de PA.....	60

Liste des tableaux

Tableau 1.1 : Origines des médicaments.....	3
Tableau 2.1: Types de paramètres de validation.....	11
Tableau 2.2 : Critères de validation en fonction de type d'analyse.....	14
Tableau 4.1 : Réactifs utilisés.....	29
Tableau 4.2 : Appareillage et équipements.....	29
Tableau 4.3 : Conditions chromatographiques de la méthode les impuretés inconnues.....	32
Tableau 4.4: représente les paramètres et les critères d'acceptation de la méthode des impuretés inconnues.....	37
Tableau 4.5 : La variation des Paramètres de la robustesse.....	42
Tableau 4.6 : Conditions chromatographiques de la méthode de dosage.....	44
Tableau 4.7 : Les paramètres à vérifier et les critères d'acceptation pour l'identification et le dosage par HPLC.....	45
Tableau 5.1 : Résultats de la répétabilité des aires du principe actif.....	48
Tableau 5.2 : Résultats des paramètres de performances de la colonne.....	49
Tableau 5.3 : Résultats de la linéarité de la méthode pour le principe actif.....	50
Tableau 5.4 : Résultats de la linéarité de la méthode pour le placebo chargé.....	51
Tableau 5.5 : Résultats des paramètres de la linéarité.....	52
Tableau 5.6. : Résultats de l'étude de la fidélité pour les impuretés (série 1 et 2).....	53
Tableau 5.7. : Résultats de l'étude de l'exactitude.....	54
Tableau 5.8. : Concentrations du PA dans la solution échantillon et du facteur de recouvrement.....	55
Tableau 5.9 : Résultats de l'étude de la robustesse de la méthode	56
Tableau 5.10. : Résultats de l'étude de stabilité.....	56

Tableau 5.11. : Résultats de la répétabilité des aires du principe actif	58
Tableau 5.12. : Résultats des paramètres de performances de la colonne.....	59
Tableau 5.13. : Résultats de l'étude de la fidélité de la méthode de dosage (série 1 et 2)...	61
Tableau 5.14.: Résultats de l'exactitude de la méthode.....	62
Tableau 5.15. : Résultats de stabilité à T ambiante et t=24 H.....	64
Tableau 5.16 : Résultats de stabilité à T réfrigérer et t=24H.....	64
Tableau 5.17.: Résultats de stabilité à T ambiante et t=72H.....	65
Tableau 5.18.: Résultats de stabilité à T réfrigérer et t= 72H.....	65

SOMMAIRE

RESUME	
REMERCIEMENTS	
DEDICACES	
LISTE DES ABREVIATIONS	
LISTE DE FIGURE	
LISTE DES TABLEAUX	

INTRODUCTION.....	1
-------------------	---

CHAPITRE 1

GENETALITE SUR LES MEDICAMENTS

1.1. Définition d'un médicament.....	3
1.2. Composants d'un médicament.....	3
1.2.1. Origines des médicaments.....	3
1.3. Les formes galéniques des médicaments.....	4
1.4. Préparations semi-solides pour application cutanée.....	5
1.4.1. Les gels.....	5
1.4.2 Procédé de fabrication des gels	5

CHAPITRE 2

VALIDATION D'UNE METHODE D'ANALYSE

Introduction	7
2.1. Normes.....	7
2.2. Types de validation	8
2.3. Validation analytique.....	8
2.4. Aspect réglementaire de la validation.....	8
2.5. Historique de la validation analytique.....	9
2.6. Validation d'une méthode analytique selon l'ICH.....	9
2.6.1. Aspect réglementaire de la validation.....	10
2.7. Objectif de la validation analytique.....	10
2.7.1 Validation des méthodes analytiques dans l'industrie pharmaceutique.....	10
2.8. Types de paramètres de validation.....	11
2.8.1. Identification.....	12
2.8.2 Dosage et Impuretés Test (s).....	12
2.9. Critères de la validation analytique.....	13

2.10. Développement d'une méthode d'analyse	16
---	----

CHAPITRE 3

GENERALITES SUR LA CHROMATOGRAPHIE LIQUIDE

Introduction.....	20
3.1. Types de chromatographie.....	20
3.2. Principe de l'HPLC.....	21
3.3. Appareillage.....	22
3.4. Définitions et grandeurs chromatographique.....	25

CHAPITRE 4

MATERIELS ET METHODES

Introduction.....	28
4.1 Matériels.....	28
4.1.1 Les réactifs.....	28
4.1.2 Appareillages et équipements.....	29
4.2 Méthodes	31
4.2.1 Méthodologie de validation de la méthode par HPLC pour la recherche des impuretés inconnues dans le produit fini	31
La conformité du système.....	37
1- Spécificité.....	37
2- Linéarité	38
3- Limite de quantification (LOQ).....	38
4- Limite de détection (LOD).....	39
5- Précision(fidélité).....	39
6- Exactitude.....	41
7- La robustesse.....	41
8- La stabilité.....	42
4.2.2. Méthodologie de vérification de la méthode par HPLC pour le dosage de principe actif dans le produit fini.....	43

CHAPITRE 5

RESULTATS ET DISCUSSION

5.1 Validation de la méthode des impuretés inconnues (substances apparentées)	48
• Evaluation de la conformité de système	48
5.1.1. Spécificité.....	49
5.1.2. Evaluation de linéarité des méthodes analytiques.....	50
5.1.3.Limite de détection (LOD) et limite de quantification (LOQ).....	52
5.1.4. Précision (Fidélité).....	53
5.1.5. Exactitude.....	54
5.1.6. Robustesse.....	55
5.1.7. Stabilité des solutions.....	56
5.2. Validation de la méthode d'identification de dosage.....	58
Evaluation de la conformité de système.....	58
5.2.1. Identification.....	59
5.2.2 La spécificité.....	60
5.3.3 Précision (fidélité).....	61
5.3.4 Exactitude.....	62
5.3.5 La stabilité.....	63
Conclusion.....	66
Références bibliographiques	
Annexes	

Introduction

INTRODUCTION

Le développement d'un médicament passe par plusieurs étapes, la découverte de la molécule active, les essais de laboratoires, les études précliniques, les essais cliniques et les enregistrements réglementaires. Avant sa mise sur le marché, les agences réglementaires exigent que le médicament soit testé sur son origine, son dosage, sa pureté et sa stabilité.

Les laboratoires pharmaceutiques doivent d'un point de vue éthique, produire des médicaments d'un haut niveau de qualité ; ces obligations réglementaires et commerciales exigent de mettre en place un système d'assurance qualité à tous les niveaux de l'entreprise depuis le développement du médicament jusqu'à sa mise sur le marché. Cette notion essentielle de qualité impose la nécessité de la validation ; Celle-ci est effectuée en se basant sur des principes scientifiques afin d'établir la respectabilité des méthodes et d'assurer la conformité du médicament. En effet, si la validité d'une méthode analytique n'est pas confirmée, la décision de conformité ou non du produit fini, basée sur les données obtenues par le contrôle qualité en utilisant cette procédure analytique devient contestable.

Afin d'établir des règles et des normes de qualité, les organismes de santé mondiale ont pu proposer des approches de validation optimisant la qualité, la sécurité et même le coût des médicaments, bénéfiques à la fois aux patients acheteurs et aux organismes de l'industrie pharmaceutique.

Notre stage de fin d'études a été réalisé au niveau du laboratoire de recherche et développement analytique de l'industrie pharmaceutique BIOPHARM. C'est un laboratoire de recherche agréé par le ministère de la santé, pour la conception de génériques innovants et la transposition à l'échelle industrielle. Il veille en permanence sur la qualité du médicament tout au long de la chaîne de production.

L'objectif de notre travail est la mise au point de méthodes analytiques par chromatographie en phase liquide à haute performance HPLC et la vérification de leur fiabilité pour deux applications :

- La première méthode HPLC sera utilisée pour la recherche d'impuretés inconnus dans le cas d'un gel anti-inflammatoire. IL est important de signaler qu'il n'existe pas de directives ou orientations relatives à la recherche d'impuretés inconnus dans les produits

finis et que la méthode proposée est nouvelle et sera utilisée en interne (au niveau des laboratoires de BIOPHARM).

- La deuxième méthode HPLC est une méthode de la pharmacopée britannique BP ; elle sera vérifiée pour le dosage d'un gel anti-inflammatoire et sera proposée comme méthode de contrôle de routine.

Le présent manuscrit est structuré comme suit:

- La première partie bibliographique, subdivisée en trois chapitres, portera sur les exigences et réglementation concernant les médicaments, le contrôle qualité et la validation des méthodes analytiques avec une étude critique des différentes approches et enfin des généralités sur la méthode HPLC ;
- La seconde partie expérimentale décrira les méthodes analytiques HPLC proposées, leurs applications pour l'analyse d'un gel anti-inflammatoire, la vérification des critères de validation et une discussion des résultats obtenus ;
- Nous finirons par une conclusion et des perspectives.

CHAPITRE 1
GENETALITES SUR LES
MEDICAMENTS

CHAPITRE I

GENETALITES SUR LES MEDICAMENTS

1.1. Définition d'un médicament

Un médicament est toute substance ou composition présentée comme possédant des propriétés curatives ou préventives à l'égard des maladies humaines. À but thérapeutique, prophylactique ou diagnostic, ou destinée à modifier les fonctions physiologiques et présentée sous forme pharmaceutique permettant son administration à L'homme. [1]

1.2. Composants d'un médicament

Parmi les principales composantes d'un médicament on distingue :

Principe actif « PA » : Le principe actif d'un médicament, est chacun des composants de ce médicament qui possède un effet thérapeutique. Cette substance est souvent en très faible proportion dans le médicament par rapport aux excipients. [2]

Excipient : Substance associée au principe actif d'un médicament et dont la fonction est de faciliter l'administration, la conservation et le transport de ce principe actif jusqu'à son site d'absorption. [3]

1.2.1. Origines des médicaments

Les origines des médicaments sont regroupées dans le tableau I.1.

Tableau 1.1. : Origines des médicaments

Origines	Définition	Exemples
Végétale	L'utilisation des Plantes en thérapeutique (Phytothérapie) est très ancienne. On utilise soit la plante entière, soit les produits d'extraction qu'elles fournissent.	Morphine : extraite de la capsule du pavot à opium
Animale	L'utilisation d'organes ou de glandes fraîches en thérapie est aussi ancienne que les plantes	Hormones polypeptidiques extractives, l'insuline

Minérale	Ce sont souvent des produits minéraux naturels employés comme principes actifs ou excipients de médicaments	Argiles, bicarbonate de sodium, sulfate de magnésium, calcium, fer
Microbiologique	Il s'agit essentiellement de vaccins obtenus à partir de bactéries ou de virus	Antibiotiques
Synthétique Hémisynthétique	Principale source de production des médicaments modernes. Molécules complexes obtenues par des méthodes de synthèse de chimie organique,	Acide acétylsalicylique
Biotechnologique	biogénétique: On utilisant les méthodes de "génie génétique", En peut fabriquer des substances naturelles polypeptidiques présentant toutes les caractéristiques de leur modèle humain.	Hormones (hormone de croissance, l'insuline).

1.3. Les formes galéniques des médicaments

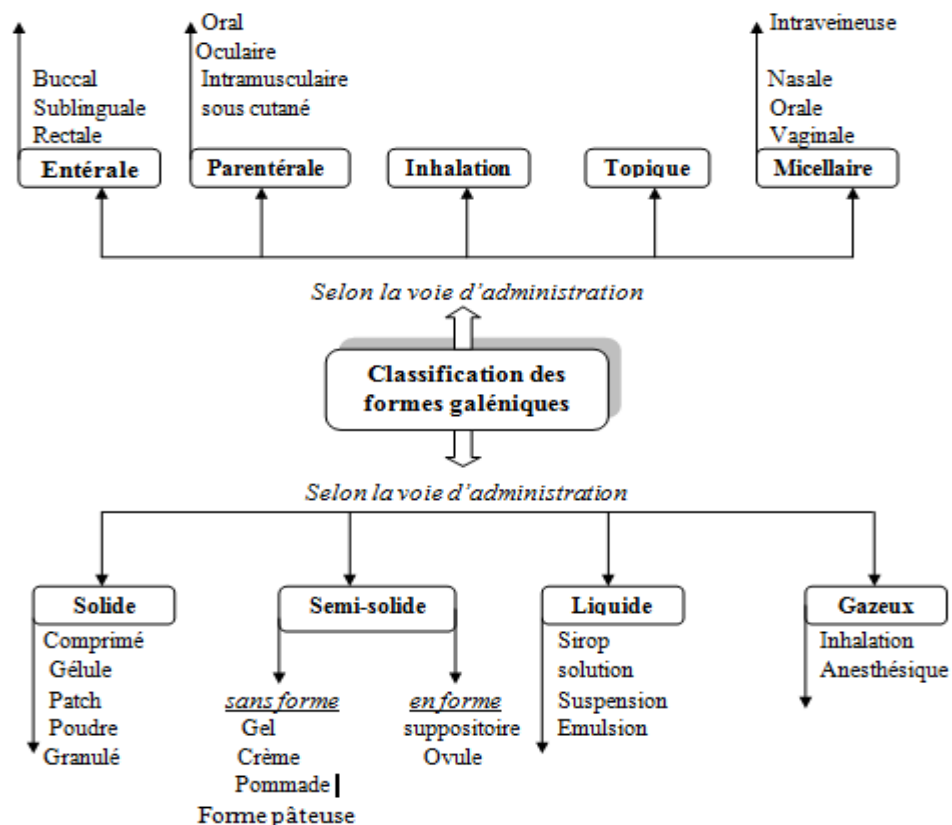


Figure 1.1 : Les voix d'administration les plus courantes selon la forme galénique .

1.4. Préparations semi-solides pour application cutanée [2]

Les préparations semi-solides pour application cutanée sont destinées à être appliquées sur la peau ou sur certaines muqueuses afin d'exercer une action locale ou transdermique de principes actifs. Elles sont également utilisées pour leur action émollissante ou protectrice. Elles présentent un aspect homogène. Elles sont constituées d'un excipient, simple ou composé, dans lequel sont habituellement dissous ou dispersés un ou plusieurs principes actifs. La composition de cet excipient peut avoir une influence sur les effets de la préparation et sur la libération du (des) principe(s) actif(s). Les excipients utilisés peuvent être des substances d'origine naturelle ou synthétique et être constitués d'un système à une seule ou à plusieurs phases. Selon la nature de l'excipient, la préparation peut avoir des propriétés hydrophiles ou hydrophobes (lipophiles). La préparation peut contenir également d'autres excipients appropriés tels que des agents antimicrobiens, des antioxydants, des agents stabilisants, émulsifiants ou épaississants. Les préparations semi-solides pour application cutanée qui sont destinées à être appliquées sur des plaies ouvertes importantes ou sur une peau gravement atteinte doivent être stériles. Plusieurs catégories de préparations semi-solides pour application cutanée peuvent être distinguées :

1.4.1. Gels [2]

Les gels sont constitués par des liquides gélifiés à l'aide d'agents gélifiants appropriés.

On distingue :

- **Les gels hydrophobes.** Les gels hydrophobes (oléogels) sont des gels dont les excipients sont habituellement constitués de paraffine liquide additionnée de polyéthylène, d'huiles grasses gélifiées par de l'oxyde de silicium colloïdal ou de savons d'aluminium ou de zinc.
- **Les gels hydrophiles.** Les gels hydrophiles (hydrogels) sont des gels dont les bases sont habituellement l'eau, le glycérol et le propylène-glycol gélifiés à l'aide d'agents gélifiants appropriés tels que la gomme adragante, l'amidon, des dérivés de la cellulose, des polymères carboxyvinyles ou des silicates de magnésium-aluminium.

1.4.2 Procédé de fabrication des gels

La préparation d'un gel pharmaceutique implique généralement plusieurs étapes. Voici un résumé d'un procédé typique :

1. Préparation de la phase aqueuse :
 - Dissoudre les agents gélifiants hydrophiles (ex : gommes, cellulose, polyacrylates) dans de l'eau purifiée chauffée.
 - Ajouter les autres excipients hydrosolubles, si nécessaire (ex : agents tampons, conservateurs).
2. Préparation de la phase huileuse (pour les gels hydrophobes) :
 - Faire fondre les gélifiants lipophiles (ex : cires, alcools gras) dans une huile végétale ou minérale chauffée.
 - Ajouter les autres excipients lipophiles (ex : antioxydants).
3. Mélange des phases :
 - Pour un gel hydrophile, agiter la phase aqueuse jusqu'à l'obtention d'un gel homogène.
 - Pour un gel hydrophobe ou émulsionné, ajouter la phase huileuse à la phase aqueuse sous agitation vigoureuse pour obtenir l'émulsion.
4. Incorporation des principes actifs :
 - Ajouter la/les substance(s) active(s) au mélange et mélanger jusqu'à homogénéité.
 - Pour des substances peu solubles, une étape de broyage/dispersion peut être nécessaire.
5. Ajustement final :
 - Ajuster la viscosité/consistance si nécessaire (avec des agents épaississants ou de l'eau).
 - Ajuster le pH à la valeur souhaitée.
6. Conditionnement :
 - Transférer le gel dans les conditionnements primaires appropriés (tubes, pots).
 - Appliquer éventuellement une étape de stérilisation finale.

Les ingrédients exacts et les étapes dépendent de la formulation et du type de gel (hydrophile, hydrophobe, émulsionné). Des précautions particulières en termes d'environnement et d'équipements peuvent être nécessaires pour assurer la stérilité du produit fini.

CHAPITRE 2

VALIDATION D'UNE

METHODE D'ANALYSE

CHAPITRE 2

VALIDATION D'UNE METHODE D'ANALYSE

Introduction

Le principe de la validation des procédures analytiques est, aujourd'hui largement, répandu dans tous les domaines d'activités où des mesures sont réalisées.

Le champ d'application de la validation analytique s'étend à toute procédure d'analyse utilisée dans le contrôle de la matière première, le développement galénique, le contrôle en cours de fabrication, le contrôle des produits intermédiaires et finis et aussi les essais de stabilité de tous les produits chimiques. Dans le domaine pharmaceutique, son exigence est avant tout une pratique réglementaire.

La validation d'une méthode analytique n'est pas seulement une exigence des autorités réglementaires ou un moyen d'accéder à l'accréditation, mais aussi la phase ultime avant l'utilisation de la méthode en question dans la routine. Malgré les critiques initiales, la validation des méthodes analytiques est maintenant bien acceptée et considérée comme une partie de la gestion de qualité [4].

2.1. Normes [5]

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

ISO/IEC/17025 : «La validation est la confirmation par examen et fourniture de preuves réelles que les exigences particulières d'un usage projeté donné sont remplies ».

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

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

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

2.2. Types de validation [5]

Il existe plusieurs types de validation :

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

2.3. Validation analytique [5]

Depuis toujours, les analystes « valident » leurs méthodes en effectuant des séries de mesures plus ou moins bien organisées pour essayer de démontrer qu'elles conviennent à leurs objectifs. Bien sûr, celles et ceux qui sont dans des laboratoires accrédités savent que c'est insuffisant et qu'une validation doit être conduite selon une procédure expérimentale plus stricte où on parle de justesse, de reproductibilité, etc. La validation est devenue un élément majeur pour la démonstration de la compétence de ces laboratoires accrédités.

La validation analytique est une vérification de la conformité des conditions d'exécution des procédures, elle tient compte notamment des résultats obtenus avec les échantillons de contrôle.

2.4. Aspect réglementaire de la validation[6]

Les principaux référentiels qui décrivent les procédures de validation analytique sont les suivants :

Documents ISO 17025 : « Exigences générales concernant la compétence des laboratoires d'étalonnages et d'essais » et ISO 5725 « exactitude (justesse et fidélité) » des résultats et méthodes de mesure.

Documents ICH: ICH Q2A: text on validation of analytical procedures «definitions and terminology» 1995; ICH Q2B: text on validation of analytical procedures «methodology» 1997 ; ICH Q2 (R1) validation of analytical procedures: text and methodology (2005).

Documents de la FDA (guidance for industry) : Validation of Bioanalytical Method (2001).

Documents des commissions SFSTP : SFSTP « Guide de validation, rapport d'une commission SFSTP » Méthodologie (1992) ; Exemples d'application (1992) ; SFSTP « dosage dans les milieux biologiques par des méthodes chromatographiques» (1997) ; SFSTP « validation des procédures analytiques : harmonisation des démarches» : Partie I : généralités, parues dans STP Pharma Pratique en 2003 ; Partie II : statistiques, parues dans STP Pharma Pratique en 2006 ; Partie III : exemples d'application : Parus dans STP Pharma Pratique en 2006 ; Parus dans Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis en 2008.

2.5. Historique de la validation analytique [7]

Les premières publications sur la validation analytique remontent à 1985, à la suite de rencontres entre l'industrie pharmaceutique américaine et les états unis d'Amérique. Dès 1986, un premier texte officiel est publié dans le pharmacopoeial forum intitulé : « current concept for the validation of compendial assays ».

L'année suivante, 1987, une note explicative européenne sur la validation analytique (CEE III/844/87) est publiée. Cette note sera adoptée en août 1989.

Toujours en 1989, l'USP publie, dans son 9e supplément, « validation of compendial methods, page 1225 », texte officialisé dans cette même pharmacopée le 1er janvier 1990.

2.6. Validation d'une méthode analytique selon l'International conférence on harmonisation[8]

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

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

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

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

2.6.1. Aspect réglementaire de la validation [7]

Le guideline ICH a dédié à la validation analytique :

- **Q2:** « Analytical validation ».
 - **Q2 A:** « Text on validation of analytical procedures » : Il présente une discussion sur les caractéristiques qui doivent être prise en compte au cours de la validation des méthodes analytiques.
 - **Q2 B :** « Méthodologie » : Son but est de fournir des conseils et recommandations sur la manière d'appréhender les différentes caractéristiques de la validation pour chaque méthode analytique. En outre, le document fournit une indication sur les données qui devrait être présentées dans un dossier d'enregistrement.

2.7. Objectif de la validation analytique

Le but de la validation d'une méthode d'analyse est de démontrer qu'elle correspond à l'usage pour lequel elle est prévue. C'est l'ensemble des opérations nécessaires pour prouver que le protocole est suffisamment exact et fiable pour avoir confiance dans les résultats fournis et ceci pour un usage déterminé.[9]

La validation est une étape importante du cycle de vie d'une procédure analytique qui permet de démontrer la fiabilité des résultats.[9]

2.7.1. Validation des méthodes analytiques dans l'industrie pharmaceutique

Le champ d'application de la validation analytique s'étend à toute procédure d'analyse utilisée dans le développement galénique, allant du contrôle des médicaments en cours de fabrication, le contrôle des produits intermédiaires et finis et les essais de stabilité de tous les produits pharmaceutiques, de la bioanalyse dans le cadre des études cliniques et des études de bioéquivalence jusqu'aux études environnementales et agro-alimentaires...[10]

Quelle que soit la méthode d'analyse utilisée et quel que soit le domaine d'application, chaque laboratoire doit être en mesure de produire des résultats fiables lors de l'exécution de l'analyse pour un client ou pour des fins réglementaires, afin de répondre au problème analytique et donc à celui d'ordre socio-économique.[11]

2.8. Types de paramètres de validation

L'ICH décrit les procédures appliquées pour valider les essais prescrits dans les monographies des pharmacopées. Ces essais peuvent être des identifications, des essais de pureté ou de dosages. Donc, on distingue les différents types d'analyse suivants : [8]

Tableau 2.1: Types de paramètres de validation. [8]

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

	également fondée sur ces caractéristiques.
--	--

2.8.1. Identification [12]

Tests d'identification appropriés devraient être en mesure de distinguer les composés de structures étroitement liées qui sont susceptibles d'être présents. La discrimination d'une procédure peut être confirmée par l'obtention de résultats positifs (peut-être par comparaison avec un matériau de référence connu) à partir d'échantillons contenant l'analyte, couplé avec un résultat négatif à partir d'échantillons qui ne contiennent pas l'analyte. En outre, le test d'identification peut être appliqué à des matériaux de structure similaire ou étroitement liés à l'analyte pour confirmer qu'une réponse positive n'est pas obtenue. Le choix de ces matériaux potentiellement interférant doit être fondé sur un jugement scientifique solide avec une prise en compte des interférences qui pourraient se produire.

2.8.2. Dosage et Impuretés Test (s) [12]

Pour démontrer la spécificité des méthodes chromatographiques, on devra utiliser des chromatogrammes représentatifs où chacune des composantes est convenablement identifiée.

Des considérations semblables s'appliquent aux autres techniques de séparation. L'examen des séparations chromatographiques déterminantes devra être aussi poussé qu'il est nécessaire. On pourra démontrer la spécificité de ces méthodes en les utilisant pour séparer deux des composantes dont les pics d'élution sont les plus proches l'un de l'autre.

Si la méthode de détermination de la teneur n'est pas spécifique, il faudra des tests complémentaires pour démontrer la spécificité totale. Par exemple, si l'on dose une substance médicamenteuse à l'aide d'un titrage, on pourra le compléter en ajoutant un test de dosage approprié pour les impuretés.

- **Impuretés disponibles**[12] : S'il est possible d'obtenir des impuretés, on doit alors démontrer que la méthode de détermination de la teneur permet de faire la distinction entre la substance à analyser, les impuretés et (ou) les excipients. Pour ce faire, on enrichit la substance pure (substance médicamenteuse ou produit fini) en y ajoutant une quantité suffisante d'impuretés et (ou) d'excipients, puis on démontre que ces composantes additionnelles n'influencent pas les résultats obtenus pour la teneur (par comparaison aux résultats obtenus avec des échantillons non enrichis). Pour le test des

impuretés, on peut mettre en évidence les propriétés de discrimination de la méthode en ajoutant à la substance médicamenteuse ou au produit fini une quantité suffisante d'impuretés pour ensuite démontrer que les différentes impuretés présentes sont séparées les unes des autres et (ou) des autres composantes dans la matrice de l'échantillon.

- **Impuretés indisponibles** [12] : Si les impuretés ou des normes produits de dégradation ne sont pas disponibles, la spécificité peut être démontrée en comparant les résultats d'essai des échantillons contenant des impuretés ou des produits de dégradation à une seconde procédure bien caractérisée, par exemple : méthode de la pharmacopée ou toute autre procédure analytique validée (procédure indépendante). Le cas échéant, ceci devrait inclure des échantillons stockés dans des conditions de stress pertinentes : la lumière, la chaleur, l'humidité, l'acide / hydrolyse et l'oxydation base.

Pour l'essai, il convient de comparer les deux résultats de standard et placebo chargée.

Pour les tests d'impuretés, les profils d'impuretés doivent être comparés. Les tests de pureté des pics peuvent être utiles pour montrer que l'analyte pic chromatographique n'est pas attribuable à plus d'un composant (par exemple, réseau de diodes, spectrométrie de masse).

2.9. Critères de la validation analytique

Les principaux critères de validation sont ceux couramment utilisés dans les laboratoires d'analyse et dont la nécessité de l'étude a fait l'objet d'un large consensus. Ces critères sont représentés dans le tableau 2.1 suivants : [13]

Tableau 2.2 : Critères de validation en fonction de type d'analyse [4]

Type de tests caractéristiques	Dosage	Impuretés		Identification	Dosage bio analyse
		Quantitatif	Essais limites		
Justesse	✓	✓			✓
Fidélité répétabilité	✓	✓			✓
Fidélité intermédiaire	✓	✓			✓
Spécificité sélectivité	✓	✓	✓	✓	✓
Limite de détection		✓	✓		✓
Limite de quantification		✓			✓
Linéarité	✓	✓			
Gamme	✓	✓			✓
Robustesse	✓	✓	✓		✓

❖ Spécificité-sélectivité

La spécificité d'une procédure analytique est sa capacité à établir de manière univoque l'existence de la substance à analyser en présence d'autres composants potentiellement présents.

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 physicochimique ou un groupement fonctionnel d'une ou de plusieurs substance(s) dans l'échantillon [13].

Dans le cas des méthodes séparatives, on parle plutôt de sélectivité qui est la capacité à différencier et quantifier l'analyte cible en présence d'interférents dans l'échantillon, telles que les techniques chromatographiques, qui sont plutôt sélectives (notion relative) que spécifiques (notion absolue) [14]. Le degré de sélectivité de la procédure de dosage dépend d'ailleurs de la

qualité de la séparation chromatographique et de la sélectivité intrinsèque du mode de détection [13].

❖ **Linéarité**

La linéarité d'une procédure d'analyse est sa capacité à l'intérieur d'un certain intervalle de dosage d'obtenir des résultats directement proportionnels à la quantité (exemple : concentration) en analyte dans l'échantillon [13].

❖ **Exactitude (Justesse)**

L'exactitude exprime l'étroitesse de l'accord entre le résultat d'essai et la valeur de référence acceptée, aussi appelée « valeur conventionnellement vraie ». L'étroitesse de l'accord ainsi observée est la résultante de la somme des erreurs systématiques et aléatoires, en d'autres termes l'erreur totale liée au résultat. Par conséquent, l'exactitude est l'expression de la somme de la justesse et de la fidélité [13].

❖ **Précision (Fidélité)**

La fidélité 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 (résultat d'essais indépendants) dans des conditions prescrites. La fidélité fournit une indication sur les erreurs liées au hasard. [13]

La fidélité peut être évaluée à trois niveaux : la répétabilité, la fidélité intermédiaire (intra laboratoire) et la reproductibilité (inter laboratoire).

Les mesures quantitatives de la fidélité dépendent de façon critique des conditions stipulées.

Peuvent ainsi être distinguées les conditions de :

- ✓ **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. [13]
- ✓ **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. [13]

- ✓ **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 [13].

❖ **Limite de détection (LOD)**

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 [13].

❖ **Limite de quantification (LOQ)**

La limite de quantification est la plus petite quantité de l'analyte dans un échantillon pouvant être dosée dans les conditions expérimentales décrites avec une exactitude définie [13].

2.10. Développement d'une méthode d'analyse

La méthode d'analyse est la manière dont une analyse est réalisée. Chaque étape doit être décrite en détail. Il faut décrire notamment, mais non exclusivement, la préparation de l'échantillon, de l'étalon de référence et des réactifs, l'utilisation des appareils, la production de la courbe d'étalonnage, l'application des formules de calcul, etc.[15]

❖ **Procédures analytiques à valider [15]**

Selon les normes NF-EN-ISO / CEI : le laboratoire doit valider :

- ✓ Les méthodes conçues, développées par le laboratoire.
- ✓ Les méthodes normalisées employées en dehors de leur domaine d'application prévu ainsi que les applications ou modifications de méthodes normalisées.
- ✓ Les procédures analytiques de la Pharmacopée Européenne et de la Pharmacopée Américaine doivent être considérées comme validées .

On est trop souvent porté à présenter les méthodes d'analyse comme des procédures figées et qui n'est pas sujette au changement, C'est un peu l'impression que donnent les manuels et autres recueils de normes techniques.

Les méthodes d'analyse naissent, évoluent et meurent, comme tout procédé de production. Les méthodes d'analyse sont appliquées dans différents domaines : contrôle des médicaments, la bio-

analyse dans le cadre des études cliniques et des études de bioéquivalence, études environnementales, études agro-alimentaires[15].

Le laboratoire doit assurer des résultats fiables lors de l'exécution de l'analyse pour un client ou pour des fins réglementaires afin que le problème analytique sera traité, ainsi que le problème socio-économique, dans n'importe quel domaine et quelle que soit la méthode utilisée. La mise en œuvre d'une méthode peut se décomposer en quatre grandes phases généralement successives comme représentée par la Figure 2.1.

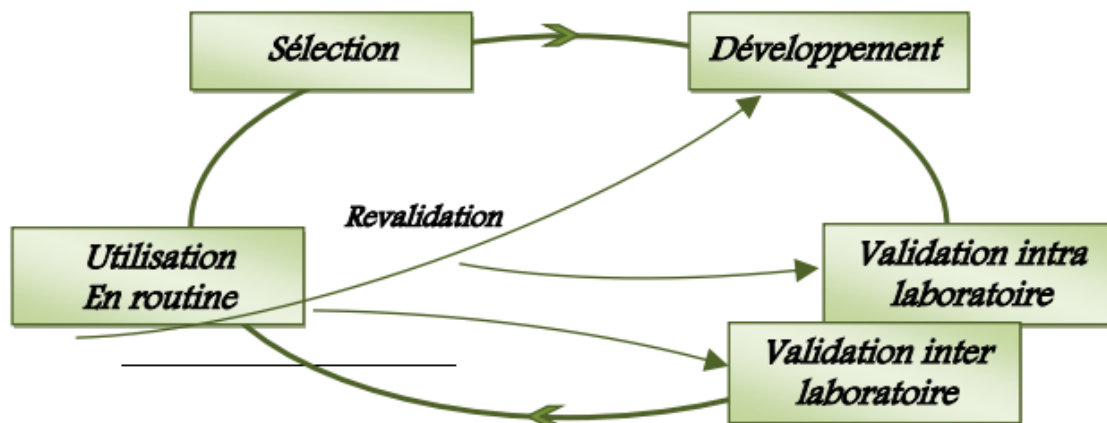


Figure 2.1: Cycle de vie d'une méthode d'analyse [16].

Sélection

D'abord on va sélectionner la méthode, c'est-à-dire l'analyste choisit parmi toutes les diverses méthodes physico-chimiques connues ou maîtrisées par le laboratoire la plus pertinente et qui permet de déterminer et doser un ou plusieurs analytes représentatifs du problème analytique à traiter [16].

Cette étape est critique pour l'analyste. En effet, étant le point de départ d'une méthode, les étapes suivantes et plus particulièrement les décisions qui seront prises dépendent d'elle. De ce fait, on doit bien circonscrire la problématique en vue de définir clairement les objectifs afin de proposer des solutions appropriées, matérialisées en termes de conditions opératoires [17].

Et afin de sélectionner la méthode adéquate, des questions triviales doivent être posées, par exemple :

- Qu'est-ce que l'analyte(s) ?
- Quelle est la nature de l'échantillon tel que les propriétés physiques et chimiques ?
- Quelles sont les informations nécessaires (qualitative, quantitative) ?
- Quel est le niveau (s) de concentration de l'analyte (s) à chercher ?
- Quel est le niveau d'exactitude nécessaire ?
- Quelles sont les limites d'acceptation de la méthode ?
- Qui d'autres constituants de l'échantillon sont généralement présentes ?
- Le nombre d'échantillons devront être analysé ?

Développement

Ensuite, il convient de développer la méthode, c'est la mise au point du mode opératoire approprié et l'adaptation de la méthode aux conditions pratiques où elle va être appliquée.

Cette étape doit être confiée à du personnel qualifié, fournis par les ressources nécessaires adéquates, pour que la démarche ainsi que les résultats obtenus soient et doivent être correctement renseignés.

En général, le développement d'une méthode est synonyme d'optimisation. Lorsque la mise au point est achevée, on dispose de ce que l'on appelle dans le cadre BPL un mode opératoire normalisé ou Standard Operating Procédure (SOP). Notamment, il faut indiquer le domaine d'application de la méthode avec précision, c'est-à-dire l'ensemble des matrices auxquelles elle s'emploie ainsi que la gamme de concentrations utilisables.[16]

Validation

C'est à ce moment, après le développement de la nouvelle procédure d'analyse, que doit intervenir l'étape de validation. On distingue deux types de validation : la validation intra-laboratoire et la validation inter-laboratoires.[18]

La validation intra-laboratoire est une validation interne, universelle et obligatoire, concerne l'ensemble des méthodes analytiques développées par un laboratoire.[18]

La validation inter-laboratoire – souvent plus lourde – n'intéresse en principe que les méthodes analytiques destinées à être utilisées par plusieurs laboratoires ou dont les résultats

peuvent servir à des échanges commerciaux ou des contrôles officiels. C'est pourquoi on peut la considérer comme optionnelle.[18]

Dans d'autres cas, certaines améliorations peuvent être apportées à la méthode. Ces modifications, et selon leur importance, mènent à appliquer une procédure plus ou moins complète de revalidation. Par un simple test effectué, l'impact de ces modifications sera déterminé. En effet, on doit effectuer une revalidation toutes les fois où l'on introduit une modification « mineure » de la méthode comme par exemple une modification de réglage comme laisser « 20min au bain-marie au lieu de 15 min ».[18]

Utilisation en routine

Si la validation se révèle conforme, la vie de la méthode va se poursuivre par son utilisation en routine. Valider une méthode ne représente que la première étape de sa mise sous assurance qualité, alors que le passage en routine de la méthode s'inscrit dans le cadre d'un système de contrôle de la qualité qui a pour objectifs de valider les résultats obtenus sur des échantillons inconnus, et de contrôler les performances de la méthode analytique au fil du temps.[18]

CHAPITRE 3

GENERALITES SUR LA

CHROMATOGRAPHIE

LIQUIDE

CHAPITRE 3

CHAPITRE 3

GENERALITES SUR LA CHROMATOGRAPHIE LIQUIDE

Introduction

La chromatographie est une technique de séparation des composants d'un mélange basée sur leurs interactions différenciées avec une phase mobile et une phase stationnaire.

3.1. Types de chromatographie

1. Chromatographie en phase liquide (HPLC) : Les composants sont séparés par leur interaction avec une phase liquide mobile qui traverse une phase stationnaire solide ou liquide.

2. Chromatographie en phase gazeuse (GC) : Les composants sont séparés par leur interaction avec une phase gazeuse mobile qui traverse une phase stationnaire liquide ou solide.

3. Chromatographie sur couche mince (TLC) : Les composants sont séparés par leur migration à travers une couche mince de support (stationnaire) sous l'effet d'une phase mobile.

4. Chromatographie en phase inverse (RPC) : Utilise une phase stationnaire hydrophobe et une phase mobile aqueuse pour séparer les composants en fonction de leur hydrophobicité.

5. Chromatographie d'exclusion stérique (SEC) : Sépare les composants en fonction de leur taille et de leur forme à travers une phase stationnaire poreuse.

6. Chromatographie d'affinité : Sépare les composants en fonction de leur affinité pour une molécule cible spécifique liée à la phase stationnaire.

7. Chromatographie ionique (IC) : Sépare les ions en fonction de leurs interactions avec une phase stationnaire échangeuse d'ions.

8. Chromatographie en phase supercritique (SFC) : Utilise un fluide supercritique comme phase mobile pour séparer les composants.

Ces techniques sont utilisées dans divers domaines, notamment en chimie analytique, en biochimie, en pharmacologie, en sciences environnementales, etc. Chaque type de chromatographie a ses propres applications et avantages spécifiques. Les plus employées

actuellement dans les laboratoires d'analyse chimique l'HPLC (High Performance Liquid Chromatography ou Chromatographie Liquide à Haute Performance anciennement appelée High-Pressure Liquid Chromatography pour Chromatographie Liquide à Haute Pression). Cette technique est devenue un outil analytique indispensable, elle permet l'identification, la séparation et le dosage des composés chimiques dans un mélange. Son succès est dû à la meilleure exploitation des mécanismes d'interactions, aux grandes efficacités des phases stationnaires de plus en plus fines (3µm) et au progrès importants effectués dans le domaine d'appareillage.

3.2. Principe de l'HPLC [19]

Les composés à séparer (solutés) sont mis en solution dans un solvant. Ce mélange est introduit dans la phase mobile liquide (éluant). Suivant la nature des molécules, elles interagissent plus ou moins avec la phase stationnaire dans un tube appelé colonne chromatographique.

La phase mobile poussée par une pompe sous haute pression, parcourt le système chromatographique. Le mélange à séparer est injecté à l'entrée de la colonne où il se dilue dans la phase mobile qui l'entraîne à travers la colonne. Les constituants du mélange injectés sont soumis à un phénomène appelé rétention et se déplacent tous plus vite que la phase mobile et que leur vitesse de déplacement sont différents. Ils sont ainsi élués de la colonne les uns après les autres et donc séparés.

Un détecteur placé à la sortie de la colonne couplé à un enregistreur permet d'obtenir un tracé appelé chromatogramme.

Dans des conditions chromatographiques données, le "temps de rétention" (temps au bout duquel un composé est élué de la colonne et détecté), caractérise qualitativement une substance. L'amplitude de ces pics, ou encore l'aire limitée par ces pics et la prolongation de la ligne de base permet de mesurer la concentration de chaque soluté dans le mélange injecté.

3.3. Appareillage

L'appareil HPLC comprend différents éléments : un réservoir à solvant contenant la phase mobile, un système de pompage permettant d'effectuer des éluations graduées, un injecteur, une colonne, un dégazeur, un détecteur et un système d'acquisition de données.

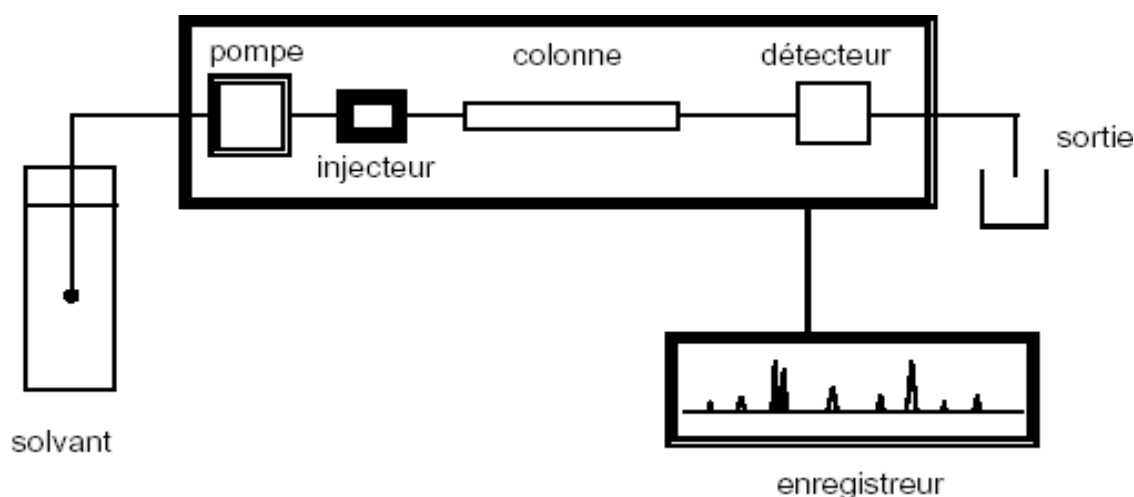


Figure 3.1.: Chromatographe HPLC [20]

a- Réservoir de solvant (éluant)

Il contient la phase mobile en quantité suffisante. La phase mobile est un solvant où un mélange de solvants qui doit être de pureté analytique et filtré pour éliminer les particules solides qui risqueraient d'endommager la pompe ou de bloquer la colonne. Le filtre, en acier inoxydable d'une porosité de 2 μm , est placé à l'extrémité dans le réservoir à solvant.

Plusieurs flacons d'éluant (solvants de polarités différentes) sont disponibles pour pouvoir réaliser des gradients d'élution (mélange de plusieurs solvants à des concentrations variables) à l'aide de la pompe doseuse. L'emploi d'un vase clos permet d'éviter l'évaporation, surtout si l'un des solvants est très volatil et lorsqu'il est nécessaire d'être en présence d'un gaz inerte [21]

Il existe deux modes de travail isocratique et gradient :

- **Mode isocratique**, c'est-à-dire la composition de la phase mobile doit rester constante tout au long de l'analyse.
- **Mode gradient**, c'est-à-dire les constituants du mélange de la phase mobile change avec le temps.

b- Pompe

Elle délivre en continu la phase mobile. Elle est caractérisée par la pression qu'elle permet d'atteindre dans la colonne, le débit délivré et la stabilité du flux.

- Débit : 0,01 à 10 ml/min,
- Stabilité < 1%
- Pression maximum 5000 psi

c- Injecteur [22]

Il faut absolument éviter de dissoudre les solutés dans un solvant plus éluant que la phase mobile. Il est souhaitable de dissoudre les solutés dans le liquide vecteur. Il existe deux types d'injection :

- Injection manuelle Par seringue,
- Injection automatique Par vanne (boucle d'échantillonnage). Ce type d'injection automatisable ne permet pas d'atteindre l'efficacité maximale. Il existe des vannes à boucles internes et des vannes à boucles externes.

d- colonne

La colonne est la partie la plus importante du système, puisque c'est à cet endroit que se fait la séparation des composés. Les colonnes sont en acier inoxydable, de longueur variant de 15 à 30cm avec un diamètre interne de 2 à 20 mm. Ces colonnes sont remplies de la phase stationnaire, dont le diamètre des particules varie de 3 à 10 μm . Des compagnies se spécialisent dans la vente de colonnes pour HPLC [23].

e- La phase stationnaire

- **La phase normale** : La phase normale est constituée de gel de silice. Ce matériau est très polaire. Il faut donc utiliser un éluant apolaire. Ainsi lors de l'injection d'une solution, les produits polaires sont retenus dans la colonne, contrairement aux produits apolaire qui sortent en tête. L'inconvénient d'une telle phase, c'est une détérioration rapide au cours du temps du gel de Silice, ce qui entraîne un manque de reproductibilité des séparations.
- **La phase inverse** : La phase inverse est majoritairement composée de silice greffée par des chaînes linéaires de 8 ou 18 atomes de carbones (C8 et C18). Cette phase est apolaire et nécessite donc un éluant polaire (MeCN, MeOH, H₂O). Dans ce cas, ce sont les composés polaires qui seront élués en premier. Contrairement à une phase normale, il n'y a pas d'évolution de la phase stationnaire au cours du temps, et la qualité de la séparation est donc maintenue constante.

f- La phase mobile

L'interaction plus ou moins forte entre la phase mobile et la phase stationnaire normale où à polarité inversée se répercute sur les temps de rétention des solutés.

g- Détecteurs

Les détecteurs ont pour but de fournir un signal électrique reflétant en continu les variations de composition de l'éluant à la sortie de colonne ce qui permet de détecter les différents composés existant dans l'éluant. Dès lors, le dispositif utilisé dépend de la nature de l'échantillon. IL existe plusieurs détecteurs:

- Détecteur UV –Visible
- Détecteur à indice de réfraction
- Détecteur stéréochimique.
- Détecteur de radioactivité.
- Détecteur PDA

Le détecteur le plus utilisé en HPLC, est le spectromètre d'absorption UV-Visible (190-600nm) relié à la sortie de colonne.

➤ **Détecteur par absorption UV-visible**

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

$$A = \varepsilon \times l \times C$$

C : concentration. **l** : longueur du trajet optique. **ε** : Coefficient d'extinction molaire du soluté.

➤ **Détecteur HPLC PDA**

Le détecteur PDA (Photodiode Array) dans la chromatographie liquide haute performance (HPLC) est un type de détecteur à barrettes de diodes très utilisé pour l'analyse de composés dans divers domaines comme la chimie pharmaceutique, l'agroalimentaire et l'environnement.

Principe de fonctionnement :

- détecteur PDA est basé sur une barrette de diodes qui mesure simultanément l'absorbance du soluté à différentes longueurs d'onde dans l'UV-visible (généralement 190-800 nm).

- Le faisceau de lumière d'une lampe (deutérium pour UV et tungstène pour visible) traverse la cellule de mesure contenant l'échantillon à analyser.
- La barrette de diodes capte l'intensité du rayonnement transmis pour chaque longueur d'onde.

Le détecteur PDA est très polyvalent et efficace pour l'analyse qualitative et quantitative de mélanges complexes en HPLC. Il apporte des informations spectrales précieuses pour l'identification et la purification des composés.

Les développements récents en HPLC

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

3.4. Définitions et grandeurs chromatographique

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

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

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

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

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

C_s : concentration du soluté dans la phase stationnaire.

C_m : concentration du soluté dans la phase mobile.

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

C'est le temps d'éluion au maximum du pic mesuré à partir de l'injection. Un chromatogramme type est schématisé, avec les paramètres principaux d'évaluation, sur la figure 3.2.

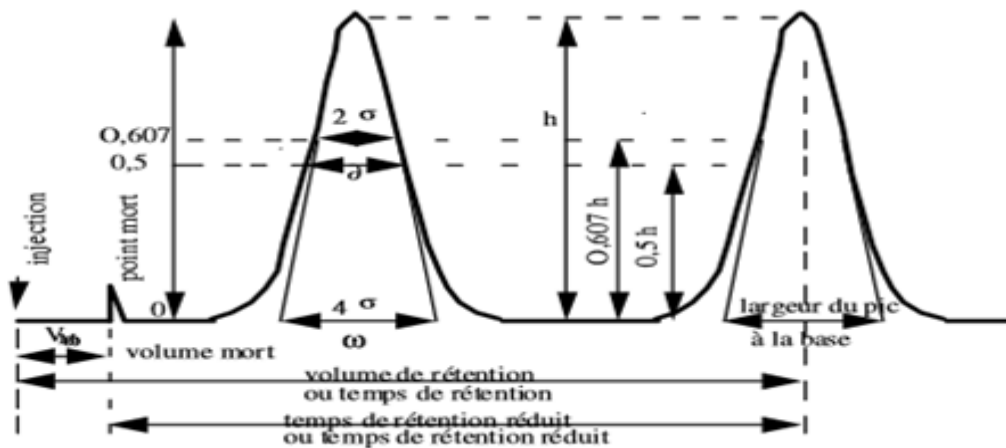


Figure 3.2. : principaux paramètres d'un chromatogramme.

Le facteur de capacité k' (ou facteur de rétention) : Pour s'affranchir des paramètres géométriques de la colonne, on utilise, pour caractériser la rétention d'un composé le facteur de capacité.

k' est le paramètre le plus important en chromatographie liquide.

$$K' = \frac{tR - t_0}{t_0}$$

Sélectivité d'une colonne : Pour caractériser la distance séparant les sommets de deux pics on utilise le facteur de sélectivité :

$$\alpha = \frac{tR2 - t0}{tR1 - t0}$$

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

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

$$N = 16 \times \left(\frac{tr}{\omega}\right)^2 = 5.54 \times \left(\frac{tr}{\delta}\right)^2$$

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

Résolution : La résolution R_s mesure la séparation qui existe entre deux pics chromatographique. Elle est définie par la relation :

$$R_s = 2 \times \frac{tr1 - tr2}{\omega1 + \omega2}$$

Plus R_s est grand, meilleure est la séparation. La séparation est complète quand **$R_s = 1$** (2 % de recouvrement des 2 pics).

CHAPITRE 4
MATERIEL ET
METHODES

CHAPITRE 4

MATERIEL ET METHODES

Dans le cadre de ce travail nous sommes intéressées à deux méthodes de validation analytiques l'une porte sur la validation des impuretés inconnues et l'autre la revalidation de dosage d'un nouveau produit (nouveau générique) forme gel.

Des modifications ont été apportées au protocole d'analyse des impuretés du produit fini préconisé par pharmacopée britannique pour des raisons pratiques.

L'objectif de notre travail est le suivi de la validation des méthodes selon les exigences de l'ICH.

4.1 Matériel

4.1.1 Réactifs

Le tableau suivant résume les différents réactifs utilisés pour la préparation des solutions

Tableau 4.1: Réactifs utilisés

Réactifs	Fournisseur
Acide phosphorique 85%	RANKOM
Acétonitrile HPLC	Fisher chimecal
Méthanol	Honeywell
Eau purifiée	Eau ultra purifiée

4.1.2 Appareillages et équipements

Les appareils et équipements utilisés dans ce travail sont résumés ci-dessous :

Tableau 4.2 : Appareillage et équipements

Appareil	Marque	Fonction
Purificateur	Elix	Purifier l'eau
Pompe à vide	Life Sciences	Filtrer de la phase mobile
Bain ultrason	BANDELIN	Solubilisation
Agitateurs magnétique	VWR	Homogénéisation des
Balances analytiques	METLER TOLEDO	Pesée
Vortex	Life sciences	Homogénéisation des solutions

➤ **Logiciel utilisé**

EMPOWER v3,0 a été utilisé pour contrôler le système HPLC de la marque alliance, afin d'enregistrer les résultats et d'établir les chromatogrammes pour la validation de la méthode de recherche des impuretés inconnues.

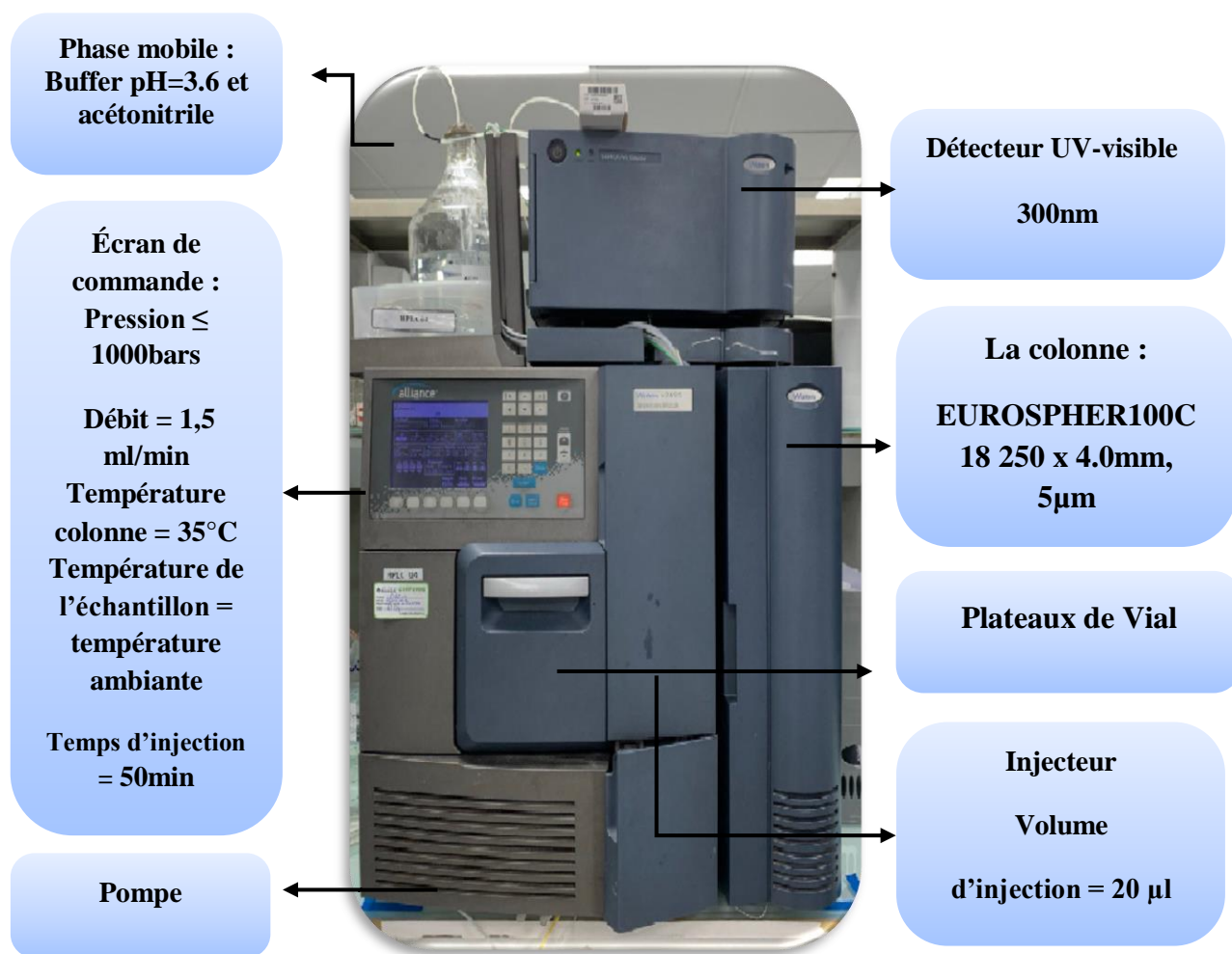


Figure 4.1 : Appareil HPLC et conditions pour la recherche des impuretés

EMPOWER v3,0 a été utilisé pour contrôler le système HPLC de la marque alliance, afin d'enregistrer les résultats et d'établir les chromatogrammes pour la méthode de dosage

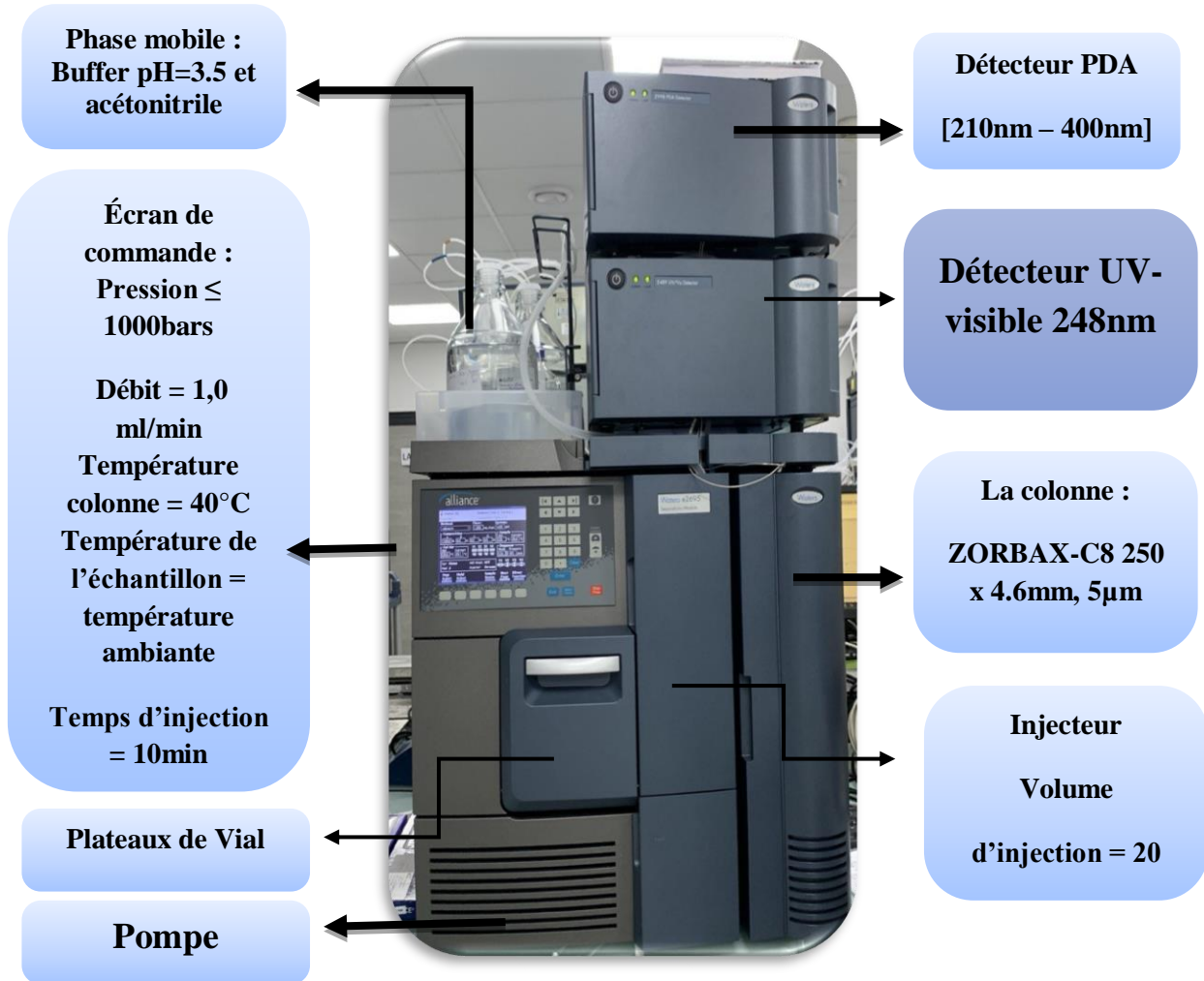


Figure 4.2 : Appareil HPLC pour l'identification et le dosage du PA dans le gel

4.2.Méthodes

4.2.1 Méthodologie de validation de la méthode de recherche des impuretés inconnues par HPLC dans le produit fini

Afin d'optimiser notre méthode de recherche des impuretés inconnues dans notre produit par HPLC, nous nous sommes référés à la pharmacopée britannique dans sa partie monographie du produit. Ils ont proposé d'utiliser un mélange d'acétonitrile et tampon pH=3.6 comme phase mobile avec différentes proportions.

4.2.1.1 Les conditions chromatographiques

Les conditions chromatographiques sont résumées dans le tableau suivant :

Tableau 4.3 : Conditions chromatographiques de la méthode les impuretés inconnues.

Colonne	EUROSPHER100C18 250 x 4.0mm, 5µm
Débit de la phase mobile	1,5 ml/min
Détecteur, longueur d'onde	300nm
Volume d'injection	20 µl
Température de la colonne	35°C
Temps d'injection	50 min

4.2.1.2 Préparations des solutions

- **Phase mobile**

Mélanger 35 % v/v d'acétonitrile HPLC et 65 % v/v de solution tampon pH3.6, la valeur de pH du mélange doit être contrôlée (pH3.7-3.8), filtrer à travers 0.45µm PTFE filtre à membrane ou équivalent et dégazer la phase mobile.

Acide phosphorique

Prendre une prise d'essai de 11.7g d'acide phosphorique 85 % et diluer dans 100 ml d'eau purifiée ; Bien mélanger.

Solution tampon pH3.6

Eau purifiée, ajuster à $\text{pH}=3.6 \pm 0.05$ avec acide phosphorique 85%.

- **Préparation des solutions à injecter**

- **Préparation du standard**

Peser avec précision 20,0mg de working standard et transfert dans une fiole jaugée de 50ml, dissoudre dans le méthanol avec bain ultrason et remplir jusqu'à le trait avec le même solvant, mélanger bien.

- **Préparation de solution d'échantillon**

Peser avec précision 4g de gel dans une fiole jaugée de 50ml, ajouter 30ml de méthanol et 300 μ l d'acide phosphorique 10% homogénéiser avec vortex l'échantillon pendant 30sec et ensuite ultrasonique pendant 5min, le processus est répété trois fois, ce qui fait un total de 20minutes bain a ultrason, après refroidissement à température ambiante, complété jusqu'au trait de jauge avec le méthanol, et agiter vigoureusement à la main pendant environ 10 à 20 sec.

Filtrer la solution à travers un filtre de GF/A et après à travers un filtre de diamètre de pore de 0,45 μ m en acétate.

- **Préparation de placebo**

Peser avec précision 4g de placebo dans une fiole jaugée de 50ml, ajouter 30ml de méthanol et 300 μ l d'acide phosphorique 10% homogénéiser avec vortex l'échantillon pendant 30sec et ensuite ultrasonique pendant 5min, le processus est répété trois fois, ce qui fait un total de 20minutes bain a ultrason, après refroidissement à température ambiante, complété jusqu'à trait de jauge avec le méthanol, et agiter vigoureusement à la main pendant environ 10 à 20 sec.

Filtrer la solution à travers une fibre de verre filtré GF/A et après à travers 0,45 μ m filtre en acétate

- **Préparation de placebo chargé : (solution contaminé)**

Peser avec précision 20mg de PA WS dans une fiole jaugée de 250ml, dissoudre dans le méthanol et complété jusqu'au trait de jauge avec le méthanol et mélanger.

Diluer 5ml de solution dans une fiole de 50ml et complété avec le méthanol et mélanger bien.

- **Préparation de placebo chargé a 0.0008mg/ml (placebo chargé à 100%)**

Peser avec précision 4g de placebo, ajouter 5ml de placebo chargé dans une fiole jaugée de 50ml, ajouter 30ml de méthanol et 300 μ l d'acide phosphorique 10% homogénéiser avec vortex l'échantillon pendant 30sec et ensuite ultrasonique pendant 5min, le processus est répété trois fois, ce qui fait un total de 20minutes bain a ultrason, après refroidissement à température ambiante, complété jusqu'à trait de jauge avec le méthanol, et agiter vigoureusement à la main pendant environ 10 à 20 sec.

Filterer la solution à travers une fibre de verre filtré GF/A et après à travers 0,45 μ m filtre en acétate.

- **Préparation de la gamme de linéarité et détermination de la LOQ**

- **La gamme de standard**

Solution STD à 0.208(μ g/ml) : (solution à 120% de la limite d'acceptation 0.2%)

Introduire 6.0ml de solution placebo chargé dans une fiole jaugée de 50ml, diluer au volume avec le méthanol, bien mélanger.

Solution STD à 0.32(μ g/ml) : (solution à 100% de la limite d'acceptation 0.2%)

Introduire 5.0ml de solution placebo chargé dans une fiole jaugée de 50ml, diluer au volume avec le méthanol, bien mélanger.

Solution STD à 0.64(μ g/ml) : (solution à 80% de la limite d'acceptation 0.2%)

Introduire 4.0ml de solution placebo chargé dans une fiole jaugée de 50ml, diluer au volume avec le méthanol, bien mélanger.

Solution STD à 0.8($\mu\text{g/ml}$) : (solution à 40% de la limite d'acceptation 0.2%)

Introduire 2.0ml de solution placebo chargé dans une fiole jaugée de 50ml, diluer au volume avec le méthanol, bien mélanger.

Solution STD à 0.96($\mu\text{g/ml}$) : (limite de déclaration d'environ 0.05%)

Introduire 1.3ml de solution placebo chargé dans une fiole jaugée de 50ml, diluer au volume avec le méthanol, bien mélanger.

➤ **Gamme de solutions d'échantillon de placebo chargé**

Solution d'échantillon placebo chargé à 0.208($\mu\text{g/ml}$) : (solution à 120% de la limite d'acceptation 0.2%)

Peser avec précision 4g de placebo dans une fiole jaugée de 50ml ajouter 6ml de solution placebo chargé et 30ml de méthanol et 300 μl d'acide phosphorique à 10%. Homogénéiser avec vortex l'échantillon pendant 30sec et ensuite ultrasonique pendant 5min, le processus est répété trois fois, ce qui fait un total de 20minutes bain a ultrason, après refroidissement à température ambiante, complété jusqu'à trait de jauge avec le méthanol, et agiter vigoureusement à la main pendant environ 10 à 20 sec.

Filtrer la solution à travers une fibre de verre filtré GF/A puis sur un filtre en acétate de 0,45 μm .

Solution d'échantillon placebo chargé à 0.32($\mu\text{g/ml}$): (solution à 100% de la limite d'acceptation 0.2%)

Peser avec précision 4g de placebo dans une fiole jaugée de 50ml ajouter 5ml de solution placebo chargé et 30ml de méthanol et 300 μl d'acide phosphorique à 10%. Homogénéiser avec vortex l'échantillon pendant 30sec et ensuite ultrasonique pendant 5min, le processus est répété trois fois, ce qui fait un total de 20minutes bain a ultrason, après refroidissement à température ambiante, complété jusqu'à trait de jauge avec le méthanol, et agiter vigoureusement à la main pendant environ 10 à 20 sec.

Filtrer la solution à travers une fibre de verre filtré GF/A puis sur un filtre en acétate de 0,45µm.

Solution d'échantillon placebo chargé à 0.64(µg/ml) : (solution à 80% de la limite d'acceptation 0.2%)

Peser avec précision 4g de placebo dans une fiole jaugée de 50ml ajouter 4ml de solution placebo chargé et 30ml de méthanol et 300µl d'acide phosphorique à 10%. Homogénéiser avec vortex l'échantillon pendant 30sec et ensuite ultrasonique pendant 5min, le processus est répété trois fois, ce qui fait un total de 20minutes bain a ultrason, après refroidissement à température ambiante, complété jusqu'à trait de jauge avec le méthanol, et agiter vigoureusement à la main pendant environ 10 à 20 sec.

Filtrer la solution à travers une fibre de verre filtré GF/A puis sur un filtre en acétate de 0,45µm.

Solution d'échantillon placebo chargé à 0.8(µg/ml): (solution à 40% de la limite d'acceptation 0.2%)

Peser avec précision 4g de placebo dans une fiole jaugée de 50ml ajouter 2ml de solution placebo chargé et 30ml de méthanol et 300µl d'acide phosphorique à 10%. Homogénéiser avec vortex l'échantillon pendant 30sec et ensuite ultrasonique pendant 5min, le processus est répété trois fois, ce qui fait un total de 20minutes bain a ultrason, après refroidissement à température ambiante, complété jusqu'à trait de jauge avec le méthanol, et agiter vigoureusement à la main pendant environ 10 à 20 sec.

Filtrer la solution à travers une fibre de verre filtré GF/A puis sur un filtre en acétate de 0,45µm.

Solution d'échantillon placebo chargé à 0.96(µg/ml) : (limite de déclaration d'environ 0.05%)

Peser avec précision 4g de placebo dans une fiole jaugée de 50ml ajouter 1.3ml de solution placebo chargé et 30ml de méthanol et 300µl d'acide phosphorique à 10%. Homogénéiser avec vortex l'échantillon pendant 30sec et ensuite ultrasonique pendant 5min, le processus est répété trois fois, ce qui fait un total de 20minutes bain a ultrason, après refroidissement à température ambiante, complété jusqu'à trait de jauge avec le méthanol, et agiter vigoureusement à la main pendant environ 10 à 20 sec.

Filtrer la solution à travers une fibre de verre filtré GF/A puis sur un filtre en acétate de 0,45µm.

4.2.1.3 Paramètres de validation (selon ICH et la pharmacopée britannique)

Paramètre de validation et les critères d'acceptation des impuretés inconnues par HPLC sont représentés dans le tableau suivant :

Tableau 4.4: les paramètres et les critères d'acceptation de la méthode des impuretés inconnues

Impuretés inconnues		
N°	Paramètres	Critères d'acceptation
1	Système de suitability (conformité de système)	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Le RSD des aires de pic du PA obtenu dans les 06 successifs injections de la solution standards doivent être $\leq 5.0\%$ ▪ Le nombre de plateaux théoriques (NPTA) du pic de PA obtenu dans la solution standards doit être ≥ 2000 ▪ Le facteur de symétrie du PA obtenu dans la solution standard doit être compris entre $[0.8 - 2.0]$
2	La spécificité	Aucune interférence ne doit être observée dans les chromatogrammes du blanc et du placebo au même temps de rétention des pics d'impuretés inconnus qui apparaissent dans les chromatogrammes sous différentes solutions de dégradation forcée.
3	Linéarité et LOQ	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Le coefficient de corrélation R^2 doit être $\geq 0,99$ ▪ Le biais moyen doit être compris entre 95,0% et 105,0%
4	La précision (fidélité)	
4.1	Répétabilité	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Le RSD des facteurs de récupération pour 06 préparations de la solution placebo chargé à 100% doit être $\leq 5,0\%$
4.2	Fidélité	La différence absolue entre la

	Intermédiaire	<p>moyenne des facteurs de récupération doit être $\leq 2\%$</p> <ul style="list-style-type: none"> ▪ Le % RSD doit être $\leq 5,0\%$. <p>La moyenne \pm l'intervalle de confiance série1 / série2 doivent être compris entre 98.0% - 102.0%</p>
5	L'exactitude	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Le RSD du facteur de récupération doit être $\leq 5,0\%$. ▪ La moyenne des facteurs de récupération doit être comprise entre 97% et 103%
6	Stabilité des solutions	<ul style="list-style-type: none"> ▪ L'augmentation du NMT de 0,05% pour toute impureté individuelle est acceptée pour démontrer la stabilité de la solution d'échantillon (à température ambiante et au réfrigérateur entre 2°C-8°C).
7	Robustesse	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Si la valeur 0 est incluse dans l'intervalle de confiance d'un paramètre l'effet de ce paramètre sur la variation acceptée est insignifiant sur la réponse obtenue.

- **La conformité du système**

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

Elle est démontrée par analyser 06 fois la solution standard

1. Spécificité

La spécificité est la capacité d'évaluer sans équivoque l'analyte en présence de composants dont on peut s'attendre à ce qu'ils soient présents.

Pour garantir que toutes les procédures analytiques effectuées permettent une déclaration précise de la teneur en impuretés d'un analyte, c'est-à-dire test de substances associées, métaux lourds, teneur en solvants résiduels, etc.

- l'évaluation de la spécificité faite sur l'injection du blanc et de placebo et le standard
- Aucune interférence ne doit être observée dans les chromatogrammes du blanc et du placebo au même temps de rétention de standard

2. Linéarité

La linéarité d'une procédure analytique est sa capacité (dans une gamme donnée) à obtenir des résultats de test directement proportionnels à la concentration (quantité) de l'analyte dans l'échantillon.

Selon l'ICH l'étude de la linéarité est faite pour 2 séries sur cinq niveaux (26%,40%, 80%,100%,120%)

Préparer une gamme d'étalonnage de cinq niveaux de concentrations (26, 40, 80, 100 et 120%) en dissolvant respectivement :0.208 $\mu\text{g}/\text{ml}$; 0.32 $\mu\text{g}/\text{m}$; 0.64 $\mu\text{g}/\text{m}$; 0.8 $\mu\text{g}/\text{m}$; 0.96 $\mu\text{g}/\text{m}$ du principe actif et du placebo chargé.

Cela nous permet de tracer une droite de régression de la linéarité, en traçant la courbe représentative des surfaces des pics du principe actif et placebo chargé en fonction de sa concentration. La pente **a**, l'ordonnée à l'origine **b** de la droite ainsi que le coefficient de corrélation **R** sont calculés et l'équation de la droite de régression est établie.

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

3. Limite de quantification (LOQ)

La limite de quantification d'une procédure analytique individuelle est la quantité la plus faible d'analyte dans un échantillon qui peut être déterminée quantitativement avec une précision et une exactitude appropriée. La limite de quantification est un paramètre des analyses quantitatives pour les faibles niveaux de composés dans les matrices d'échantillons et elle est utilisée en particulier pour la détermination des impuretés et/ou des produits de dégradation.

❖ Pour calculée Limite de quantification (LOQ) en utilisant la formule suivante :

$$LOQ = 10 \times (SD / a) \dots\dots\dots(4.2.1)$$

4. Limite de détection (LOD)

La limite de détection d'une procédure analytique individuelle est la quantité la plus faible d'analyte dans un échantillon qui peut être détectée mais pas nécessairement quantifiée comme une valeur exacte.

❖ Pour calculée Limite de détection (LOD) en utilisant la formule suivante :

$$LOD = 3.3 \times (SD / a) \dots\dots\dots(4.2.2)$$

5. Précision (fidélité)

La précision d'une procédure analytique exprime l'étroitesse de l'accord (degré de dispersion) entre une série de mesures obtenues à partir d'échantillonnages multiples du même échantillon homogène dans les conditions prescrites. La précision peut être considérée à trois niveaux : répétabilité, précision intermédiaire et reproductibilité.

La précision doit être étudiée à l'aide d'échantillons homogènes et authentiques. Toutefois, s'il n'est pas possible d'obtenir un échantillon homogène, celui-ci peut être étudié à l'aide d'échantillons préparés artificiellement ou d'une solution échantillon.

La précision d'une procédure analytique est généralement exprimée comme la variance, l'écart type ou le coefficient de variation d'une série de mesures.

5.1. Répétabilité

La répétabilité exprime la précision dans les mêmes conditions de fonctionnement sur un court intervalle de temps. La répétabilité est également appelée précision intra-essai.

Calcul :

$$\text{facteur de recouvrement}(\%) = \frac{\text{concentration calculée de l'analyte dans le placebo chargé}}{\text{concentration introduite de l'analyte dans le placebo chargé}} \times 100 \dots\dots(4.2.3)$$

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

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

5.2. La fidélité intermédiaire

La précision intermédiaire exprime des variations au sein des laboratoires : différents jours, différents analystes, différents équipements, etc.

L'étude de la fidélité est faite pour 2 séries 6fois sur un seul niveau (placebo chargé à100%) cette opération faite dans 2 jours.

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

Calcul :

- La moyenne des facteurs de recouvrement :

Pour n répétitions, la moyenne (\bar{F}) des facteurs de recouvrement est :

$$F = \frac{\sum_{i=1}^n Fi}{n} \dots\dots(4.2.4)$$

Où Fi est le facteur de recouvrement pour chaque répétition.

- **Alpha :** L'alpha (α) est le niveau de signification pour les tests statistiques, on choisit 0.05 pour un intervalle de confiance de 95%.
- **Calcul de l'Écart-Type**

Calcule l'écart-type (s) des facteurs de recouvrement :

$$Si' = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n (Fi - \bar{F})^2}{n-1}} \dots\dots(4.2.3)$$

- **Calcul de l'Intervalle de Confiance**

L'intervalle de confiance (IC) pour la moyenne des facteurs de recouvrement est calculé en utilisant la distribution t de student . Les étapes sont les suivantes :

Détermination La valeur Critique t

Pour un intervalle de confiance à 95% et 5 degrés de liberté, trouve la valeur critique $t_{\alpha/2, n-1}(t_{0.025,5})$ est approximativement 2,1 dans la série 1 et 1,5 dans la série 2.

Donc :

$$\bar{F} \pm t_{\alpha/2, n-1} \cdot \frac{S_i'}{\sqrt{n}} \dots\dots(4.2.4)$$

6. Exactitude

L'exactitude d'une procédure analytique exprime l'étroitesse de l'accord entre la valeur acceptée soit comme valeur vraie conventionnelle, soit comme valeur de référence acceptée, et la valeur trouvée.

L'exactitude est évaluée avec 3 niveaux de concentration différents (correspondant à 80, 100 et 120 % de la concentration de la solution d'essai) en dissolvant respectivement : 16 mg ; 20 mg ; 24 mg de principe actif dans des fioles jaugées de 50 ml avec le diluant,

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

7. La robustesse

La robustesse d'une procédure analytique est une mesure de sa capacité à répondre aux critères de performance attendus lors d'une utilisation normale. La robustesse est testée par des variations délibérées des paramètres de la procédure analytique. (ICH Q14)

Les solutions à préparer

Solution échantillon (placebo chargé) :

- ✓ Echantillon 01 : placebo chargé en principe actif à 26%
- ✓ Echantillon 02 : placebo chargé en principe actif à 120%
- ✓ Une solution standard pour la quantification des échantillons.

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

On a démontré la variation des paramètres de robustesse dans le tableau 4.7.

Tableau 4.5 : La variation des Paramètres de la robustesse

	Concentration de STD (ug/ml)	Le débit (ml/min)	La longueur d'onde (nm)
Valeur nominale	0.8	1.5	300
La variation	Entre 26% et 120 %	± 0.2	± 2
Niveau faible (-)	0.208 (26%)	1.3	298
Niveau élevé (+)	0.96 (120%)	1.7	302

8. La stabilité

- les tests de stabilité faite sur les placebos chargés à 100% et à t = 0 et t = 72h

Donc on a préparé 3 placebos chargés à 100% et les analyser après on a refait l'analyse après 72h

- on doit faire la comparaison entre les résultats trouvés

- Le pourcentage des impuretés inconnues :

$$\% \text{ IMP inconnues} = \frac{\text{aires impuretés}}{\text{PA de l'échantillon}} \dots\dots\dots (4.2.5)$$

4.2.2 Méthodologie de vérification de la méthode d'identification de dosage de principe actif par HPLC dans le produit fini :

Afin d'optimiser notre méthode de dosage à mettre en œuvre lors de la vérification de la méthode analytique de l'identification de dosage du principe actif dans le gel anti-inflammatoire.

Objectif :

La vérification d'une méthode est une évaluation systématique d'une procédure visant à démontrer qu'elle est scientifiquement acceptable dans les conditions dans lesquelles elle doit être appliquée et à améliorer que la méthode adoptée soit spécifique, exacte et précise.

La vérification est faite pour confirmer le fonctionnement de la méthode de la pharmacopée britannique pour exploiter cette méthode dans le contrôle de routine .

4.2.2.1 Les conditions chromatographiques :

Les conditions chromatographiques sont résumées dans le tableau suivant :

Tableau 4.6 : Conditions chromatographiques de la méthode de dosage

Colonne	ZORBAX RX -C8 250 x 4.6mm, 5µm
Débit de la phase mobile	1,0 ml/min
Détecteur, longueur d'onde	248nm
Volume d'injection	20 µl
Température de la colonne	40°C
Temps d'injection	10 min

4.2.2.2 Les paramètres à vérifier et les critères d'acceptation pour l'identification et le dosage par HPLC

Les paramètres et les critères d'acceptation pour la vérification de dosage est représenté dans le tableau suivant :

Tableau 4.7: Les paramètres à vérifier et les critères d'acceptation pour l'identification et le dosage par HPLC

N°	Paramètres	Critères d'acceptation
1	<p align="center">System suitability (conformité de système)</p>	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Le RSD des aires de pic du PA obtenu dans le 06 successifs injections de la solution standards doivent être $\leq 2.0\%$ ▪ Le nombre de plateaux théoriques (NPTA) du pic de PA obtenu dans la solution standards doit être ≥ 2000 ▪ Le facteur de symétrie du PA obtenu dans la solution standard doit être compris entre 0.8 et 2.0.
2	<p align="center">La spécificité</p>	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Aucune interférence ne doit être observée dans les chromatogrammes du blanc et du placebo au même temps de rétention des pics PA de la solution standard (s'il existe, il ne doit pas être supérieur à NMT 2.0%).
3	<p align="center">Identification</p>	<ol style="list-style-type: none"> 1. Par HPLC : Le temps de rétention du pic de PA obtenu dans la solution échantillon doit correspondre au temps de rétention du pic de PA obtenu dans la solution standard. 2. Par HPLC avec détecteur PDA : Le spectre UV obtenu avec le pic du PA dans la solution échantillon doit correspondre à celui avec la solution standard dans la gamme 210nm à 400nm.
4	<p align="center">La précision</p>	
4.1	<p align="center">Répétabilité</p>	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Le RSD des facteurs de récupération pour 06 préparations d'échantillons à 100% doit être $\leq 2.0\%$
4.2	<p align="center">Intermédiaire</p>	<ul style="list-style-type: none"> ▪ La différence absolue entre la moyenne des facteurs de récupération doit être $\leq 2.0\%$

		<ul style="list-style-type: none"> ▪ Le% RSD total doit être $\leq 2.0\%$ <p>La moyenne \pm l'intervalle de confiance série1 / série2 doivent être compris entre 98.0% - 102.0%</p>
5	L'exactitude	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Le RSD du facteur de récupération doit être $\leq 2.0\%$ ▪ La moyenne de % de récupération doit être comprise entre 98.0% - 102.0%
6	Stabilité des solutions	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Les valeurs de x et Dt doivent être $\leq 2.0\%$ (à température ambiante et au réfrigérateur 2°C - 8°C).

4.2.2.3 Préparation des solutions

- **Préparation de La phase mobile**

Mélanger 30 volumes d'acétonitrile HPLC, 15 volumes de méthanol HPLC et 55 volumes de solution tampon pH3.5, filtrer sur membrane filtre PTFE 0.45 μ m ou équivalent et dégazer la phase mobile.

Acide phosphorique

11.7g d'acide phosphorique 85 % dilué à 100 ml avec l'eau purifiée, et mélanger bien.

Solution tampon (buffer solution) pH3.6

Dissoudre 6g d'ortho phosphate monosodique (sodium dihydrogène ortho phosphate) dans 1000ml d'eau purifiée, ajuster à pH=3.5 \pm 0.05 avec acide phosphorique 85%.

- **Préparation des solutions à injecter**

Solution mère standard

Peser avec précision 100.0mg de P WS et transférer dans une fiole jaugée de 100ml, dissoudre dans l'acide méthanoïque HCl 0.01N et remplir jusqu'au trait avec le même solvant, bien mélanger.

Solution standard

Transférer 5ml de solution mère standard dans une fiole jaugée de 100ml, remplir jusqu'au trait avec la phase mobile, bien mélanger.

Solution d'échantillon

Peser avec précision 1g de gel de P dans une fiole jaugée de 100ml, Ajouter 5ml d'acide chlorhydrique méthanoïque 0.01N, agiter pendant 10min, remplir jusqu'au trait de phase mobile, mélanger bien.

Filtrer la solution sur un filtre en fibre de verre GF/C puis sur un filtre en acétate de 0.45µm.

Solution mère placebo (stock)

Peser avec précision 1g de placebo dans une fiole jaugée de 100ml, ajouter 5ml d'acide chlorhydrique méthanoïque 0,01N, agiter pendant 10min, ajouter environ 50ml de phase mobile et agiter vigoureusement pendant 10min, compléter au trait avec la phase mobile, bien mélanger.

Filtrer la solution sur un filtre en fibre de verre GF/C puis sur un filtre en acétate de 0.45µm.

Solution mère d'échantillon placebo chargé

Peser avec précision 1g de placebo dans une fiole jaugée de 100ml, ajouter 5ml de solution mère standard, agiter pendant 10 min, ajouter environ 50ml de phase mobile et agiter vigoureusement pendant 10min, remplir jusqu'au trait de phase mobile, bien mélanger.

Filtrer la solution sur un filtre en fibre de verre GF/C puis sur un filtre en acétate de 0,45µm.

CHAPITRE 5
RESULATATS ET
DISCUSSION

CHAPITRE 5

RESULTATS ET DISCUSSION

L'objectif de ce chapitre est de présenter et discuter les résultats obtenus relatifs à la validation de la méthode des impuretés inconnus par HPLC et par la suite présenter et discuter ceux obtenus relatifs à la revalidation de la méthode d'identification et de dosage du principe actif dans le produit fini gel par HPLC.

5.1 Validation de la méthode des impuretés inconnues (substances apparentées)

❖ Evaluation de la conformité de système

➤ Résultats des injections

Après avoir injecté 06 fois la solution standard, nous avons obtenu les résultats et les chromatogrammes représentés sur les tableaux

Les aires de pic des injections du standard à 300nm sont représentées dans le tableau

Tableau 5.1 : Résultats de la répétabilité des aires du principe actif

Injections	Solution témoin	Aires du pic du principe actif
1	Standard	14496
2	Standard	13862
3	Standard	13079
4	Standard	13687
5	Standard	14769
6	Standard	14644
Moyenne		14094.5
RSD%		4,7
Norme		< 5.0%

Selon les résultats de tableau on peut dire que le système est conforme

➤ Résultats de validation de la performance de la colonne

Les résultats obtenus pour la performance de la colonne sont représentés par la Figure 5.1 et dans le Tableau 5.2.

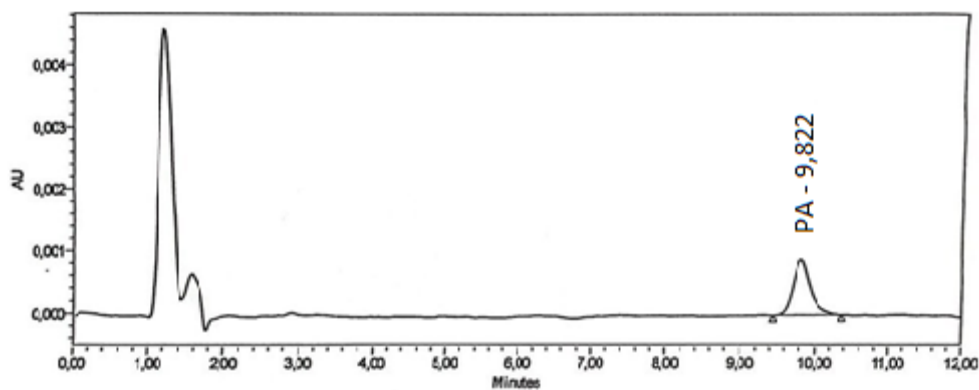


Figure 5.1 : chromatogramme de performance de la colonne

Tableau 5.2 : Résultats des paramètres de performances de la colonne

	RSD%	Le nombre de plateaux théoriques	Facteur de symétrie
PA	4.7	9405,48	1,2

D'après les résultats obtenus nous pouvons conclure que notre colonne est performante pour notre validation.

5.1.1. Spécificité

La spécificité de la méthode a été vérifiée en comparant des chromatogrammes du blanc, du placebo et principe actif représentés par les Figures 5.2. et 5.3.

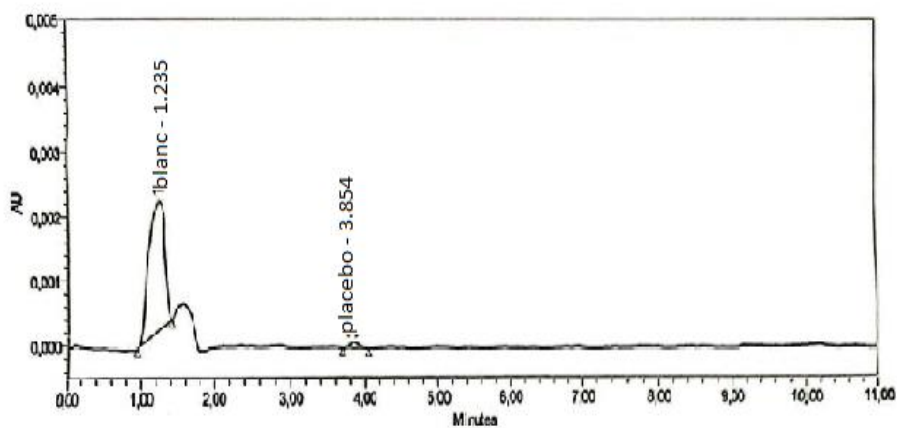


Figure 5.2. Chromatogramme du blanc et placebo

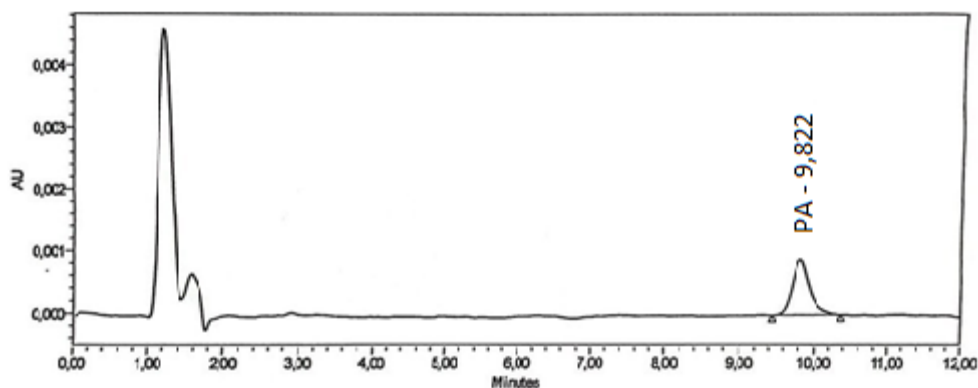


Figure 5.3. Chromatogramme de PA

Le chromatogramme du standard présente un pic du principe actif au temps de rétention de 9,822min alors que celui du blanc et du placebo ne présentent aucun pic à ce niveau, donc pas d'interférence ce qui démontre la spécificité de la méthode.

5.1.2. Evaluation de linéarité des méthodes analytiques

➤ **Linéarité de la méthode pour le principe actif**

Les résultats de l'étude de la linéarité, réalisée sur le principe actif dans le domaine (26% à 120%), sont résumés dans le Tableau 5.3 et représentés par la Figure 5.4

Tableau 5.3 : Résultats de la linéarité de la méthode pour le principe actif

Concentration théorique (Xi) en %	Concentration réelle (Xi réel) en (µg/ml)	Moyenne des aires (Yi)	Moyenne de biais (%)
26%	0.208	3196.000	99.28
40%	0.32	5953.000	
80%	0.64	11560.000	
100%	0.8	14021,667	
120%	0.96	16845.000	

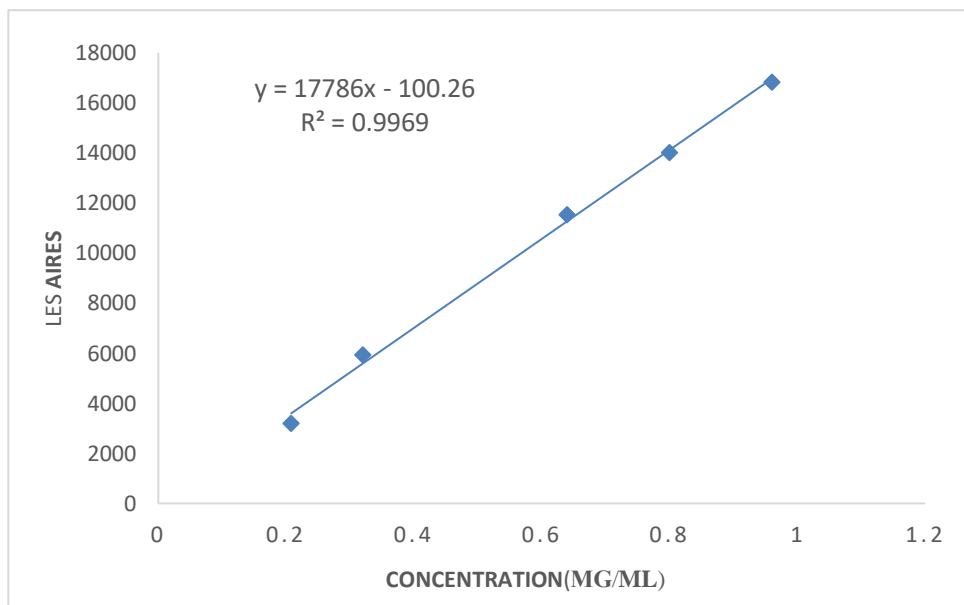


Figure 5.4. : Droite de régression du signal en fonction de la concentration de l'analyte (linéarité sur le PA).

D'après le graphique de la linéarité pour le PA, nous pouvons conclure que la méthode est linéaire. En effet, la courbe de linéarité est une droite sous forme $y = ax + b$ avec une pente $a = 17786$, une ordonnée à l'origine $b = -100.26$ et un coefficient de corrélation $R = 0.998$, ce qui répond aux critères d'acceptation indiqués par l'ICH.

➤ **Linéarité sur le placebo chargé**

Les résultats de cette étude, effectués dans le domaine (26% à 120%) sont reportés dans le Tableau 5.4. et représentés par la Figure 5.5.

Tableau 5.4 : Résultats de la linéarité de la méthode pour le placebo chargé

Concentration théorique (Xi) en %	Concentration réelle (Xi réel) en (µg/ml)	Moyenne des aires (Yi)	Moyenne de biais (%)
26%	0.208	3993.333	101.31
40%	0.32	5592.333	
80%	0.64	10773.667	
100%	0.8	14261.333	
120%	0.96	17665.667	

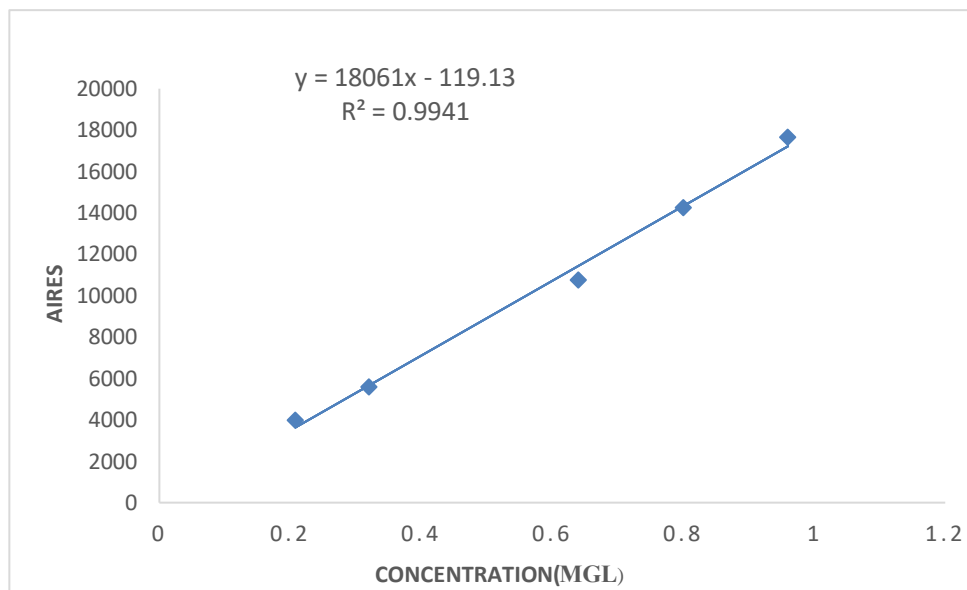


Figure 5.5 : Droite de régression du signal en fonction de la concentration de l'analyte (linéarité sur le placebo chargé).

D'après le graphique de la linéarité pour le placebo chargé (figure 5.5) nous pouvons conclure que la méthode est linéaire. En effet, la courbe de linéarité est une droite sous forme $y = ax + b$ avec une pente $a = 18061$, une ordonnée à l'origine $b = -119,13$, et un coefficient de corrélation $R = 0.997$, ce qui répond aux critères d'acceptation indiqués par l'ICH.

Le Tableau 5.5 résume les résultats de l'étude de la linéarité obtenus pour le PA et le placebo chargé.

Tableau 5.5 : Résultats des paramètres de la linéarité

Paramètres	PA	Placebo chargé
Pente	140.74	142.91
Ordonnée à l'origine	-100.26	-119.13
Coefficient de corrélation (R)	0.998	0.997
Coefficient de régression (R ²)	0.9969	0.9941
Biais moyen (%)	99.28	101.31

5.1.3. Limite de détection (LOD) et limite de quantification (LOQ)

Les valeurs de la limite de détection (LOD) et la limite de quantification (LOQ) sont égales à 0.01673 µg/mL et 0.0507 µg/mL respectivement, ce qui prouve la bonne sensibilité de la méthode HPLC proposée.

5.1.4. Précision (Fidélité)

L'étude de la fidélité est réalisée sur le placebo chargé à 100%. La fidélité s'exprime par la mesure de la répétabilité et la précision intermédiaire.

Les résultats de la fidélité qui inclue la précision intermédiaire et la répétabilité du principe actif dans le placebo sont représentés dans le Tableau 5.6.

Tableau 5.6. : Résultats de l'étude de la fidélité pour les impuretés (série 1 et 2)

Echantillon	Prises d'essais (mg)	Aires de standard	Aires échantillon	C calculée (mg/ml)	C introduite (mg/ml)	Facteur de recouvrement (%)
Série 1						
01	20.22	14090	13846	0.001	0.001	98.3
02	20.22	14090	13808	0.001	0.001	98.0
03	20.22	14090	13863	0.001	0.001	98.4
04	20.22	14090	13622	0.001	0.001	96.7
05	20.22	14090	14273	0.001	0.001	101.3
06	20.22	14090	14609	0.001	0.001	103.7
Moyenne						99,4
SD						2,6
RSD%						2,6
Intervalle de confiance (\bar{x})						2.1
Intervalle de confiance 95%(inf)						97.3%
Intervalle de confiance 95%(sup)						101.5%
Série 2						
01	20.22	13216	13120	0.001	0.001	99,3
02	20.22	13216	13780	0.001	0.001	104,3
03	20.22	13216	13422	0.001	0.001	101,6
04	20.22	13216	13240	0.001	0.001	100,2
05	20.22	13216	13357	0.001	0.001	101,1
06	20.22	13216	13175	0.001	0.001	99,7
Moyenne						101,0
SD						1,8
RSD%						1,8
Intervalle de confiance (\bar{x})						1.5
Intervalle de confiance 95%(inf)						99.5
Intervalle de confiance 95%(sup)						102.5
Résultats de l'étude de la fidélité intermédiaire						
Facteur de recouvrement (Yi)						100.2
L'écart-type						2.3
RSD%						2.3
Alpha						0.05

La moyenne du facteur de recouvrement est 100,2%, et l'intervalle de confiance à 95% est, pour la série 1 (97,3% à 101,5%) et pour la série 2 (99,5% à 102,5%).

De plus, les faibles coefficients de variation (RSD) obtenus que se soit pour la répétabilité que pour la précision intermédiaire, démontrent la bonne précision de la méthode HPLC proposée.

5.1.5. Exactitude

Les résultats de l'étude de l'exactitude sont représentés dans le Tableau 5.7 suivant :

Tableau 5.7. : Résultats de l'étude de l'exactitude

	Prise d'essais placebo chargé (mg)	Aires de standard	Aires placebo chargé	Concentration calculée (mg/ml)	Concentration introduite (mg/ml)	Facteur de recouvrement (%)	Yi
Pc 1 à 80%	0,16	14090	11217	0,001	0,001	99,5	100,6
Pc 2 à 80%	0,16	14090	11456	0,001	0,001	101,6	
Pc 3 à 80%	0,16	14090	11357	0,001	0,001	100,8	
Pc 1 à 100%	0,20	14090	13846	0,001	0,001	98,3	98,2
Pc 2 à 100%	0,20	14090	13808	0,001	0,001	98,0	
Pc 3 à 100%	0,20	14090	13863	0,001	0,001	98,4	
Pc 1 à 120%	0,24	14090	16114	0,001	0,001	95,3	100,7
Pc 2 à 120%	0,24	14090	17689	0,001	0,001	104,6	
Pc 3 à 120%	0,24	14090	17277	0,001	0,001	102,2	
La moyenne Yi'							99,9
SD							2,8
RSD%							2,8

La moyenne de récupération est de 99,9% et se situe dans l'intervalle d'acceptation qui est de 98% et 102%. Une récupération proche de 100% indique que la méthode est exacte et précise .

5.1.6. Robustesse

Le nombre d'essais HPLC à réaliser est de 8 suivant les différentes combinaisons comme c'est indiqué dans le Tableau 5.8. Pour chaque essai, nous avons injecté la solution standard 100% et nous avons calculé la concentration du PA dans la solution échantillon, puis le facteur de recouvrement. Tous les résultats de robustesse sont résumés dans le tableau 5.9.

Tableau 5.8. : Concentrations du PA dans la solution échantillon et du facteur de recouvrement

Nombre échantillon	Echantillon	Pe d'essais éch (mg)	Aires standard	Aires éch	C calculée (mg/ml)	C introduit (mg/ml)	Facteur de recouvrement (%)
1	26% débit 1,3 298nm	0,52572	14267	3881	0,0002	0,0002	104,6
2	120% débit 1,3 298nm	2,4264	14267	17256	0,0010	0,0010	100,8
3	26% débit 1,3 302nm	0,52572	14525	3776	0,0002	0,0002	100
4	120% débit 1,3 302nm	2,4264	14525	17634	0,0010	0,0010	101,2
5	26% débit 1,7 298nm	0,52572	13153	3417	0,0002	0,0002	99,9
6	120% débit 1,7 298nm	2,4264	13153	15609	0,0010	0,0010	98,9
7	26% débit 1,7 302nm	0,52572	13853	3544	0,0002	0,0002	98,4
8	120% débit 1,7 302nm	2,4264	13853	15654	0,0009	0,0010	94,2
Ecart-type							2.9

Tableau 5.9 : Résultats de l'étude de la robustesse de la méthode

Variation Paramètre	T _{student}	Les effet	Intervalle de confiance		Résultats de l'effet	Conclusion
Débit de phase mobile	2.3646	-1,3	-3,8	1,1	Non significatif	Robuste
Longueur d'onde		-1,9	-4,4	0,6	Non significatif	Robuste
Concentration de PA/ débit de phase mobile		0,2	-2,2	2,7	Non significatif	Robuste
Concentration de PA/ longueur d'onde		-0,3	-2,8	2,1	Non significatif	Robuste
Débit de phase mobile / longueur d'onde		-0,2	-2,7	2,2	Non significatif	Robuste
Concentration de PA / longueur d'onde / débit de phase mobile		-1,0	-3,5	1,4	Non significatif	Robuste

Les résultats de l'étude ont démontré que la méthode est robuste pour le changement des paramètres étudiés (teneur en principe actif, débit de la phase mobile et longueur d'onde). Suite aux résultats obtenus qui sont tous dans les limites d'acceptation retenues, nous pouvons conclure que notre méthode HPLC proposée pour l'analyse des impuretés est spécifique, fidèle, exacte, linéaire et robuste.

5.1.7. Stabilité des solutions

Les résultats de l'étude de stabilité des solutions sont résumés dans le tableau 5.10.

Tableau 5.10. : Résultats de l'étude de stabilité

T=0			
	Temps de rétention Min	Surface	Pourcentage de surface%
PC1 à 100%	9.831	7693247	99.65
Impureté 1	7.501	1133	0.01
Impureté 2	16.582	7601	0.10
PC2 à 100%	9.827	7555934	99.74
Impureté 1	7.479	921	0.01
Impureté 2	16.596	6866	0.09
PC3 à 100%	9.834	7698803	99.75
Impureté 1	7.500	1206	0.02

Impureté 2	16.601	6828	0.09
T=72h			
PC1 à 100%	9.580	7322516	99.44
Impureté 1	4.927	965	0.01
Impureté 2	16.595	7236	0.10
PC2 à 100%	9.574	7409385	99.47
Impureté 1	4.927	1126	0.02
Impureté 2	16.596	6974	0.09
PC3 à 100%	9.580	7401899	99.49
Impureté 1	4.930	1087	0.01
Impureté 2	16.606	6794	0.09

Les solutions sont stables à 72h à température ambiante puisque la différence entre les impuretés à T=0 et T=72h ne dépasse pas les 0,05%. Selon les normes d'acceptation d'ICH.

5.2. Validation de la méthode d'identification de dosage

Evaluation de la conformité de système

➤ Résultats des injections

Après avoir injecté 06 fois la solution standard, nous avons obtenu les résultats et les chromatogrammes représentés sur les tableaux

Les aires de pic des injections du standard à 300nm sont représentées dans le tableau 5.11.

Tableau 5.11. : résultats sur la répétabilité des aires du principe actif

Injections	Solution témoin	Aires du pic du principe actif
1	Standard	2045238
2	Standard	2048137
3	Standard	2045000
4	Standard	2047929
5	Standard	2053555
6	Standard	2045900
Moyenne		2047627
RSD%		0.2
Norme		< 2.0%

Selon les résultats de tableau on peut dire que le système est conforme

➤ Résultats de validation de la performance de la colonne

Les résultats de conformité de système sont obtenus sont représentées dans la figure 5.6. et le dans tableau 5.12.

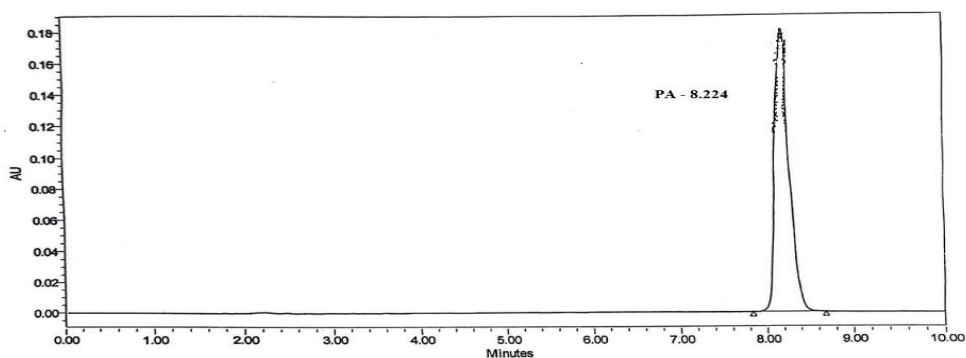


Figure 5.6. : chromatogramme de performance de la colonne

Tableau 5.12. : représente les résultats de la performance de la colonne

	RSD%	Le nombre de plateaux théorique	Facteur de symétrie
PA	0.2	14931	1.0149

Les résultats obtenus indiquent que la colonne est adaptée et que le système est performant pour notre analyse

5.2.1. Identification

- Par Détecteur PDA : le spectre obtenu avec le PA dans la solution PC chargée à 100 % correspond à celui obtenu avec la solution standard (Figure 5.7).
- Par HPLC : le Tr du pic du PA dans le chromatogramme obtenu avec la solution PC chargée à 100 % correspond au Tr du pic du chromatogramme obtenu avec la solution standard. (Figure 5.8)

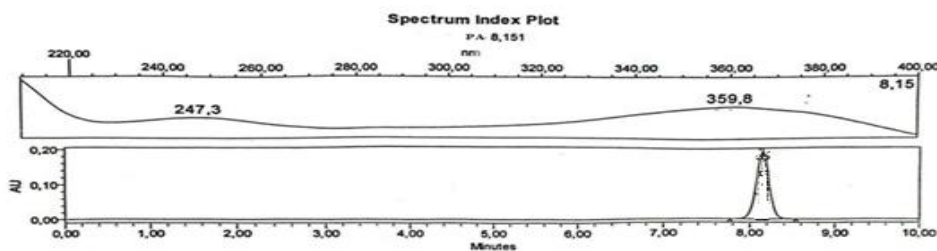


Figure 5.7. : chromatogramme de STD par détecteur PDA

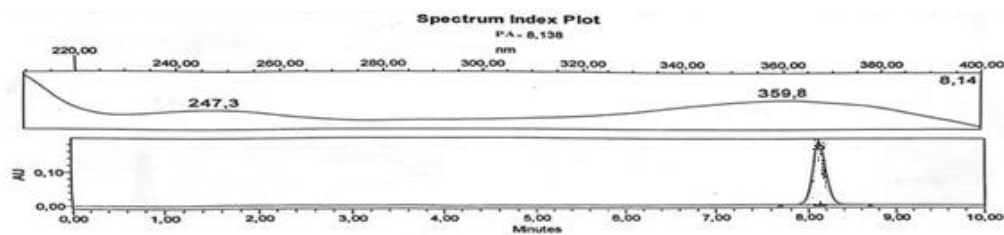


Figure 5.8.: chromatogramme de PC chargé à 100% détecteur PDA

5.2.2. La spécificité

La spécificité de la méthode a été vérifiée en comparant des chromatogrammes types du blanc, placebo et PA (figure 5.9. et 5.10 et 5.11.)

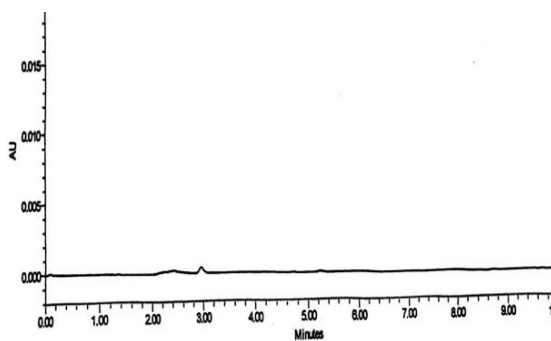


Figure 5.9.: chromatogramme de blanc

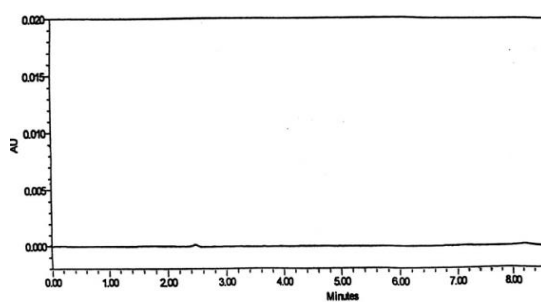


Figure 5.10.: chromatogramme de Placebo

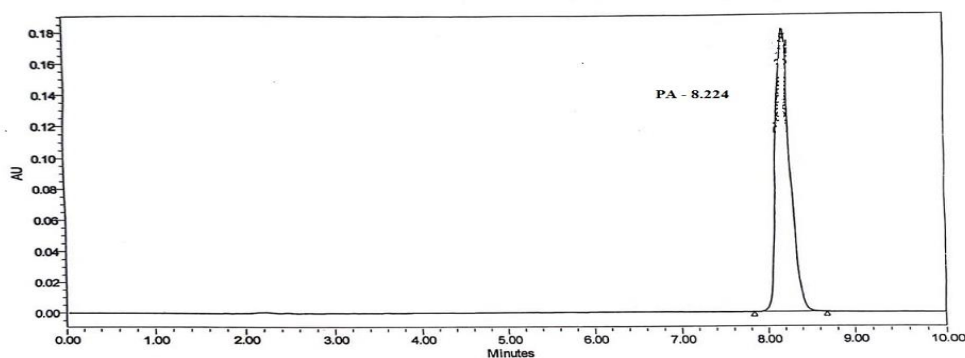


Figure 5.11. : Chromatogramme de PA

Le chromatogramme de standard présente un pic du principe actif dont le temps de rétention est de 8.224 min, donc il n'y a pas d'interférence au temps de rétention de pic due au PA ceci prouve que la méthode est spécifique au principe actif.

5.2.3. Précision (fidélité)

L'étude de la fidélité est réalisée sur le placebo chargé à 100%. La fidélité s'exprime par la mesure de la répétabilité et la précision intermédiaire.

Les résultats de la fidélité du principe actif dans le placebo sont représentés dans le Tableau 5.13.

Tableau 5.13. : Données brutes de l'étude de la fidélité pour le dosage (série 1)

Echantillon	Prises d'essais (mg)	Aires de standard	Aires échantillon	C calculée (mg/ml)	C introduite (mg/ml)	Facteur de recouvrement (%)
Série 1						
01	100.11	2047627	1987751	0.049	0.050	97.1
02	100.11	2047627	2034816	0.050	0.050	99.4
03	100.11	2047627	2028732	0.050	0.050	99.1
04	100.11	2047627	2040712	0.050	0.050	99.7
05	100.11	2047627	2039185	0.050	0.050	99.6
06	100.11	2047627	2043703	0.050	0.050	99.8
Moyenne						99,1
SD						1.0
RSD%						1.0
Intervalle de confiance (\mp)						0.8

Intervalle de confiance 95%(inf)						98.3
Intervalle de confiance 95%(sup)						99.9
Série 2						
01	100.28	2065783	2006028	0.049	0.050	97.1
02	100.28	2065783	2062770	0.050	0.050	99.9
03	100.28	2065783	2046064	0.050	0.050	99.0
04	100.28	2065783	2063840	0.050	0.050	99.9
05	100.28	2065783	2061970	0.050	0.050	99.3
06	100.28	2065783	2062298	0.050	0.050	99.8
Moyenne						99.2
SD						1.1
RSD%						1.1
Intervalle de confiance ($\bar{\pm}$)						0.9
Intervalle de confiance 95%(inf)						98.3
Intervalle de confiance 95%(sup)						100.1
Résultats de l'étude de la fidélité intermédiaire						
Facteur de recouvrement (\bar{Y}_i)						99.1
L'écart-type						1.0
RSD%						1.0
Alpha						0.05

La moyenne du facteur de recouvrement est 100,2%, et l'intervalle de confiance à 95% pour la série 1 est de 98.3% à 99.9% et pour la série 2 est de 98,3% à 100,1%

Ainsi que les faibles coefficients de variation (RSD) obtenus que se soit pour la répétabilité que pour la précision intermédiaire démontrent la bonne précision de la méthode HPLC proposé l'analyse de PA.

5.2.4. Exactitude

Les résultats illustrés de l'exactitude sont représenté dans le tableau suivant

Tableau 5.14.: résultats brute de l'exactitude

	Prise d'essais placebo chargé (mg)	Aires de standard	Aires placebo chargé	Concentration calculée (mg/ml)	Concentration introduite (mg/ml)	Facteur de recouvrement (%)	Yi
Pc1	4.00	2047627	163176	0,040	0,040	99.6	

à 80 %			0				
Pc2 à 80 %	4.00	2047627	1595342	0,039	0,040	97.4	99.1
Pc 3 à 80 %	4.00	2047627	1642768	0,040	0,040	100.3	
Pc 1 à 100 %	5.01	2047627	1987751	0,049	0,050	97.1	98.5
Pc 2 à 100 %	5.01	2047627	2034816	0,050	0,050	99.4	
Pc 3 à 100 %	5.01	2047627	2028732	0,050	0,050	99.1	
Pc 1 à 120 %	6.01	2047627	2435954	0,060	0,060	99.1	99.5
Pc 2 à 120 %	6.01	2047627	2442328	0,060	0,060	99.4	
Pc 3 à 120 %	6.01	2047627	2455165	0,060	0,060	99.9	
La moyenne Yi'							99,0
SD							1.1
RSD%							1.1

La moyenne récupération 99,9%, une récupération acceptable se situe entre 98% et 102%

Une récupération proche de 100% indique que la méthode est exacte et précise pour identifier le dosage

5.2.5. La stabilité

Les tableaux suivants résument les résultats de stabilité à temps 0 et temps 72h et aussi à T ambiante et T réfrigérer

Tableau 5.15. : tableau de résultats de stabilité à T ambiante et t 24 H

	Aire	La moyenne	C à T= 0	La moyenne	C à T=24 h	La moyenne	DT à T = h	La moyenne
ST D1	2058037	2064020	0.0501	0.0501	0.0500	0.0501	0.2	0.2
ST D2	2068053		0.0501		0.0502		0.3	
ST D3	2065970		0.0501		0.0502		0.2	
PC 1	2050329	2050383.667	0.0501	0.0501	0.0497	0.0498	0.5	0.5
PC 2	2051057		0.0501		0.0498		0.5	
PC 3	2049765		0.0501		0.0498		0.6	

Tableau 5.16. : tableau de résultats de stabilité à T réfrigérer et t 24 H

	Aire	La moyenne	C à T= 0	La moyenne	C à T=24 h	La moyenne	DT à T = h	La moyenne
ST D1	2067300	2074423.667	0.0501	0.0501	0.0499	0.0501	0.3	0.2
ST D2	2078290		0.0501		0.0502		0.2	
ST D3	2077681		0.0501		0.0501		0.2	
PC 1	2026204	2047153.333	0.0501	0.0501	0.0498	0.0494	2.3	1.3
PC 2	2055992		0.0501		0.0496		0.9	
PC 3	2059264		0.0501		0.0497		0.7	

Tableau 5.17.: tableau de résultats de stabilité à T ambiante et t 72H

	Aire	La moyenne	C à T= 0	La moyenne	C à T=24 h	La moyenne	DT à T = h	La Moyenne
ST D1	2059822	2065247,333	0.0501	0.0501	0.0500	0.0501	0.1	0.2
ST D2	2068203		0.0501		0.0502		0.3	
ST D3	2067717		0.0501		0.0502		0.3	
PC 1	2048717	2050475.667	0.0501	0.0501	0.0497	0.0498	0.6	0.5
PC 2	2051377		0.0501		0.0498		0.5	
PC 3	2051233		0.0501		0.0498		0.5	

Tableau 5.18.: tableau de résultats de stabilité à T réfrigérer et t 72H

	Aire	La moyenne	C à T= 0	La moyenne	C à T=72 h	La moyenne	DT à T = 72 h	La moyenne
ST D1	2082019	2077959.333	0.0501	0.0501	0.0502	0.0501	0.4	0.2
ST D2	2076233		0.0501		0.0501		0.1	
ST D3	2075626		0.0501		0.0501		0.1	
PC 1	2034171	2048053.667	0.0501	0.0501	0.0491	0.0494	1.9	1.3
PC 2	2054347		0.0501		0.0496		0.9	
PC 3	2055643		0.0501		0.0496		0.3	

Toutes les valeurs de Dt sont $\leq 2.0\%$ donc on dit que la méthode est stable.

Conclusion

Conclusion

Dans notre travail, nous nous sommes intéressées à la validation analytique de la méthode des impuretés inconnues et la vérification de la méthode de dosage d'un gel anti-inflammatoire par la méthode de chromatographie liquide à haute performance (HPLC).

Pour la mise au point de la méthode chromatographique (HPLC) pour l'analyse des impuretés, deux paramètres ont été optimisés à savoir le débit de la phase mobile de 1,5 ml/min qui a permis de réduire le temps de rétention et la longueur d'onde du détecteur utilisée de 300nm qui a démontré une meilleure absorbance des substances analysées. Concernant la méthode HPLC utilisée pour le dosage du PA dans le gel, le débit et la longueur d'onde optimisés sont respectivement de 1 ml/min et 248nm présentant un meilleur profile chromatographique.

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

La validation de la méthode HPLC proposée pour la recherche des impuretés inconnus dans un gel anti-inflammatoire nous a permis de conclure qu'elle est spécifique, linéaire, répétable, fidèle, exacte, et même robuste, ce qui nous a permis la détection des impuretés.

Aussi, la vérification des paramètres de validation de méthode HPLC proposée pour le dosage du gel a donné des résultats très satisfaisant permettant son utilisation dans les contrôles de routine dans les laboratoires d'analyse.

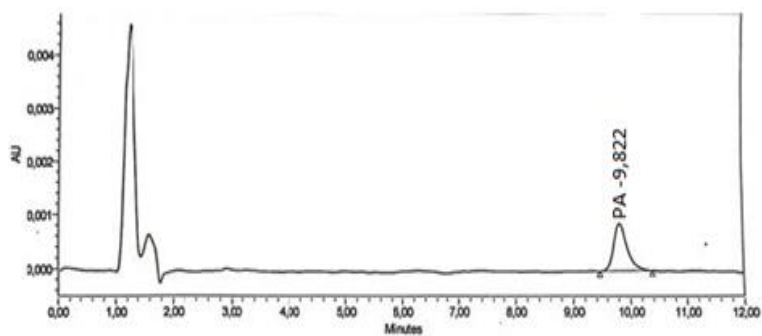
En perspective, cette étude pourrait être complétée, par l'application de la méthode de recherche des impuretés aux études de stabilité sous différentes conditions de températures et en fonction du temps.

D'autre part, d'autres protocoles pourraient être établis permettant de bien maîtriser et gérer les conditions opératoires et de confirmer par vérification que les documents, les locaux, les équipements et les réactifs adoptés conduisent à des résultats fiables et répétables.

Annexe

- Les chromatogrammes des critères de la méthode des impuretés inconnus
- La conformité de système

Pic de STD



Peak Name	RT	Area	Symmetry Factor	EP Plate Count
1	9,822	14499	1,283917e+000	9,405481e+003

[0,8 - 2,0] > 2000

Retention Time Summarized by Name
Channel: W2489 ChA

	Sample Name	Inj	Channel	Vial	Piroxicam
1	STD Imp	2	W2489 ChA	53	9,822
2	STD Imp	3	W2489 ChA	53	9,817
3	STD Imp	4	W2489 ChA	53	9,815
4	STD Imp	5	W2489 ChA	53	9,817
5	STD Imp	6	W2489 ChA	53	9,816
6	STD Imp	7	W2489 ChA	53	9,815
	Mean				9,817
	Std. Dev.				0,003
	% RSD				0,0

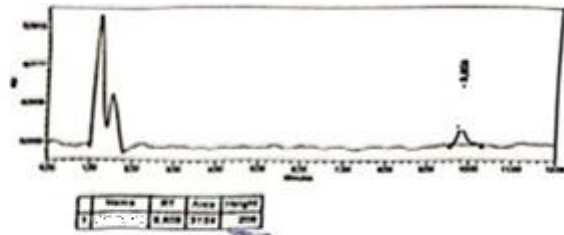
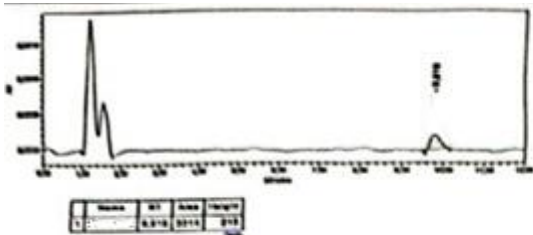
Area Summarized by Name
Channel: W2489 ChA

	Sample Name	Inj	Channel	Vial	Piroxicam
1	STD Imp	2	W2489 ChA	53	14496
2	STD Imp	3	W2489 ChA	53	13862
3	STD Imp	4	W2489 ChA	53	13079
4	STD Imp	5	W2489 ChA	53	13687
5	STD Imp	6	W2489 ChA	53	14769
6	STD Imp	7	W2489 ChA	53	14644
	Mean				14090
	Std. Dev.				659
	% RSD				4,7

<5,0%

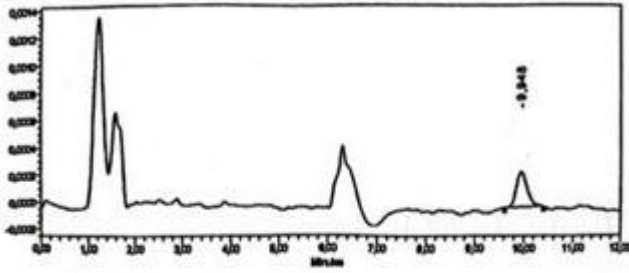
- Linéarité sur le principe actif
PA à 26%

PA à 26%



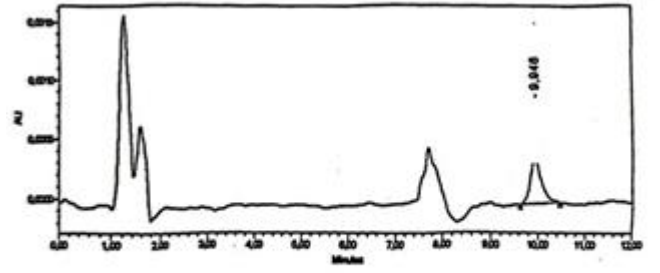
PA à 26%

PA à 40%



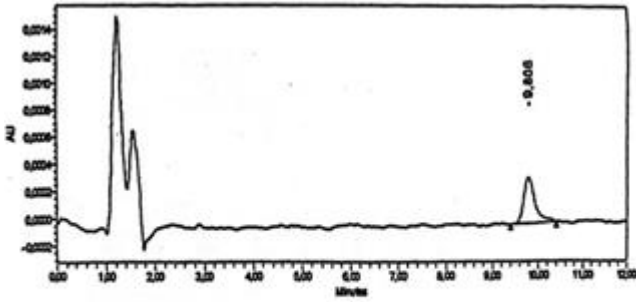
Name	RT	Area	Height
1	9,948	2933	254

PA à 40%



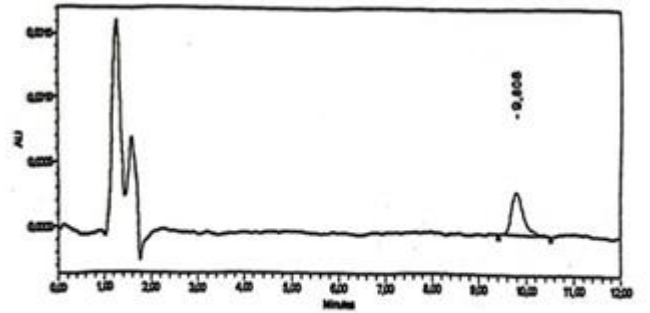
Name	RT	Area	Height
1	9,946	6064	356

PA à 40%



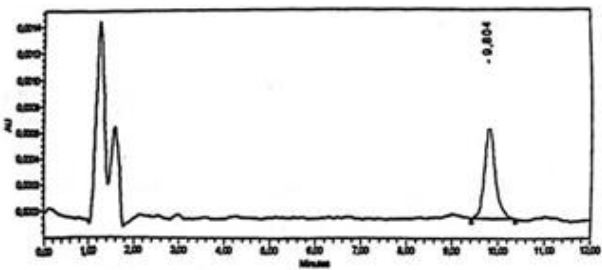
Name	RT	Area	Height
1	9,806	5996	345

PA à 80%



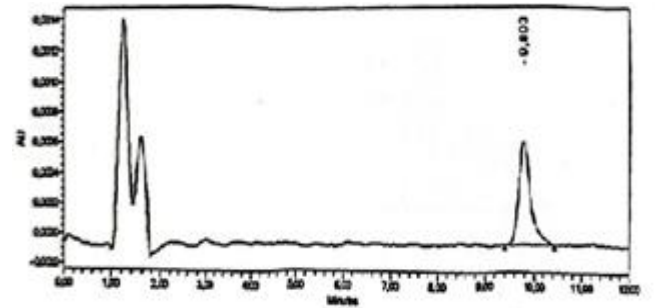
Name	RT	Area	Height
1	9,808	5799	333

PA à 80%



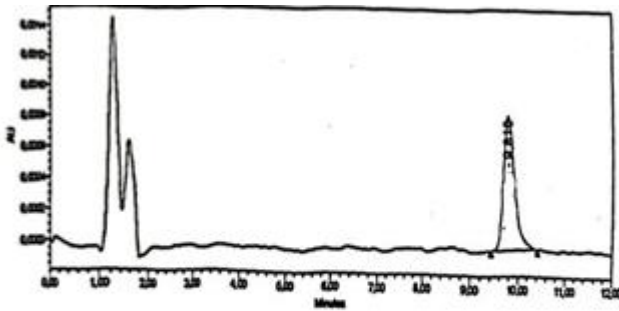
Name	RT	Area	Height
1	9,804	11442	686

PA à 80%

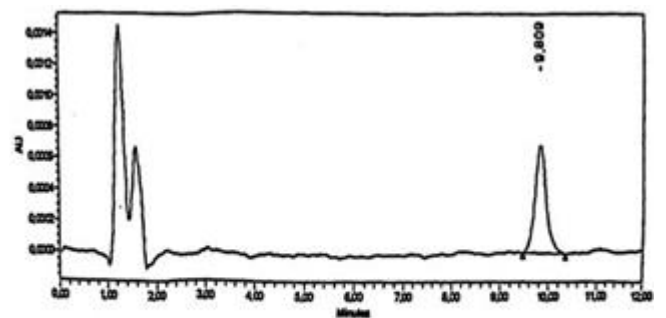


Name	RT	Area	Height
1	9,803	11622	685

PA à 100%

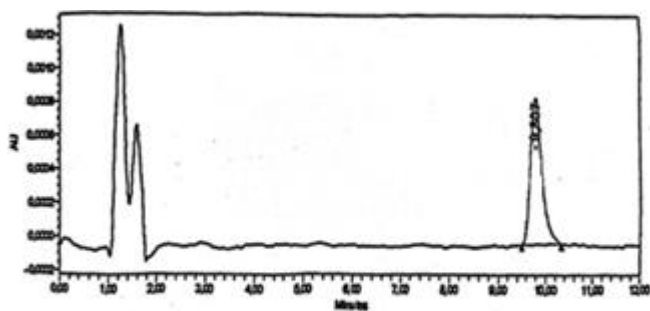


Name	RT	Area	Height
1	9,810	14116	859



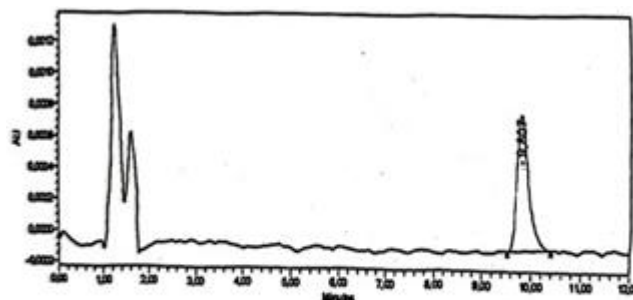
Name	RT	Area	Height
1	9,809	11556	694

PA à 100%



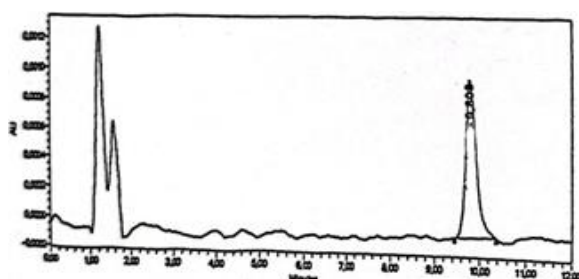
Name	RT	Area	Height
1	9,807	14152	866

PA à 100%



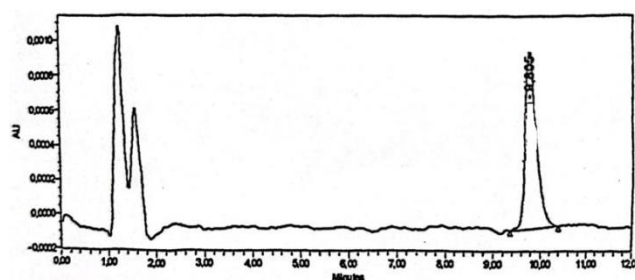
Name	RT	Area	Height
1	9,807	13797	856

PA à 120%



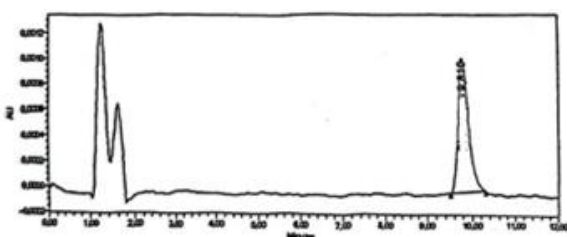
Name	RT	Area	Height
1	9,806	16487	1032

PA à 120%



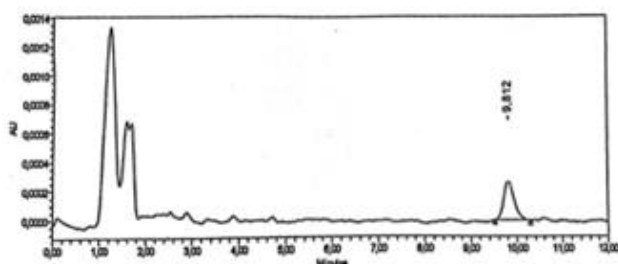
Name	RT	Area	Height
1 Piroxicam	9,805	16743	1014

PA à 120%



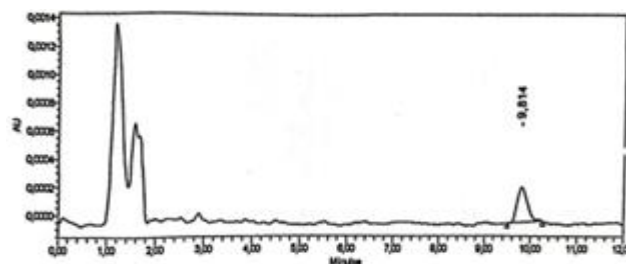
Name	RT	Area	Height
1	9,810	16905	1034

- Linéarité sur le placebo chargé
PC à 26%



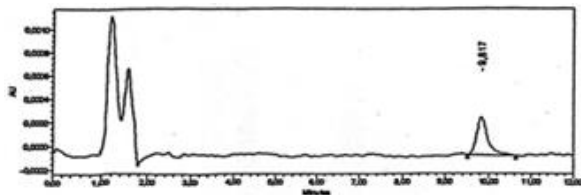
Name	RT	Area	Height
1	9,812	4154	263

PC à 26%



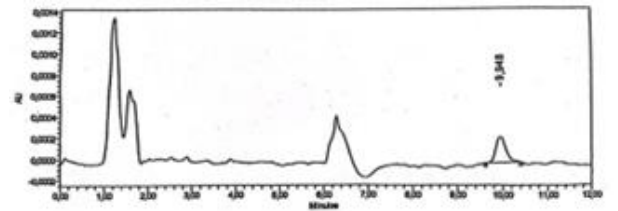
Name	RT	Area	Height
1	9,814	3893	251

PC à 26%



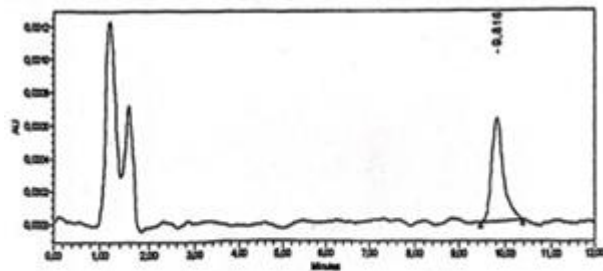
Name	RT	Area	Height
1	9,817	5822	323

PC à 40%



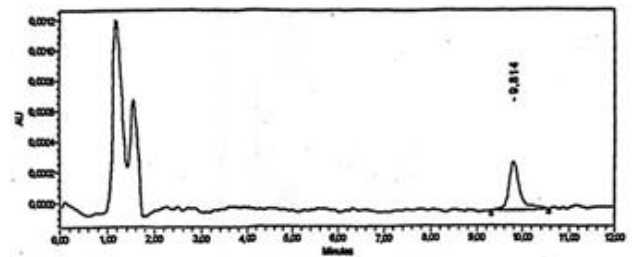
Name	RT	Area	Height
1	9,848	3933	264

PC à 40%



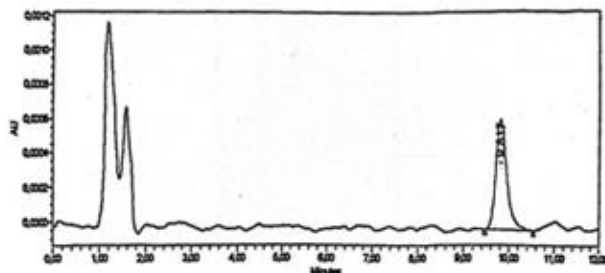
Name	RT	Area	Height
1	9,816	11040	633

PC à 80%



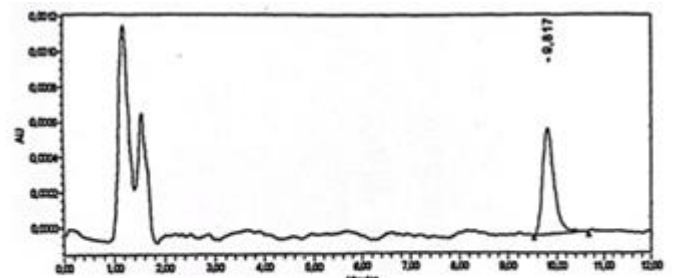
Name	RT	Area	Height
1	9,814	5460	320

PC à 80%



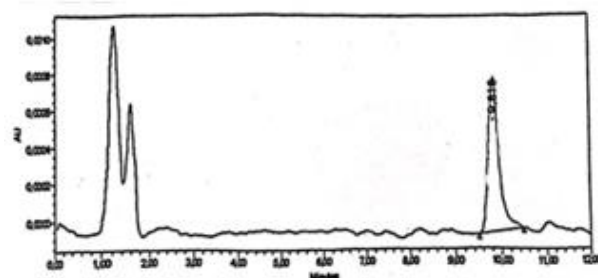
Name	RT	Area	Height
1	9,817	11022	647

PC à 80%



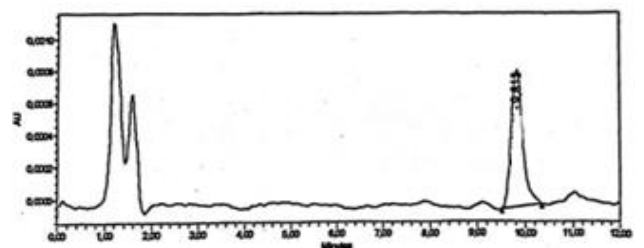
Name	RT	Area	Height
1	9,817	10259	612

PC à 100%



Name	RT	Area	Height
1	9,816	14245	855

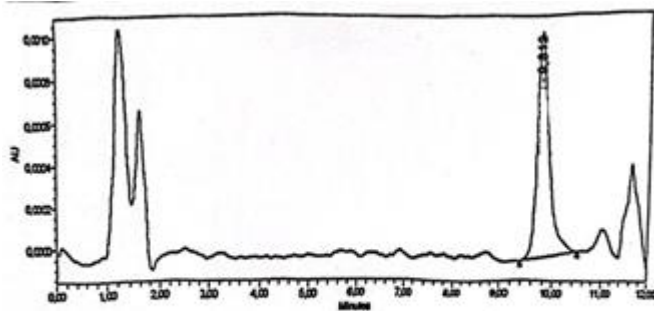
PC à 100%



Name	RT	Area	Height
1	9,813	14383	867

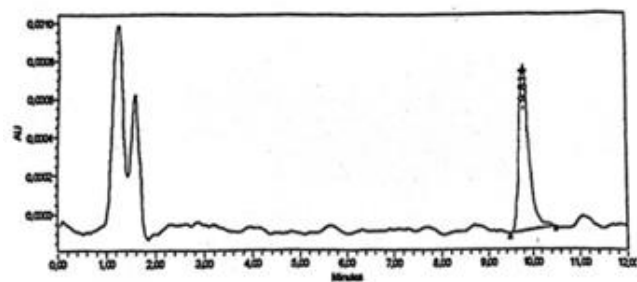
PC à 100%

PC à 120%



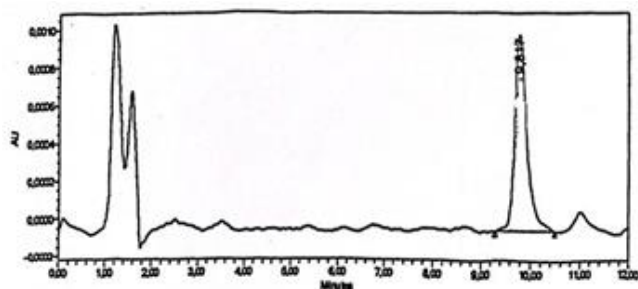
Name	RT	Area	Height
1	9,812	17963	1058

PC à 120%

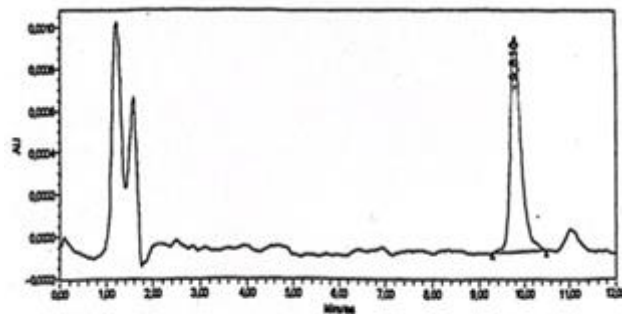


Name	RT	Area	Height
1	9,814	14156	866

PC à 120%



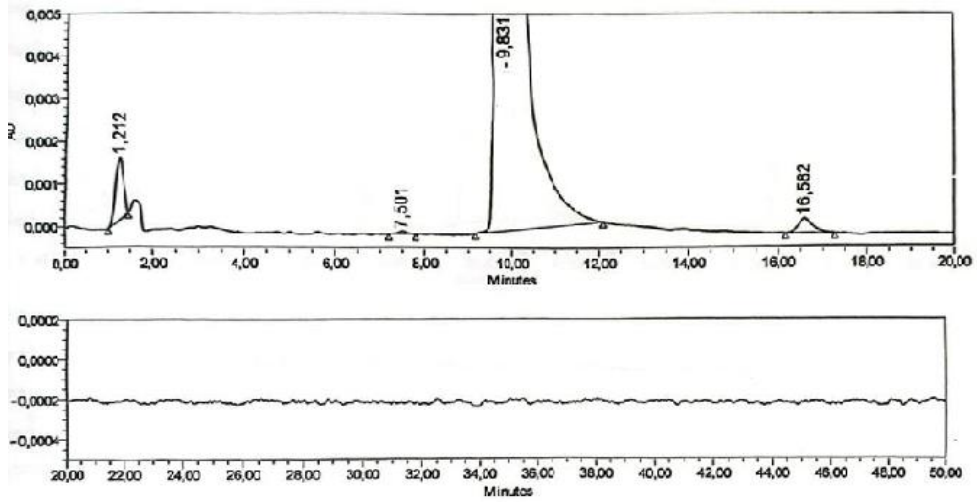
Name	RT	Area	Height
1	9,817	17552	1042



Name	RT	Area	Height
1	9,810	17482	1032

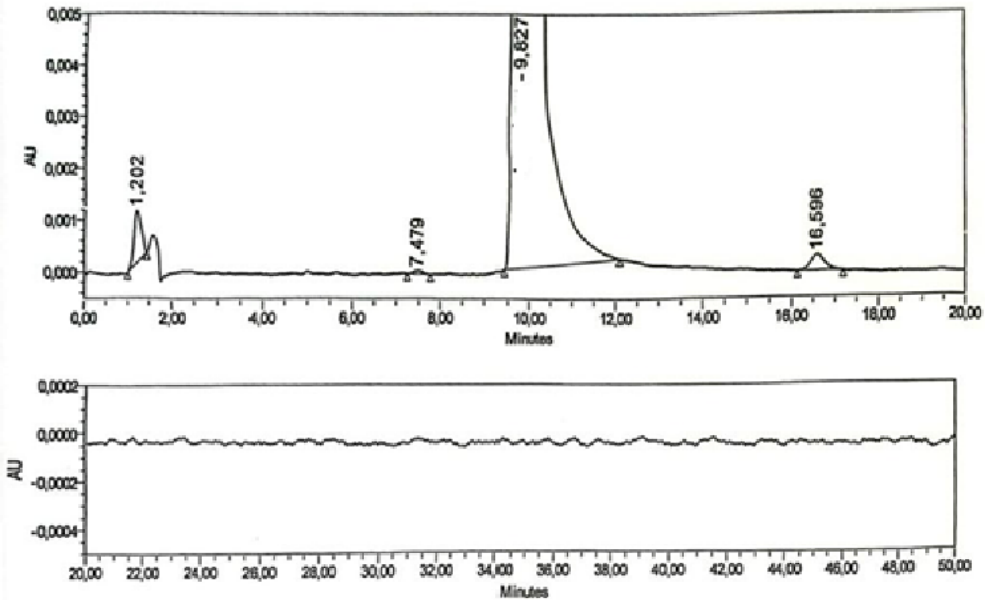
- Stabilité
 - à T=0

PC 1 à 100%



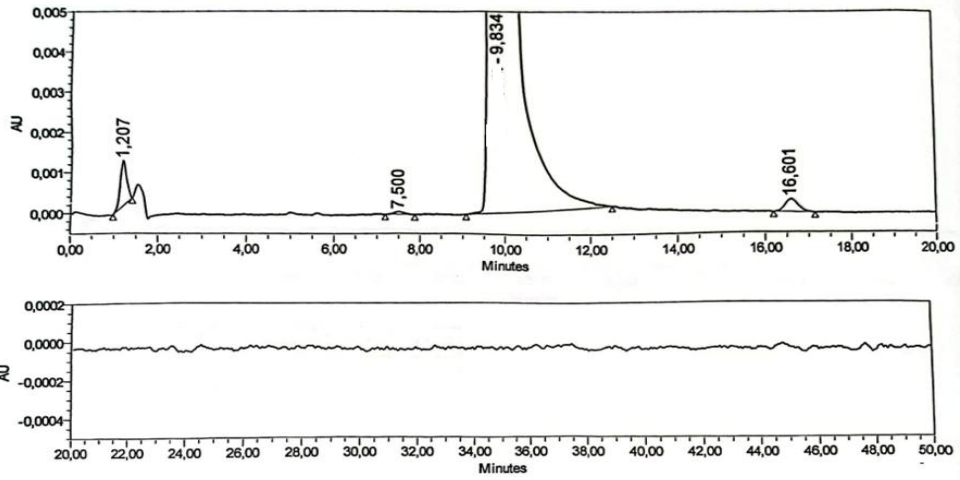
Peak Name	RT	Area	% Area	Height
1 Blanc	1,212	18426	0,24	1483
2 Imp Inoxy	7,501	1133	0,01	69
3 PA	9,831	7693247	99,55	486648
4 Imp Inoxy	16,582	7601	0,10	327

PC 2 à 100%



Peak Name	RT	Area	% Area	Height
1 Blanc	1,202	11818	0,16	1002
2 Imp Inoxy	7,479	921	0,01	63
3 PA	9,827	7555934	99,74	481097
4 Imp Inoxy	16,596	6866	0,09	302

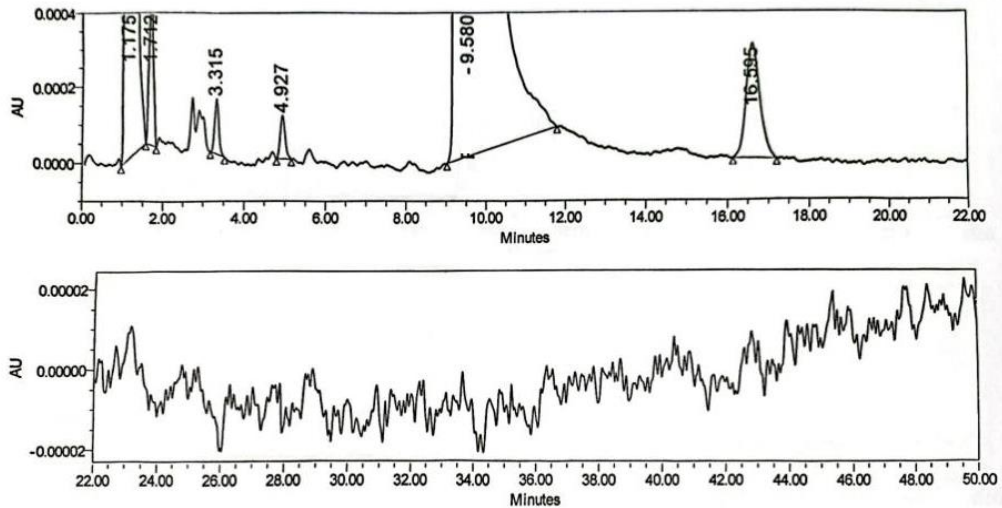
PC 3 à 100%



	Peak Name	RT	Area	% Area	Height
1	Blanc	1,207	11538	0,15	1126
2	Imp Inc 1	7,500	1206	0,02	74
3	PA	9,834	7698803	99,75	489396
4	Imp Inc 2	16,601	6828	0,09	309

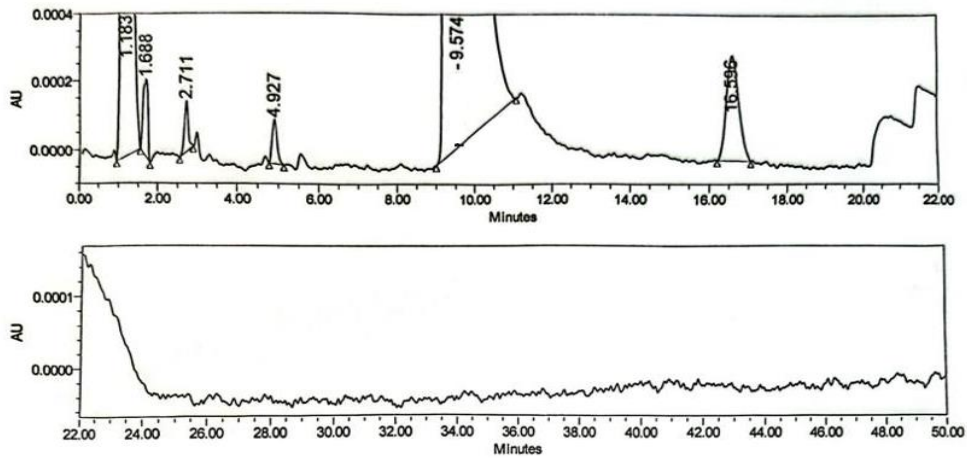
➤ à T= 72h

PC 1 à 100%



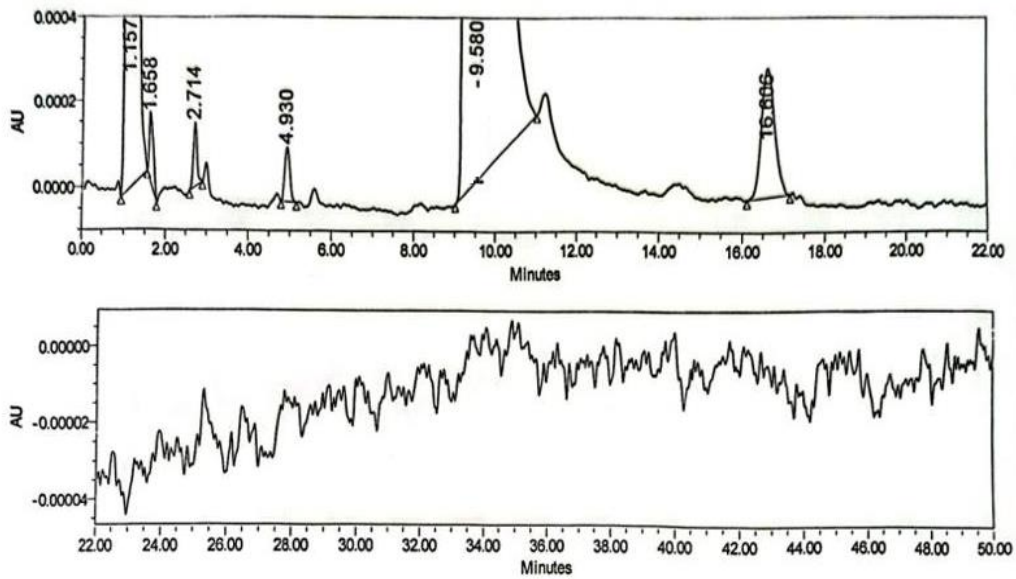
	Peak Name	RT	Area	% Area	Height
1	Blanc	1,175	28972	0,39	1709
2	Placbo	1,712	3149	0,04	455
3	Placbo	3,315	1039	0,01	145
4	Imp Inc 1	4,927	965	0,01	115
5	PA	9,580	7322516	99,44	490469
6	Imp Inc 2	16,595	7236	0,10	305

PC 2 à 100%



	PeakName	RT	Area	% Area	Height
1	Blanc	1.183	28161	0.38	1709
2	Placebo	1.688	1905	0.03	227
3	Placebo	2.711	986	0.01	146
4	Imp Inc 1	4.927	1126	0.02	128
5	PA	9.574	7409385	99.47	499687
6	Imp Inc 2	16.596	6974	0.09	310

PC 3 à 100%



	Peak Name	RT	Area	% Area	Height
1	Blanc	1.157	28177	0.38	1592
2	Placebo	1.658	1091	0.01	164
3	Placebo	2.714	923	0.01	147
4	Imp Incl	4.930	1087	0.01	124
5	PA	9.580	7401899	99.49	492551
6	Imp Incl 2	16.606	6794	0.09	301

➤ **La vérification de la méthode de dosage selon la pharmacopée britannique**

Réaliser la méthode de chromatographie liquide, en utilisant les solutions suivantes.

Pour la solution (1), ajouter 5 ml d'acide chlorhydrique méthanolique 0,01 M à une quantité de gel contenant 5 mg de PA agiter doucement pendant 30 minutes, ajouter 50 ml de phase mobile et agiter vigoureusement pendant 30 minutes. Diluer à 100 ml avec la phase mobile, mélanger et filtrer. une membrane filtrante en fibre de verre (1 µm). Pour la solution (2), préparez une solution à 0,10 % p/v de PA SCRPB dans de l'acide chlorhydrique méthanolique 0,01 M, à l'aide d'ultrasons si nécessaire, et diluer 5 volumes de cette solution à 100 volumes avec la phase mobile.

La procédure chromatographique décrite sous 2-Pyridylamine peut être utilisée mais utilisez un détecteur spectrophotomètre ultraviolet à une longueur d'onde de 248 nm.

Calculez la teneur en C₁₅H₁₃N₃O₄S dans le gel en utilisant la teneur déclarée en C₁₅H₁₃N₃O₄S dans PA SCRPB.

Référence

- [1]- MARC TALBERT, GERARD WILLOQUET, ROSLYNE GERVAIS, « guide pharmaco », 6^{ème} édition 2006.
- [2]-A.LEHIR, « pharmacie galénique : bonne pratique de fabrication des médicaments », 8^{ème} édition Masson, 2001.
- [3]-P.JOLLIET ; M.FONTAINE ; B.HERLIN, « pharmacologie et soins infirmiers », 2^{ème} édition Masson, 2001.
- [4]- (HALALI.A.E.K docteur en médecine, pharmacologie 2^{ème} édition 1983. Fondamentale et clinique).
- [5]- FDA Guidance for Industry --Analytical Procedures and Methods Validation --Chemistry, Manufacturing, and Controls Documentation» (Draft, August 2000)]
- [6] - BOUCHAMA Fatiha, MAMMOU Wahiba. Validation analytique d'une méthode de dosage simultané du Paracétamol et du Tramadol de sodium dans des comprimés par HPLC. Application de la démarche harmonisée [thèse]. Tizi-Ouzou, université Mouloud Mammeri ; 2017.
- [7] - Prescriptions générales concernant la compétence des laboratoires d'etalonnages et d'essais. Norme NF EN ISO/CEI 17025, mai 2000. § 5.4.5.1
- [8] - Rouessac F, Rouessac A(2000) . Analyse chimique –Méthodes et techniques instrumentales modernes , 5 éditions, Dunod , paris
- [9]-[http://www.ulpmmed.ustrasbg.fr/medecine/cours_en_ligne/e_cours/pharmaco/pdf/dcm3/DCEM3- Pharmaco_Chap18_ADO_2009.pdf](http://www.ulpmmed.ustrasbg.fr/medecine/cours_en_ligne/e_cours/pharmaco/pdf/dcm3/DCEM3-Pharmaco_Chap18_ADO_2009.pdf)
- [10]- WELAC. Guidance Documents WGD2, Eurachem/Western European Laboratory Accreditation Cooperation (WELAC) Chemistry. UK, firsted: Teddington, 1993.
- [11] -Feinberg, M. « Chapitre 2 - Validation et cycle de vie. In: LABO-STAT Guide de validation des méthodes d'analyse.» Lavoisier, 2009-b. 33-46.
- [12] -SIAVELIS Armand, Analyse des différentes approches de validation de méthodes de dosage et proposition; un guide de validation de méthode de dosage en pharmacie

hospitalière, THÈSE pour l'obtention du Diplôme d'état de docteur en pharmacie, université Angers, 2014/2015.

[13] -Hubert Ph, Nguyen JJ, Boulanger B, Chapuzet E, Chiap P, Cohen N, et al. SFSTP.

Validation des procédures analytiques quantitatives, harmonisation des démarches. PARTIE I; Généralité ; 2003

[14] -VIAL J. Journée de Formation Scientifique en Spectrométrie Atomique. Définition de la validation de méthodes et outils associés. Laboratoire Environnement et Chimie Analytique de l'ESPCI. Paris. 14 Nov 2006.

[15] -Analytical Procedures and Methods Validation for Drugs and Biologics Guidance for Industry- July 2015. Disponible sur <https://www.fda.gov>

[16] -Feinberg M, Validation interne des méthodes d'analyse

[17] -ISABELLE PINGUET Validation analytique : application de la procédure SFSTP 2003-2006 au domaine de la phytothérapie, THÈSE pour l'obtention du Diplôme d'état de docteur en pharmacie, université de Bordeaux 2015/2016

[18] -Feinberg M., Labo-stat, Guide de validation des méthodes d'analyse. s.l: Editions Lavoisier, 2009, 384 pages.

[19]-HPLC principe et appareillage. [Extrait du Biotechnologie & Biologie et physiopathologie humaine-Académie de Rouen.

[20]-Mémoire Présenté pour l'obtention du diplôme de Magister en médecine vétérinaire Option : hygiène alimentaire Spécialité : surveillance de la chaîne alimentaire de la filière viande DEPARTEMENT DES SCIENCES VETERINAIRES EL KHROUB

[21]-D. Wiem, Etude des interactions physicochimiques des bétabloquants avec les excipients, Diplôme National d'Ingénieur en Sciences Appliquées et en Technologie, Université de Carthage, 2013, pp15

[22]-Pharmacopée européenne 1998.

[23]-Granulation-PharmaEtudes,

<http://www.pharmaetudes.com/ressources/3-année-pharmacie/galénique>

