

REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE  
MINISTERE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR  
ET DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE



**Université Frères Mentouri Constantine 1**  
**Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie**  
**Département de Biologie Appliquée**

## Mémoire

Présenté en vue de l'obtention du diplôme de Master Professionnalisant  
Filière : Sciences biologiques, Spécialité: Bioindustrie, Analyse et Contrôle

**Par:**

M<sup>elle</sup>. Boukhalfa Imen

M<sup>elle</sup>. Belkhalfa Oumeima fatma baya

## Thème

# Validation d'une méthode analytique physico-chimique selon l'ICH

**Jury d'évaluation:**

Président :	Mr. HAMIDECHI MOHAMED ABD ELHAFID	Prof. UFM. Constantine 1.
Encadreur / Rapporteur:	Mme. BELLOUM ZAHIA	MAA. UFM. Constantine 1.
Examinatrice:	Mme. GHERBOUDJ OUISSEM	Dr. UFM. Constantine 1.
Maitre de stage:	Mr. BENATIA ZAKARIA	Coordinateur développement analytique, LDM-groupe

**ANNEE UNIVERSITAIRE : 2018-2019**

# Remerciement

*Avant tout on remercie dieu tout puissant de nous avoir donné la chance d'étudier et de nous avoir donné la force, le courage, et la patience de supporter les difficultés et de dépasser la douleur et de nous avoir répondu à nos prières pour accomplir ce travail.*

Ce projet de recherche n'aurait pas pu aboutir sans la riche collaboration et l'aide précieuse et le soutien infaillible de nombreuses personnes. Nous désirons leur témoigner nos gratitudee via ces quelques lignes.

Nos remerciements vont particulièrement à :

Notre encadreur : Madame, **BELLOUM Zahia**

De nous avoir honorée de diriger et de nous guidé au long de la réalisation de ce mémoire. Vos critiques nous ont été précieuses pour son élaboration. Que ce travail soit pour vous la preuve de la gratitude et du respect que nous vous portons.

Nous remerciements vont également aux membres de jury de ce mémoire que nous tiennent à vous remercier d'avoir bien voulu participer à l'évaluation de ce travail :

Monsieur **HAMIDECHI MOHAMED Abd Elhafid**, Professeur en biologie à l'Univ. Frères Mentouri Constantine 1, pour nous avoir fait l'honneur de présider et de juger ce travail. Il nous est particulièrement agréable de le remercier.

Madame **GHERBOUDJ Ouissam**, Docteur à l'Univ. Frères Mentouri Constantine 1. Outre le fait qu'elle ait accepté de participer en tant que membres du jury, nous la remercier sincèrement pour l'honneur qu'elle nous a fait en bien voulue juger et d'évaluer ce mémoire.

Nos maitres de stage : Monsieur, **BENATIA Zakaria**,

Ce travail n'aurait probablement pas pu être entamé et atteindre de telles dimensions sans sa contribution qui tout au long de ce stage professionnel, a été d'une très grande disponibilité. Ses conseils, son soutien, son encadrement et sa confiance nous ont permis de mener ce travail à bien. Nous vous sommes reconnaissants de la spontanéité et de la gentillesse avec laquelle vous avez accepté de nous guidée pondent la réalisation de ce mémoire. Nous vous témoignons de notre profonde reconnaissance.

Nous souhaitons également adresser nos plus vifs remerciements à Monsieur, **BOUZIDI Nasr Eddine**, notre accompagnons dans la partie expérimentale et qui nous a permis de participer au travail pratique et qui a répondu à beaucoup de nos problèmes. Nous vous prions de trouver ici l'expression de notre profonde gratitude.

Nous remercions Monsieur **KACEM CHOUACHE Noureddine**, Professeur et chef département de biologie appliquée (Univ. Frères Mentouri Constantine 1), qui nous a donné des conseils et des orientations qui nous ont aidés dans notre vie éducative et publique. Et on vous remercie d'avoir être le père pour nous avant d'être le professeur.

Nous remercions aussi Mme Fériel qui a eu la gentillesse de corriger quelques fautes d'orthographe et d'expression de ce manuscrit, merci pour sa disponibilité et son soutien.

Nous tiennent également à remercier nos amis, nos proches ainsi que les personnes qui, de près ou de loin, nous ont soutenues par leurs paroles et leurs encouragements, qu'ils trouvent ici l'expression de nos remerciements les plus sincères.

Thank  
You



# Dédicaces

*A mes chers parents **BELBEY KARIMA** et **BELKHALFA AHMED***

*A mes sœurs **IMENE ET YASMINE***

*A mon oncle **ABD ELHAKIM** et son épouse **ITIDEL** et leurs enfants **RAFIK** et*

***BESSMA***

*A ma tante **BELBEY NADIA***

*A mon frère et ma sœur **DJENNENE KHALED** et **FERIEL***

*A mon coach **MONSIEUR MOURAD***

*A madame **CHELLAL KARIMA***

*A tous mes professeurs*

*A mes très chères copines **YASMINE** et **MAYA***

*A mes Amis de la promotion (**Bioindustrie analyse et contrôle 2019**)*

*A tous mes collègues*

*A toi **IMEN** ainsi qu'à toute ta famille et à toute ma famille*

***Oumeima Fatma Baya***

# Dédicaces

*A mes très chers parents « Abdelhamid, Boulacrachef Lyamna »*

*A ma très chère défunte grand -mère paternelle « Oulha Aicha »*

*A ma chère grand-mère « Milli Rahima »*

*A ma petite sœur « SALSABIL »*

*A mes très chers beaux-parents « Zeroual Said, Grayri*

*Rachida»*

*A mon fiancé « Zeroual Abdelrazak »*

*A mes belles sœurs « Imen ; Siham et leurs enfants, Amina, et la petite*

*Farah»*

*A toute la famille*

*A mes copines*

*A toi Oumeima ainsi qu'à toute ta famille*

*Et à tous mes Amis spécialement notre promotions BAC 2019*

*Imen*

# Résumé

La validation des méthodes figurent parmi les mesures universellement reconnues comme étant une partie indispensable d'un système exhaustif d'assurance qualité dans le domaine de l'industrie pharmaceutique.

Valider une méthode d'analyse consiste à apporter la preuve qu'elle est adaptée aux objectifs que l'on s'est fixé. Il ne suffit donc pas de calculer quelques critères de validation, tels que la répétabilité ou la justesse, il faut aussi interpréter les valeurs trouvées pour déboucher sur une conclusion claire et sans ambiguïté.

C'est dans ce contexte que le développement de nouvelles méthodes analytiques plus efficaces et rapides est devenu un véritable challenge moderne pour les chimistes et les biologistes. Selon les données bibliographiques; parmi ces techniques, la chromatographie liquide à haute performance s'est avérée être un outil de choix dans le domaine du contrôle qualité des produits pharmaceutiques. Nous nous sommes intéressés dans le cadre de ce mémoire au Phloroglucinol, un antispasmodique.

A travers ce travail, nous avons effectué une étude analytique sur les différents essais physico-chimiques existants, pour la validation de la méthode analytique dosage par HPLC de la substance active dans une spécialité pharmaceutique : Phloroglucinol LDM® 80 mg / 160 mg, appartenant à la classe thérapeutique des antispasmodiques, en se basant dans cette démarche sur les critères décrits par le référentiel ICH thème Q2(R1).

L'utilisation de la HPLC comme technique de dosages du générique Phloroglucinol LDM® 80 mg et 160 mg, a été testée pour les critères suivants : Spécificité, Sélectivité, Exactitude, Linéarité, Fidélité, dans le cadre d'une validation interne au laboratoire.

Durant la période de notre formation effectuée au sein de l'unité de contrôle qualité «LDM groupe » où nous faisons partie de l'équipe responsable du contrôle qualité physico-chimique pour réaliser un dosage par HPLC du principe actif «Phloroglucinol » dans une spécialité pharmaceutique / produit fini qui est un comprimé orodispersible.

Nos résultats expérimentaux montrent que pour la méthode choisie pour cette étude est : sélective/spécifique, linéaire, fidèle, et exacte. La technique s'est montrée valide pour les utilisations définies et en conformité parfaite avec les critères de validation définis par l'ICH 2005 Q2(R1).

**Mots Clés :** dosage par HPLC, validation analytique, ICH Q2(R1), critères de validation, Phloroglucinol LDM®, Spécificité, Sélectivité, Exactitude, Linéarité, Fidélité.

# Abstract

The validation of the methods appears among the measures universally recognized as being an indispensable part of an exhaustive system of quality assurance in the field of the pharmaceutical industry.

To validate a method of analysis consists in bringing the proof that it is adapted to the objectives that we settled. It is not thus enough to calculate some criteria of validation, such as the repeatability or the correctness, it is also necessary to interpret the values found to result in a clear conclusion and without ambiguity.

It's in this context that development of new, more efficient and fast analytical methods has become a modern challenge for chemists and biologists. According to bibliographic data. Among these techniques, high performance liquid chromatography has proved to be a tool of choice in the field of quality control of pharmaceutical products. We were interested in this Phloroglucinol memory, an antispasmodic.

Through this work, we carried out an analytical study on the different physicochemical tests, for the validation of an analytical method for HPLC of a principle activates in a pharmaceutical specialty: Phloroglucinol LDM® 80 mg / 160 mg, belonging to the therapeutic class of antispasmodic, based in this approach on the criteria described by the ICH repository theme Q2 (R1).

The use of HPLC as a test method for the generic Phloroglucinol LDM® 80 mg and 160 mg was tested for the following criteria: Specificity, Specificity, Accuracy, Linearity, and Fidelity, as part of an internal validation in the laboratory.

During our professional internship in a quality control unit "LDM group" we were part of the team responsible for Physico-chemical quality control to perform a qualitative and quantitative analysis of a finished product "Phloroglucinol" which an orodispersible tablet.

Our experimental results show that for the method chosen for this study is: selective / specific, linear, faithful, and accurate. The technique has proven valid for defined uses and in full compliance with the validation criteria defined by ICH 2005 Q2 (R1).

**Keywords:** HPLC assays, analytical validation, ICH Q2 (R1), validation criteria, Phloroglucinol LDM®, Selectivity, specificity, Accuracy, Linearity, Fidelity.

# ملخص

تعد أساليب التحقق من الطرق التحليلية أحد المقاييس المعترف بها عالمياً كجزء لا غنى عنه لنظام شامل لضمان الجودة في مجال صناعة المستحضرات الصيدلانية.

التحقق من صحة طريقة التحليل يتمثل في إثبات تكيفها مع الأهداف التي حددت لها. لذلك لا يكفي حساب بعض معايير التحقق، مثل الدقة أو التكرار، بل يجب علينا أيضاً تفسير القيم التي تم العثور عليها للتوصل إلى استنتاج واضح لا لبس فيه.

من خلال هذا العمل، أجرينا دراسة تجريبية للمصادقة على طريقة تحليلية معتمدين في ذلك على الاختبارات الفيزيائية والكيميائية المختلفة، باستعمال طريقة المعايرة بواسطة الكروماتوغرافيا السائلة عالية الجودة HPLC لفحص المادة الفعالة في التخصص الدوائي: Phloroglucinol LDM® 80 mg / 160 mg، الذي ينتمي إلى الفئة العلاجية: لمضادات التشنج، مستنديين في هذا النهج إلى المعايير التي ينص عليها المؤتمر العالمي للتلاؤم ICH theme Q2 (R1).

لقد أصبح تطوير طرق تحليلية جديدة، أكثر كفاءة وسريعة تحدياً عصرياً للكيميائيين وعلماء الأحياء. في هذا السياق، وفقاً للبيانات الببليوغرافية، من بين هذه التقنيات، أثبت أن التحليل بواسطة الكروماتوغرافيا السائلة عالية الأداء هي الأداة المفضلة في مجال مراقبة جودة المنتجات الصيدلانية.

خلال فترة التربص التي تمت ضمن "مجموعة LDM" وحدة مراقبة الجودة، أين كنا جزء من الفريق المسؤول عن مراقبة الجودة الفيزيائية والكيميائية أين تم استخدام الـ HPLC كوسيلة اختبار للمادة الفعالة "الفلوروغلوسينول" في التخصص الدوائي / المنتج النهائي Phloroglucinol LDM® 80 mg / 160 mg، وفقاً للمعايير التالية: الخصوصية، الانتقائية، الدقة، الخطية والإخلاص كمعايير أساسية تمكننا من التحقق الداخلي -في المختبر- للمصادقة على صحة الطريقة التحليلية المدروسة.

تظهر نتائجنا التجريبية أن الطريقة المختارة لهذه الدراسة هي: انتقائية / محددة، خطية، مخصصة، ودقيقة. لقد أثبتت هذه التقنية أنها صالحة للاستخدامات المحددة لها وبالتوافق التام مع معايير التحقق المحددة في ICH 2005 Q2 (R1).

**الكلمات المفتاحية:** اختبار HPLC ، التحقق من الصحة، ICH Q2 (R1)، معايير التحقق، الفلوروغلوسينول LDM® 80 ملغ / 160 ملغ، الخصوصية، الانتقائية، الدقة، الخطية.



# Table des matières

Remerciement .....	i
Dédicaces .....	ii
Dédicaces .....	iii
Résumé .....	iii
Abstract.....	iv
ملخص.....	v
Table des matières.....	vi
Liste des abréviations et acronyme.....	viii
Liste des figures .....	ix
Liste des tableaux.....	x

## Introduction générale

1 Problématique et objectif.....	1
2 Structure de mémoire .....	3

## Première partie : Synthèse bibliographique

### Chapitre 1 : Validation des Méthodes Analytiques

1 Généralités sur la validation de méthodes analytiques .....	4
1.1 Définitions.....	4
1.1.1 Validation des méthodes analytiques dans l'industrie pharmaceutique .....	5
1.2 Types de validations .....	6
1.3 Normes et guidelines relative à la validation des méthodes analytiques .....	7
1.3.1 Place dans l'Autorisation de Mise sur le Marché .....	8
1.3.2 Pharmacopée .....	8
1.3.3 ICH : Harmonisation tripartite de la réglementation .....	9
1.4 Objectifs de la validation analytique .....	11
2 Démarche de documentation pour la validation des méthodes analytiques .....	13
2.1 Cycle de vie des méthodes analytiques.....	13
2.2 Organisation de la validation de méthode analytique .....	17
2.3 Critères de validation.....	19
2.3.1 Spécificité / sélectivité.....	19
2.3.2 Exactitude.....	20
2.3.3 Fidélité.....	20
2.3.4 Linéarité .....	21
2.3.5 Limite de détection .....	22
2.3.6 Limite de quantification.....	22
2.3.7 Domaine d'utilisation ou intervalle de mesure .....	22
2.3.8 Robustesse.....	22
2.4 Les règles de décision.....	23

### Chapitre 2: Chromatographie liquide à haute performance

1 Définition .....	24
2 Principe .....	24
3 Paramètres chromatographiques.....	25
4 Facteurs influençant l'optimisation .....	26
4.1 La colonne chromatographique .....	27
4.2 La phase mobile et le solvant de mise en solution .....	28
4.3 Les conditions d'élution .....	29
5 Etapes de l'optimisation .....	29

## Deuxième partie : Etude Expérimentale

### Chapitre 3: L'organisme d'accueil

1 Présentation de l'organisme d'accueil « LDM Groupe ».....	31
1.1 Différents classes thérapeutiques fabriquées par LDM.....	32

1.2	Différents compartiments de l'industrie pharmaceutique LDM. ....	32
<b>Chapitre 4: Matériel et Méthodes</b>		
1	Matériel.....	<b>33</b>
1.1	PHLOROGLUCINOL LDM® 80 mg/ 160 mg .....	33
1.1.1	Produit fini (formule de médicament) (la spécialité LDM-groupe) .....	33
1.1.2	Composition .....	33
1.1.3	Mode d'action de la Phloroglucinol LDM® 80 mg/160 mg .....	38
1.2	Propriétés pharmacologiques.....	38
1.2.1	Propriétés pharmacodynamiques .....	38
1.2.2	Propriétés pharmacocinétiques .....	38
2	Plans d'expérience .....	<b>39</b>
2.1	Produits chimiques et réactifs.....	39
2.2	Instrumentation et conditions chromatographiques .....	40
2.2.1	Appareillage .....	40
2.2.2	Optimisation de la méthode .....	40
3	Méthode de dosage.....	<b>42</b>
3.1	Préparation des solutions.....	42
3.1.1	Préparation de la solution tampon phosphate de pH 3 .....	42
3.1.2	Préparation de diluant (le blanc).....	42
3.1.3	Préparation de la phase mobile .....	42
3.1.4	Solution standard et forme pharmaceutique reconstituée.....	43
3.1.5	Préparation de solution standard (PA) .....	44
3.1.6	Préparation de la forme pharmaceutique reconstituée (PA+PB).....	45
3.1.7	Préparation du placebo .....	46
3.1.8	Préparation de l'échantillon.....	46
3.2	Validation de la méthode.....	48
3.2.1	Spécificité (ou sélectivité) .....	48
3.2.2	Linéarité .....	49
3.2.3	Exactitude.....	51
3.2.4	Fidélité (répétabilité, fidélité intermédiaire) .....	53
<b>Chapitre 5: Résultats et discussion</b>		
1	Développement de la méthode de dosage.....	<b>56</b>
1.1	Choix de la longueur d'onde de détection .....	56
1.2	Choix de la composition de la phase mobile acétonitrile-tampon phosphate .....	57
2	Résultats de Validation de la méthode.....	<b>59</b>
2.1	Résultats de spécificité / sélectivité .....	59
2.2	Résultats de Linéarité .....	63
2.2.1	Traitement statistique de la linéarité .....	67
2.3	Résultats de l'exactitude.....	69
2.3.1	Limites de quantification (LQ) .....	70
2.4	Résultats de Fidélité .....	71
2.4.1	Données brutes recueillies .....	71
<b>Conclusions et Perspectives .....</b>		<b>75</b>
1	Synthèse des résultats.....	<b>75</b>
2	Commentaires sur le protocole de validation établi.....	<b>76</b>
3	Perspectives.....	<b>76</b>
<b>Conclusion générale .....</b>		<b>78</b>
<b>Bibliographie .....</b>		<b>78</b>
<b>Annexes.....</b>		<b>84</b>
Annexe 1		
Annexe 2		
Annexe 3		
Annexe 4		

# Liste des abréviations et acronyme

Les abréviations ont généralement été indiquées sous la forme la plus couramment utilisée dans la littérature, elles sont donc souvent issues de terminologie anglo-saxonne.

AFSSAPS :	Agence française de sécurité sanitaire des produits de santé
AMM :	Autorisation de Mise sur le Marché
ANSM :	Agence Nationale de la Sécurité des Médicaments et autres produits de santé
CTD :	<i>Common Technical Document</i> : Document Technique Commun
EDQM :	European Directorate for the Quality of Medicines and Health care : Direction Européenne de la Qualité du Médicament et des soins de santé
FDA :	Food and Drug Administration
FR:	Forme pharmaceutique reconstituée
ICH :	<i>International Conference on Harmonisation</i> : Conférence Internationale d'Harmonisation
IUPAC :	International Union of Pure and Applied Chemistry
HPLC :	High Performance Liquid Chromatography.
OMS :	Organisation Mondiale de la Santé
PA :	principe actif.
Ph. Eur :	Pharmacopée Européenne
SDT	Standard
SFSTP :	Société Française des Sciences Techniques et Pharmaceutiques
SST :	<i>System Suitability Tests</i> : Tests de conformité du système
USP :	United States Pharmacopeia : Pharmacopée Américaine

## Symboles utilisés pour l'étude statistique

a :	Pente de la droite.
b :	Ordonnée à l'origine
$\sigma_a$ :	l'écartype de la pente ou Erreur pente
$\sigma_b$ :	l'écartype de l'ordonnée à l'origine ou Erreur ordonnée
C :	test de <i>Cochran</i>
CV :	coefficient de variation.
F :	Test de <i>Fisher</i>
X :	moyenne de la quantité pesée.
Y :	moyenne des aires.
N :	nombre totale d'essai
n :	nombre d'essai
k :	nombre répétition par essai
R <sup>2</sup> :	Coefficient de détermination
RSD :	Relative Standard Deviation
SCE :	Somme des carrés des écarts
t :	Test de <i>Student</i>

# Liste des figures

## Chapitre 1 :

Figure 1. 1 : Problème analytique (Adapté de Max Feinberg, 2009).....	6
Figure 1. 2: Cycle de vie d'une méthode analytique (Feinberg, M. 2009-b).....	14
Figure 1. 3: Critères et procédures de validation liés au cycle de vie d'une méthode d'analyse (validation <i>inter</i> et <i>intra</i> -laboratoire).....	15
Figure 1. 4: Courbe de linéarité.....	21

## Chapitre 2 :

Figure 2. 1: Schéma de principe d'une chaîne HPLC.....	25
Figure 2. 2: Logigramme optimisation de l'HPLC .....	30

## Chapitre 3 :

Figure 3. 1 : Site géographique de l'industrie pharmaceutique LDM (Google Map) .....	31
Figure 3. 2 : Organigramme de répartition des espaces du «LDM groupe» .....	32

## Chapitre 4 :

Figure 4. 1 : Emballage extérieur du Phloroglucinol LDM® 80 mg / 160 mg sous plaquettes thermoformées (PVC/PVDC/Aluminium): boîte de 10 comprimés. ....	33
Figure 4. 2 : Structure chimique de phloroglucinol .....	34
Figure 4. 3 : Structure chimique de l'Aspartam.....	38

## Chapitre 5 :

Figure 5. 1: Spectre UV de Phloroglucinol de concentration 80 µg mL <sup>-1</sup> .....	56
Figure 5. 2 : Effet de la variation de la composition de la phase mobile sur la rétention du Phloroglucinol et ses substances apparentés : ACN/tampon de phosphate 10 mM de pH = 3; débit = 1 mL/min; T = 25 °C.....	57
Figure 5. 3: Chromatogramme obtenu par HPLC du blanc; Phase mobile : ACN/tampon phosphate 10 mM de pH = 3 (92:8; v/v); débit = 1 mL min <sup>-1</sup> ; T = 25°C.....	59
Figure 5. 4: Chromatogrammes obtenus par HPLC du placebo ; Phase mobile : ACN/tampon phosphate 10 mM de pH = 3 (92:8; v/v); débit = 1 mL min <sup>-1</sup> ; T = 25°C. ....	59
Figure 5. 5: Chromatogramme obtenu par HPLC du STD ; Phase mobile : ACN/tampon phosphate 10 mM de pH = 3 (92:8; v/v); débit = 1 mL min <sup>-1</sup> ; T = 25°C. ....	60
Figure 5. 6: Chromatogramme obtenu par HPLC de la FR ; Phase mobile : ACN/tampon phosphate 10 mM de pH = 3 (92:8; v/v); débit = 1 mL min <sup>-1</sup> ; T = 25°C. ....	60
Figure 5. 7: Chromatogramme obtenu par HPLC de l'impureté A ; Phase mobile : ACN/tampon phosphate 10 mM de pH = 3 (92:8; v/v); débit = 1 mL min <sup>-1</sup> ; T = 25°C. ....	60
Figure 5. 8: Chromatogramme obtenu par HPLC de l'impureté B ; Phase mobile : ACN/tampon phosphate 10 mM de pH = 3 (92:8; v/v); débit = 1 mL min <sup>-1</sup> ; T = 25°C. ....	61
Figure 5. 9: Chromatogramme obtenu par HPLC de l'impureté D ; Phase mobile : ACN/tampon phosphate 10 mM de pH = 3 (92:8; v/v); débit = 1 mL min <sup>-1</sup> ; T = 25°C. ....	61
Figure 5. 10: Chromatogramme obtenu par HPLC de la FR-chargée ; Phase mobile : ACN/tampon phosphate 10 mM de pH = 3 (92:8; v/v); débit = 1 mL min <sup>-1</sup> ; T = 25°C.....	61
Figure 5. 11: Chromatogramme obtenu par HPLC de la SST ; Phase mobile : ACN/tampon phosphate 10 mM de pH = 3 (92:8; v/v); débit = 1 mL min <sup>-1</sup> ; T = 25°C. ....	62
Figure 5. 12: Superposition des chromatogrammes.....	63
Figure 5. 13: Courbes d'étalonnage du phloroglucinol dihydraté dans la solution témoin.....	65
Figure 5. 14: Courbes d'étalonnage du phloroglucinol dihydraté dans la solution FR.....	65
Figure 5. 15: Superposition des deux courbes d'étalonnage du phloroglycinol dihydraté.....	66

# Liste des tableaux

Tableau 1. 1 : Caractéristiques de performance en fonction du type d'analyse, selon l'ICH Q2(R1) .....	17
Tableau 4. 1 : Calcule des concentrations du PA par la 1 <sup>ier</sup> méthode (règle de trois) .....	43
Tableau 4. 2 : Calcule des masses de prise d'essai du PA par la 1 <sup>ier</sup> méthode (règle de trois) ....	44
Tableau 4. 3 : Prise d'essais du phloroglucinol (PA).....	45
Tableau 4. 4: Prise d'essais de la forme pharmaceutique reconstituée (PA+PB).....	46
Tableau 4. 5 : Prise d'essais des échantillons .....	47
Tableau 4. 6: Prise d'essais du standard .....	55
Tableau 5. 1 : Répétabilité du système (Canal: W2489 ChA) .....	58
Tableau 5. 2 : Les temps de rétention du PA dans les différentes solutions, placebo, impureté et la phase mobile.....	62
Tableau 5. 3 : Données brutes de l'étude de la linéarité. ....	64
Tableau 5. 4 : Paramètre de l'équation de de régression de linéarité .....	65
Tableau 5. 5 : Résultats de répétabilité du système .....	67
Tableau 5. 6 : Résultats du traitement statistique de la linéarité pour la gamme STD et FR.....	68
Tableau 5. 7 : Comparaison des pentes $a_1$ et $a_2$ .....	69
Tableau 5. 8 : Résultats du traitement statistique de l'exactitude pour la gamme STD et FR.....	70
Tableau 5. 9 : Les données brutes de l'étude de la fidélité pour STD.....	71
Tableau 5. 10 : Les données brutes de l'étude de la fidélité pour FR .....	72
Tableau 5. 11 : Etude statistique de la fidélité du STD.....	73

A decorative border with a repeating floral and scrollwork pattern in blue, framing the central text. The border is composed of a top and bottom horizontal strip and two vertical strips on the left and right sides, all meeting at ornate corners.

# *Introduction générale*

Toute analyse, chimique, biologique ou autre, nécessite la mise au point de méthodes de séparation, d'identification et de dosage des analytes avec des résultats qui doivent être les mêmes pour tout opérateur procédant à l'analyse en question (**M. Feinberg 1996**).

Les laboratoires pharmaceutiques doit prendre les dispositions appropriées pour s'assurer qu'il est en mesure de fournir, et qu'il fournit, avec ses analyses des données du niveau de qualité requis. De telles dispositions comprennent l'utilisation de procédures de contrôle interne de qualité mais aussi ils sont tenus de prouver que les méthodes d'analyses employées sont parfaitement valides et fiables (**Thompson 2002**).

La validation est fondée sur une analyse statistique des méthodes analytiques, basée sur un certain nombre de critères, aboutissant à une *assurance* de donner des résultats fiables. Donc, elle a pour but de démontrer que les techniques correspondent à l'utilisation pour laquelle elles sont proposées. Ceci fait clairement apparaître le lien très étroit qui existe entre la qualité d'une analyse et la validation de la méthode qui permet de la faire (**Bekka et Tifaoui 2014**).

Parmi les analyses effectuées dans les laboratoires pharmaceutiques lors des contrôles de la qualité : le dosage. Il permet de s'assurer, avec un maximum de garantie pour la santé publique, de la qualité du produit, dans un minimum de temps et au moindre coût. Il ne faut pas oublier que le produit fabriqué l'a été à partir de matières premières pharmaceutiques conformes, soit à une monographie officielle (Pharmacopée), soit à un cahier des charges analytiques très strict. Ainsi le contrôle des matières premières étant très complet, la démarche logique voudrait que le contrôle des produits finis soit le plus simple possible tous en garantissant la sécurité d'utilisation, ce qui nécessite des techniques adaptées et fiables (**ISO/IEC. 2005**). Pour assurer cette fiabilité, la validation des méthodes analytiques est donc d'une importance primordiale.

## 1 Problématique et objectif

La validation des méthodes analytiques constitue une étape essentielle dans le processus intégral de démonstration de la fiabilité des résultats analytiques qui seront générés par ces méthodes dans leurs utilisations quotidiennes, car non seulement elle permet de répondre aux exigences réglementaires, mais elle permet également à l'utilisateur d'évaluer la méthode et le risque statistique lié à son usage futur.

En outre, l'interprétation et l'évaluation des résultats d'analyse au cours de cette étape-clé doivent être fondées sur des bases statistiques. Sinon, l'importance et l'utilité des résultats d'analyse obtenus pour la prise de décision demeurent vagues.

On est confronté, dans la littérature et dans la pratique, à plusieurs approches de validation analytique.

Notre travail s'inscrit dans cette optique. Il a pour objectif la validation d'une méthode analytique physico-chimique d'un produit fini de la famille des antispasmodique : PHLOROGLUCINOL LDM® 80 mg et 160 mg, selon le référentiel international ICH thème Q2 (R1), développées au sein du laboratoire pharmaceutique LDM (LDM groupe, Z.I. Oued H'mimime, 25100 El Khroub, Constantine), ou la totalité du travail a été effectuée, afin de démontrer que la méthode convient pour l'usage auquel elle est destinée.

La validation d'une méthode d'analyse entraîne la détermination de plusieurs paramètres. L'ICH propose une validation de méthode basée sur la validation de nombreux critères qui sont : la spécificité et la sélectivité, l'exactitude, la fidélité (réplicabilité, répétabilité, reproductibilité), la linéarité et l'intervalle de dosage défini.

La méthode de dosage de PHLOROGLUCINOL LDM® 80 mg /160 mg est celle de la Chromatographie Liquide à Haute Performance (HPLC) couplé à un détecteur UV monochromatique. Cette validation est effectuée en interne et conformément aux procédures de dosage de cette forme pharmaceutique (**ICH 2005-a**).

Cette analyse fait ressortir trois types de validation de méthode, validation de méthode par ses critères de performance, par quantification des incertitudes et par profil d'exactitude comme outil de décision. Elle a pour Objectif de :

- Établir une procédure nécessaire pour prouver que le protocole est suffisamment exact et fiable pour avoir confiance dans les résultats fournis et ceci pour un usage déterminé ;
- normaliser la méthode pour en faire une méthode alternative, ou de référence, en s'assurant que les résultats seront acceptés (**EURACHEM 1998**).



Au cours de notre stage pratique, effectué au niveau de l'industrie pharmaceutique au sein laboratoire pharmaceutique dénommée LDM-groupe, ou on a fait partie de l'équipe contrôle qualité responsable de la validation de méthodes physico-chimiques, ou on étaient témoin d'un personnel qualifié et professionnel, afin d'obtenir le diplôme de Master en Bioindustrie Analyse et Contrôle.

## 2 Structure de mémoire

Dans le présent travail, nous avons repartis notre démarche en deux parties principales:

La première partie, qui suit l'introduction générale, était consacrée à la synthèse bibliographique en 1<sup>ier</sup> lieu au sujet de validation des méthodes analytiques dans le domaine pharmaceutique (définition, les types, norme et guides lignes en relation, objectif, démarche de documentation : le cycle de vie d'une méthode, les critères, les règles de décision, le dossiers de validation, l'utilisation en routine), en 2<sup>ème</sup> lieu nous présentons la méthode analytique utilisée dans notre étude qui est basée sur le dosage par chromatographie liquide haute performance d'un produit fini, ainsi que les caractéristiques de la technique HPLC.

Dans la deuxième partie, dénommée « Etude expérimentale », on trouve deux grands titres :

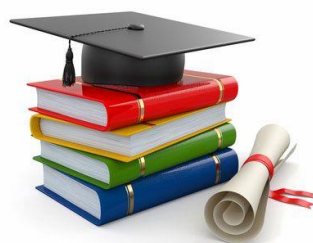
Le 1<sup>ier</sup> est nommé « Matériel et Méthodes », dans lequel nous présenterons le matériel utilisés dans cette étude ainsi que le travail personnel réalisé en cour de la période du stage pratique au sein du laboratoire LDM, et pour ce faire, nous citerons les différents protocoles effectués pour la validation de la méthode analytique proposée dans cette étude sur les paramètres suivants : la linéarité, l'exactitude, la fidélité, la spécificité et la sélectivité.

Le second est intitulé « Résultats et Discussion », réservée à la présentation des différents résultats obtenus avec leurs discussions.

Enfin, nous concluant ce manuscrit par une conclusion générale de la validation de la méthode analytique utilisée et une citation des perspectives estimés dans le prochain futur, suivi de la liste de références bibliographiques et des Annexes.



*Première partie : Synthèse  
bibliographique*



## *Chapitre 1*

# *Validation des Méthodes Analytiques*



Le contexte industriel actuel impose à de nombreuses entreprises de démontrer que l'ensemble des procédés et des méthodes utilisées dans l'élaboration d'un produit manufacturé conduisent effectivement au résultat recherché ; l'industrie pharmaceutique n'échappe pas à cette règle et les laboratoires pharmaceutiques sont tenus de prouver que les méthodes d'analyse employées sont parfaitement valides et fiables. Si la qualité d'une méthode analytique n'est pas confirmée, la décision de conformité ou non des produits finis basée sur les données obtenues par le Contrôle Qualité en utilisant cette procédure analytique devient contestable (**Hubert 2016**). C'est pourquoi l'assurance de la fiabilité de la méthode garantie par la validation est non seulement une exigence réglementaire, mais également un critère essentiel de l'assurance de la Qualité.

Dans le domaine pharmaceutique, l'exigence de la validation est avant tout une pratique réglementaire. En Algérie, selon la dernière circulaire du ministère de la santé N°08-13 du 20 juillet 2008 modifiant et complétant la loi du N°85-05 du 16 février 1985, toute méthode analytique décrite dans le dossier d'AMM doit être accompagnée d'une validation complète (**Miri 2014**).

## 1 Généralités sur la validation de méthodes analytiques

### 1.1 Définitions

La notion de validation implique qu'une technique d'usage généralisé doit être "prouvée", confirmée avant d'être reconnue.

La clause 5.4.5.1. de la norme ISO 17025 : 2005 définit ainsi la validation : « *est la confirmation par examen et apport de preuves objectives du fait que les exigences particulières en vue d'une utilisation prévue déterminée sont remplies* » (**ISO/IEC:17025. 2005**).

La validation est donc un exercice documenté, au cours duquel on veut démontrer que chaque étape d'un procédé se déroulera comme prévu initialement, et ce même dans des conditions extrêmes, et permettra de répondre à des critères de qualité définis au préalable. Elle est appliquée à tout ce qui contribue directement ou indirectement à la fabrication du produit (**Girault 1997**), c'est-à-dire (**ANSM. 2015**):

- aux procédés de production et de nettoyage,

- aux systèmes informatisés
- aux équipements, dans ce cas, le terme qualification sera employé
- et également aux méthodes d'analyse

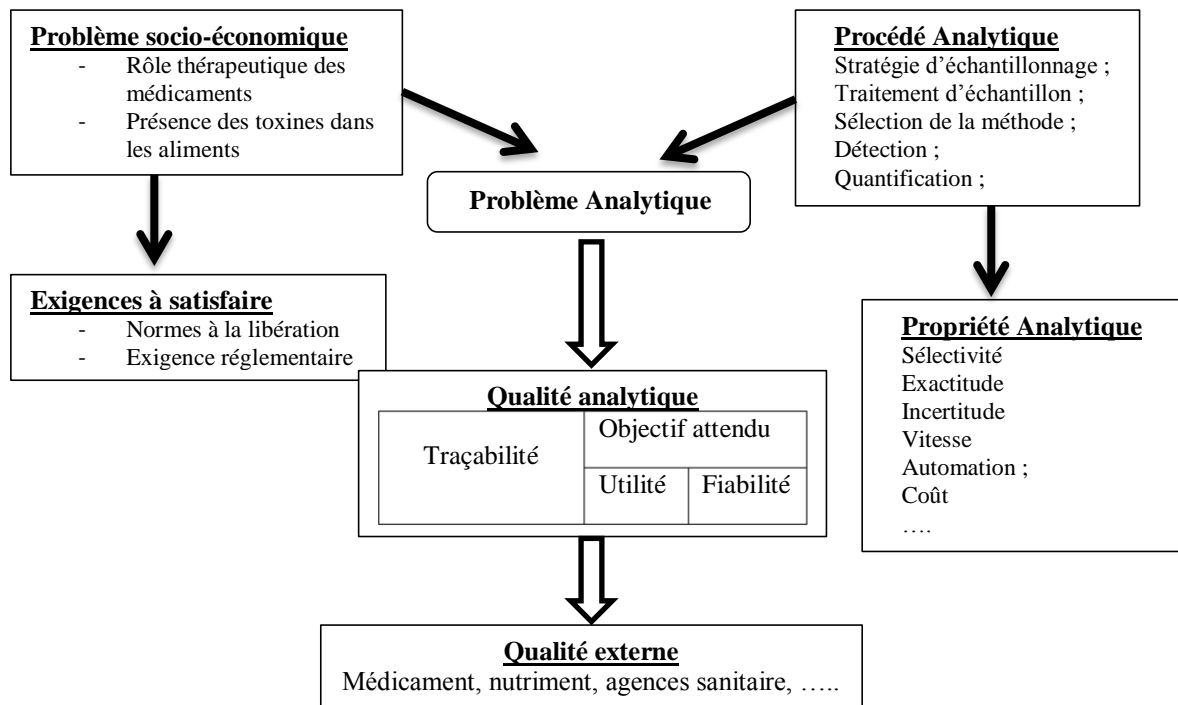
Pour les industries pharmaceutiques, la validation est tout d'abord une exigence réglementaire. Mais la validation est également un outil fondamental des entreprises, leur permettant d'avoir confiance dans la qualité des produits fabriqués. Par la maîtrise du procédé qu'elle apporte, la validation réduit la variabilité inter lots et minimise les effets liés au hasard. Cela assure l'obtention de produits de la même qualité, sûrs et efficaces et réduit les risques de rappels de lots ou de réclamations clients (**Pandita , et al. 2012**).

Enfin, bien que coûteuse au départ, la validation permet aux entreprises d'optimiser les dépenses en limitant les incidents en cours de production et les non-conformités lors des contrôles et donc en diminuant les coûts liés aux rejets, retraitements, retests ou investigations (**Pandita , et al. 2012**).

### **1.1.1 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 (**WELAC 1993**), de la bioanalyse dans le cadre des études cliniques et des études de bioéquivalence jusqu'aux études environnementales et agro-alimentaires....

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 comme le montre la Figure 1 (**Feinberg, M. 2009-b**).



**Figure 1. 1: Problème analytique (Adapté de Max Feinberg, 2009)**

L'ensemble de ces actions représentent un coût élevé pour l'entreprise (Pandita , *et al.* 2012).

Les méthodes employées pour ces contrôles doivent donc elles-mêmes être contrôlées pour s'assurer de la fiabilité, de la cohérence et de la précision des résultats obtenus : c'est la validation des méthodes analytiques (Pierre 2015).

Tout comme la fréquence et la nature des contrôles à réaliser, les exigences relatives à la validation des méthodes analytiques sont dictées par les autorités réglementaires (Feinberg, M. 2009-b).

## 1.2 Types de validations

Afin de réaliser au mieux la vérification / validation de ses méthodes, le laboratoire analyse et définit pour chaque examen la nature des opérations à mettre en œuvre en fonction :

❖ Du type de flexibilité :

- Méthodes « fournisseurs », dites adoptées, avec uniquement une vérification de performance sur site,

- Méthodes adaptées ou développées en interne, avec une validation de méthode.
- ❖ Du type de méthodes (quantitatif ou qualitatif), schématiquement, on distingue deux types de méthodes d'examen :
  - Les méthodes de type quantitatif : Elles fournissent un résultat chiffre, sur une échelle continue à partir de la mesure d'un signal en relation directe avec une quantité (analyte, molécule, substance, cellule ou organisme, ...) ou une activité donnée de l'analyte (enzymes). Sont également assimilées au type quantitatif, les examens fournissent un résultat de type quantitatif, extrapolé à partir de la mesure d'un signal continu quantifiable (absorbance par exemple).
  - Les méthodes de type qualitatif : Le résultat de ce type de méthode n'apporte pas d'information sur la quantité de l'analyte (cellule ou organisme), mais seulement sur sa présence ou son absence (positif/négatif), ou l'identification de la caractéristique recherchée. On peut classer dans cette catégorie tous les examens où aucune mesure d'une donnée quantifiable ne peut être déterminée et ceux dont le résultat est obtenu par l'observation de la réaction, par comparaison avec des témoins positif et négatif notamment.

### 1.3 Normes et guidelines relative à la validation des méthodes analytiques

La validation analytique est régie par des textes réglementaires ou des référentiel tels que l'ICH (ISO 1994), la FDA (USFG 2001), EURACHEM (FPAM 1998), IUPAC (IUPAC 2002), AOAC (AOAC 1990). Ces derniers décrivent et définissent les critères de validation à prendre en considération pour toute validation analytique, mais ne proposent pas des approches expérimentales. En effet toutes ces références se limitent à des concepts généraux (Rozet 2008).

C'est pour ces raisons que des guidelines pratiques ont été mis en place afin de faciliter la tâche aux analystes désireux de la réalisation de la validation de leurs procédures d'analyse tels que ceux de l'ICH qui représentent la référence internationale

de base en matière de validation analytique pour l'industrie pharmaceutique (**ICH 2005-b**).

### 1.3.1 Place dans l'Autorisation de Mise sur le Marché

Tous les médicaments mis sur le marché doivent faire l'objet d'une AMM préalable. En vue de l'harmonisation internationale des demandes d'AMM, le dossier doit être présenté selon un format standard élaboré par l'*International Conference on Harmonisation* (ICH) et appelé "*Common Technical Document*" (CTD) ou Document Technique Commun.

La validation des méthodes d'analyse est donc une exigence réglementaire pour la commercialisation d'un médicament.

### 1.3.2 Pharmacopée

La Pharmacopée est un référentiel opposable qui présente, sous forme de monographies, les critères de pureté des matières premières ou des préparations entrant dans la fabrication des médicaments ainsi que les méthodes à utiliser pour assurer leur contrôle (**ANSM 2017**).

Les méthodes décrites dans la Pharmacopée sont des méthodes de référence et sont considérées comme étant validées (**EDQM.1. 2014**), cependant des indications sont données dans les différents chapitres relatifs aux méthodes pour que le laboratoire s'assure de son aptitude à les mettre en œuvre. La Pharmacopée comprend :

- la Pharmacopée française, préparée et publiée par l'ANSM
- la Pharmacopée européenne, préparée et publiée par l'*European Directorate for the Quality of Medicines* (EDQM) ou Direction Européenne de la Qualité du Médicament et des soins de santé (DEQM)
- U.S. Pharmacopeia (USP) : Pharmacopée américaine : Comme c'est le cas pour la Pharmacopée européenne, les monographies de l'USP constituent un référentiel opposable (**USPC 2016**). Plusieurs textes font référence à la validation des méthodes :
  - <1225> *Validation of compendial procedures* : ce texte décrit les paramètres à considérer pour la validation d'une nouvelle méthode



et les informations à fournir pour son intégration à l'USP (**USP 2016-a**).

- <1226> *Verification of compendial procedures* : ce texte apporte des informations pour les laboratoires qui souhaitent mettre en place au sein de leur laboratoire des méthodes de référence ou des méthodes déjà validées au sein d'un autre laboratoire. Il ne couvre cependant pas la vérification des méthodes en microbiologie qui est abordée dans les chapitres généraux « 51 », « 61 », « 62 », « 71 » et « 1227 » (**USP 2016-b**).

### 1.3.3 ICH : Harmonisation tripartite de la réglementation

Elle est définie comme un processus d'harmonisation des exigences réglementaires en matière de médicaments à usage humain "*International Council for Harmonisation of Technical Requirements for Pharmaceuticals for Human Use*". Cette entité est créée à Bruxelles en Avril 1990, en réunissant les autorités de réglementation et l'industrie pharmaceutique de l'Union Européenne, du Japon et aux USA. Son but est d'accroître le degré d'harmonisation internationale pour obtenir des médicaments de bonne qualité, avec des niveaux de sécurité et d'efficacité satisfaisants, enregistrés de la façon la plus efficace possible et à des coûts raisonnables, et de discuter des aspects techniques et scientifiques de l'enregistrement des médicaments au niveau mondial afin d'aboutir à un dossier harmonisé pour la mise sur le marché des médicaments (**ICH 2016**).

Ils rassemblent des groupes d'experts qui représentent les autorités réglementaires et les associations industrielles des trois régions initiatrices, mais également de la Suisse et du Canada ainsi que des observateurs comme l'OMS (**ICH; 2016**). Ils émettent des *Guidelines* pour une meilleure compréhension des exigences relatives à la qualité, la sécurité et l'efficacité des médicaments et leur application. Ces *Guidelines* sont divisées en quatre grands thèmes (**ICH 2016-b**):

- qualité, qui aborde des étapes clés pour la qualité du médicament comme les études de stabilité, la validation analytique ou encore le management du risque qualité
- sécurité, relative à la toxicité des médicaments, entre autres : détection des effets cardiotoxiques, génotoxiques ou reprotoxiques ...
- efficacité, qui traite les essais cliniques : conception, réalisation, sécurité lors des essais cliniques et établissement de rapports.

- une partie multidisciplinaire, pour les thèmes transversaux comme le *Common Technical Document (CTD)* articulé en cinq modules qui permet l'harmonisation du dossier de demande d'Autorisation de Mise sur le Marché (AMM) des médicaments.

Dans le thème de qualité l'ICH a dédiés deux guides pour la validation analytique:

- Q2A: «*Text on Validation of Analytical Procedures (1994)*»: dont l'objectif est de définir les critères et les caractéristiques qui doivent être prises en considération lors de la validation des méthodes analytiques (**ICH 2005-a**).
- Q2B: «*Methodology (1996)*» : Son but est de fournir des conseils et recommandations sur la manière d'appréhender les différentes caractéristiques de la validation pour chaque méthode analytique. En outre, le document fournit une indication sur les données qui devraient être présentées dans un dossier d'enregistrement (**ICH 2005-a**).

En 2005 ces deux lignes directrices ont été regroupées en une seule : Q2(R). L'ICH Q2 (R1) intitulée *Validation of Analytical Procedures : Text and Methodology* (Validation des Procédures d'Analyse : Texte et Méthodologie) est entièrement consacrée à la validation des méthodes d'analyse (**ICH 2005-a**).

Les types des procédures analytiques à valider décrites par l'ICH sont :

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

L'ICH est une exigence réglementaire, toute validation de méthode analytique présentée dans un dossier d'AMM (Autorisation de Mise sur le Marché) doit répondre à ses exigences.

Nous rappelons qu'au cours de ce travail, nous avons réalisé une validation d'une méthode de dosage d'un produit fini en se référant aux guidelines décrites par le référentiel l'ICH Q2\_R1 afin de vérifier par des études expérimentales que les critères de

performance de la méthode satisfont aux exigences prévues par les applications de la méthode.

Pour ces raisons, plusieurs méthodologies pratiques ont été proposées (**Caporal-Gautier , et al. 1992-a, Huber 2010**), afin d'aider les analystes à valider leurs procédures d'analyse en appliquant les recommandations réglementaires, dans le but d'obtenir une AMM.

Ces guides ont grandement contribué à faire progresser la validation des procédures de dosage. Néanmoins, le premier guide de la SFSTP (Société Française des Sciences Techniques et Pharmaceutiques) (**Caporal-Gautier , et al. 1992-a**) est exclusivement dédié aux spécialités pharmaceutiques :

- SFSTP « Guide de validation analytique – Rapport d'une commission SFSTP »
- SFSTP « Méthodes chromatographiques de dosage dans les milieux biologiques : stratégie de validation. Rapport d'une commission SFSTP » paru dans STP Pharma Prat. en 1997 (**Chapuzet et Mercier 1997**);
- SFSTP « Validation des procédures analytiques quantitatives : Harmonisation des démarches »

#### 1.4 Objectifs de la validation analytique

Sachant que les notions de "vrai biais" et de "vraie fidélité" sont des paramètres qui resteront toujours inconnus, mais qu'ils pourront être estimés par les mesures qui seront réalisées en phase de validation, quel est donc l'objectif de la validation ?

Il paraît raisonnable de prétendre que l'objectif principal de la validation analytique est de démontrer l'aptitude et la fiabilité d'une méthode vis-à-vis des exigences réglementaires et normatives en vigueur. Elle permet de garantir que chaque mesure qui doit être réalisée en routine est comprise dans une limite d'acceptation appropriée au type de procédure analytique et au produit concerné. Il faut donc définir correctement à la fois les conditions et le but dans lesquels la méthode sera utilisée. Ces principes s'appliquent à toutes les méthodes utilisées par un fabricant de médicaments, qu'elles soient ou non décrites dans une pharmacopée.

Les objectifs de la validation ne sont pas seulement d'obtenir une estimation de la justesse, du biais ou de la fidélité de la méthode, mais également d'évaluer le risque statistique lié à son utilisation, qui peut être exprimé par l'incertitude de mesure associée au résultat (**Gustavo González et Ángeles Herrador 2007**).

Par rapport aux méthodes de validation classiques antérieures basées sur l'estimation des critères de validation tels que la justesse, la fidélité ou la linéarité, l'introduction du concept de profil d'exactitude représente une avancée pour l'évaluation de ce risque (**M. Feinberg , B. Boulanger , et al. 2004**).

Dans ces conditions, l'exactitude, la fidélité, la linéarité, ... ne sont plus que des "paramètres statistiques" ou "éléments de calcul" permettant de chiffrer ces garanties. En effet, on attend d'une procédure de dosage qu'elle soit capable de quantifier, et non pas tellement qu'elle soit fidèle, même si, admettons-le, cette fidélité constitue un gage de réussite.

C'est dans ce contexte que l'analyse statistique des résultats de validation trouve sa véritable dimension.

Toutefois, dans cette perspective, il faut encore faire la différence entre les statistiques qui permettent de prendre une décision (quant à l'aptitude d'une procédure à correspondre à l'usage pour lequel elle est prévue) de celles qui aident à poser un diagnostic, c'est-à-dire nous renseigner sur un point particulier de ses performances, comme par exemple la linéarité ou le passage de l'ordonnée par zéro.

En fait, ce dont on a réellement besoin, c'est d'un bon outil de décision c'est-à-dire un outil offrant la **garantie** que la plupart des futures mesures seront dans les limites d'acceptation (**Bouabidi 2013**).

Si les garanties offertes par la règle de décision ne sont pas satisfaisantes, mais dans ce cas seulement, les outils de diagnostic aideront alors l'analyste à identifier les causes possibles du problème.

## 2 Démarche de documentation pour la validation des méthodes analytiques

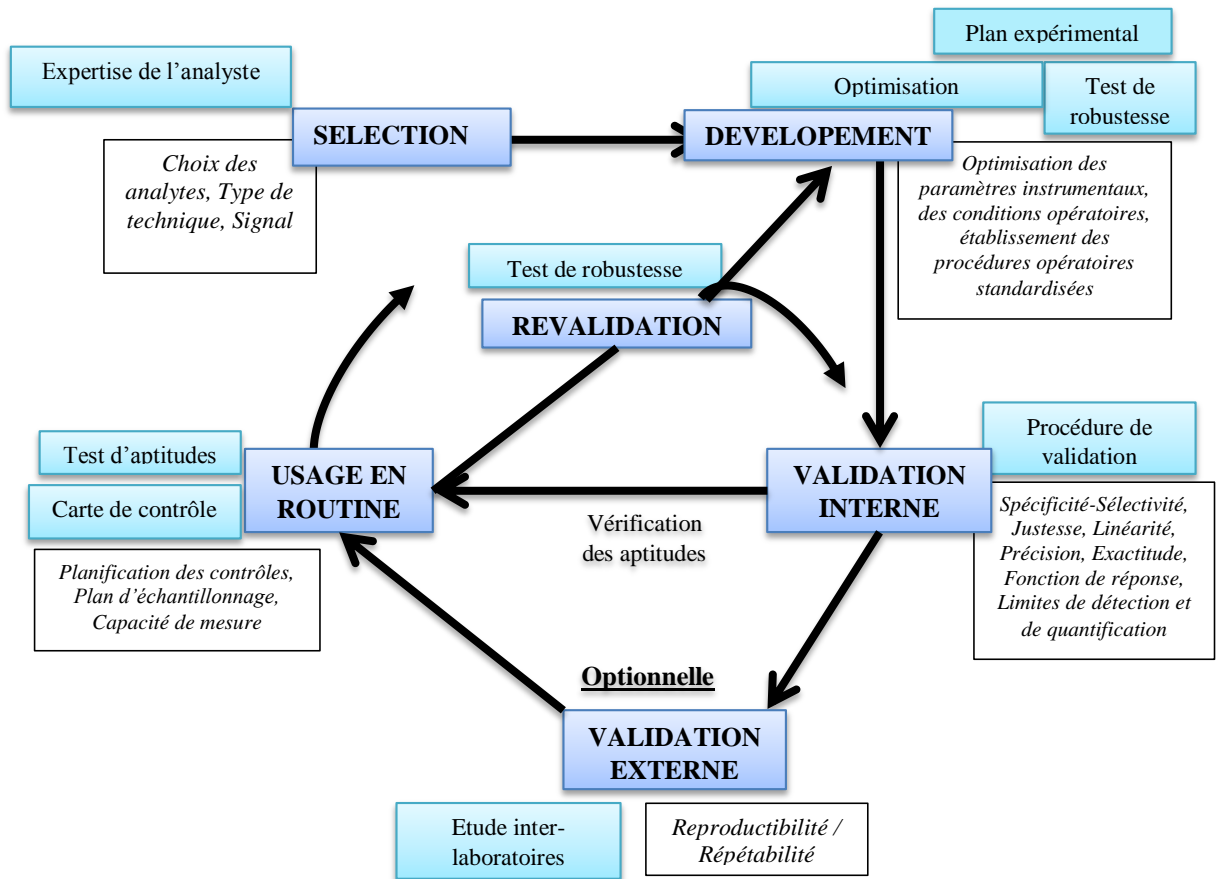
### 2.1 Cycle de vie des méthodes analytiques

La vie d'une méthode d'analyse est un processus évolutif qui suit différentes étapes (ANSM, 2015) pouvant être représentées par un cycle.

Le cycle de vie d'une méthode est un concept souligné dans la norme ISO 17025 (ISO/IEC:17025, 2005). L'idée de base est qu'une méthode d'analyse n'est pas statique, mais une entité vivante qui passe par plusieurs étapes interdépendantes.

Les principales étapes de ce cycle sont les suivantes :

- une phase de sélection où des objectifs et des conditions opératoires initiales sont définis ;
- une phase de développement, avec ou sans optimisation au moyen de plans d'expériences;
- une phase de validation (caractérisation *intra*-laboratoire et, au besoin, *inter*-laboratoires, de la méthode) précédée, selon les cas, d'une phase de prévalidation;
- une phase d'application en routine (usage en routine), incluant le plus souvent une validation en routine et parfois une validation partielle ou une revalidation.



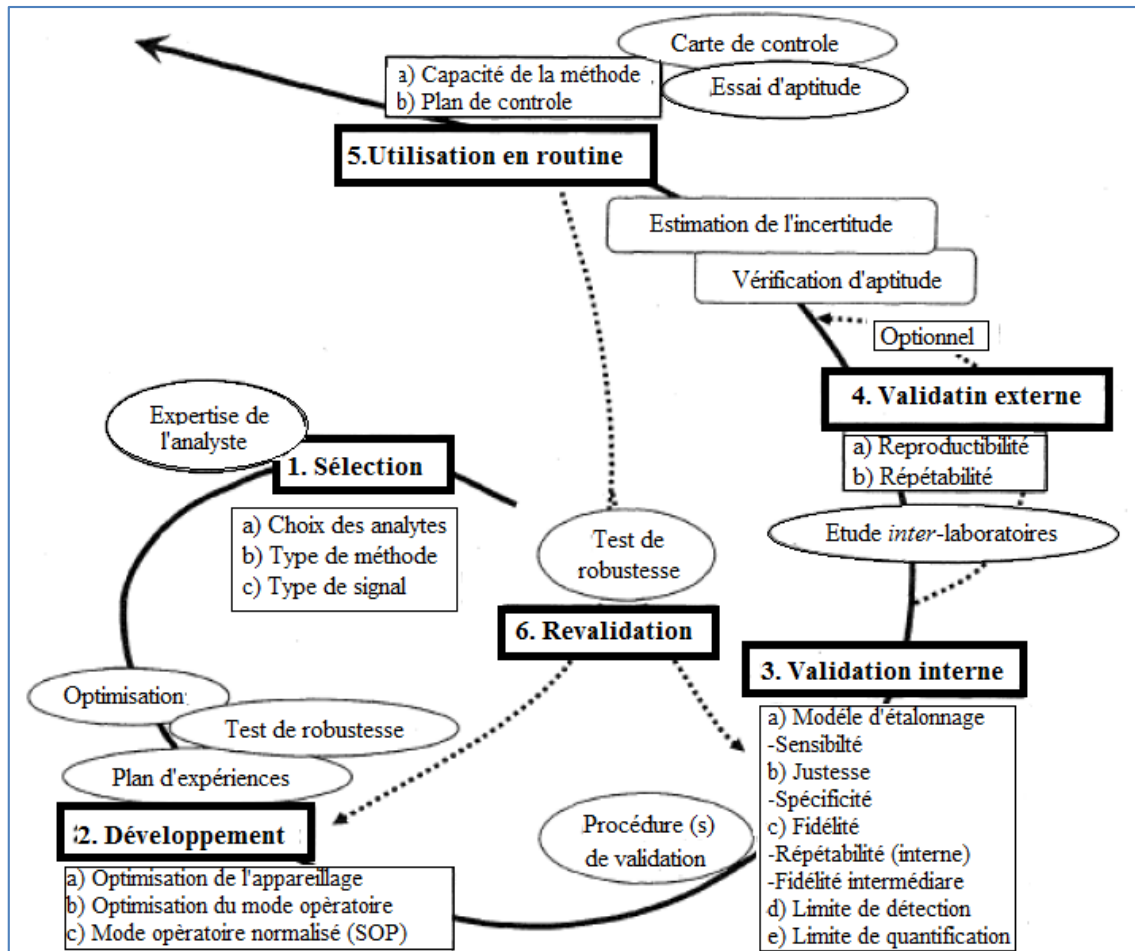
**Figure 1. 2:** Cycle de vie d'une méthode analytique (Feinberg, M. 2009-b).

*Légendes : Les étapes sont reprises dans un rectangle bleu (gras), les tests associés dans un rectangle Cyan et les critères pour l'évaluation dans un rectangle non colorié (italique).*

L'étape de validation intervient après le développement d'une nouvelle procédure d'analyse (Comme l'indique très explicitement la Figure I. 3, la validation ne doit intervenir qu'après la mise au point complète de la méthode).

En effet, les performances de la méthode vont évoluer tout au long du cycle de vie, et plus particulièrement au cours des deux premières étapes.

Ainsi, la fiabilité du résultat analytique fourni par la méthode doit être améliorée lors de ces premières phases, pour tendre vers une confiance accrue qui sera attestée durant cette troisième étape de validation.



**Figure 1. 3:** Critères et procédures de validation liés au cycle de vie d'une méthode d'analyse (validation *inter* et *intra*-laboratoire).

On distingue deux types de validation, la validation *intra*-laboratoire (ou in-house) et la validation *inter*-laboratoires (ou en collaboration).

La validation *inter*-laboratoire concerne principalement les méthodes analytiques destinées à être utilisées par plusieurs laboratoires, ou bien dont les résultats vont servir lors d'échanges commerciaux. Ainsi, ce type de validation se rencontre rarement dans l'industrie pharmaceutique où les méthodes sont utilisées en interne, et très fréquemment dans l'industrie agro-alimentaire. En effet, il faut impérativement réaliser une validation *inter*-laboratoire pour des méthodes destinées à mesurer la conformité d'une denrée lors d'un échange commercial (Feinberg, *et al.* 2004). Ce type de validation permet en outre de calculer les limites de reproductibilité de la méthode.

La validation *intra*-laboratoire est une validation interne concernant l'ensemble des méthodes analytiques développées par un laboratoire. Le sujet d'étude de ce mémoire se limite exclusivement à ce type de validation.

L'objectif spécifique de la méthode d'analyse doit être défini avant de commencer toute validation. En effet, comme indiqué précédemment, une méthode doit être adaptée à un but donné (**E. Rozet 2008, Feinberg, M. 2009-a, M. Feinberg, B. Boulanger, et al. 2004**).

L'étude de validation devrait inclure les sources de variabilité qui peuvent être couramment rencontrés lors de l'application de la méthode en routine et au moins différents types d'équipement et différents analystes qui vont appliquer la méthode tous les jours. Si l'analyse est effectuée toujours avec le même équipement et par le même opérateur, d'autres équipements ou opérateurs ne devront donc pas être pris en compte. Enfin, avant que l'équipement ne soit utilisé pour l'étape de validation ainsi que pour des analyses de routine, sa performance doit être vérifiée (**Rozet 2008**).

En conclusion, les méthodes normalisées sont considérées comme valides lorsqu'elles sont mises en œuvre selon les dispositions prévues dans la norme. Le laboratoire est uniquement tenu de démontrer son aptitude à appliquer correctement les méthodes et de s'assurer qu'elles sont applicables à des substances médicamenteuses ou produits spécifiques, cette validation peut être appelée vérification.

Cependant, dans le cas où une méthode normalisée est utilisée hors du champ d'application de la norme, elle devra être entièrement validée (**ISO 2010**). Le laboratoire est tenu de valider les méthodes développées en interne (**ISO 2010**). Si la validation est conforme, la méthode peut être utilisée en routine au laboratoire (**Feinberg, M. 2009-b**).

La plupart des systèmes d'analyse réelle contiennent des pièces mécaniques, électriques et / ou optiques, dans lesquelles le facteur temps peut avoir une importance déterminante : le vieillissement de la lampe du détecteur photométrique, une diminution de la capacité de séparation de la colonne chromatographique, ... D'autres systèmes d'analyse peuvent être affectés par des changements dans les conditions environnementales, comme la température, l'humidité, ....



Ces changements peuvent provoquer des dérives dans les résultats, c'est-à-dire que des tendances systématiques des résultats sont fonction du temps.

## 2.2 Organisation de la validation de méthode analytique

Le procédé de validation d'une méthode analytique peut être découpé en différentes phases. Une fois la méthode sélectionnée, optimisée et formalisée il faut définir les critères de validation c'est-à-dire déterminer les paramètres de performance et les critères d'acceptation. Les paramètres de performances dépendront de l'usage attendu de la méthode.

Il n'est pas nécessaire de valider tous les paramètres de performance, mais il faut savoir définir ceux qui doivent l'être (**ICH 2005-a**), (**Huber 2010**) . L'ICH Q2(R1) présente un tableau avec les critères à valider en fonction du type d'analyse, (Tableau 1. 1) (**ICH 2005-a**).

**Tableau 1. 1** : Caractéristiques de performance en fonction du type d'analyse, selon l'ICH Q2(R1)

Caractéristiques de performance *	Identification	Recherche d'impuretés		Dosage
		Essai quantitatif	Essai qualitatif	- Dissolution - Teneur ou activité
Exactitude	NON	OUI	NON	OUI
Précision	NON	OUI	NON	OUI
Répétabilité	NON	OUI	NON	OUI
Précision intermédiaire	NON	OUI	NON	OUI
Spécificité	OUI	OUI	OUI	OUI
Limite de détection	NON	NON	OUI	NON
Limite de quantification	NON	OUI	NON	NON
Linéarité	NON	OUI	NON	OUI
Intervalle de mesure	NON	OUI	NON	OUI

\*Caractéristiques définies ci-après.

Les critères d'acceptation dépendent également de l'usage attendu de la méthode et des spécifications réglementaires (tirées des *Guidelines* ICH ou de la Pharmacopée par exemple) et parfois des exigences du client, dans le cas de la sous-traitance industrielle, notamment. Ils pourront être réajustés si nécessaire lorsque le fabricant disposera de plus d'informations lors de la fabrication du produit (**Huber 2010**). Il faut ensuite définir les essais de validation, c'est-à-dire quels tests seront réalisés pour évaluer

ces critères, tous ces éléments doivent être réunis dans un protocole de validation (**Pandita , et al. 2012**).

L'étape suivante est l'exécution des essais de validation selon le protocole prédéfini. Dans un premier temps, il convient de préparer ces essais et donc de s'assurer d'avoir à disposition tous les réactifs et standards nécessaires, du matériel et des équipements qualifiés, du personnel formé et une documentation structurée sous forme de procédures. Les différentes *Guidelines* ne précisent pas l'ordre dans lequel les paramètres doivent être validés, la séquence optimale dépendra de la méthode elle-même.

Les résultats obtenus sont ensuite comparés aux critères d'acceptation pour conclure sur la conformité de la validation. Il est également important de développer des essais qui permettront de s'assurer, lors des analyses de routine, que la méthode reste appropriée (**Huber 2010**).

Une fois la méthode validée, un rapport de validation doit être rédigé. Ce rapport doit préciser les critères de revalidation, c'est-à-dire dans quelles conditions la méthode doit être revalidée (**Huber 2010**). Ce rapport doit faire référence au protocole de validation (**ANSM. 2015**) en rappelant:

- les objectifs
- le domaine d'application
- les documents associés
- les responsabilités
- la description de l'équipement, procédé, système ou méthode ayant fait l'objet de la validation
- la procédure de test et les critères d'acceptation

Il doit surtout présenter de façon synthétique les résultats obtenus lors de l'étude de validation et les interpréter (**ANSM. 2015**). Si des écarts par rapport au protocole initial ont été observés, ils doivent être commentés et aboutir à des recommandations pour remédier au problème et fournir des pistes d'améliorations (**ANSM. 2015**).

Enfin, l'objectif de la validation des méthodes analytiques est leur utilisation en routine, des procédures adaptées à l'utilisation en routine et doivent donc être rédigées **(Huber 2010)**.

## 2.3 Critères de validation

Vu le but visé dans notre étude, nous allons se focaliser aux critères de performance des méthodes analytiques fournies dans des publications comme les *guidelines* ICH, notamment le *guideline* ICH Q2 (R1) paru en 2005. Son but est de fournir des recommandations sur la manière d'appréhender les différentes caractéristiques de la validation qui sont globalement résumés en une série de procédure physico-chimique pour chaque méthode analytique. En outre, le document fournit une indication sur les données qui devraient être présentées dans un dossier d'enregistrement. Ces paramètres bien codifiée, validée par l'outil statistique sont présentés ci-dessous.

### 2.3.1 Spécificité / sélectivité

#### 2.3.1.1 Concept & Définition

Le premier critère pour évaluer une méthode analytique consiste à vérifier sa capacité à établir de manière univoque l'existence de la substance à analyser (analyte) en présence d'autres composants potentiellement présents **(P. Hubert, et al. 2003)**. Cette capacité de distinguer l'analyte des autres composants a été désignée pendant plusieurs années par le nom de "sélectivité" ou, selon les *guidelines* par "spécificité" d'une méthode **(Rozet, et al. 2007)**.

Seul le document ICH parle de la spécificité et la définit comme « *la capacité de la méthode à doser sans équivoque un analyte en présence d'autres composants que l'on s'attend à trouver dans la préparation* » **(ICH 2005-a)**, alors que les autres documents parlent bien de la sélectivité et EURACHEM utilise les deux termes pour définir la même chose.

Sur le plan d'expérience, Aucun document ne propose un plan expérimental complet en terme de nombre exact d'échantillons.

### 2.3.1.2 Recommandations

Une distinction claire doit être faite entre les deux termes "sélectivité" et "spécificité" :

Exemple : "Une réaction spécifique est celle qui se produit seulement avec la substance à analyser, tandis qu'une réaction sélective est celle qui peut se produire avec d'autres substances, mais expose d'une manière préférentielle la substance à analyser. Peu de réactions sont spécifiques, mais plusieurs montrent une sélectivité".

Ceci est compatible avec le concept de la sélectivité qui désigne quelque chose qui peut être graduée tandis que la spécificité est une caractéristique absolue. Pour plusieurs analystes, il est généralement admis que la spécificité est quelque chose d'exceptionnel. En effet, peu de méthodes répondent à un analyte unique (**Rozet, et al. 2007**) . Il paraît donc plus opportun de maintenir le terme «sélectivité» dans le cas des méthodes chromatographiques (**P. Hubert, et al. 2003**).

### 2.3.2 Exactitude

Correspond à « *l'étroitesse de l'accord entre la valeur considérée comme vraie ou la valeur de référence et la valeur obtenue* » (**ICH 2005-a**).

L'exactitude d'une méthode doit être établie dans son intervalle de mesure. Elle s'exprime par le pourcentage d'erreur entre la valeur observée et la valeur réelle (**Chaloner-Larsson , et al. 1997**).

C'est le reflet d'une erreur systématique, les résultats expérimentaux dévient toujours dans le même sens. Elle peut être due à des erreurs instrumentales (appareil déréglé, appareil non étalonné, appareil qui n'est pas utilisé dans les conditions appropriées), à la méthode, aux produits (contenant des impuretés) ou à des erreurs personnelles (manques de soin ou d'attention, personnel non qualifié). Si elles sont décelées suffisamment tôt, elles peuvent être évitées.

### 2.3.3 Fidélité

La fidélité ou précision correspond à « *l'étroitesse de l'accord entre les valeurs obtenues lors de la répétition d'une mesure, et ce dans des conditions spécifiées* » (**ICH 2005-a**). Elle est déterminée par la répétition de la procédure d'analyse sur un nombre

suffisant d'aliquotes d'un même échantillon afin de calculer le coefficient de variation (CV) exprimé en pourcentage (**ICH 2005-a**).

Néanmoins, trois types de fidélité sont généralement estimés, à savoir :

- i. La répétabilité qui est une expression de la fidélité de la méthode lorsque celle-ci est reprise dans les mêmes conditions (même échantillon, même laboratoire, par le même analyste, avec les mêmes équipements) de réalisation, après un court intervalle de temps. La répétabilité est aussi désignée par fidélité *intra*-analyse (*intra* série) (**ICH 2005-a**)
- ii. La fidélité intermédiaire qui correspond aux variations survenant dans un même laboratoire : analyses effectuées dans des jours différents, par des personnes différentes, au moyen d'appareils différents, etc. Elle exprime la variabilité *intra*-laboratoire (**ICH 2005-a**).
- iii. La reproductibilité correspond à la concordance entre laboratoires (travaux de collaboration visant généralement la normalisation de la méthode), ou les mesures sont réalisées sur le même échantillon (Les lieux, opérateurs et équipements sont différents). Les mesures sont réalisées sur un intervalle de temps long. (**ICH 2005-a**). Elle exprime la variabilité *inter*-laboratoire

### 2.3.4 Linéarité

La linéarité est « *la capacité d'une méthode à donner des résultats directement proportionnels à la concentration de l'analyte dans l'échantillon* ». Elle est établie sur l'intervalle de mesure (**ICH 2005-a**). Le coefficient de corrélation doit être supérieur à 0,995 pour respecter le critère de la limite de linéarité.

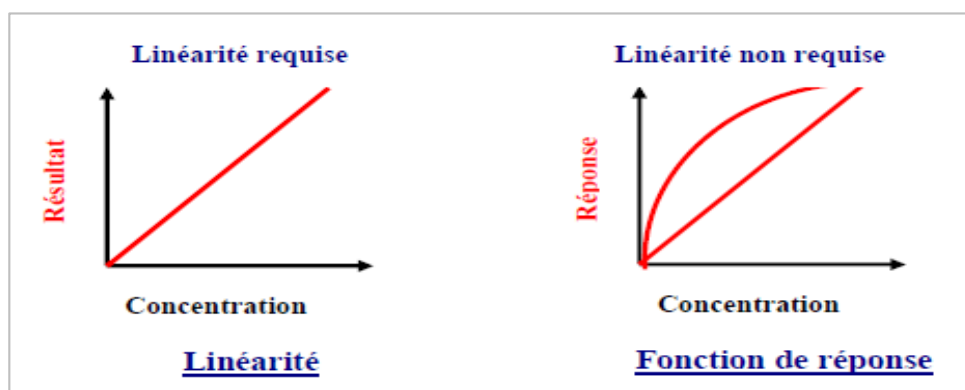


Figure 1. 4: Courbe de linéarité

### 2.3.5 Limite de détection

La limite de détection est « *la plus faible quantité de substance à analyser que la méthode peut détecter, sans fournir nécessairement la valeur exacte* » (ICH 2005-a).

### 2.3.6 Limite de quantification

La limite de dosage est « *la plus faible quantité de substance à analyser que la méthode peut doser avec un degré acceptable d'exactitude et de précision* » (ICH 2005-a).

### 2.3.7 Domaine d'utilisation ou intervalle de mesure

Le domaine d'utilisation ou d'intervalle de mesure est « *l'intervalle entre la concentration la plus faible et la concentration la plus élevée de la substance analysée dont on a démontré qu'elles pourraient être déterminées avec un degré acceptable d'exactitude, de précision et de linéarité* » (ICH 2005-a). Les intervalles de mesure minimum à considérer sont :

- 80 à 120% de la concentration théorique pour le dosage des solutions à analyser
- 70 à 130% de la concentration d'essai pour une uniformité de teneur
- jusqu'à 120% de la limite spécifiée pour le dosage des impuretés

### 2.3.8 Robustesse

La robustesse d'une méthode est sa « *capacité à supporter sans conséquence de petites variations apportées délibérément aux paramètres de la méthode* » (ICH 2005-a).

Elle donne une indication de la fiabilité de l'analyse dans les conditions normales d'utilisation (Chaloner-Larsson, *et al.* 1997).

Dans le cas où les conditions expérimentales ont une influence sur les résultats de l'analyse, cela devra être précisé afin qu'elles puissent être maîtrisées et que le test soit réalisé de façon appropriée (ICH 2005-a).

Quelques exemples de paramètres qu'il est possible de faire varier : température d'incubation, durée d'incubation, humidité relative...

## 2.4 Les règles de décision

Puisque les documents réglementaires relatifs à la validation des méthodes sont à caractères global, ils laissent une place à l'interprétation des analystes qui pourront alors choisir la règle de décision qui permettra de déclarer valide une méthode d'analyse.

Selon le processus de décision adopté, nous pouvons distinguer entre 3 approches statistiques conventionnelles, se caractérisant toutes par le fait qu'elles comparent séparément la justesse et la fidélité, c'est-à-dire respectivement les erreurs systématiques et les erreurs aléatoires de la méthode. Nous distinguons aussi une quatrième approche qui s'intéresse à la combinaison des erreurs systématique et aléatoire dans le concept d'erreur totale.

- L'approche descriptive : utilise seulement des estimations des paramètres statistiques : Biais et fidélité intermédiaire (**Dubois, et al. 2010**).
- L'approche de différence : est basée sur les tests d'hypothèses comme le test de *Student* (**Dubois, et al. 2010, Hassonville, et al. 2004, Staes, et al. 2010**).
- L'approche d'équivalence : diffère des précédentes par le fait qu'au lieu de vérifier si le biais relatif estimé ou le  $CV_{FI}$  estimé est inclus dans les limites d'acceptation, elle vérifie si la vraie valeur de ces paramètres est incluse dans leurs limites d'acceptation respectives, cela pour chaque niveau de concentration des standards de validation étudiés. Cela consiste à comparer des intervalles de confiance des paramètres étudiés aux limites d'acceptation (**Dubois, et al. 2010, Staes, et al. 2010, Marini, et al. 2010, Hubert, et al. 2010**).
- L'approche erreur totale ou profil d'exactitude : A côté de ces approches classiques, une approche originale, basée sur le profil d'exactitude en utilisant les intervalles de tolérance statistique et l'erreur totale de mesure comme outil de décision unique a été proposé (**Rozet, et al. 2007, Bimazubute, et al. 2008, Cavalier, et al. 2010**). Face à la disponibilité de ces différentes approches, il est du devoir de l'analyste de choisir l'approche la plus appropriée. Toutefois, cette dernière approche est une règle de décision, à la fois pratique et visuelle. Elle repose sur l'intégration du profil d'exactitude dans des limites d'acceptation ( $\pm\lambda$ ) (**Rozet, et al. 2007**), (**Bimazubute, et al. 2008**).



*Chapitre 2*

*Chromatographie liquide à haute  
performance*



Plusieurs techniques sont utilisées en industrie pharmaceutique afin de doser les différents composants d'un médicament. Dans de nombreux cas, on peut appliquer la même procédure pour le dosage de la nouvelle substance médicamenteuse et la quantification des impuretés raison pour laquelle nous avons opté pour la chromatographie liquide haute performance (HPLC).

## 1 Définition

La Chromatographie Liquide Haute Performance (CLHP ou HPLC) (**Burgot et Burgot 2011**), (**Rouessac , Rouessac et Cruché 2004**) est une technique instrumentale très utilisée dans les laboratoires d'analyse. Elle permet de séparer les composants d'un mélange non volatile, thermosensible, de polarités différentes afin de les identifier et les quantifier. C'est une technique d'analyse à la fois qualitative et quantitative, très utilisée en chimie analytique puisqu'elle permet une étude précise et complète d'une espèce chimique. Elle met en œuvre, selon la nature des interactions entre la phase stationnaire, la phase mobile et l'échantillon analysé, des phénomènes de partage, d'adsorption, d'échange d'ions ou d'exclusion.

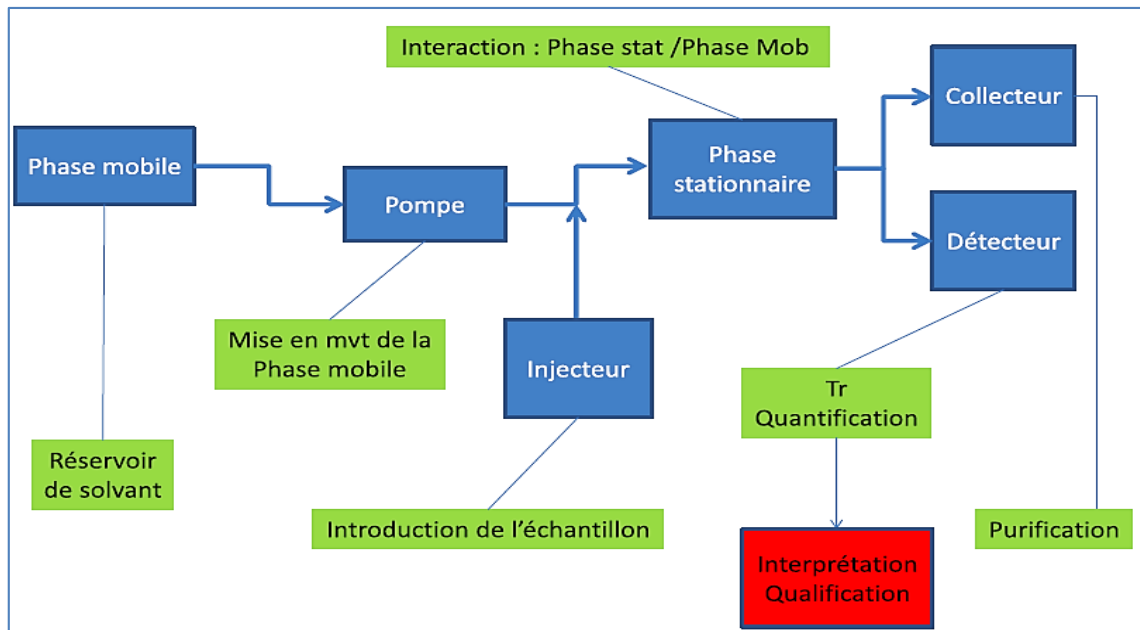
## 2 Principe

Il s'agit d'une méthode de migration différentielle des constituants d'un mélange, par entraînement au moyen d'une phase mobile et passage sur une phase stationnaire qui manifeste des affinités distinctes pour chacun des composés à séparer (**Jean-Louis 2019**).

Les composés chimique du mélange, ayant une affinité différente avec la silice, sont plus ou moins retenus: par ce phénomène appelé rétention les composés sont séparés et n'ont plus la même vitesse de traversée de la colonne. Un détecteur ainsi qu'un enregistreur détermine l'ordre et le temps de sortie de chaque espèce. Ainsi un chromatogramme est obtenu. Chaque pic correspond à la présence d'un composé, ayant préalablement effectué des chromatogrammes standards dans les mêmes conditions, il est possible de retrouver la nature chimique de chaque composé du mélange de départ grâce à son pic caractéristique.

L'aire du pic et donc son amplitude peuvent également permettre au calcul de la concentration de l'espèce chimique dans la solution injectée puisqu'elle est

proportionnelle à l'aire du pic.



**Figure 2. 1:** Schéma de principe d'une chaîne HPLC.

### 3 Paramètres chromatographiques

Le développement et l'optimisation d'une méthode d'analyse résulte d'un compromis entre différents paramètres chromatographiques (**Burgot et Burgot 2011**), dans le but d'obtenir une séparation optimale des constituants d'un mélange (pics gaussien : pics fins et symétriques, bien séparés, avec un temps d'analyse le plus court possible). Parmi les paramètres, il y a :

- le temps de rétention ( $t_R$ ),  $t_R$  brut : temps écoulé depuis l'injection du composé dans la colonne et le max du pic chromatographique (min ; sec ;  $10^{\text{ème}}$  de sec ;  $100^{\text{ème}}$  de sec.) ;  $t_0$  temps mort = temps que mettrait un composé non retenu pour arriver au détecteur ;  $t_R'$  temps de rétention corrigé ou réduit
- le facteur de rétention ou facteur de capacité ( $k'$ ) ;  $K' = (t_R(1) - t_0) / t_0 =$  temps de rétention réduit /  $t_0$ , il correspond au rapport molaire entre quantité de soluté dans la phase stationnaire et dans la phase mobile ; c'est aussi le temps passé par le soluté dans la phase stationnaire / temps dans phase mobile.

- le facteur de sélectivité ( $\alpha$ ), est le pouvoir de distinguer entre deux composés, il est toujours supérieur à 1. C'est une condition nécessaire et suffisante pour décrire une séparation. Elle est calculée à partir de la relation suivante:

$$\alpha = \frac{t_R(b) - t_0}{t_R(a) - t_0}$$

$t_0$  : le temps morte,  $t_R(a)$ : le temps de rétention de composé a, et  $t_R(b)$  : le temps de rétention de composé b

- la résolution ( $R_s$ ); est une mesure de la qualité d'une séparation de point de vue chevauchement de deux signaux consécutifs. Elle est exprimée à partir des temps de rétention. La résolution est calculée à partir de la

$$R_s = 2 \frac{(t_R(1) - t_R(2))}{(\omega_{1/2}(1) + \omega_{1/2}(2))}$$

- $R < 1$  : mauvaise résolution
  - $1 < R < 1,4$  : résolution acceptable
  - $1,4 < R < 1,6$  : résolution optimale
  - $R > 1,6$  : résolution trop bonne car le temps d'analyse est rallongé.
- et l'efficacité d'une colonne (largeurs des pics) ( $N_{th}$ ) : mesure de la dispersion du pic. L'efficacité d'une colonne analytique d'une chaîne HPLC peut s'exprimer par le nombre  $N_{th}$  de plateaux théoriques. Plus le nombre des plateaux théoriques sont élevés, plus la colonne est efficace.

$$N_{th} = 5.54 \times \left( \frac{t_R}{\omega_{1/2}} \right)^2$$

Avec  $t_R$  : temps de rétention et  $\omega_{1/2}$  : largeur du pic à mi-hauteur

#### 4 Facteurs influençant l'optimisation

En ce qui concerne l'optimisation en HPLC (**Douglas , James Holler et Tiothy 2003**), c'est la même technique qui est conservée mais les éléments qui seront modifiés par rapport à la méthode actuelle vont permettre d'obtenir :

- une réduction dans le temps global de l'analyse
- une réduction de la consommation de solvant
- et/ou une amélioration des paramètres chromatographiques (résolution, limite de quantification, facteur de symétrie)

#### 4.1 La colonne chromatographique

Au niveau des changements, on peut utiliser une nouvelle colonne chromatographique donc modifier la phase stationnaire pour :

- avoir plusieurs analyses en une (exemple : dosage du principe actif et de ses impuretés)
- diminuer le temps de l'analyse
- améliorer la sensibilité

En chromatographie de partage (correspondant au type majoritaire pour les méthodes de contrôle des médicaments), la phase stationnaire est souvent composée de particules de silice sur lesquelles des groupements organiques vont être greffés.

Ces groupements de nature et composition différentes seront choisis en fonction des propriétés compatibles avec les composés à séparer (**Douglas , James Holler et Tiothy 2003**). De plus, dans le cas de la chromatographie de partage, deux genres sont à distinguer :

- la chromatographie de partage à polarité de phases normale
- la chromatographie de partage à polarité de phases inversée (RP pour "*Reversed phase*")

En effet, la séparation dépend des différences de solubilité des solutés dans la phase mobile et des différentes interactions des solutés avec les groupements organiques greffés sur la phase stationnaire (**Douglas , James Holler et Tiothy 2003**).

A l'inverse de la chromatographie de partage à polarité de phases normale, la RP-HPLC met en jeu une phase stationnaire de type apolaire (généralement une structure greffée par des groupements apolaires de type alkyle) et une phase mobile polaire

(généralement un mélange eau/méthanol ou eau/acétonitrile) (**Douglas , James Holler et Tiothy 2003**).

L'importance des phénomènes de rétention dépend de la nature des solutés. En effet, un composé apolaire sera surtout en interaction avec les chaînes alkyles de la phase stationnaire, alors qu'un composé polaire interagira plutôt avec le solvant organique de la phase mobile (**Douglas , James Holler et Tiothy 2003**).

## 4.2 La phase mobile et le solvant de mise en solution

La phase mobile et la préparation de l'échantillon peuvent aussi être modifiées afin qu'elles soient compatibles pour plusieurs analyses ce qui permet un gain dans le temps de préparation et une diminution de la consommation de solvants (**Douglas , James Holler et Tiothy 2003**).

En phase inverse, la phase mobile est généralement un mélange eau (ou tampon) / solvant organique tel que l'acétonitrile, le méthanol, l'éthanol ...

L'acétonitrile est un solvant aprotique. C'est un éluant fort qui possède une faible viscosité ce qui permet d'avoir une faible pression dans la colonne. Il a également l'avantage d'avoir une faible absorbance en UV et une limite basse d'absorption (*cut-off*) de 190 nm. Ses deux principaux inconvénients sont son coût et sa toxicité.

Le méthanol est un solvant moins cher, mais de viscosité plus élevée, ce qui peut entraîner une augmentation de la pression dans la colonne. De plus, il peut réagir chimiquement avec les composés. Il est également toxique (**Douglas , James Holler et Tiothy 2003**).

Deux types d'élution sont possibles :

- le mode isocratique où la composition de la phase mobile reste fixe tout au long de l'analyse
- le gradient d'élution qui consiste à diminuer progressivement la polarité de la phase mobile, en augmentant la concentration en solvant organique et donc la force éluante de la phase mobile ; le gradient est souvent utilisé pour la séparation de solutés de polarité très différentes

Le pH de la phase mobile est aussi un facteur important à contrôler. En effet, celui-ci va modifier l'ionisation des composés ce qui a une forte influence sur la balance hydrophile / hydrophobe et donc sur la durée de l'analyse en phases inverses. Le pH influence également au niveau de la mise en solution sur la stabilité des produits car certains se dégradent en fonction du pH de la solution dans laquelle ils sont.

### 4.3 Les conditions d'élution

En plus de la phase stationnaire et de la phase mobile, d'autres facteurs ont un impact sur la rétention et la sélectivité : le débit, la température et la pente du gradient si celui-ci est utilisé.

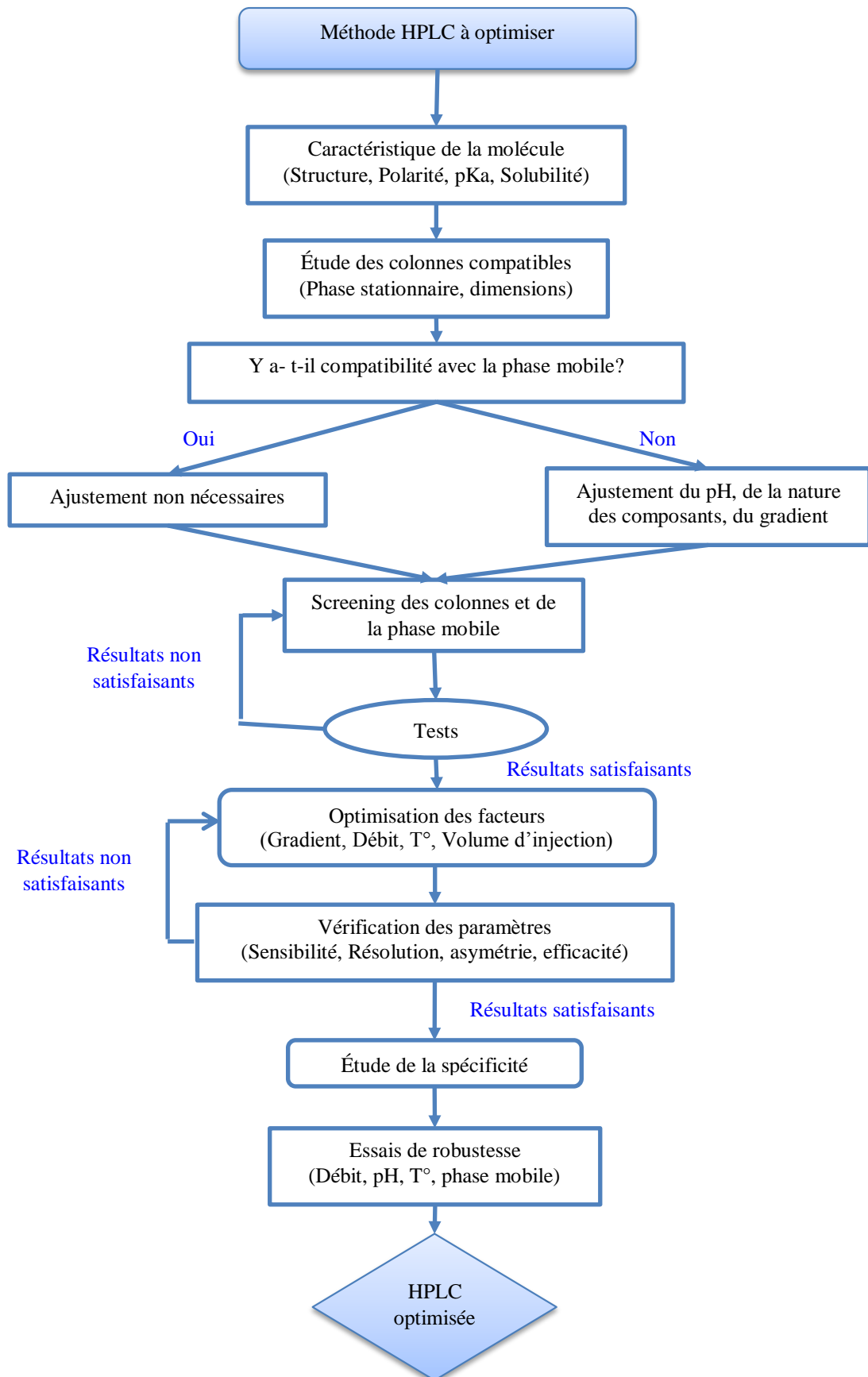
Le débit est un facteur lié à la pression. Il faut travailler à un débit de telle sorte que la pression appliquée soit tolérée par la colonne et l'appareillage utilisé. Selon la courbe de Van Deemter, l'efficacité de la colonne est directement liée au débit de la phase mobile. Afin de garantir un maximum d'efficacité, il est donc préférable de travailler à un débit correspondant au minimum de la courbe.

La température appliquée à la colonne lors de l'analyse permet aussi d'optimiser la séparation. Son augmentation peut diminuer la rétention des composés, faciliter leur séparation. Ceci est dû au fait que l'augmentation de la température va diminuer la viscosité de la phase mobile. Cependant une température trop élevée peut diminuer la durée de vie des colonnes et dégrader les composés qui sont thermosensibles. Il est donc nécessaire de contrôler ce paramètre.

La pente du gradient influence la rétention des composés. Une pente élevée va permettre d'éluer plus rapidement les composés mais en contrepartie va diminuer la résolution entre ces derniers. Selon la séparation voulue, il est donc possible de jouer sur ce paramètre.

## 5 Étapes de l'optimisation

Les étapes à suivre avec les différents facteurs à modifier pour l'optimisation d'une méthode par HPLC sont résumées dans le logigramme suivant (Figure II. 2) (Douglas , James Holler et Tiothy 2003).

**Figure 2. 2:** Logigramme optimisation de l'HPLC



*Deuxième partie : Etude  
Expérimentale*





## *Chapitre 3*

# *L'organisme d'accueil*



## 1 Présentation de l'organisme d'accueil « LDM Groupe »

LABORATOIRES DE DIAGNOSTIC MAGHREBINS "LDM" est une entreprise familiale de forme juridique: S.A.R.L à régime privé, fondée en 1997 par son directeur général : Mohamed EL AMMOUCHI avec ses frères Ahmed et Mouloud.

Le siège social de l'entreprise se trouve dans la Zone industrielle Oued Hamimime El Khroub 25100 Constantine ALGERIE. Son activité consiste à la production, l'exportation, et l'importation de produits pharmaceutiques à usage humains.



Figure 3. 1 : Site géographique de l'industrie pharmaceutique LDM (Google Map)

Dénomination	Logo de la société
LDM groupe	

Le groupe LDM assure la fabrication, le conditionnement et la commercialisation des produits LDM dont la décision d'enregistrement est obtenue :

- La fabrication, le conditionnement et la commercialisation des produits LDM;

- La fabrication, le conditionnement et la commercialisation par contrat de sous licence des produits GSK : Panadol 1G ; Extra et R&G auprès de GSK « Irlande »;
- La fabrication et le conditionnement par contrat de sous-traitance avec plusieurs laboratoires fabricants (PHARMETHIC, ABBOTT, SANOFI, SERVIER, TABOUK) de plusieurs spécialités pharmaceutiques;
- L'importation et distribution de produits pharmaceutiques et parapharmaceutiques;
- Promotion médicale;
- Formulation et développement.

### 1.1 Différents classes thérapeutiques fabriquées par LDM

LDM produit différents formes médicamenteuse tels que les gélules, comprimés, poudres pour suspension buvable « forme sèche » et les gels, crème et pommades «forme semi solide» qui appartiennent à des classes thérapeutiques différentes tel que, les Antipsychotiques, les Antihypertenseurs, les Anti-inflammatoires Non Stéroïdiens, les Antiagrégant plaquettaire, les Antispasmodiques, les Antifongiques, les Hypolipidémiants, les Antipyrétique, les Anti-angoreux et les Antiépileptique Antalgiques.

### 1.2 Différents compartiments de l'industrie pharmaceutique LDM.

La répartition des espaces au niveau du «LDM groupe» est comme suit :

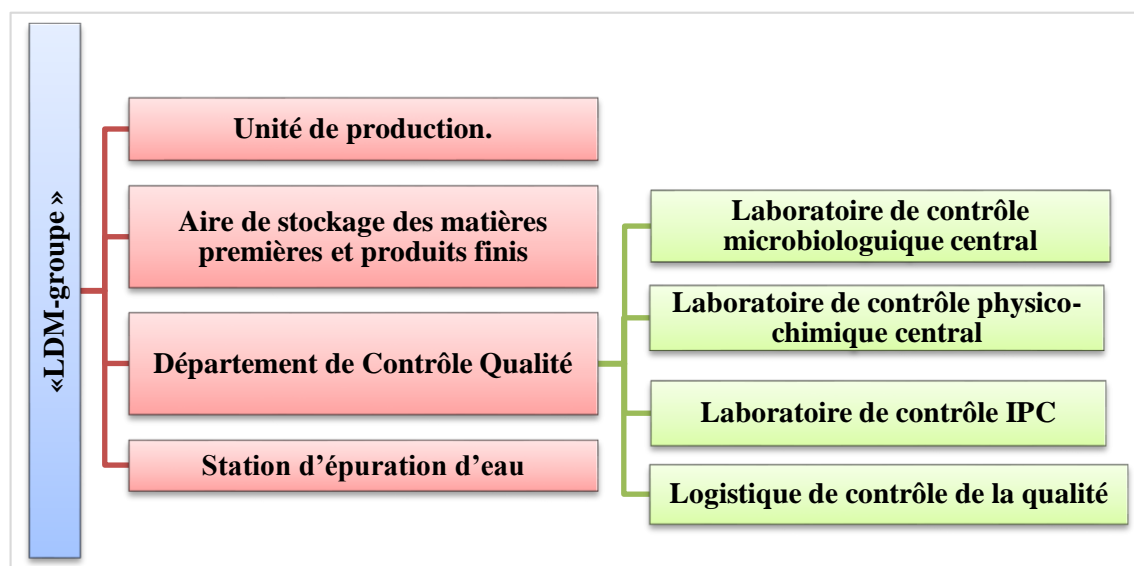


Figure 3. 2 : Organigramme de répartition des espaces du «LDM groupe»

A decorative border with a repeating floral and scrollwork pattern in blue, framing the central text.

## *Chapitre 4*

# *Matériel et Méthodes*

## 1 Matériel

Le présent travail entre dans le cadre d'une approche qui a pour objectif: la validation de méthode de dosage de PHLOROGLUCINOL LDM® 80 mg/ 160 mg par HPLC, l'étude a été réalisé au niveau du Laboratoire de contrôle qualité de l'unité LDM groupe –Z.I. Oued H'mimime – 25100 El Khroub – Constantine, laboratoire disposant de tous les outils essentiels pour la validation.

### 1.1 PHLOROGLUCINOL LDM® 80 mg/ 160 mg

#### 1.1.1 Produit fini (formule de médicament) (la spécialité LDM-groupe)

Le Phloroglucinol LDM® étudié est formulé avec des excipients décrits dans la Ph. Eur. en vigueur. Tous les excipients utilisés dans le produit ont été démontrés conformes à la Directive 2003/63/EC et à la note explicative « Réduction du risque de transmission des agents des encéphalopathies spongiformes animales par les médicaments à usage humain et vétérinaire (EMEA/410/01)» (afssaps 2007).

Le Phloroglucinol LDM® 80 mg / 160 mg est un médicament générique fabriqué par le laboratoire pharmaceutique LDM groupe sous forme de comprimé orodispersible à base de Phloroglucinol dihydraté (80 mg/comprimé et 160 mg/comprimé), est conditionnée sous plaquettes thermoformées (PVC/PVDC/Aluminium) et l'emballage extérieur : boîte de 10 comprimés.



**Figure 4. 1** : Emballage extérieur du Phloroglucinol LDM® 80 mg / 160 mg sous plaquettes thermoformées (PVC/PVDC/Aluminium): boîte de 10 comprimés.

#### 1.1.2 Composition

La Phloroglucinol LDM ® 80 mg / 160mg est un comprimé orodispersible se présente sous forme de comprimé orodispersible, contenant le principe actif Phloroglucinol dihydraté (équivalent à 62.25mg du phloroglucinol anhydre) et les autres

composants sont introduits comme excipients tel que : le Stéarate de magnésium, la Cellulose microcristalline, le Lactose monohydraté, la Povidone K90, la Crospovidone et l'Aspartam (E951).

### 1.1.2.1 Principe actif

Le phloroglucinol également appelé benzène-1, 3,5-triol, figure 4. 2, est la matière première utilisée dans la synthèse de produits pharmaceutiques et d'explosifs. C'est un dérivé du phénol. Phloroglucinol a des propriétés antispasmodiques. Ainsi, il peut être utilisé comme réactif de laboratoire. Cet isomère du benzène-triol est particulièrement utilisé par l'industrie pharmaceutique pour ses propriétés antispasmodiques. Il est connu sous le nom de Spasfon®, c'est un antispasmodique entrant dans la composition de médicaments génériques du même nom (VIDAL 2019).

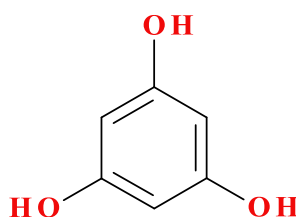


Figure 4. 2 : Structure chimique de phloroglucinol

#### 1.1.2.1.1 Propriétés

Le phloroglucinol est un composé organique isolé à partir de l'écorce de certains arbres fruitiers. Cet antispasmodique musculotrope de la famille des triphénols agit en levant les spasmes des fibres musculaires, calmant ainsi la douleur. Sous la forme d'éther de phloroglucinol, de phloroglucinol hydraté ou de phloroglucinol dihydraté, le phloroglucinol entre dans la composition de nombreux médicaments.

Le phloroglucinol se comporte comme un triphénol ( $K_{a1} = 3,56 \cdot 10^{-9}$ ,  $K_{a2} = 1,32 \cdot 10^{-9}$ ) comme dans la réaction qui méthyle les trois groupes hydroxyle pour former le 1, 3, 5-triméthoxybenzène (Helmut , *et al.* 2005).

Le phloroglucinol anhydre de formule brute  $C_6H_6O_3$  est sous forme d'une poudre cristalline blanche à beige clair de  $T^\circ$  fusion = 218,5 °C, et de masse molaire 126,11 g/mol. Il est assez soluble dans l'eau, sa solubilité est de 110,6 g·l<sup>-1</sup> à 20 °C. Il est soluble aussi dans l'acétone, l'éthanol, l'éther et la pyridine (Helmut , *et al.* 2005).

Dans l'eau, le phloroglucinol cristallise sous forme d'un dihydrate ( $C_6H_6O_3 \cdot 2H_2O$ ) qui a une masse molaire de 162 g/mol, un point de fusion de 116–117 °C (pKa (20°C) : 8,0 ; 9,2 et 14). Il se décompose à sa température d'ébullition mais il est possible de le sublimer (**Helmut , et al. 2005**).

Le Phloroglucinol est commercialisé sous l'appellation *Spasfon* en France sous diverses formes galéniques : comprimés, lyophilisat (*Spasfon Lyoc*), suppositoires, soluté injectable. Ces différentes spécialités ne contiennent pas les mêmes principes actifs dans les mêmes proportions. Le phloroglucinol y est associé avec son dérivé tri-méthylé, insoluble dans l'eau, le 1,3, 5 triméthoxybenzène. Ce dérivé triméthoxylé, probablement actif, est absent du lyophilisat et en quantité "imperceptible" dans l'injectable (**afssaps 2007**).

#### 1.1.2.1.2 Utilisation

Le phloroglucinol est utilisé dans les médicaments visant à soulager les spasmes douloureux (les contractions anormales et douloureuses de l'intestin), des voies biliaires (coliques hépatiques), de la vessie et de l'utérus.

Il peut également aider à traiter les patients souffrant de coliques néphrétiques ou hépatiques, mais aussi être utilisé en traitement adjuvant gynécologique (règles douloureuses et contractions de l'utérus pendant la grossesse) (**afssaps 2007**), (**ANSM 2018**).

#### 1.1.2.2 Présentation des excipients

##### 1.1.2.2.1 Stéarate de magnésium

Sa formule chimique est  $C_{36}H_{70}MgO_4$ , C'est un mélange en proportions variées de stéarate de magnésium, de palmitate et d'oléate. Il se présente sous forme de poudre fine, blanche, visqueuse, avec une légère odeur et le goût d'acide stéarique. Pratiquement insoluble dans l'eau, l'éthanol et l'éther.

Son poids moléculaire pour une poudre pure est de 591.27 g/mol. Il est utilisé comme lubrifiant de compression dans les formes orales (capsule et comprimé). Il est également utilisé en cosmétologie et dans l'alimentation (**Rowe, Sheskey et Weller 2003**).

#### 1.1.2.2.2 Cellulose microcristalline

La cellulose microcristalline se présente sous la forme d'une poudre blanche ou sensiblement blanche, fine ou granuleuse, inodore, sans saveur. Sa formule brute est (C<sub>6</sub>H<sub>10</sub>O<sub>5</sub>). La cellulose microcristalline est souvent utilisé comme agent liant en granulation humide, elle présente une perte à dessiccation faible (moins de 1,5%), ce qui facilite la stabilité du principe actif (**Parikh 1997**).

#### 1.1.2.2.3 Lactose monohydraté

Le lactose monohydraté est un excipient, de formule chimique C<sub>12</sub>H<sub>22</sub>O<sub>11</sub> H<sub>2</sub>O, largement utilisé comme diluant et agent de remplissage. Il se présente sous forme de poudre ou de cristaux blancs, inodores avec un goût légèrement sucré. C'est un disaccharide de glucose et galactose, présent naturellement dans le lait à des proportions de 5%. Le lactose utilisé pour la compression, il se présenter sous la forme  $\alpha$ -lactose monohydrate qui est un monocristal non hygroscopique et stable à l'air, et se présente aussi sous la forme d'agrégats sphériques avec un poids moléculaire de 360,31 g/mol (**Rowe, Sheskey et Weller 2003**).

#### 1.1.2.2.4 Polyvinylpyrrolidone soluble (Povidone K90)

La PVP est un excipient utilisé largement pour la préparation de formes solides. Sa principale fonction est d'être un liant dans la granulation humide. Il est aussi utile pour la préparation de tablettes effervescentes ou en compression directe. Beaucoup d'autres utilisations incluant des applications non parentérales ont été décrites au cours de la longue histoire de ce polymère (**HARKE GROUP 2016**).

C'est une poudre hygroscopique blanche ou jaune pâle. Elle remplit toutes les exigences des principales pharmacopées (USP, EP) et des produits nutraceutiques. Elle résulte de la polymérisation de la vinylpyrrolidone. Différentes longueurs de chaîne produisent différentes viscosités. Traditionnellement le degré de polymérisation est caractérisé par la valeur K qui est essentiellement fonction de la viscosité en solution aqueuse.

La povidone est un excipient disponible dans plusieurs tailles moléculaires différentes, de K-12 [bas poids moléculaire (PM), en moyenne PM ~ 2 000] à K-90 (PM élevé, en moyenne PM 1 100 000). Elle est principalement utilisée dans les solutions



orales (K-90) comme agent épaississant ou comme agent liant (par ex. K-25, K-30) dans les comprimés.

#### 1.1.2.2.5 Polyvinylpyrrolidone insoluble (Crospovidone)

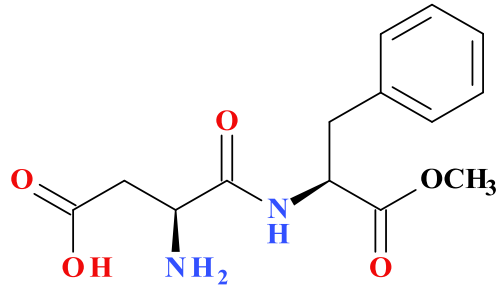
La Crospovidone, aussi appelée polyvinylpolypyrrolidone (sigle PVPP) ou polyvinylpyrrolidone insoluble, se présente sous forme d'une poudre blanche totalement insoluble dans l'eau.

La Crospovidone présente une forte affinité pour les polyphénols. Cette propriété est utilisée pour le collage des boissons, car elle élimine en particulier les tanins, les acides cinnamiques oxydables ou les quinones issues de leur oxydation, ce qui permet de traiter les phénomènes de brunissement, de rosissement, les excès de coloration ou d'amertume.

La Crospovidone est utilisée dans l'industrie pharmaceutique comme pansement gastro-intestinal. Elle a une action protectrice sur la muqueuse intestinale grâce à son pouvoir couvrant et par la fixation des toxines microbiennes, elle absorbe les gaz intestinaux et réduit ainsi le météorisme, elle agit enfin par son pouvoir hygroscopique (rétention d'eau) et gonflant. Elle est aussi utilisée comme agent désintégrant dans les formulations de comprimés et comme stabilisant pour les substances actives sensibles à l'humidité (par exemple vitamines, enzymes).

#### 1.1.2.2.6 Aspartam

L'aspartame (figure 4.3) est un dipeptide, dérivant de deux acides aminés, l'acide L-aspartique et l'ester méthylique de la L-phénylalanine. Son nom chimique est donc L-Aspartyl-L-phénylalanate de méthyle. Il possède une base aminée et un groupement acide lui conférant deux constantes d'acidité, 3,1 et 7,9 à (25 °C). L'aspartame de formule brute  $C_{14}H_{18}N_2O_5$  est un solide cristallin blanc, inodore et légèrement hygroscopique. Il est faiblement soluble dans l'eau (10 g/l eau à 20 °C) et l'éthanol (Rowe, Sheskey et Weller 2003). Il se solubilise plus vite dans les solutions acides.



**Figure 4. 3** : Structure chimique de l'Aspartam

L'aspartame (E951) est un édulcorant qui possède un pouvoir sucrant 150 fois plus élevé que celui du sucre. Il est parfois utilisé comme excipient (composant sans activité thérapeutique) dans des médicaments. Il est déconseillé aux jeunes enfants et peut être mal supporté par certaines personnes. Il n'est pas toléré par les personnes souffrant de phénylcétonurie, une maladie génétique.

### 1.1.3 Mode d'action de la Phloroglucinol LDM® 80 mg/160 mg

PHLOROGLUCINOL LDM® 80 mg/160 mg, contient de : l'aspartam (E951) qui contient une source de phénylalanine. Peut être dangereux pour les personnes atteintes de phénylcétonurie (PCU), une maladie génétique rare caractérisée par l'accumulation de phénylalanine ne pouvant être éliminée correctement ; et du lactose : si le médecin vous a informé(e) d'une intolérance à certains sucres.

## 1.2 Propriétés pharmacologiques

### 1.2.1 Propriétés pharmacodynamiques

Comme ce produit fini est un médicament générique appartenant à la classe pharmacothérapeutique des antispasmodique musculotrope, alors son Mécanisme d'action consiste à avoir une activité spasmolytique sur les muscles lisses et un effet anti-nociceptif viscéral, en particulier au décours d'épisodes de douleur aiguë.

### 1.2.2 Propriétés pharmacocinétiques

- Absorption : Après administration orale, le pic plasmatique est atteint entre 15 et 20 minutes (afssaps 2007).

- Distribution : La distribution tissulaire du phloroglucinol est rapide et importante (**afssaps 2007**).
- Biotransformation : Le phloroglucinol est métabolisé au niveau du foie par glucuroconjugaison (**afssaps 2007**).
- Elimination : L'élimination s'effectue par voie urinaire sous forme glucuroconjugée et par voie biliaire sous forme libre et conjugée. La demi-vie d'élimination est de l'ordre de 1h 40 (**afssaps 2007**).

Alors, dans cette étude, et dans le cadre défini par le laboratoire d'accueil LDM-groupe pour la validation du dosage de phloroglucinol dihydraté par HPLC, ont se basons sur les conditions décrites par le référentiel ICH (Conférence Internationale d'Harmonisation), nous nous sommes limités à l'estimation des paramètres suivants : spécificité / sélectivité, linéarité, exactitude, et fidélité. Les données présentées sont suffisantes pour confirmer la validité de cette méthode.

## 2 Plans d'expérience

- Pour cette validation, le nombre de séries de validation a été fixé à 3, en considérant qu'une série est équivalente à un jour.
- Pour le plan d'expérience de validation, le nombre de répétitions a été fixé à 3 et le nombre de niveaux de concentration est de 5 fois : 80%, 90%, 100%, 110% et 120% de la teneur en PA de la spécialité pharmaceutique utilisée pour effectuer la validation.

### 2.1 Produits chimiques et réactifs

Le Phloroglucinol dihydrate fourni auprès d'EQDM, et est déclaré à une pureté supérieure à 99 %. Les solvants utilisés sont tous de qualité HPLC : L'Acétonitrile grade HPLC (VWR chemicals), le dihydrogénophosphate de potassium «  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  » (SIGMA-ALDRICH), l'acide phosphorique (85 %) (VWR chemicals), Résorcinol extra pure «  $\text{C}_6\text{H}_6\text{O}_2$  » à 99.85% (Loba Chimie), Phloroglucide hydrate 95% (ACROS ORGANICS), Pyrogallol «  $\text{C}_6\text{H}_6\text{O}_3$  » à 99.69 % (Biochem Chemopharma), l'eau purifiée (LDM-groupe).

Toute la verrerie utilisée est en borosilicates de classe A, et tous les équipements sont qualifiés.

## 2.2 Instrumentation et conditions chromatographiques

Le dosage est effectué par chromatographie liquide, proposé par la monographie **Ph. Eur. 2.2.29**.

### 2.2.1 Appareillage

Le dosage du marqueur dans le produit fini est réalisé à l'aide d'une chaîne HPLC de marque WATERS, de type Alliance e2695 équipé d'un injecteur automatique d'une boucle d'injection de 20 µL, d'un four à colonne avec fonction *heater/cooler* (4°C à 65°C), d'une pompe d'injection (système chromatographique). L'analyse quantitative du marqueur est effectuée par un détecteur UV/Vis monochromatique provenant de la maison de WATERS France, de longueurs d'onde 265 nm, couplé au système chromatographique.

### 2.2.2 Optimisation de la méthode

L'objectif principal de cette étude est de valider une méthode de dosage simultané de Phloroglucinol par HPLC sous sa forme pharmaceutique comprimé conformément aux recommandations internationales de la conférence harmonisée (ICH).

Il est pour nous très utile d'optimiser cette méthode de dosage avant de la voir valider. Pour mettre au point, nous avons effectués une recherche bibliographique sur le dosage du phloroglucinol, nous avons adoptés les paramètres suivants :

#### 2.2.2.1 Choix de la phase stationnaire

Pour une bonne résolution et un gain en temps et réactifs nous avons choisi une colonne MACHEREY-NAGEL C18 pyramid, 250 mm de longueur et 4 mm de diamètre interne avec une granulométrie de 5 µm :

#### 2.2.2.2 Choix de la phase mobile

La phase mobile choisie est un mélange isocratique de deux solvant souvent utilisé dans ce genre d'analyse : l'acétonitrile - tampon phosphate (pH = 3 ; 10 mM).

Le choix de la phase mobile a été testé sur quatre gammes de compositions (volume à volume) : (90 : 10); (85 : 15); (88 : 12) et (92 : 8).

### **2.2.2.3 Choix du débit**

Plusieurs études ont été réalisées sur le débit de la méthode de 1ml/min à 2ml/min, pour réduire au maximum le temps de rétention (moins de rejet et plus d'économie) tout en gardant une bonne résolution, nous avons choisi un débit de 1ml/min.

### **2.2.2.4 Choix de la température**

L'étude de la température de la colonne a été testée sur trois gammes de températures 20°C, 25°C et 30°C on a constaté qu'il n'a pas de différence entre ces trois températures.

Pour rendre la méthode plus simple nous avons choisi 25°C (température ambiante).

### **2.2.2.5 Choix du volume d'injection**

Pour une concentration de 0.24 mg/ml de Phloroglucinol, Le volume d'injection choisi est de 20 µl et ce dans le but d'obtenir une bonne intégration des pics et avec moins d'erreurs.

### **2.2.2.6 Choix de la longueur d'onde**

Nous avons choisi 265 nm comme valeur de la longueur d'onde de la méthode qui peut être utilisée pour le dosage de Phloroglucinol car elle correspond aussi à la valeur du maximum d'absorption de ce principe actif.

### **2.2.2.7 Choix du solvant de dilution**

Comme le Phloroglucinol est assez solubles dans l'eau et pour rendre la méthode plus simple et plus économique nous avons adopté eau comme solvant de dilution.

### 3 Méthode de dosage

Toutes les analyses ont été effectuées à une température ambiante de 25°C dans des conditions isocratiques dont la phase mobile est constituée d'acétonitrile - tampon phosphate (pH = 3 ; 10 mM) (92:8 ; v/v).

La séparation chromatographique est réalisée en utilisant une colonne de type MACHEREY-NAGEL C18 pyramid (250 mm × 4 mm de diamètre interne, taille des particules de 5 µm) et le volume d'injection est de 20 µl. La détection s'effectue à la longueur d'onde fixe de 265 nm, correspondant à un maximum d'absorption du marqueur PA), et l'élution se fait à un débit de 1.0 ml/min.

Le pH de la solution tampon a été mesuré avec un pH-mètre (JENWAY 3510) avec sonde de température et 03 points d'étalonnage. Nous utilisons des solutions étalons de chez VWR chemicals (pH 4 ; 7 ; 9 et 10).

#### 3.1 Préparation des solutions

##### 3.1.1 Préparation de la solution tampon phosphate de pH 3

La solution tampon (10 mM) de pH = 3 est préparée par dissolution de 136,0 mg du dihydrogénophosphate de potassium  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  dans 900 mL d'eau purifiée. Le pH a été ajusté à 3 avec l'acide phosphorique ( $\text{H}_3\text{PO}_4$ ), puis avec le même solvant nous complétons le volume à 1 litre.

##### 3.1.2 Préparation de diluant (le blanc)

Le blanc est préparé à titre de 1L, en mélangeant 100 mL de l'acétonitrile dans 900 mL d'eau purifiée.

Le diluant est préparé dans une erlenmeyer de 5L, en mélangeant 500 mL de l'acétonitrile dans 4500 mL d'eau purifiée sous agitation magnétique afin d'avoir une solution homogène. Avant l'injection, la solution est traitée à l'ultrason pendant 15 minutes, afin de la dégazée.

##### 3.1.3 Préparation de la phase mobile

La phase mobile constituée d'un mélange binaire de deux phases :

- une organique constituée de 80 mL de l'acétonitrile

- et l'autre aqueuse constituée de 920 mL de la solution tampon phosphate  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  (10 mM) de pH 3.

### 3.1.4 Solution standard et forme pharmaceutique reconstituée

#### 3.1.4.1 Calcule des concentrations

Pour en se faire, on a deux méthodes pour calculer les concentrations (PA)

##### ❖ Première méthode (règle de trois)

Pour en trouver les concentrations correspondantes à chaque concentration effectuée, on se réfère à la règle de trois, on fait comme suit :

Si la concentration 100% vaut 0.24 mg du PA, Alors c'elle de 80% par exemple vaut X mg du PA, donc la valeur de cette concentration en mg/mL et de 0.192 ( $X = 0.192$  mg/mL) ; de même on obtient les autres valeurs correspondantes aux % voulus (**Tab. 4. 1**).

**Tableau 4. 1** : Calcule des concentrations du PA par la 1<sup>er</sup> méthode (règle de trois)

Concentration effectué en %	Concentration en mg/mL
<b>80</b>	0.192
<b>90</b>	0.216
<b>100</b>	0.240
<b>110</b>	0.264
<b>120</b>	0.288

Les prises d'essais : pour en trouver les masses à peser correspondante à chaque concentration effectuée, on se réfère à la règle de trois, notre démarche va être comme suit :

Si 60 mg du PA correspond à la concentration de 0.24 mg/ml en PA, alors une masse Y (mg) va être équivalente à la concentration de 0.192 mg/mL en PA ; et donc : Y vaut 48 mg.

De même, on peut calculer les masses correspondantes aux autres %, et les résultats sont présentés dans le **tableau 4. 2** qui suit :

**Tableau 4. 2 :** Calcule des masses de prise d'essai du PA par la 1<sup>er</sup> méthode (règle de trois)

Concentration effectuée en %	Masse correspondante en mg
<b>80</b>	48
<b>90</b>	54
<b>100</b>	60
<b>110</b>	66
<b>120</b>	72

❖ **Deuxième méthode (la règle de 20% plus ou moins ±)**

**Exemple (calculer les masses) :**

Si : 60 mg → 100 %

L'intervalle de mesure est : (80%,90%,100%,110%,120%)

**Exemple :**

La concentration du standard :

60 mg → 250 ml

60mg/250ml = 0.24 mg/ml

La masse de la (FR) dans 80 % :

$$\begin{cases} 60 \rightarrow 100\% \\ X \rightarrow 20\% \end{cases} \Leftrightarrow X = 20 \times 60 \div 100 = 12$$

$$60 - 12 = 48\text{mg}$$

Calculer la concentration dans 80% : 48mg/250ml=0.192mg/ml

### 3.1.5 Préparation de solution standard (PA)

On prépare dans des fioles jaugées de 250 mL, trois séries (n=3) de cinq concentrations (k=5) allant de 80 % à 120 % sur le principe actif seul.

Les solutions standards du PA sont préparées par dissolution des prises d'essai selon la concentration effectuée (**Tab. 4. 3**) de produit dans les quantités convenables de diluant, et sont introduites dans l'ultrason pendant 15 min afin de les homogénéiser.



Ensuite, et à l'aide d'une seringue, nous complétons le volume à préparer jusqu'à le trait de jauge des fioles, puis à l'aide d'un filtre seringue, nous remplissons les vials et les mettrons dans la carroucel qui seront introduit dans l'instrument HPLC.

**Tableau 4.3 : Prise d'essais du phloroglucinol (PA)**

Echantillonnage	
Concentrations (%)	Pesée du phloroglucinol (mg)
<b>80</b>	48.3
	49.4
	48.2
<b>90</b>	54.0
	54.4
	54.2
<b>100</b>	60.3
	60.5
	60.6
<b>110</b>	66.6
	66.9
	66.3
<b>120</b>	72.1
	72.8
	72.9

### 3.1.6 Préparation de la forme pharmaceutique reconstituée (PA+PB)

La forme pharmaceutique reconstituée a été préparée selon la même méthodologie d'expérience des standards.

La série sera effectuée par la préparation des échantillons reconstitués du placebo (PB) et de PA dans une gamme de concentrations égale à 80 - 120% de la teneur théorique de P.A. pour chaque concentration, nous préparons trois essais qui seront réalisés selon le tableau suivant :

**Tableau 4. 4:** Prise d'essais de la forme pharmaceutique reconstituée (PA+PB)

Echantillonnage Forme reconstitué	
Concentration %	Masse introduites
80	47.4
	47.0
	47.9
90	54.1
	54.3
	54.0
100	60.0
	59.8
	59.6
110	66.0
	66.1
	65.8
120	72.3
	72.9
	72.2

### 3.1.7 Préparation du placebo

Le placebo (ou matrice) constitue une forme pharmaceutique reconstituée qui comprend tous les composants présents dans la forme pharmaceutique à l'exception des substances à analyser.

Le placebo est préparé par le mélange des excipients : Lactose monohydrate, Cellulose microcristalline, Crospovidone, Povidone K-90, stéarate de magnésium, Aspartame dans 100 mL d'eau purifiée.

### 3.1.8 Préparation de l'échantillon

Un lot de 10 comprimés de Phloroglucinol LDM<sup>®</sup> de 80/160 représente notre échantillon.

Un équivalent de 60 mg de Phloroglucinol LDM<sup>®</sup> de 80/160 mg est pesé et placé dans une fiole de 250 mL, puis un volume de diluant est ajouté. Avant l'injection, la solution est traitée à l'ultrason pendant 20 minutes, puis filtrée sur un filtre seringue de 0,45 µm.

### 3.1.8.1 Préparation des échantillons

❖ La prise d'essais: On va démontrer les prises d'essais du principe actif, placebo et les différents impuretés :

**Tableau 4. 5 : Prise d'essais des échantillons**

échantillon	Pesée (mg)
<b>Principe actif (PA)</b>	10.1
<b>Impureté A</b>	6.2
<b>Impureté B</b>	5.9
<b>Impureté D</b>	6.00
<b>PA</b>	60.1
<b>Placebo (PB)</b>	159.3
<b>Forme reconstitué</b>	60.4 (PA) + 161.4 (PB)

Pour le PA la valeur de 60 mg est imposée selon le protocole décrit par la Ph. Eur. ; Par contre celle de placebo (PB) qui vaut 159 mg est calculée comme suit :

Si la Masse moyenne est de 292 mg, et la masse du comprimé est de 80 mg, donc on peut calculer la masse d'excipient comme montré par la suite :

$$292 - 80 = 212 \text{ mg (excipient)}$$

$$\begin{cases} 80 \rightarrow 212 \\ 60 \rightarrow Z \end{cases} \Rightarrow Z = (212 \times 60) / 80 = 159 \text{ mg (Matrice pure)}$$

Les solutions d'échantillons sont préparées par dissolution des prises d'essai selon la concentration effectuée (**Tab. 4. 6**) de produit dans les quantités convenables de diluant en agitant soigneusement.

Les solutions préparées ainsi sont traitées à l'ultrason pendant 15 minutes afin de les homogénéiser.

Ensuite, et à l'aide d'une seringue, nous complétons le volume à préparer jusqu'à le trait de jauge des fioles, puis à l'aide d'un filtre seringue qui permet l'élimination des

microparticules, nous remplissons les vials et les mettons dans le carrousel qui sera introduit dans l'instrument HPLC pour commencer la séparation.

### 3.2 Validation de la méthode

La validation est fondée sur une analyse physico-chimique ou la mise en pratique de la méthode à valider; basée sur un certain nombre de critères tels que la spécificité / sélectivité, la linéarité, la fidélité, l'exactitude, selon les directives du guideline Q2(R1) de l'Internationale Conférence sur l'Harmonisation (ICH) (**ICH 2005-b, ICH 1996**), aboutissant à des méthodes analytiques permettant de donner des résultats fiables.

Le présent document présente aussi une démarche statistique de confirmation et de conformité des résultats obtenus par la méthode, selon le guide SFSTP permettant de minimiser les essais effectués et minimiser les deux risques: le risque d'accepter une procédure qui ne serait pas suffisamment exacte ou, au contraire, le risque de rejeter une procédure qui serait capable (**Bouklouze et Digua 2006**).

Donc deux étapes sont communément admises et appliquées dans l'industrie pharmaceutique nationale (ICH et SFSTP) permet de valider la méthode étudiée.

#### 3.2.1 Spécificité (ou sélectivité)

##### ● Objectif

La spécificité (ou sélectivité) d'une méthode d'analyse consiste à montrer que le pic mesuré ne provient que du composé à analyser, sans aucune interférence avec sa matrice (excipients, produits de dégradation, impuretés,...).

##### ● Mode opératoire

Avant la réalisation des standards de validation il nous a tout d'abord semblé indispensable de vérifier l'absence de toute interférence au niveau du temps de rétention du Phloroglucinol dihydraté ainsi qu'au niveau de ceux des autres impuretés séparées par la méthode de CLHP développée dans ce travail.

Pour cela, la sélectivité de la méthode a été vérifiée en injectant séparément le blanc, le placebo (PB), le standard (STD) et la forme pharmaceutique reconstituée (FR et FR-chargée) ainsi que la solution SST, puis en comparant les chromatogrammes typiques

obtenus en analysant d'une part, une solution d'un blanc et du placebo, et d'autre part, les solutions STD, SST, FR et FR-chargée.

### ● Critères d'acceptation

La méthode d'analyse est considérée spécifique et sélective si :

- Le témoin de PA et l'essai présentent le même profil du chromatogramme,
- le placebo ne présente aucun pic dans le temps de rétention de PA+  
Absence d'interférences entre le PA et les substances apparentées (Identification des pics (par comparaison du temps de rétention)),
- Absence d'interférences entre le PA et les substances apparentées.

Le test de la spécificité (ou sélectivité) se base sur la préparation de : diluant (blanc), placebo (médicament sans principe actif), la solution standard (principe actif seul), les solutions des impuretés, la solution de la forme pharmaceutique reconstitué (principe active +placebo), la solution SST (PA + impuretés A, B, D), et de la solution de la forme reconstituée chargés (PA + placebo + impuretés A, B, D).

### 3.2.2 Linéarité

#### ● Objectif

Le but de ce critère est d'apporter la preuve que les résultats obtenus dans l'intervalle de mesure considéré sont directement proportionnels à la concentration (quantité) et de définir si cette méthode est linéaire sur des domaines de dosage prédéfini selon ICH et confirmé par les tests statistiques adéquat selon le protocole SFSTP.

#### ● Opération

L'étude de ce caractère doit être réalisée :

- sur le standard (PA seul) = gamme standard
- sur la forme pharmaceutique reconstituée (PA+PB) = gamme spécialité.

En ce qui concerne le protocole d'étude de la linéarité, on se réfère sur ICH qui demande au minimum de travailler sur Cinq concentrations réparties sur l'intervalle d'étude (80% à 120%) seront préparées on effectue trois séries de mesures cinq concentrations ( $192 \mu\text{g mL}^{-1}$ ,  $216 \mu\text{g mL}^{-1}$ ,  $240 \mu\text{g mL}^{-1}$ ,  $264 \mu\text{g mL}^{-1}$ , et  $288 \mu\text{g mL}^{-1}$ ) pendant trois jours consécutifs.

Chaque solution est injectée 3 fois avec un volume de  $20 \mu\text{L}$ . La linéarité se détermine donc sur au moins 15 résultats couvrant tout le domaine.

**N.B :** Avant l'injection des solutions, la colonne était équilibrée pendant au moins 20 min avec la phase mobile. Les aires des pics des substances ont été tracées en fonction des concentrations du Phloroglucinol dihydraté.

Les résultats doivent être évalués au moyen de la méthode des moindres carrés pour calculer les paramètres de régression (équations d'étalonnage et coefficients de détermination).

#### ● **Traitement des données :**

A partir des valeurs expérimentales, on trace les droites de régression pour l'étalon et la forme reconstituée et on cherche :

- les paramètres de régression : droite  $Y=a X + b$  / pente  $a$  / ordonnée à l'origine  $b$  / coefficient détermination  $R^2$ .
- le test de validité des droites

#### ● **Critères d'acceptation :**

On doit s'assurer que la réponse obtenue est due à une régression linéaire. Pour cela, des tests statistiques sont à réaliser sur les résultats expérimentaux obtenus :

- par les tests statistiques de validation de la régression linéaire doivent être concluants au risque 5%.
- Le calcul du coefficient de corrélation  $R^2$  qui doit être  $\geq 0.999$ : existence d'une pente / ordonnée passe par l'origine

- Test de comparaison de l'ordonnée à l'origine (b) avec zéro (test de *Student*) (NS) :  $t_{\text{calculé}} < t(\alpha, N-2)$  ;  $\alpha$ : risque considéré (5%), N : nombre de valeurs
- Test d'homogénéité des variances (test de *Cochran*) (NS) :  $C_{\text{calculé}} < C(\alpha, k, N-1)$ ,  $\alpha$  : risque considéré (5%), k : nombre de groupes, n : nombre de valeurs par groupe
- Test d'existence d'une pente significative (test de *Fisher*) (S) :  $F_{\text{calculé}} > F(\alpha, 1, N-2)$ ,  $\alpha$  : risque considéré (5%), N : nombre de valeurs
- Test de validité de l'ajustement (test de *Fisher*) (NS) :  $F_{\text{calculé}} < F(\alpha, k, N-k)$   $\alpha$  : risque considéré (5%), k : nombre de groupes, N : nombre de valeurs
- Comparaison des ordonnées à l'origine (b) principe actif seul (PA) et forme pharmaceutique reconstituée (FPR) (test de *Student*) :  $t_{\text{calculé}} < t(\alpha, N_1+N_2-4)$   $\alpha$  : risque considéré (5%),  $N_1$  : nombre de valeurs PA,  $N_2$  : nombre de valeurs FR.
- Comparaison des pentes (a) des droites du principe actif seul (PA) et de la forme pharmaceutique reconstituée (FPR) (test de *Student*) :  $t_{\text{calculé}} < t(\alpha, N_1+N_2-4)$ ,  $\alpha$  : risque considéré (5%),  $N_1$  : nombre de valeurs PA,  $N_2$  : nombre de valeurs FR.

### 3.2.3 Exactitude

#### ● Objectif

L'exactitude correspond au degré de concordance entre la valeur de la méthode obtenue et la valeur de référence ou la valeur considérée comme véritable par convention. Elle porte sur l'évaluation des résultats de la linéarité. Le principe de l'exactitude est de calculer les valeurs de recouvrements en % entre les quantités retrouvées et les quantités introduites.

#### ● Opération

L'exactitude est déduite à partir des données de l'étude de linéarité de la gamme standard et de la gamme Spécialité, par le biais de tests statistiques, pour chaque

concentration trois mesures des variables dépendantes sont effectuées. Elle sera évaluée dans une gamme de concentrations égale à 80, 90, 100, 110 et 120% de la teneur théorique de P.A.

### ● Traitement des données

L'exactitude doit être indiquée en termes de pourcentage de recouvrement d'une quantité connue de substance ajoutée à l'échantillon, ou en termes de différence entre la moyenne obtenue et la valeur conventionnellement vraie, avec les intervalles de confiance correspondants. Les valeurs obtenues pour chaque point (80, 90, 100, 110 et 120%) de la gamme FR sont projetées sur la gamme SDT.

On obtient ainsi la quantité recouvrée, à partir de laquelle on calcule le pourcentage de recouvrement.

On évalue l'exactitude en comparant la valeur expérimentale à la valeur de référence par un recouvrement, ou en montrant que la valeur théorique se trouve dans l'intervalle de confiance de 95 % de la valeur expérimentale. On calculera :

#### 3.2.3.1 Le recouvrement

On peut exprimer quantitativement l'exactitude au moyen d'un biais qui exprime la différence entre la moyenne mesurée et la valeur exacte.

Calcul de la quantité recouvrée : On dispose

- pour étalon : droite régression : aire étalon =  $aX + b$
- pour spécialité : aire spécialité :

$$\text{quantité recouvrée} = \frac{(\text{aire pic spécialité} - b)}{a}$$

- Pourcentage de recouvrement :

$$\% \text{ recouvrement} = \frac{(\text{quantité recouvrée} \times 100)}{\text{quantité introduite}}$$



### 3.2.3.2 La moyenne

C'est le paramètre de position le plus classique. Intuitivement, elle indique où se trouve le milieu des valeurs mais ne donne aucune information sur la répartition des données. La moyenne arithmétique d'un ensemble de nombres est égale à la somme des valeurs divisée par le nombre de valeurs.

#### ● Critères d'acceptation

La méthode est considérée comme exacte, si tous les biais individuels et le biais moyen (valeurs moyenne de recouvrement) sont compris dans l'intervalle considéré (**98 % à 102 %**) (L'intervalle de confiance inclure la valeur 100%).

### 3.2.4 Fidélité (répétabilité, fidélité intermédiaire)

#### ● Objectif

La fidélité de la procédure d'analyse exprime l'étroitesse de l'accord entre une série de mesures provenant de multiples prises d'un même échantillon homogène dans des conditions prescrites. Elle s'exprime par la mesure de la répétabilité et de fidélité intermédiaire.

Démonstration que la méthode est répétable et reproductible. Cette analyse permet de prouver que le degré de dispersion entre une série de dosage provenant de multiples prises d'un même échantillon est acceptable

#### ● Opération

Effectuer au minimum 3 séries de 6 pesées de concentration théorique (100%) sur la forme pharmaceutique reconstituée et ce à raison d'une série par jour :

La répétabilité se rapporte à des essais de la même grandeur effectuée dans des conditions aussi stables que possible. Le travail sera effectué sur 2 solutions de concentration 100% dans le même groupe (**ICH 2005-b**), par le même opérateur et dans les mêmes conditions expérimentales. Chaque solution est injectée 6 fois.

La fidélité intermédiaire a été évaluée en étudiant deux groupes de résultats obtenus en trois jours consécutifs. Chaque groupe comporte les résultats obtenus sur 2 solutions.

En pratique, la fidélité du PA dans la solution témoin est étudiée pendant trois jours successifs tout en conservant le même opérateur et le même appareil. La fidélité a été déterminée par le calcul de recouvrement moyen et des coefficients de variation (CV) sur les 6 injections de deux solutions de concentration 100 %.

#### **3.2.4.1 Le coefficient de variation (CV)**

Il est souvent utilisé pour mesurer la variabilité d'une série de données, le (CV) est l'écartype exprimé comme un pourcentage de la moyenne, une faible valeur étant un critère de fidélité (**voir l'annexe 2**) (**Fleury 1987**).

Vérifier l'accord des résultats d'essais effectués sur les 3 jours (série) correspond à un changement dans les conditions de travail (les analystes, les matériel)

##### **➤ Le premier jour**

- **préparation de la solution standard (principe actif seul)**

La solution standard est préparée dans une fiole de 250 ml, en dissolvant 60 mg de principe actif dans une quantité adéquate de diluant.

- **préparation de forme pharmaceutique reconstituée (PA+PB)**

La solution de forme reconstituée est préparée dans les 6 fioles jaugées de 250 mL, par dissolution de 159 mg de placebo puis 60 mg de principe actif dans une quantité convenable de diluant en agitant soigneusement. Les solutions préparées ainsi sont traitées à l'ultrason pendant 15 minutes.

Ensuite, et à l'aide d'une seringue, nous complétons le volume à préparer jusqu'à le trait de jauge des fioles, puis à l'aide d'un filtre seringue qui permet l'élimination des microparticules, nous remplissons les vials et les mettons dans la carroucel qui seront introduits dans l'instrument HPLC pour commencer l'analyse.

**Tableau 4. 6:** Prise d'essais du standard

Fidélité : SERIE 1		Fidélité : SERIE 2		Fidélité : SERIE 3	
	Masse introduite (concentration)		Masse introduite (concentration)		Masse introduite (concentration)
<b>1</b>	60,0	<b>1</b>	60,0	<b>1</b>	60,2
<b>2</b>	60,2	<b>2</b>	60,1	<b>2</b>	60,0
<b>3</b>	60,1	<b>3</b>	60,0	<b>3</b>	60,4
<b>4</b>	60,1	<b>4</b>	60,1	<b>4</b>	62,3
<b>5</b>	60,4	<b>5</b>	60,1	<b>5</b>	63,4
<b>6</b>	60,1	<b>6</b>	60,0	<b>6</b>	60,2

- **Le 2<sup>ème</sup> jour** : en a changée l'instrument (fidélité intermédiaire).
- **Le 3<sup>ème</sup> jour** : changement de la main d'œuvre (fidélité intermédiaire).

### ● **Traitement des données**

Projection de chaque point de la spécialité sur la droite de régression de la spécialité et Projection de chaque point étalon sur la droite de régression de la matière première.

### ● **Critères d'acceptation**

La fidélité est exprimée par l'écart-type ( $\sigma$ ), la variance ( $\sigma^2$ ) ou le coefficient de variation (CV). Elle mesure l'erreur aléatoire liée à une procédure analytique, c'est-à-dire la dispersion des résultats autour de leur valeur moyenne.

La fidélité est généralement exprimée comme le pourcentage de coefficient de variation (CV). La formule classique est :

$$CV(\%) = 100 \times \frac{\sqrt{\sigma^2}}{\bar{x}}$$

Avec  $\sigma^2$  : est l'estimation de variance et  $\bar{x}$  : est la valeur de la moyenne estimée (**voir annexe 2**)

La Fidélité est satisfaisante si :

- Le coefficient de variation répétabilité doit être inférieur à 2 %.
- Le coefficient de variation reproductibilité doit être inférieur à 2 %.

## *Chapitre 5*

# *Résultats et discussion*



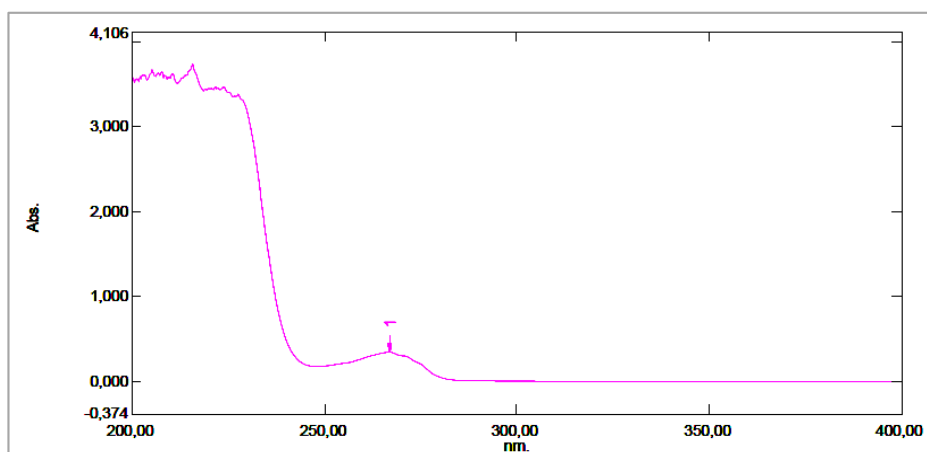
## 1 Développement de la méthode de dosage

L'objectif de cette étude est d'effectuer une validation complète de la méthode de HPLC / UV pour la détermination du Phloroglucinol dans la spécialité pharmaceutique Phloroglucinol LDM<sup>®</sup> 80 mg /160 mg. Dans la pratique courante, avant l'étape de la validation, il devient de plus en plus évident et essentiel de démontrer au moyen d'optimisation qu'une méthode optimisée correspond à l'usage attendu tout en fournissant, par ailleurs, des résultats fiables.

Pour cela, nous avons déterminé quelques paramètres optimaux permettant l'analyse du Phloroglucinol par HPLC/UV avec une colonne de type MACHEREY-NAGEL C18 pyramid (4\*250 mm ; 5 $\mu$ m) tel que, l'effet pourcentage en solvant organique sur le temps de rétention du Phloroglucinol dihydraté et ces substances apparentés ont été étudiés. Sachant que l'influence du débit, du pH et de la température de la colonne sur le temps de rétention ont été aussi initiés, mais nous n'allons pas vous montrés ses résultat.

### 1.1 Choix de la longueur d'onde de détection

L'analyse spectrale d'une solution aqueuse du Phloroglucinol dihydraté à une concentration de 80  $\mu$ g mL<sup>-1</sup>, on utilisant un spectrophotomètre UV de Type: UV-1800 Series, model UV-1800 (A11635507207), a montré la présence d'une bande d'absorption maximale, à la longueur d'onde 265 nm. Par suite, la détection a été effectuée à longueur d'onde fixe  $\lambda = 265$  nm (**Fig. 5. 1**).



**Figure 5. 1:** Spectre UV de Phloroglucinol de concentration 80  $\mu$ g mL<sup>-1</sup>.

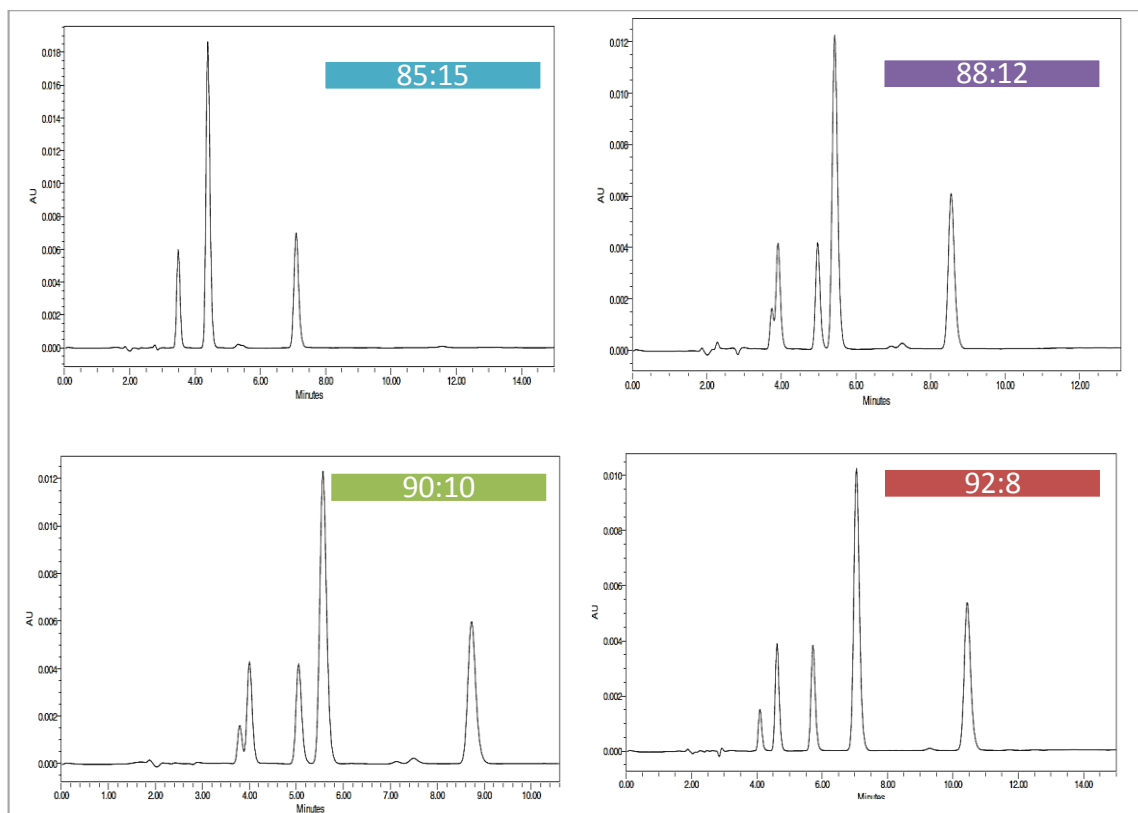
## 1.2 Choix de la composition de la phase mobile acétonitrile-tampon phosphate

La variation de la composition de la phase mobile acétonitrile-tampon phosphate  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  10 mM de pH = 3.0 sur la rétention du Phloroglucinol dihydraté a donné les enregistrements chromatographiques représentés par la **figure 5.2**.

Les chromatogrammes de la figure 5. 2 illustrent l'effet de la variation du pourcentage du solvant organique (ACN) sur la rétention du Phloroglucinol dihydraté.

En effet, l'augmentation du pourcentage de l'ACN dans la phase mobile induit une élution rapide du Phloroglucinol dihydraté.

Ceci est expliqué par la grande affinité du Phloroglucinol dihydraté vis à vis du solvant organique.



**Figure 5. 2 :** Effet de la variation de la composition de la phase mobile sur la rétention du Phloroglucinol et ses substances apparentés : ACN/tampon de phosphate 10 mM de pH = 3; débit = 1 mL/min; T = 25 °C.

On choisit donc une phase mobile constituée d'un mélange isocratique d'acétonitrile-tampon phosphate 10 mM de composition (92:8; v/v) pour le dosage du Phloroglucinol.

Pour l'effet de la composition de la phase mobile sur la rétention et la séparation du Phloroglucinol dihydraté et ses substances apparentées, les limites d'acceptation applicables à la conformité du système sont :

- Ø RSD% des six injections successives de la solution STD  $\leq 2.0\%$
- Ø Résolution : au minimum 2.5 entre les pics dus à l'impureté A et le Phloroglucinol
- Ø Résolution : au minimum 4.0 entre les pics dus à l'impureté D et B

**Tableau 5. 1 : Répétabilité du système (Canal: W2489 ChA)**

	Nom de l'échantillon	Inj	Vial	Imp_inc	PA	Imp_A	Imp_D	Imp_B
<b>1</b>	STD	1	51	4.095	4.782	5.717	7.048	10.438
<b>2</b>	STD	2	51	4.095	4.771	5.717	7.048	10.438
<b>3</b>	STD	3	51	4.095	4.838	5.717	7.048	10.438
<b>4</b>	STD	4	51	4.095	4.801	5.717	7.048	10.438
<b>5</b>	STD	5	51	4.095	4.738	5.717	7.048	10.438
<b>6</b>	STD	6	51	4.095	4.741	5.717	7.048	10.438
<b>Moyenne</b>				<b>4.095</b>	<b>4.778</b>	<b>5.717</b>	<b>7.048</b>	<b>10.438</b>
<b>Ecart type</b>				0.000	0.038	0.000	0.000	0.000
<b>% RSD</b>				<b>0.0</b>	<b>0.8</b>	<b>0.0</b>	<b>0.0</b>	<b>0.0</b>

Ce tableau présente aussi un résumé des composants pour des temps de rétention du Phloroglucinol dihydraté et ses substances apparentées :

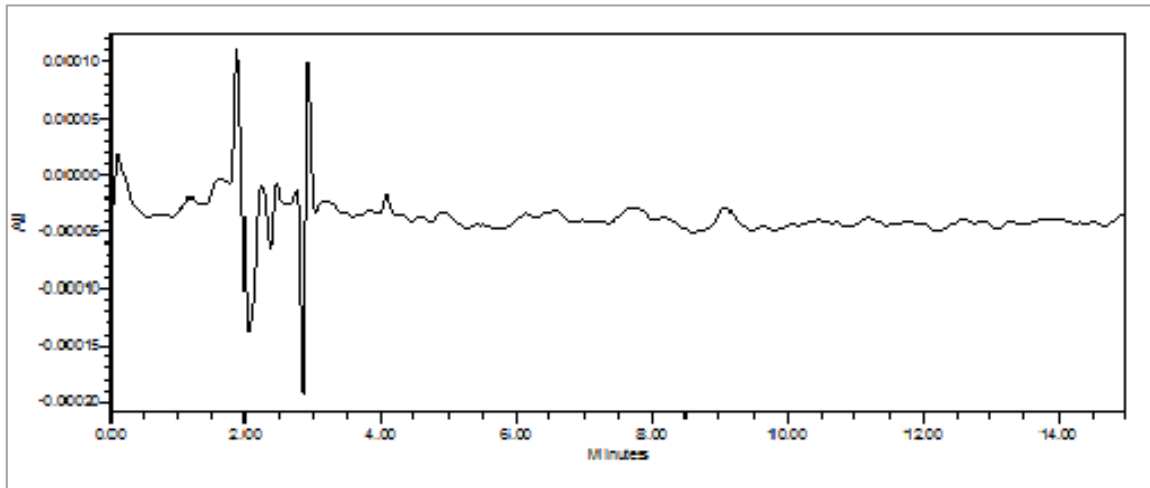
- ✓  $t_R$  (Imp\_inc) = 4.095 min,
- ✓  $t_R$  (Phloroglucinol Dihydraté) = 4.778 min,
- ✓  $t_R$  (Imp\_A) = 5.717 min,
- ✓  $t_R$  (Imp\_D) = 7.048 min
- ✓  $t_R$  (Imp\_B) = 10.438 min

## 2 Résultats de Validation de la méthode

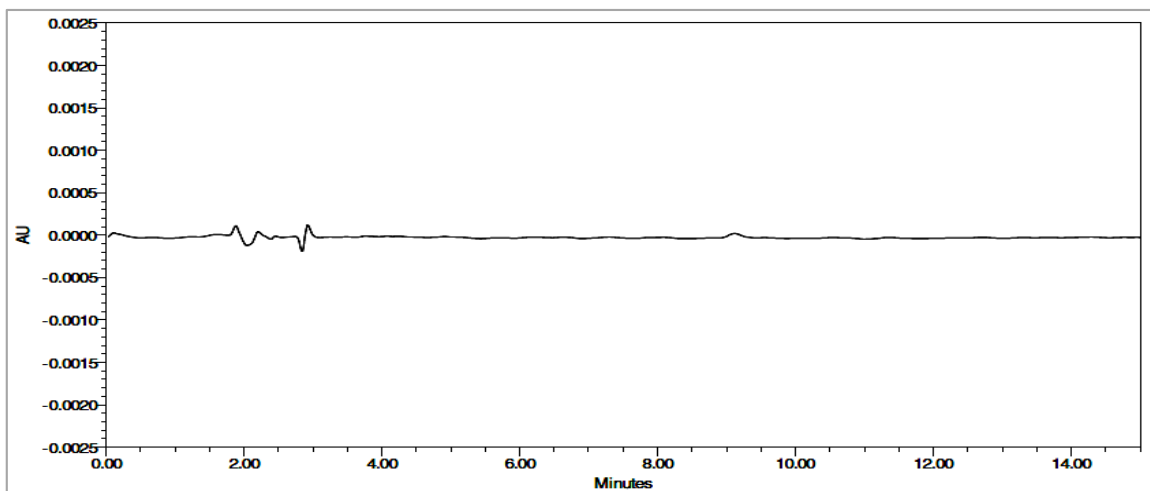
### 2.1 Résultats de spécificité / sélectivité

Avant la réalisation des standards de validation il faut vérifier la sélectivité en injectant séparément le blanc, le placebo, le standard et la forme reconstituée.

Les résultats obtenus sont représenté dans les **figures 5. 3 –5. 11** suivantes:

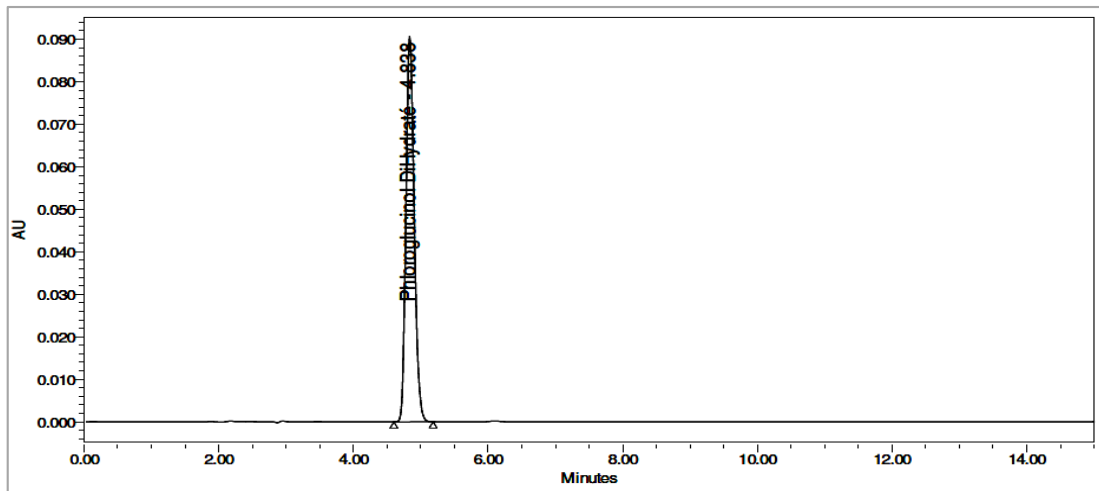


**Figure 5. 3:** Chromatogramme obtenu par HPLC du blanc; Phase mobile : ACN/tampon phosphate 10 mM de pH = 3 (92:8; v/v); débit = 1 mL min<sup>-1</sup> ; T = 25°C.

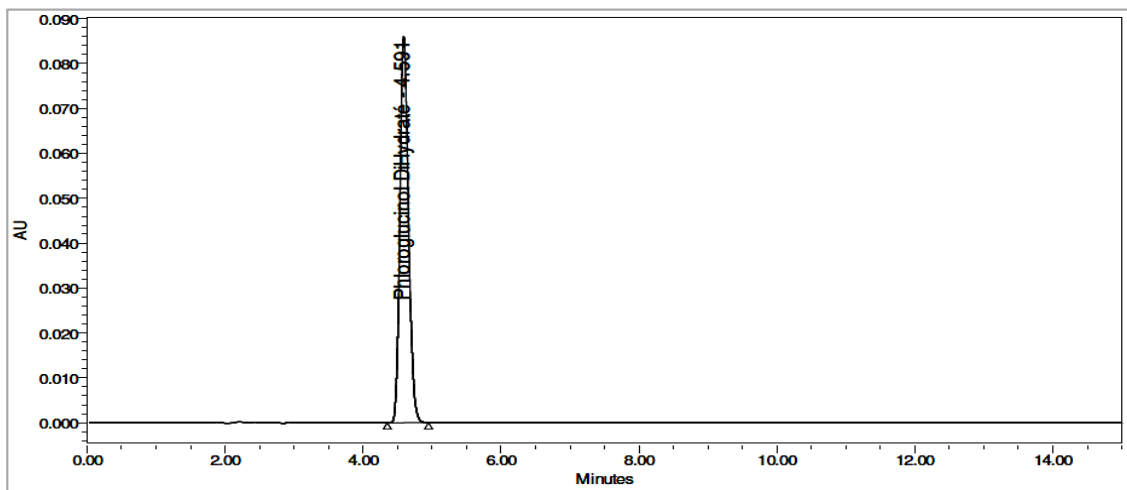


**Figure 5. 4:** Chromatogrammes obtenus par HPLC du placebo ; Phase mobile : ACN/tampon phosphate 10 mM de pH = 3 (92:8; v/v); débit = 1 mL min<sup>-1</sup> ; T = 25°C.

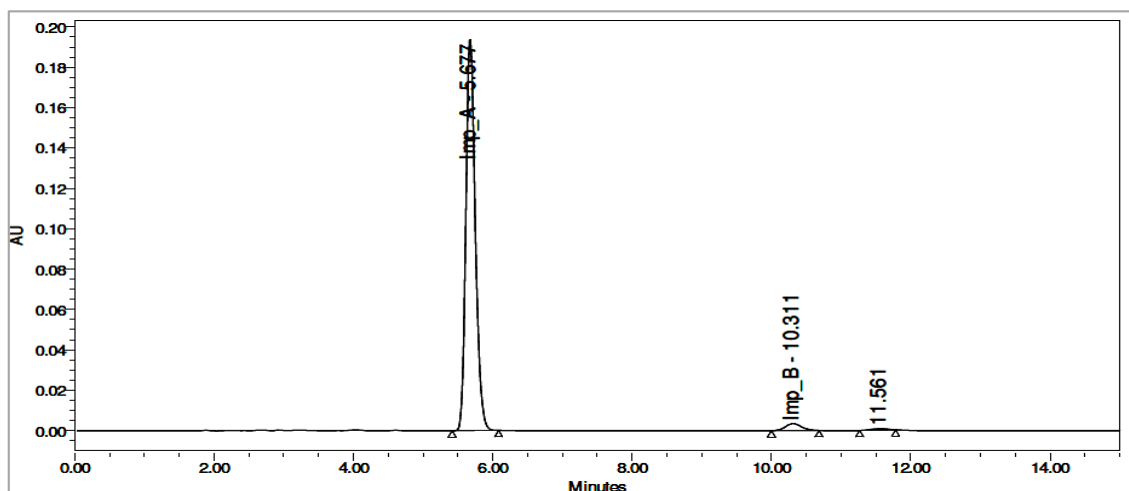




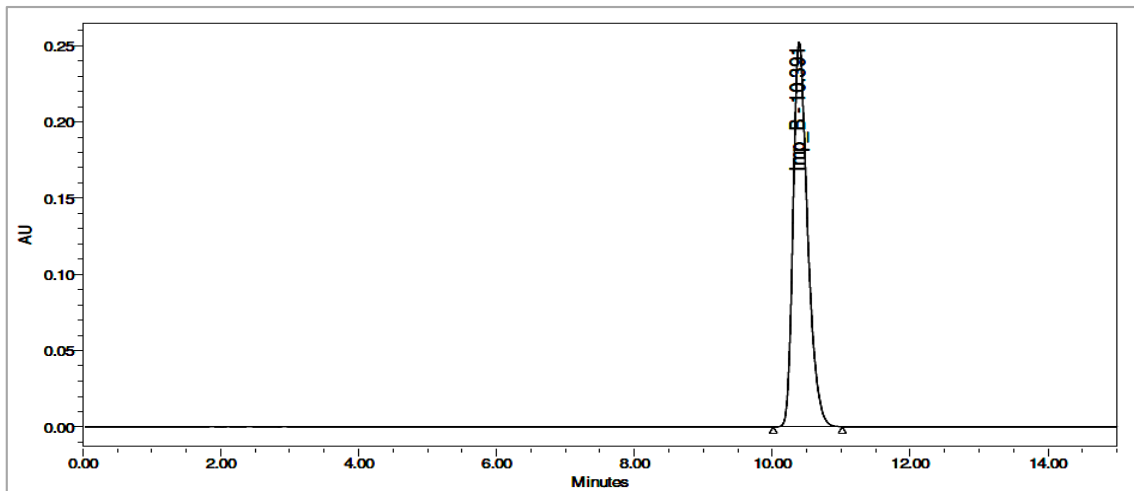
**Figure 5. 5:** Chromatogramme obtenu par HPLC du STD ; Phase mobile : ACN/tampon phosphate 10 mM de pH = 3 (92:8; v/v); débit = 1 mL min<sup>-1</sup> ; T = 25°C.



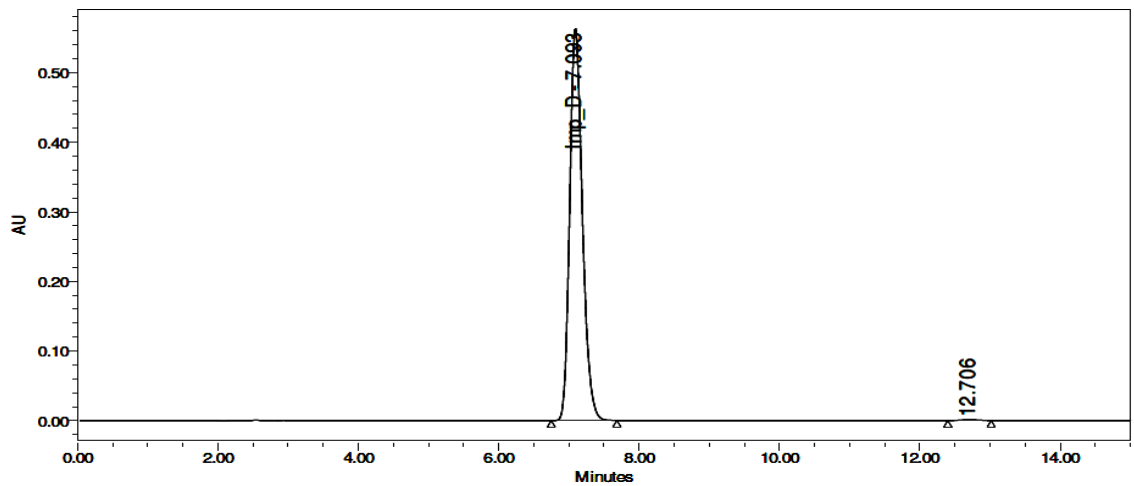
**Figure 5. 6:** Chromatogramme obtenu par HPLC de la FR ; Phase mobile : ACN/tampon phosphate 10 mM de pH = 3 (92:8; v/v); débit = 1 mL min<sup>-1</sup> ; T = 25°C.



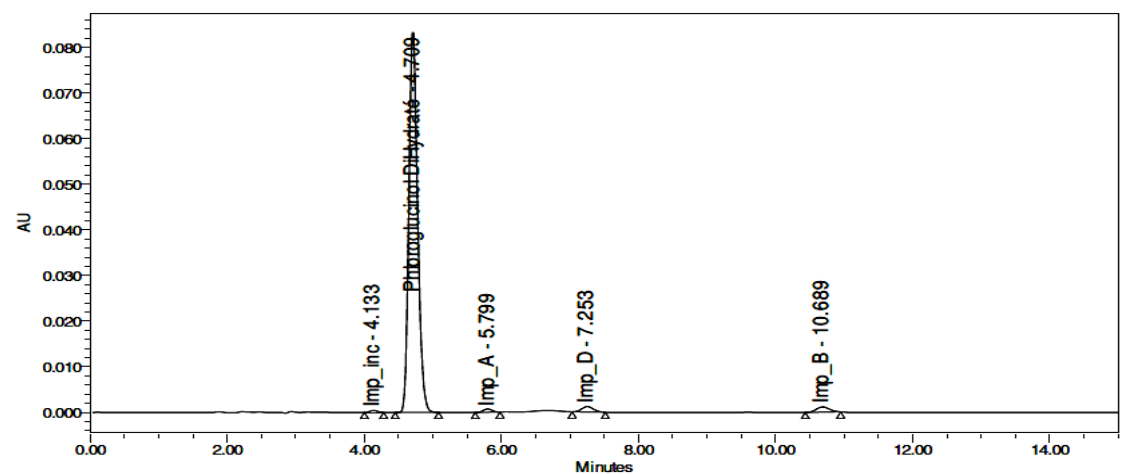
**Figure 5. 7:** Chromatogramme obtenu par HPLC de l'impureté A ; Phase mobile : ACN/tampon phosphate 10 mM de pH = 3 (92:8; v/v); débit = 1 mL min<sup>-1</sup> ; T = 25°C.



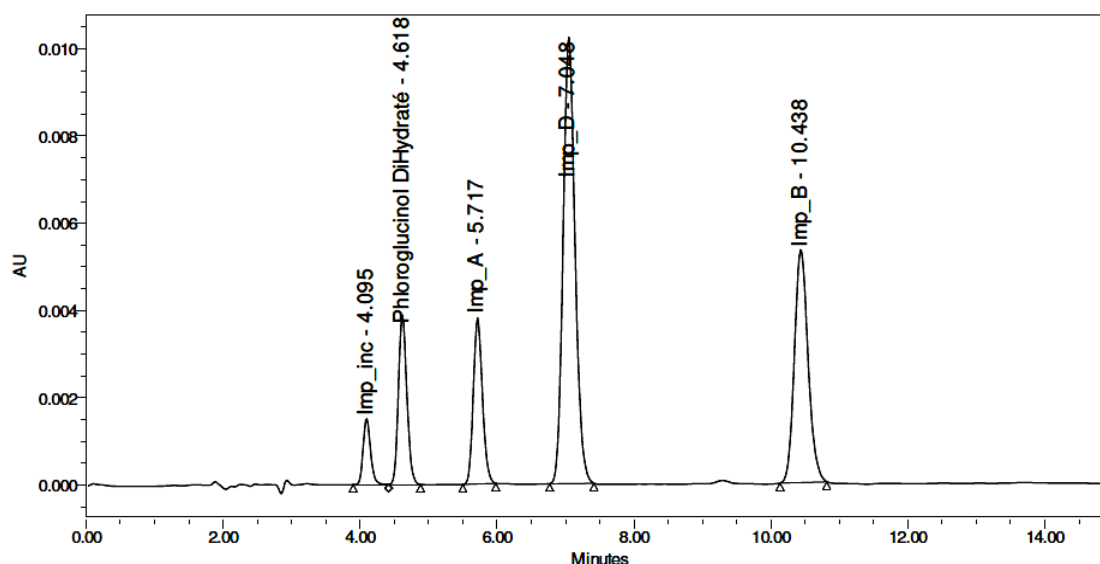
**Figure 5. 8:** Chromatogramme obtenu par HPLC de l'impureté B ; Phase mobile : ACN/tampon phosphate 10 mM de pH = 3 (92:8; v/v); débit = 1 mL min<sup>-1</sup> ; T = 25°C.



**Figure 5. 9:** Chromatogramme obtenu par HPLC de l'impureté D ; Phase mobile : ACN/tampon phosphate 10 mM de pH = 3 (92:8; v/v); débit = 1 mL min<sup>-1</sup> ; T = 25°C.



**Figure 5. 10:** Chromatogramme obtenu par HPLC de la FR-chargée ; Phase mobile : ACN/tampon phosphate 10 mM de pH = 3 (92:8; v/v); débit = 1 mL min<sup>-1</sup> ; T = 25°C.



**Figure 5. 11:** Chromatogramme obtenu par HPLC de la SST ; Phase mobile : ACN/tampon phosphate 10 mM de pH = 3 (92:8; v/v); débit = 1 mL min<sup>-1</sup> ; T = 25°C.

Les chromatogrammes du blanc et du placebo ne présente aucun pic ni dans le temps de rétention de PA ni dans celui des autres impuretés, c'est-à-dire l'absence du principe actif, par contre ceux du STD, la FR et la FR- chargée montrent la détection du pic principale du au principe actif « Phloroglucinol dihydraté » dans les temps de rétention  $t_R$  développé dans le **tableau 5.2** qui suit, sans présence d'interférences.

Le chromatogramme de la solution SST présentes une bonne sélectivité et montrent la détection du pic correspond au PA mais sans présence d'interférences.

Quant aux chromatogrammes des impuretés A, B et D, ils ne montrent que la détection des pics caractéristiques à leurs temps de rétention c'est-à-dire l'absence du principe actif avec absence totale d'interférences.

**Tableau 5. 2 :** Les temps de rétention du PA dans les différentes solutions, placebo, impureté et la phase mobile.

	$t_R$ (en min)
<b>blanc</b>	/
<b>placebo (PB)</b>	/
<b>SDT</b>	4.83
<b>FR</b>	4.59
<b>FR-chargée</b>	4.708
<b>SST</b>	4.618

D'après la superposition (**Fig. 5. 12**) de ces chromatogrammes on remarque qu'il n'y a pas d'interférence avec le principe actif.

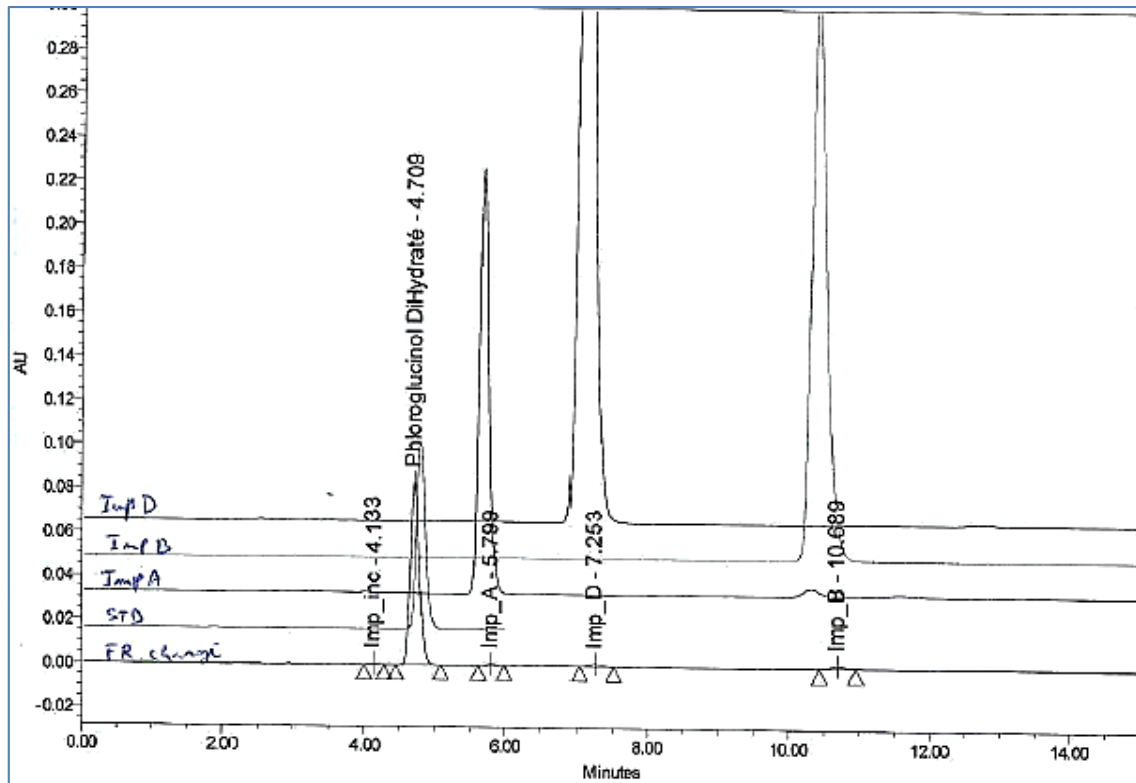


Figure 5. 12: Superposition des chromatogrammes

Nous pouvons conclure que chaque échantillon de produit analysé, ne montre aucune interférence avec le pic correspondant au principe actif Phloroglucinol dihydraté, par conséquent la sélectivité de la méthode proposée est prouvée et donc la spécificité est acceptable.

## 2.2 Résultats de Linéarité

La linéarité de la méthode de dosage HPLC/ UV est vérifiée sur l'intervalle de validation, en utilisant les données des premières répétitions de chaque niveau de concentration, pour les trois séries de validation, que ce soit pour la solution standard (PA) ou pour la forme pharmaceutique reconstituée (PA+PB).

Les résultats obtenus sont présentés dans le tableau 5. 3, montrent que l'HPLC donne des airs proportionnels aux concentrations, que ce soit pour la solution standard ou pour la forme reconstituée.

**Tableau 5. 3** : Données brutes de l'étude de la linéarité.

Linéarité sur gamme standard			Linéarité sur gamme FPR		
% théorique	Masse introduite (concentration)	Air du pic	% théorique	Masse introduite (concentration)	Air du pic
80	48.3	599470	80	47.4	584752
	49.4	611484		47.0	576672
	48.2	598586		47.9	592715
90	54.0	674768	90	54.1	670846
	54.4	677178		54.3	678314
	54.2	680825		54.0	667376
100	60.3	751357	100	60.0	740829
	60.5	754769		59.8	745024
	60.6	752730		59.6	739472
110	66.6	832546	110	66.0	819232
	66.9	829797		66.1	826731
	66.3	826311		65.8	822300
120	72.1	897266	120	72.3	892535
	72.8	907366		72.9	903646
	72.9	912546		72.2	897566

La linéarité est, dans un premier temps, évaluée par comparaison visuelle des représentations graphiques des réponses instrumentales Y en fonction des concentrations introduites X selon la fonction  $Y = f(X)$ , pour la forme pharmaceutique reconstituée et pour les standards.

Effectivement les résultats de notre étude présente une courbe d'étalonnage du PA linéaire sur toute la gamme de concentration. L'équation de la droite de régression est de la forme :

$$Y = a \times X + b$$

Où:

**X** : représente la concentration introduite (en mg/mL);

**Y** : représente la réponse analytique (en aire du pic);

**a** et **b** : représente respectivement la pente et l'ordonnée à l'origine.

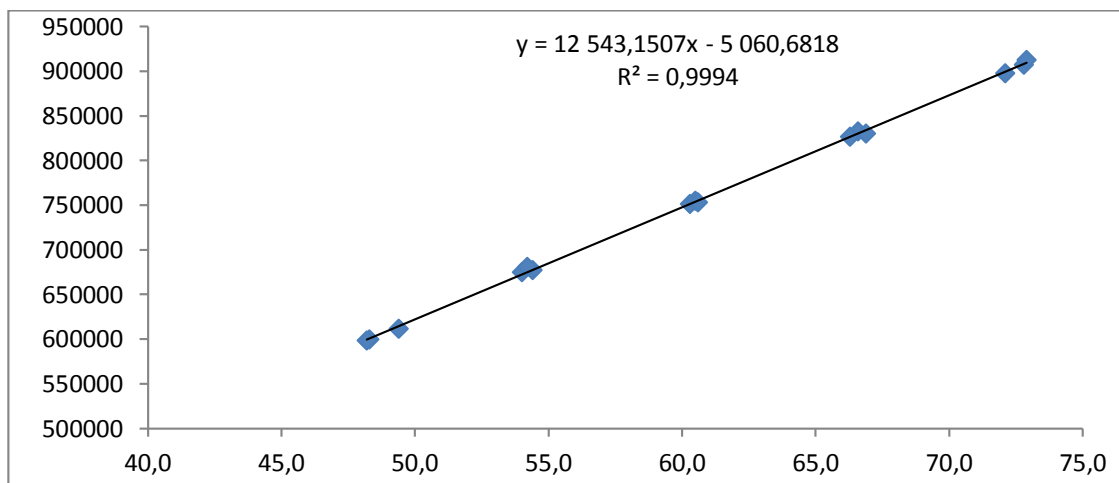
Pour toutes les séries de validation, une droite de régression a été ajustée sur les concentrations calculées par rapport aux concentrations introduites en appliquant le modèle de régression linéaire on utilisant le logiciel « Excel », pour lequel le coefficient

de détermination ( $R^2$ ), la pente et l'ordonnée à l'origine sont présentés dans le **tableau 5.4**.

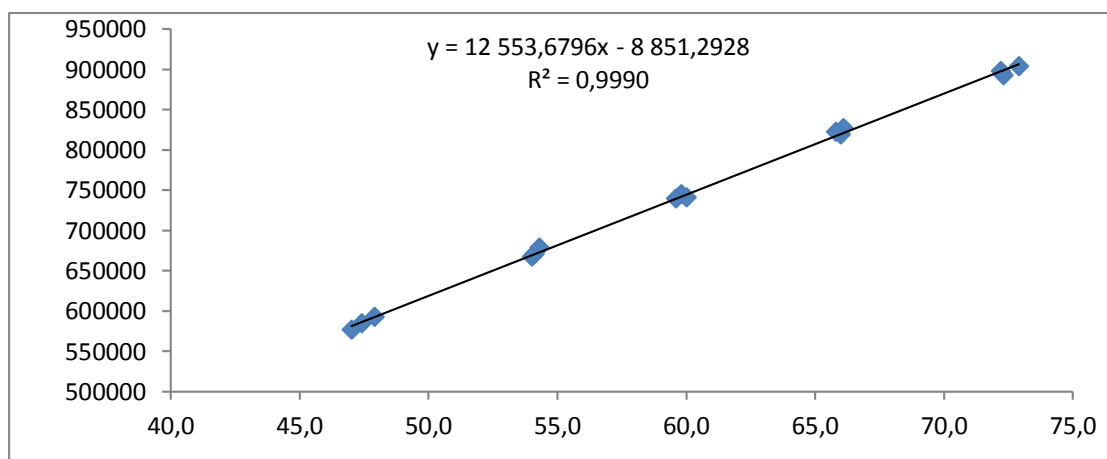
**Tableau 5.4** : Paramètre de l'équation de de régression de linéarité

Paramètres étudiés	dans la solution standard	dans la forme FPR
Equation de la droite de régression ( $Y= a*X+ b$ )	$Y=12543.1507 X - 5060.6818$	$Y=12553.6796 X- 8851.2928$
Pente de la droite (a)	12543.1507	12553.6796
Ordonnée à l'origine (b)	-5060.6818	-8851.2928
Coefficient de corrélation ( $R^2$ )	0.9994	0.9990

Les figures 5.13 et 5.14 représente les courbes de régression correspondant aux phloroglucinol dans la solution témoin et dans la forme pharmaceutique reconstituée (FR).

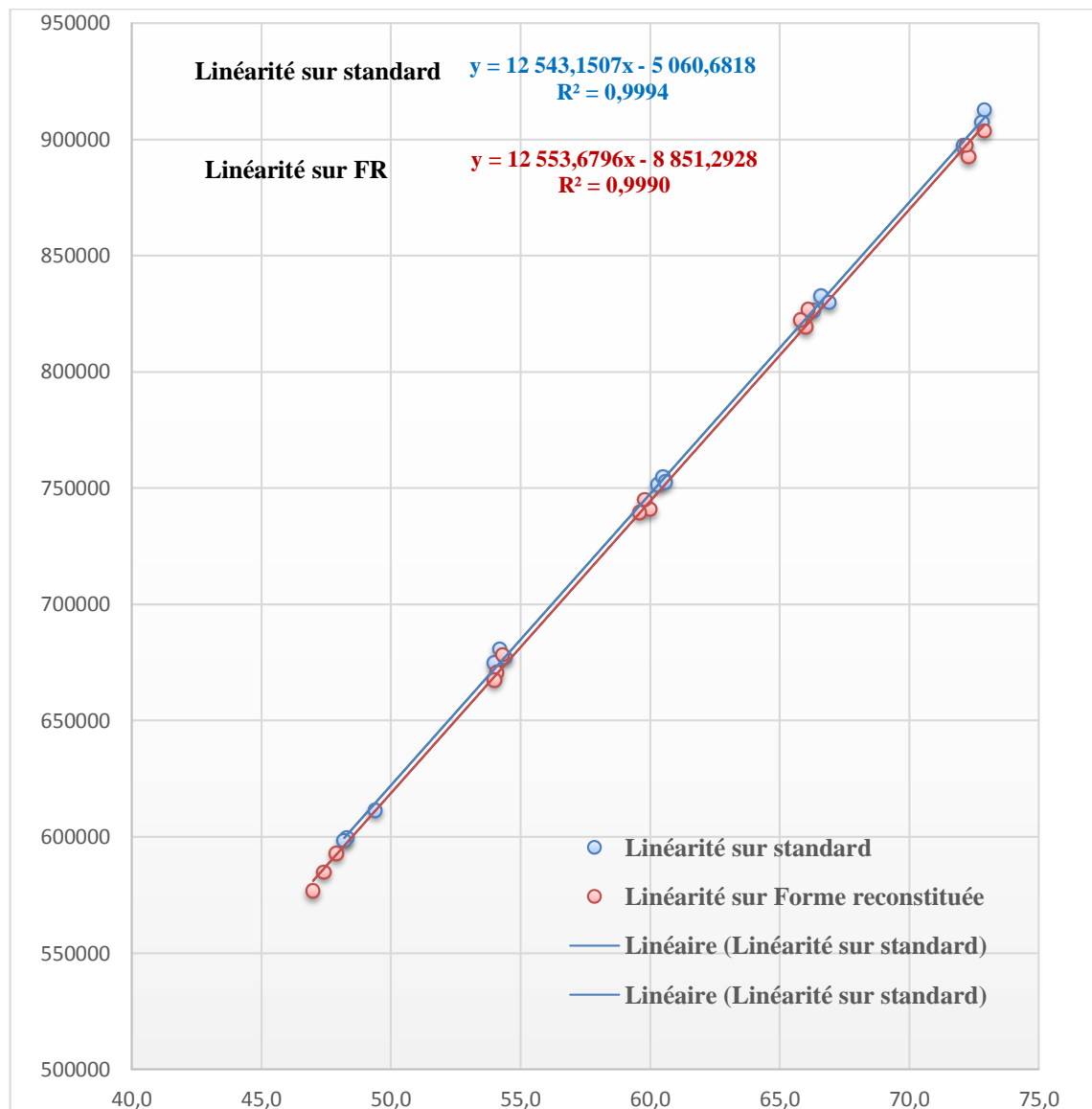


**Figure 5.13**: Courbes d'étalonnage du phloroglucinol dihydraté dans la solution témoin



**Figure 5.14**: Courbes d'étalonnage du phloroglucinol dihydraté dans la solution FR

En effet, la superposition des deux courbes (**Fig. 5. 15**) montre bien que ces dernière sont parfaitement parallèles et linéaire.



**Figure 5. 15:** Superposition des deux courbes d'étalonnage du phloroglycinol dihydraté

Les coefficients de corrélations  $R^2$ , doit être situé dans l'intervalle  $[0.97 - 1]$ , des droites de régression correspondant aux PA dans la solution témoin et dans la forme pharmaceutique reconstituée sont supérieurs à 0.999.

Ces valeurs sont satisfaisant et nous permet, dans un premier temps, de pouvoir affirmer qu'il existe bien une liaison hautement significative « de type croissante » entre l'aire et la concentration.

Par conséquent, la méthode d'analyse présente ainsi un profil linéaire.

**Tableau 5. 5 : Résultats de répétabilité du système**

Phloroglucinol Dihydraté	
<b>1</b>	768291
<b>2</b>	768664
<b>3</b>	767711
<b>4</b>	769259
<b>5</b>	771192
<b>6</b>	771796
<b>Moyenne</b>	<b>769485,5</b>
<b>Ecart type</b>	<b>1646,35339</b>
<b>% RSD</b>	<b>0,2%</b>

Reste à dire que même si la technique présente un comportement linéaire, et donne des « signaux » directement proportionnels à la quantité mesurée ; elle peut ne pas suivre exactement l'équation de la droite théorique dont on a calculé l'équation (droite de régression).

On peut donc conclure, que la méthode de dosage de la Phloroglucinol par HPLC/UV est linéaire pour l'intervalle de validation.

### 2.2.1 Traitement statistique de la linéarité

Afin de s'assurer que l'équation de la droite obtenue par la méthode des moindres carrés, il est judicieux de vérifier la significativité de la pente (Test *Student*), et l'ajustement du modèle (la vérification de l'ajustement est effectuée par la comparaison des pentes (méthode spécifique)).

#### 2.2.1.1.1 Comparaison de la pente à 1

L'objectif de ce test est de vérifier si la pente est équivalente à 1. Si la valeur de  $t$  calculé est supérieur ou égal à la valeur critique  $t^{\circ}_{\text{tabulé}}$  (0.05 ; N-2) lue dans la table au risque 5 %, il est possible de conclure que la pente n'est pas différente à 1 et que la méthode est spécifique.

La comparaison de la pente avec «1» se fait selon les formules données en Annexe 2, et les résultats obtenus que soit pour la solution témoin et la forme pharmaceutique reconstituée sont regroupés dans le tableau 5. 6 qui suit.



Nos résultats de comparaison présente un intervalle de confiance (risque 5%) :

$$\begin{cases} \text{Pour STD : } t_{\text{calculé}} = 149,898 \\ \text{Pour FR : } t_{\text{calculé}} = 113,124 \end{cases}$$

Avec :

- $t_{\text{calculé}}$  : représente la valeur calculé par la formule (**voir l'annexe 2**)
- $t^{\circ}_{\text{tabulé}}$ : représente la valeur de référence tirée de la table statistique au risque  $\alpha=5\%$ .

Le coefficient calculé pour les deux cas est dans les fourchettes d'acceptabilité :

$$t_{\text{calculé}} > t^{\circ}_{\text{tabulé}} (0,05 ; 13) = 2,160$$

Donc la pente est comparable à 1 au risque 5% aussi bien pour STD que pour la FR.

**Tableau 5. 6** : Résultats du traitement statistique de la linéarité pour la gamme STD et FR.

Linéarité sur gamme standard		
Comparaison de la pente $a_1$ avec 0	$t_{\text{calculé}}$	149,898
	$t^{\circ}_{\text{tabulé}} (0,05, 13)$	2,160
	<b>Condition</b>	$t_{\text{calculé}} > t^{\circ}_{\text{tabulé}}$
	<b>Résultat</b>	<b>VRAI</b>
Linéarité sur gamme forme reconstituée		
Comparaison de la pente $a_2$ avec 0	$t_{\text{calculé}}$	113,124
	$t^{\circ}_{\text{tabulé}} (0,05, 13)$	2,160
	<b>Condition</b>	$t_{\text{calculé}} > t^{\circ}_{\text{tabulé}}$
	<b>Résultat</b>	<b>VRAI</b>

#### 2.2.1.1.2 Comparaison des pentes $a_1$ et $a_2$ : Méthode spécifique

Le **Tableau 5. 7** qui suit, présente la comparaison des pentes selon le test de *Student* présente toujours des résultats satisfaisante, car la valeur du  $t_{\text{calculé}}$  qui vaut 0.076 et inférieur à la valeur du  $t^{\circ}$  (**0.05, 26**) dont la valeur est de 2.056 au risque de 5%. Ce qui nous permet de dire que la méthode est spécifique.

**Tableau 5. 7** : Comparaison des pentes  $a_1$  et  $a_2$ 

Comparaison des pentes $a_1$ et $a_2$ : METHODE SPECIFIQUE			
$t$ calculé	$t^\circ (0.05, 26)$	Condition	Résultat
0.076	2.056	$t$ calculé < $t^\circ (0.05, 26)$	VRAI

Les résultats du test de *Student* comparés pour les deux types de préparations pourraient signifier que la linéarité de cette méthode serait meilleure pour la gamme des standards que pour la FR. Mais ça reste à prouver et à elle ne remet pas en cause l'adéquation de la technique pour les deux types de préparation.

Sur la base des résultats obtenus et les analyses statistiques réalisés sur les droites de régressions, nous pouvons dire que la linéarité de la technique est une droite de coefficient de régression supérieur à 0.999 confirmée par les résultats de comparaison des données à l'origine avec zéro et les résultats du test d'homogénéité des variances.

Tous les tests statistiques ont donnés des valeurs toujours comprises dans les limites d'acceptation :

- un coefficient de détermination acceptable de 0,999 ;
- la pente est comparable à 1 au risque 5% ;

Nos gammes sont donc conformes en termes de linéarité car l'erreur de modèle est négligeable et la méthode de dosage de la Phloroglucinol par HPLC/UV présente ainsi **un profil linéaire valide** pour l'intervalle de validation.

### 2.3 Résultats de l'exactitude

Selon l'ICH l'exactitude a été étudiée sur 5 concentrations couvrant le 100% (80%- 90%- 100%- 110%- 120%).

Les résultats obtenus lors de l'étude de l'exactitude relatifs aux Phloroglucinol sont rassemblés dans le **Tableau 5. 8** ci-après :

La vérification de l'exactitude de la méthode est faite par rapport à un écart maximal pour l'intervalle de dosage où il est compris dans les limites d'acceptation fixées a priori 5%.

Le pourcentage de recouvrement moyen (pour un nombre total d'essais de N=15) est de 99,56% avec un intervalle de confiance (risque)  $\pm 5\%$ , d'où intervalle du pourcentage de recouvrement moyen de la méthode de [99,13-100,05]%

Cette valeur est très satisfaisant sur l'intervalle de 80% à 120% de la concentration de standard et FR, c'est-à-dire que les valeurs sont exactes et précises.

**Tableau 5. 8** : Résultats du traitement statistique de l'exactitude pour la gamme STD et FR.

Linéarité sur gamme standard			Linéarité sur FR		masse estimée (xi')	Index de recouvrement	
% théorique	Masse introduite (Concentration)	Aire du pic (absorbance)	Masse introduite (Concentration)	Aire du pic (absorbance)			
80	48,3	599470	47,4	584752	47,0	99,2	
	49,4	611484	47,0	576672	46,4	98,7	
	48,2	598586	47,9	592715	47,7	99,5	
90	54,0	674768	54,1	670846	53,9	99,6	
	54,4	677178	54,3	678314	54,5	100,3	
	54,2	680825	54,0	667376	53,6	99,3	
100	60,3	751357	60,0	740829	59,5	99,1	
	60,5	754769	59,8	745024	59,8	100,0	
	60,6	752730	59,6	739472	59,4	99,6	
110	66,6	832546	66,0	819232	65,7	99,6	
	66,9	829797	66,1	826731	66,3	100,3	
	66,3	826311	65,8	822300	66,0	100,2	
120	72,1	897266	72,3	892535	71,6	99,0	
	72,8	907366	72,9	903646	72,4	99,4	
	72,9	912546	72,2	897566	72,0	99,7	
Pente	12543,15066		Moyenne		99,56		
Ordonnée	-5060,681817		Ecart type		0,49		
					Limite inférieur de l'Intervalle de Confiance		99,29
					Limite supérieur de l'Intervalle de Confiance		99,84
							VRAI

### 2.3.1 Limites de quantification (LQ)

Les limites de quantification sont obtenues en calculant la plus petite et la plus grande concentration pour lesquelles les limites d'exactitude, c'est à dire les limites de l'intervalle de tolérance attendu tolérance sont incluses dans la limite d'acceptabilité fixée à  $\pm 5\%$ . L'intervalle de dosage est l'intervalle compris entre les limites inférieure et supérieure de quantification où la procédure analytique atteint l'exactitude souhaitée.

- Limite inférieure de quantification (LQ<sub>Inf</sub>) (mg/ml) =99.29
- Limite supérieure de quantification (LQ<sub>Sup</sub>) (mg/ml) = 99.84

Les limites de quantification supérieure et inférieure sont définies ce qui montre que la méthode est validée. En effet, l'exactitude est validée dans les limites d'acceptation fixées à 5%, en conséquence nous pouvons conclure que la méthode est validée.

Le coefficient de variation relatif au Phloroglucinol dihydraté étant inférieur à 2 %, et l'intervalle de confiance (IC) du recouvrement moyen :  $IC = 100,009 \% \pm 0,311$  comprend le 100 %, donc la méthode est exacte.

## 2.4 Résultats de Fidélité

La fidélité fournit une indication sur les erreurs dues au hasard. Elle a été estimée en calculant la répétabilité et la fidélité intermédiaire à chaque niveau de concentration utilisé en utilisant des standards de validation.

### 2.4.1 Données brutes recueillies

Après réalisation des injections sur HPLC, la fidélité de la méthode est évaluée sur chaque série de validation, en utilisant les données obtenues pour les trois séries réalisées dans des jours différents afin d'obtenir les réponses analytiques sous forme des aires des pics.

Les recouvrements entre les concentrations introduites et les concentrations retrouvées sont calculés pour les trois séries, puis une analyse statistique est effectuée sur ces résultats. Les résultats obtenus sont représentés dans le **Tableau 5. 9**, et les résultats de l'étude statistique sont donnés dans le **Tableau 5. 10** :

**Tableau 5. 9** : Les données brutes de l'étude de la fidélité pour STD

	STD S1	STD S2	STD S3
<b>1</b>	733231	739107	780021
<b>2</b>	734950	738322	778409
<b>3</b>	733614	739321	778779
<b>4</b>	735984	737652	778641
<b>5</b>	734986	738107	778482
<b>6</b>	734329	738204	777986
<b>Moyenne</b>	734515,6667	738452,1667	778719,6667
<b>Ecart type</b>	1006,387334	635,863953	692,0178225
<b>RSD%</b>	0,1%	0,1%	0,1%

Les résultats présentés dans ce tableau (**Tab. 5. 9**), montre que les réponses analytiques sous forme des aires des pics obtenus par HPLC sont proportionnelles aux concentrations introduites.

Ainsi la valeur du RSD % (0.1% dans toutes les séries réalisées pour le STD) affirme la conformité du système.

**Tableau 5. 10** : Les données brutes de l'étude de la fidélité pour FR

<b>Fidélité : série 1</b>			
<b>N°</b>	<b>Masse (concentration) standard</b>		<b>60.1</b>
	<b>Air standard</b>		<b>734516</b>
	<b>Masse introduite (concentration)</b>	<b>Air du pic</b>	<b>%de recouvrement</b>
<b>1</b>	60.0	734820	100.2
<b>2</b>	60.2	724139	98.4
<b>3</b>	60.1	735750	100.2
<b>4</b>	60.1	730583	99.5
<b>5</b>	60.4	726258	98.4
<b>6</b>	60.1	735217	100.1
<b>Fidélité : série 2</b>			
<b>N°</b>	<b>Masse (concentration) standard</b>		<b>60.1</b>
	<b>Air standard</b>		<b>738452</b>
	<b>Masse introduite (concentration)</b>	<b>Air du pic</b>	<b>%de recouvrement</b>
<b>1</b>	60.0	734997	99.7
<b>2</b>	60.1	739743	100.2
<b>3</b>	60.0	737495	100.0
<b>4</b>	60.1	735829	99.6
<b>5</b>	60.1	744521	100.8
<b>6</b>	60.0	737404	100.0
<b>Fidélité : série 3</b>			
<b>N°</b>	<b>Masse (concentration) standard</b>		<b>60.2</b>
	<b>Air standard</b>		<b>778720</b>
	<b>Masse introduite (concentration)</b>	<b>Air du pic</b>	<b>%de recouvrement</b>
<b>1</b>	60.2	782848	100.5
<b>2</b>	60.0	767796	98.9
<b>3</b>	60.4	788307	100.9
<b>4</b>	60.3	809927	100.5
<b>5</b>	60.4	825498	100.7
<b>6</b>	<b>60.2</b>	<b>785442</b>	<b>100.9</b>

Comme montré dans ce **tableau 5.10**, les réponses analytiques sous forme des aires des pics obtenus par HPLC sont proportionnelles aux concentrations introduites.

Le **tableau 5. 11** regroupe les différents critères qui vont nous permettre le calcul de la répétabilité et la fidélité intermédiaire afin de pouvoir juger la fidélité de la méthode.

**Tableau 5. 11** : Etude statistique de la fidélité du STD.

N	Pourcentages de recouvrement			Nombre de groupes K	
	Série 1	Série 2	Série 3	Nombre de mesure / groupe	6
1	100,2	99,7	100,5	$T1 = S_{nj}m_j$	1805,899
2	98,4	100,2	98,9	$T2 = S_{nj}m_j^2$	181184,401
3	100,2	100,0	100,9	$T3 = SS_j^2$	1,464
4	99,5	99,6	100,5	$T4 = S (m_j - m')^2 / k - 1$	0,227
5	98,4	100,8	100,7	Variance de Répétabilité : $S^2r = T3/K$	0,488
6	100,1	100,0	100,9	Variance inter groupe $S^2g = T3 - S^2r/6$	0,145
Variance du groupe	0,739	0,180	0,545	Variance inter groupe $S^2g = T3 - S^2r/7$	0,145
C calculé	0,505			Variance de fidélité $S^2R = S^2r + S^2g$	0,633
C° (0,05, 3, 5)	0,707			CV Répétabilité 100 Sr/m'	0,7
Variances homogènes?	VRAI			CV de fidélité 100 Sr/m'	0,8
Moyenne du groupe	99,45 7	100,06 7	100,39 6		
Variance <i>intra</i> groupe	0,488				
Variance <i>inter</i> groupe	1,360				
F calculé	2,786				
F° (0,05, 2, 15)	3,682				
Validité des moyennes	VRAI				

#### 2.4.1.1 Les coefficients de variation de répétabilité et la fidélité intermédiaire :

D'après le tableau des résultats de fidélité de STD, on voit que le coefficient de variation:

- $CV_{\text{répétabilité}} = 0.7\%$
- $CV_{\text{fidélité intermédiaire}} = 0.8\%$

On parlera de fidélité de la méthode lorsque les coefficients de variabilité sont inférieurs ou égaux à 2% ( $CV < \text{ou} = 2,0\%$ ) (< 2% valeur fixée par les normes pharmaceutiques).

- La répétabilité : Elle est évaluée par le calcul du coefficient de variation. Compte tenu de la valeur du  $CV_{\text{Répétabilité}} = 0.7\%$  (< 2% valeur fixée par

les normes pharmaceutiques), la répétabilité de la méthode est jugée très satisfaisante.

- La fidélité intermédiaire : Le calcul du  $CV_{FI} = 0.8 \%$ , cette valeur est inférieure à 2%, la fidélité intermédiaire de la méthode est jugée satisfaisante.

En conclusion, les coefficients de variation de répétabilité qui reflètent la fidélité *intra*-jour pour chaque niveau de concentration ne dépassent pas 0.7%.

Pour la fidélité intermédiaire qui reflète la fidélité *inter*-jour, les coefficients de variation ne dépassent pas 0.8%, ces coefficients de variation que soit de la répétabilité ou de fidélité intermédiaire obtenus pour le Phloroglucinol dans la solution standard (témoin) sont inférieurs à 2%, valeur exigé par les normes, ce qui démontre l'excellence de la fidélité de la méthode de dosage par HPLC développée.

De ce fait les résultats confèrent à la méthode une bonne fidélité, c'est-à-dire que l'homogénéité des mesures de dosage faites par deux opérateurs distincts est conforme et le dosage reste indépendant de l'opérateur.

# Conclusions et Perspectives

## 1 Synthèse des résultats

On s'est intéressé dans la présente étude à l'analyse et à la validation d'une méthode de dosage d'un produit fini par Chromatographie Liquide Haute Performance à polarité de phases inversée couplée à un détecteur UV monochromatique.

Dans la première partie, nous avons déterminé quelques paramètres optimaux permettant l'analyse du Phloroglucinol par HPLC/UV en utilisant une colonne de type de type MACHEREY-NAGEL C18 pyramid (4\*250 mm ; 5 $\mu$ m), à  $\lambda = 265$  nm, une phase mobile constituée d'un mélange binaire acétonitrile-tampon phosphate  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  10 mM de pH 3 (92:8 ; v/v), à débit 1 mL min<sup>-1</sup> et à une température de 25°C.

La spécificité/ sélectivité, la linéarité, l'exactitude et la fidélité de la méthode de dosage du marqueur analytique (PA) dans le produit fini sont démontrées sur les intervalles :

- 0,10 à 0,24 mg/comprimé de marqueur analytique dans le produit fini.

Ces intervalles sont cohérents avec les critères d'acceptation :

- $\geq 0,14$  mg/ comprimé de marqueur dans le produit fini ;

La méthode analytique est validée pour les limites d'acceptation définies, et sur les intervalles décrits. Nous avons pu montrer que la méthode de dosage adoptée du marqueur analytique dans le produit fini par chromatographie liquide est validée en termes de spécificité / sélectivité, linéarité, exactitude et fidélité entre 192  $\mu\text{g mL}^{-1}$  et 288  $\mu\text{g mL}^{-1}$ .

La limite de détection de 0.003660 mg/ml, et les limites de quantification inférieure et supérieure du Phloroglucinol sont respectivement : 99.29 mg/ml et 99.84 mg/ml.

Cette méthode validée est appliquée pour le dosage d'une forme pharmaceutique le «Phloroglucinol LDM<sup>®</sup> 80 et 160 mg» avec un excellent taux de recouvrement.



## 2 Commentaires sur le protocole de validation établi

Le protocole de validation développé à partir le guide de validation analytique ICH Q2(R1) est bien applicable aux validations analytiques des méthodes de dosage des médicaments.

Cette représentation va pouvoir aider l'analyste à justifier que les critères d'acceptation établis sont adéquats, adaptés à la méthode analytique et au produit auquel elle est appliquée.

L'exactitude obtenue à partir des résultats de validation peut permettre de soutenir la justification d'un écart de teneur en substance active supérieur à  $\pm 5\%$  dans le cas des méthodes de dosage où la variabilité est relativement importante, du fait de l'erreur analytique et/ou du produit considéré.

Il est en effet plus aisé de commenter une représentation visuelle des résultats obtenus, plutôt qu'une liste de performances diverses de la méthode, dont il peut être difficile de voir l'impact sur les résultats.

## 3 Perspectives

Ce protocole de validation a été approuvé par le responsable du laboratoire CQ de LDM- groupe et est désormais utilisé pour les validations analytiques au sein du laboratoire de LDM- groupe. Il n'est cependant pas figé et doit être adapté au produit et à la méthode d'analyse à valider.

La mise en place des critères choisis comme outil de décision pour les validations analytique est une avancée majeure consécutive à l'adaptation de ce protocole de validation.

Ce protocole pourra par exemple servir de base au développement d'une procédure plus adaptée aux méthodes analytiques permettant de doser de faibles quantités de marqueurs, en utilisant par exemple la méthode des ajouts dosés.

Le profil d'exactitude pourra cependant être conservé comme outil de décision, en raison des multiples avantages qu'il offre.





*Conclusion générale*



La validation des procédures analytiques est aujourd'hui un principe accepté et utilisé dans tous les domaines d'activité générateurs de résultats de mesures.

Cependant, bien que ce principe soit reconnu comme indispensable à la gestion de la Qualité dans l'industrie pharmaceutique, son application pratique n'est pas toujours aisée.

En effet, bien qu'il existe de nombreux documents officiels décrivant les critères de validation à tester, les sources proposant des solutions pratiques en termes de protocoles expérimentaux sont rares.

De plus, le protocole expérimental de validation devant être adapté au produit étudié, ces quelques guides ne peuvent pas offrir une solution exhaustive applicable sans adaptation à tous les produits possibles.

Les médicaments génériques représentent l'un de ces cas particuliers dont les guides de validation, ainsi que les guidelines actuellement en vigueur, ne tiennent pas compte. L'adaptation de ces textes est donc nécessaire afin de mener à bien les validations analytiques pour ce type de produits, nécessitant une réflexion importante et une bonne connaissance à la fois de la validation analytique, et des spécificités de ces produits.

C'est dans ce cadre que ce travail a trouvé toute sa justification.

Une proposition de protocole de validation s'appuyant sur le guide de validation ICH Q2 (R1) a été testée en conditions réelles, pour la validation d'un médicament générique. Cet essai s'est révélé concluant, et a permis de démontrer que les outils statistiques proposés par le guide de validation ICH Q2 (R1) pouvaient être appliqués à la validation analytique des médicaments.

Ce travail représente une porte entrouverte sur ce qui peut être fait dans le domaine de la validation analytique des médicaments, et propose une solution exploitable permettant de satisfaire aux exigences réglementaires en vigueur.

# Bibliographie

- AFSSAPS. *PHLOROGLUCINOL SET 80 mg, comprimé orodispersible PHLOROGLUCINOL*. Rapport public d'évaluation, LABORATOIRE BIOGARAN, Direction de l'Évaluation des Médicaments et des Produits Biologiques, 2007.
- Albert, A. «Analyses statistiques multivariées.» 2006, éd. Edition de l'ULg.
- ANSM. «PHLOROGLUCINOL BIOGARAN 80 mg, comprimé orodispersible - Résumé des caractéristiques du produit.» 28 Mars 2018. <http://agence-prd.ansm.sante.fr/php/ecodex/rcp/R0306665.htm> (accès le Mai 20, 2019).
- . «Qu'est-ce que la Pharmacopée ? ANSM Agence nationale de sécurité des médicaments et des produits de santé.» 2017. [http://ansm.sante.fr/Activites/Pharmacopee/Qu-est-ce-que-la-Pharmacopee/\(offset\)/0](http://ansm.sante.fr/Activites/Pharmacopee/Qu-est-ce-que-la-Pharmacopee/(offset)/0) (accès le 04 20, 2019).
- ANSM. «Agence Nationale de Sécurité du Médicament et des Produits de Santé. Bonnes pratiques de fabrication.» n° N°2015/12 bis. 2015.
- AOAC. «Association of Official Analytical Chemists (AOAC) : Official Methods of Analysis.» 1990, éd. 15th: 673-674.
- Azaïs, J.M., et J.M. Bardet. *Le modèle linéaire par l'exemple, Régression, analyse de la variance et plans d'expérience illustrés avec R, SAS et Splus*. Paris: Dunod, 2006.
- Bekka, Salima, et Kahina Tifaoui. «Validation de méthode de dosage pharmaceutique Application au dosage des parabènes dans Maxilase® et au dosage du saccharose dans Rhinathiol®.» *Mémoire de fin de cycle, En vue de l'obtention du diplôme de Master en biochimie Option : Pharmacologie moléculaire*. Université Abderrahmane Mira de Bejaia, 2014.
- Bimazubute, M. A., et al. «Liquid chromatographic determination of enrofloxacin in nasal secretions and plasma of healthy pigs using restricted access material for on-line sample clean-up.» *J. Chromatogr. A*, 2008: 456.
- Bouabidi, A. «Étude Critique des Différentes Approches de Validation des Méthodes Analytiques.» *Thèse Présentée en vue d'obtenir le diplôme de DOCTORAT en Sciences Pharmaceutiques*. Casablanca, Maroc: Faculté des Sciences Ben M'Sik, 26 avril 2013.
- Bouklouze, A., et K. Digua. «démarche statistique de la validation analytique dans le domaine pharmaceutique (Méthodologie et exemple pratique).» *Les technologies de laboratoire*, 2006.
- Boulanger, B., P. Chiap, W. Dewe, J. Crommen, et P. Hubert. «An analysis of the SFSTP guide on validation of chromatographic bioanalytical methods: Progresses and limitations.» *J. Pharm. Biomed. Anal.*, 2003: 753.
- BPF. «Bonne Pratique de Fabrication de ansm - Ministère des Solidarités et de la Santé.» février 2016. [https://solidarites-sante.gouv.fr/IMG/pdf/bpf\\_de\\_ansm.pdf](https://solidarites-sante.gouv.fr/IMG/pdf/bpf_de_ansm.pdf).
- Burgot, G., et J.L. Burgot. *Méthodes instrumentales d'analyse chimique et applications : méthodes chromatographiques, électrophorèses, méthodes spectrales et méthodes thermiques*. édition Tec. 3e édition vols. Paris : , 2011.
- Caporal-Gautier, J., et al. *Guide de validation analytique. Rapport d'une commission SFSTP. I : Méthodologie, STP Pharma Pratiques*. Vol. 2. STP Pharma Pratiques, 1992-a.
- Caporal-Gautier, J., J.M. Nivet, P. Algranti, et et al. «Analytical validation guide, Part I.» *STP Pharma Pratiques*, 1992-b: 205-226.
- Caporal-Gautier, J.; Nivet, J.M.; Algranti, P.; et al. «Analytical validation guide, Part II.» *STP Pharma Pratiques*, 1992-c: 227-239.

- Carr, GP., et JC. Wahlich. «A practical approach to method validation in pharmaceutical analysis.» *J Pharm. Biomed Anal.*, 1990: 613-618.
- Cavalier, E., et al. «Analytical validation of the BAP OSTASE on Liaison (DiaSorin).» *Clin. Chem. Lab. Med.*, 2010: 67.
- Chaloner-Larsson , G, R Anderson , A Egan , MA Da Fonseca Costa Filho , et JF Gomez Herrera . «World Health Organization. Vaccine Supply and Quality Unit.» *Guide OMS des normes relatives aux bonnes pratiques de fabrication (BPF) [Internet]*. Organisation Mondiale de la Santé. 1997. <http://www.who.int/iris/handle/10665/68527> (accès le mai 12, 2019).
- Chapuzet , E., et N. Mercier . «Méthodes chromatographiques de dosage dans les milieux biologiques : stratégie de validation.» *STP Pharma Pratiques*, 1997: 169-194.
- CTD. «M4 : The Common Technical Document.» *ICH harmonisation for better health*. July 2003. <http://www.ich.org/products/ctd.html> (accès le mai 02, 2019).
- Defarge , Juliette. *La povidone : découverte et utilisations, thèse de doctorat d'état en Pharmacie*. Université de POITIERS, 18 Mai 2016.
- Désenfant, M., M. Priel, et C. Rivier. *De la validation des méthodes d'analyse à l'évaluation de l'incertitude des résultats de mesure*. Actes Congrès Int Métrologie Toulon., 2003.
- Douglas , A. Skoog, F. James Holler, et A. Niema Tiothy . *Principes d'analyse instrumentale*. 5ème. Amerique: de boeck, 2003.
- Duarte , A.C., et S. Capelo . «Application of Chemometrics in Separation Science.» *Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies*, 2006: 114-1176.
- Dubois, N., B. Debrus, P. Hubert, et C. Corinne. «Validated quantitative simultaneous determination of cocaine opiates and amphetamines in serum by U-HPLC coupled to tandem mass spectrometry .» *Acta Clin. Belg.*, 2010: 75.
- EDQM. 5.1.6. . *Méthodes alternatives pour le contrôle de la qualité microbiologique*. Strasbourg: Conseil de l'Europe: Pharmacopée européenne. 8e éd, 2014.
- EDQM.1. *Prescriptions générales*. Strasbourg: Conseil de l'Europe: Pharmacopée européenne 8e éd, 2014.
- EL Bourkadi, ANOUAR. *VALIDATION ANALYTIQUE PAR L'APPROCHE DE L'ERREUR TOTALE D'UNE METHODE DE DOSAGE DU CLONAEPAM PAR HPLC*. Université Sidi Mohammed Ben Abdellah, Faculté des Sciences et Techniques,: MEMOIRE DE FIN D'ETUDES Pour l'Obtention du Diplôme de Master Sciences et Techniques, 2016.
- EMA. «European Medicines Agency. About us. EUROPEAN MEDICINES AGENCY SCIENCE MEDICINES HEALTH.» 1995. [http://www.ema.europa.eu/ema/index.jsp?curl=pages/about\\_us/document\\_listing/document\\_listing\\_000426.jsp&mid](http://www.ema.europa.eu/ema/index.jsp?curl=pages/about_us/document_listing/document_listing_000426.jsp&mid), (accès le avril 10, 2019).
- . «European Medicines Agency. Guideline on bioanalytical method validation.» 2011.
- Ermer, J. , et C. Burgess. *Limite de détection et de quantification. Validation de la méthode dans l'analyse des produits pharmaceutiques. Une Guide de bonnes pratiques*. Wiley-VCH: Weinheim, 2005.
- Eurachem. *The fitness for purpose of analytic method. A laboratory guide to method*, 1998.
- EURACHEM. «The Fitness for Purpose of Analytical methods. A Laboratory Guide to Method Validation and Related Topics.» 1998.
- FDA. «Food and Drug Administration, Analytical Procedures and Methods Validation for Drugs and Biologics- Guidance for Industry.» 2015. <http://www.fda.gov/downloads/drugs/guidancecomplianceregulatoryinformation/guidances/ucm386366.pdf>.
- . *Food and Drug Administration. Guidance for Industry Bioanalytical Method Validation Draft Guidance. 2013*. 2013.

- FDA. «Food and Drug Administration.21 CFR Part 211 - Current Good Manufacturing Practices.» 2015.
- Feinberg , M. «Labo-Stat, Guide de validation des méthodes d'analyse.» 2012. <http://www.ichq3d.fr/Fiches-Experts>.
- Feinberg , M, B Boulanger, W Dewe, et Ph Hubert. «New advances in method validation and measurement uncertainty aimed at improving the quality of chemical data.» 2004: 502 – 514.
- Feinberg , M. «Validation of analytical methods based on accuracy profiles.» *Journal of Chromatography A*, 2007-b: 174-183.
- Feinberg , M., B. Boulanger , W. Dewé , et P. Hubert. «New advances in method validation and measurement uncertainty aimed at improving the quality of chemical data.» *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 2004: 502-514.
- Feinberg , M.; Laurentie , M. «A global approach to method validation and measurement uncertainty.» *Accreditation and Quality Assurance*, 2006: 3-9.
- Feinberg, M. «Chapitre 2 - Validation et cycle de vie. In: LABO-STAT Guide de validation des méthodes d'analyse.» Lavoisier, 2009-b. 33-46.
- . «-LABO-STAT - Guide de validation des méthodes d'analyse.» Lavoisier Edition Tec & Doc, 2009-a. 384 pages.
- Feinberg, Max. *La Validation des Méthodes d'Analyse*. Masson, 1996.
- Fleury, J. «Introduction à l'usage des méthodes statistiques en pharmacie.» Genève: médecine hygiène, 1987.
- FPAM. *The Fitness for Purpose of Analytical Methods: A Laboratory guide to method validation and related Topics*. Eurachem, Teddington, Middlesex. UK, 1998.
- Girault, MJ. «La validation: un outil essentiel dans la culture qualité.» *STP Pharma Prat.* 7, n° 5 (1997): 346-8.
- Goupy, J. «Stratégie de recherche, Définition et objectifs des méthodes des plans d'expériences.» Paris, France: Dunod, 1996-a.
- Goupy, J. «Plans factoriels à deux niveaux, La méthode des plans d'expériences.» Paris, France: Dunod, 1996-b.
- Guide. 2009.
- Gustavo González , A., et M. Ángeles Herrador. «A practical guide to analytical method validation, including measurement uncertainty and accuracy profiles.» *Trends in Analytical Chemistry.*, 2007: 227-238.
- HARKE GROUP. *Products : A-Z: Polyvinyl pyrrolidone*. 2016. [http://www.harke.com/index.php?id=0&L=2&bc=131;130;317;320&tx\\_hkcatalog\\_pi1\[test42\]=1&tx\\_hkcatalog\\_pi1\[productid\]=646&tx\\_hkcatalog\\_pi1\[country\]=9999&tx\\_hkcatalog\\_pi1\[legal\]=294&tx\\_hkcatalog\\_pi1\[mn\]=43;id12&tx\\_hkcatalog\\_pi1\[newsid\]=-1](http://www.harke.com/index.php?id=0&L=2&bc=131;130;317;320&tx_hkcatalog_pi1[test42]=1&tx_hkcatalog_pi1[productid]=646&tx_hkcatalog_pi1[country]=9999&tx_hkcatalog_pi1[legal]=294&tx_hkcatalog_pi1[mn]=43;id12&tx_hkcatalog_pi1[newsid]=-1), (accès le mai 01, 2019).
- Hassonville, H. D., et al. «Development and validation of a high-performance liquid chromatographic method for the determination of cyproterone acetate in human skin.» *J. Pharm. Biomed. Anal.*, 2004: 133.
- Helmut , Fiege, et al. "*Phenol Derivatives*" in *Ullmann's Encyclopedia of Industrial Chemistry*. Weinheim: Wiley-VCH, 2005.
- Huber, L. «Validation of Analytical Methods.» *Agilent Technology*. 2010. <https://www.agilent.com/cs/library/primers/Public/5990-5140EN.pdf>.
- Hubert , Ph., et al. «Validation of quantitative analytical procedures: harmonization of approaches. Part II. Statistics.» *STP Pharma Pratiques*, 2006-a: 30-60.

- Hubert, BAZIN. «Validation de méthodes analytiques.» *Hubert BAZIN conseil et formation*. 2016. <http://bazinconseil.fr/validation-de-methodes.html> (accès le 02 19, 2019).
- Hubert, C., et al. «Development and validation of a sensitive solid phase extraction/hydrophilic interaction liquid chromatography/mass spectrometry method for the accurate determination of glucosamine in dog plasma.» *J. Chromatogr. A*, 2010: 3275.
- Hubert, P., et al. «Harmonization of strategies for the validation of quantitative analytical procedures: a SFSTP proposal part IV. Examples of application.» *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 2008: 760-771.
- . «Validation of quantitative analytical procedures: harmonization of approaches. Part III. Examples of application.» *STP Pharma Pratiques*, 2006-b: 87-121.
- Hubert, Ph, et al. «Validation of quantitative analytical procedures, Harmonization of approaches Part I.» *STP Pharma Pratiques* 13, n° 3 (2003): 101-138.
- Huet , S., A. Bouvier , M.A. Poursat , et E. Jolivet . *Statistical Tools for Nonlinear Regression* . New-York,: Springer Verlag, 2004.
- ICH . *Guidelines;/ Work products [Internet]. ICH harmonisation for better health*. 2016-b. <http://www.ich.org/products/guidelines.html>.
- ICH. *Harmonised Tripartite Guideline. Good Manufacturing Practices Guide for Active Pharmaceutical Ingredients Q7*. 2000.
- . *History [Internet]. ICH harmonisation for better health*. 22 mai 2016. Disponible sur: <http://www.ich.org/about/history.html>.
- ICH. «International Conference on Harmonization of Technical Requirements for registration of Pharmaceuticals for Human Use, Topic Q2 (R1): Validation of Analytical Procedures: Text and Methodology.» 2005-b.
- . «International Conference on Harmonization, ICH Q2B, Validation of Analytical Procedures, Methodology.» 1996.
- . «Note for guidance on validation of analytical procedures: Text and methodology. ICH Q2 (R1) Validation of Analytical Procedures: Text and Methodology.» 2005-a. <https://www.ich.org/home.html> (accès le avril 28, 2019).
- ICH;. *Organisation of ICH; ICH harmonisation for better health*. 2016. <http://www.ich.org/about/organisation-of-ich.html>.
- ISO. «Application of the statistics-accuracy (trueness and precision) of the results and methods of measurement – Parts 1 to 6, International Organization of Standardization (ISO), ISO 5725.» Geneva, Switzerland, 1994.
- . «International Organization for Standardization (ISO).» *ISO 5725-1:1994 Exactitude (justesse et fidélité) des résultats et méthodes de mesure - Partie 1: Principes généraux et définitions*. . 2012.
- . «International Organization for Standardization , ISO 17025:2005 Exigences générales concernant les compétences des laboratoires d'étalonnage et d'essai.» 2010.
- ISO/IEC. «Guide 43-1 Essais d'aptitude des laboratoires par intercomparaison-partie 1 développement et mise en oeuvre de systèmes d'essais d'aptitude.» 2005.
- ISO/IEC:17025. «General Requirements for the Competence of Testing and calibration Laboratories.» *International Organization for Standardization (ISO)*. Geneva., 2005.
- IUPAC. *Technical Report Harmonized guidelines for single laboratory validation of methods of analysis* . 2002.
- Jean-Louis , CUQ. . *COURS : la chromatographie liquide*. 2019. [https://www.academia.edu/33835757/CHROMATOGRAPHIE\\_LIQUIDE](https://www.academia.edu/33835757/CHROMATOGRAPHIE_LIQUIDE) (accès le mai 24, 2019).



- Lantéri , P, et R Longera y . *Chimiométrie : le mariage réussi entre les sciences analytiques et l'informatique*. Vol. 24, M17 – M27. 1996.
- Leem Les entreprises du médicament. «QUALITE DU MEDICAMENT : Comment l'assurer en restant compétitif ?» 2013. <http://www.leem.org/qualite-du-medicament-comment-lassurer-en-restant-competitif>.
- Marini, R. D., E. Rozet, C. Hubert, E. Ziemons, et P. Hubert. «Estimation of uncertainty from the total error strategy: Application to internal and normative methods.» *Acta Clin. Belg.* , R.D. Marini, E. Rozet, C. Hubert, E. Ziemons, P. Hubert. 2010: 100.
- Miri, Faïza. «ENREGISTREMENT D'UN MÉDICAMENT GÉNÉRIQUE FABRIQUÉ EN ALGÉRIE, ASPECTS TECHNICO-RÉGLEMENTAIRES DU CONTRÔLE DE QUALITÉ.» Mémoire de fin d'études pour l'obtention du Diplôme de Master en Pharmacie Industrielle, Faculté de Technologie, Université Abou Bekr BELKAID de Tlemcen, 2014.
- Pandita , R., A. Rana , N. Seth , et R. Bala. «Introduction and General Overview of Pharmaceutical Process Validation.» *a Review. International Research Journal of Pharmacy*. 2012. [http://www.irjponline.com/admin/php/uploads/1166\\_pdf.pdf](http://www.irjponline.com/admin/php/uploads/1166_pdf.pdf) (accès le mai 18, 2019).
- Parikh, D.M. *Handbook of pharmaceutical granulation technology. Drugs and pharmaceutical science*. Vol. 81. MARCEL DEKKER, 1997.
- Pierre, M. «Validation des méthodes analytiques : les fondations de la conformité dans l'industrie pharmaceutique.» *Mielabelo*. 2015. <http://www.mielabelo.be/main/index.php/fr/publications/whitepapers/item/312-validation-methodes-analytiques> (accès le avril 15, 2019).
- Rius, A., I. Ruisanchez, M.P. Callao, et F.X Rius. «Reliability of analytical systems: use of control charts, time series models and recurrent neural networks (RNN), Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems,» Vol. 40. 1998. 1–18.
- Rouessac , F., A. Rouessac , et D. Cruché. *Analyse chimique : méthodes et techniques instrumentales modernes : cours et exercices*. 6e édition vols. Paris: Dunod, 2004.
- Rowe, R. C., P. J. Sheskey, et P. Weller. *Handbook of pharmaceutical excipients*. 5ème . PHARMACETICAL PRESS., 2003.
- Rozet , E. «Improvement of the predictive character of test results issued from analytical methods life cycle.» *Thèse présentée en vue de l'obtention du grade de Docteur en Sciences Pharmaceutiques*. Université de Liège, 2008.
- Rozet, E., et al. «Improvement of the decision efficiency of the accuracy profile by means of a desirability function for analytical methods validation - Application to a diacetylmonoxime colorimetric assay used for the determination of urea in transdermal iontophoretic.» *ex. Anal. Chim. Acta.*, 2007: 239.
- Sandle, T . «Approaching the Selection of Rapid Microbiological Methods.» *J Valid Technol* 20(2) (2014): 1-10.
- Staes, E., E. Rozet, B. Ucakar, P. Hubert, et V. Prétat. «Validation of a method for the quantitation of ghrelin and unacylated ghrelin by HPLC.» *J. Pharm. Biomed. Anal.*, 2010: 633.
- Tenenhaus, M. «La régression PLS, Théorie et Pratique.» Technip., 1998.
- Thompson, M. *S.L.R. Ellison, undR. Wood: Harmonized guidelines for single-laboratory validation of methods of analysis*. Pure Appl. Chem., 2002, 835-855.
- USFG. *US Federal Government, Guidance for industry: Bioanalytical Method Validation, US Department of Health and Human Services, Food and Drug Administration, Center for Drug Evaluation and Research (CDER), Center for Biologics Evaluation and Research (CBER)*. Rockville, MD, USA, May 2001.

- USP <1223> . *United States Pharmacopeial Convention. <1223> Validation of alternative microbiological methods. In: USP 39 NF 34. 39<sup>e</sup>me.* United States Pharmacopeial Convention. <1223> Validation of alternative micro Rockville, MD: The United States Pharmacopeial Convention, 2016.
- USP. *United States Pharmacopeial Convention. <1225> Validation of compendial procedures. In: USP 39 NF 34. Vol. 39e édition.* Rockville, MD: The United States Pharmacopeial Convention, 2016.
- . *United States Pharmacopeial Convention. <1225> Validation of compendial procedures. In: USP 39 NF 34. 39<sup>e</sup>me.* Rockville, MD: The United States Pharmacopeial Convention, 2016-a.
- . *United States Pharmacopeial Convention. <1226> Verification of compendial procedures. In: USP 39 NF 34. 39<sup>e</sup>me.* Rockville, MD: The United States Pharmacopeial Convention, 2016-b.
- USPC. «The United States Pharmacopeial Convention. Legal Recognition of USP Standards. U.S. Pharmacopeial Convention.» 2016. <http://www.usp.org/about-usp/legal-recognition>.
- VIDAL. *Eureka Santé par VIDAL.fr.* 19 Mars 2019. <https://eurekasante.vidal.fr/medicaments/vidal-famille/medicament-jspasf01-SPASFON.html#weVpzd0uToUWVr4b.99>. (accès le avril 22, 2019).
- WELAC . *Guidance Documents WGD2, Eurachem/Western European Laboratory Accreditation Cooperation (WELAC) Chemistry.* UK, firsted: Teddington, 1993.



*Annexes*



# Annexe 1

## Les équipements utilisés pour cette étude



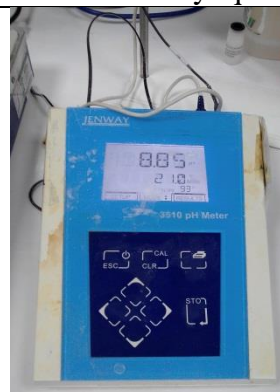
Système d'HPLC (Waters Alliance 2695)



Balance analytique



Spectrophotomètre UV



pH-mètre (JENWAY 3510)



**La colonne MACHEREY-NAGEL C18 pyramid** : Gel de silice octadécylsilylé pour chromatographie, à groupements polaires intercalés, postgreffé



Bain ultrason Fisherbrand®  
FB15066

# Annexe 2

## Formules de calcul statistique

Sur un logiciel "Microsoft Excel", programmé par LDM, nous avons introduit nos valeurs expérimentales, les formules de calcul suivantes :

### 1. Estimation des droites de régression linéaire :

- ❖ Une partie du modèle est **déterministe** et peut s'écrire  $y = f(x)$ .
  - ❑ L'équation de la droite : L'équation de la droite de régression est calculée par la méthode des moindres carrés.

$$Y = a x + b$$

- ❑ Calcul de la moyenne empirique de (X) :

$$\bar{X} = \frac{1}{N} \sum_{i=0}^n x_i$$

- ❑ Calcul de la moyenne empirique de (Y) :

$$\bar{Y} = \frac{1}{N} \sum_{i=0}^n y_i$$

N : représente le nombre de solutions étalons.

- ❖ Calcul de la pente (a) :
  - ❑ Les valeurs de (a) et (b) sont déterminés par les relations suivantes :

$$a = \frac{\sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})(y_i - \bar{y})}{\sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})^2}$$

$$b = \bar{y} - a \bar{x}$$

Avec :

a : La pente ; b : Ordonnée à l'origine ;  $x_i$  : Concentration ;  $Y_i$  : la réponse instrumentale mesurée ;  $\bar{y}$  : La moyenne des surfaces ;  $f$ : la fonction de réponse de l'instrument.

- ❑ formule de coefficient de corrélation est donné par la relation suivante:

$$R^2_{xy} = \frac{\sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})(y_i - \bar{y})}{\sqrt{(\sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})^2) (\sum_{i=1}^n (y_i - \bar{y})^2)}}$$

$\bar{X}$  : La moyenne des concentrations  $x_i$  ;

$\bar{Y}$  : La moyenne des réponses instrumentales mesurées  $y_i$  ;

□ SCE : Somme des Carrés des Écarts à la moyenne :  $SCE_x = \sum_{i=0}^n (X_i - \bar{X})^2$  ;

□ SPE : Somme des Produits des Écarts aux moyennes :

$$SPE_{XY} = \sum_{i=0}^n (X_i - \bar{X})(y_i - \bar{y})$$

### 1.1. Test de *Student* (t) :

❖ Pour vérifier si la pente de la droite d'ajout globale est égale à 1, on va effectuer un test en calculant le critère  $t_{cal}$  qui suit une loi de *Student* à  $N - 2$  degrés de liberté.

— Si  $t_{cal}$  est inférieur ou égal à la valeur critique lue dans la table de *Student* au risque  $1-\alpha/2$  avec  $N - 2$  degrés de liberté, il est possible de conclure à l'absence d'interférences et que la spécialité est acceptable.

— Si  $t_{cal}$  est supérieur à la valeur critique, la méthode n'est pas spécifique.

On a 2 hypothèses :

$H_0$ : absence d'une pente significative ( $H_0: u=0$  contre)

$H_1$ : existence d'une pente significative ( $H_1: u \neq 0$  au risque d'erreurs  $\alpha$ )

□ La formule de calcul:

$$t_{calculé} = \frac{|b|}{\sigma_b}$$

Avec :  $b$  : l'ordonnée à l'origine ; et  $\sigma_b$  : Écartype de la variable de l'ordonnée à l'origine

□ **Comparaison des pentes des droites de régression des deux pentes** : Cette comparaison s'effectue par le biais de test *Student* suivant :

$$t_{cal} = |a_1 - a_2| / \sqrt{\sigma^2 a_1 + \sigma^2 a_2}$$

Avec :  $\sigma^2 a = S^2 r / SCE_x$

D1 : Droite de régression du principe actif seul.

D2 : Droite de régression de la forme pharmaceutique reconstituée.

$a_1$  : la pente de la droite D1.

$a_2$  : la pente de la droite D2.

$\sigma^2 a_1$ : Variance de la pente de la droite D1.

$\sigma^2 a_2$ : Variance de la pente de la droite D2.

- **Comparaison des ordonnées à l'origine des droites de régression des deux pentes** : Cette comparaison s'effectue par le biais du test *Student* suivant :

$$t_{cal} = |b_1 - b_2| / \sqrt{\sigma^2 b_1 + \sigma^2 b_2}$$

Avec  $\sigma^2_b = S^2_r [1/N + ((\bar{X}_{ij})^2 / S^2_{ij} (N-1))]$

$b_1$  : la pente de la droite D1.

$b_2$  : la pente de la droite D2.

$\sigma^2 b_1$  : Variance de la pente de la droite D1.

$\sigma^2 b_2$  : Variance de la pente de la droite D2.

## 2. Estimation de Fidélité :

- ❖ Il est aussi possible de fournir un estimateur de la variance résiduelle  $\sigma^2$ , noté  $s_e^2$  et calculé à partir de la formule suivante :

$$\sigma^2 = s_e^2 = \frac{\sum_{i=0}^n (X_i - \bar{X})^2 - a \sum_{i=0}^n (X_i - \bar{X})(y_i - \bar{y})}{N - 2}$$

- formule de calcul du coefficient de variation est donné par la relation suivante :

$$CV(\%) = 100 \times \frac{\sqrt{\sigma^2}}{\bar{X}} = 100 \times \frac{\sigma}{\bar{X}}$$

Avec :  $\sigma$  : La variance, et  $\bar{X}$  : Moyenne des groupes.

## 3. Estimation de l'exactitude :

- *Le recouvrement*:

$$\% = \frac{\text{surface essai} \times \text{prise d'essai du témoin}}{\text{surface témoin} \times \text{prise d'essai de l'essai}}$$

### Table de la Loi de Student

Cette table donne les fractiles de la loi de Student à N-2 degrés de liberté : valeur t ayant la probabilité  $\alpha$  d'être dépassée en valeur absolue :  $P(-t < T < t) = 1 - \alpha$ . Ou:  $P(T < -t) = \alpha/2 = P(T > t)$

	α bilatéral		1 - α / 2 (unilatéral)							N-2 (degré de liberté)				
	0,9	0,8	0,7	0,6	0,5	0,4	0,3	0,2	0,1	0,05	0,02	0,01	0,005	0,001
	0,55	0,6	0,65	0,7	0,75	0,8	0,85	0,9	0,95	0,975	0,99	0,995	0,9975	0,9995
1	0,1584	0,3249	0,5095	0,7265	1	1,3764	1,9626	3,0777	6,3137	12,706	31,821	63,656	127,32	636,58
2	0,1421	0,2887	0,4447	0,6172	0,8165	1,0607	1,3862	1,8856	2,92	4,3027	6,9645	9,925	14,089	31,6
3	0,1366	0,2767	0,4242	0,5844	0,7649	0,9785	1,2498	1,6377	2,3534	3,1824	4,5407	5,8408	7,4532	12,924
4	0,1338	0,2707	0,4142	0,5686	0,7407	0,9417	1,1896	1,5332	2,1318	2,7765	3,7469	4,6041	5,5975	8,6101
5	0,1322	0,2672	0,4082	0,5594	0,7267	0,9195	1,1558	1,4759	2,0152	2,5706	3,3649	4,0321	4,7733	6,8685
6	0,1311	0,2648	0,4043	0,5534	0,7176	0,9057	1,1342	1,4398	1,9432	2,4469	3,1427	3,7074	4,3168	5,9587
7	0,1303	0,2632	0,4015	0,5491	0,7111	0,8961	1,1192	1,4149	1,8946	2,3646	2,9979	3,4995	4,0294	5,4081
8	0,1297	0,2619	0,3995	0,5459	0,7064	0,8889	1,1081	1,3968	1,8595	2,3065	2,8965	3,3554	3,8325	5,0414
9	0,1293	0,261	0,3979	0,5435	0,7027	0,8834	1,0997	1,3831	1,8335	2,2622	2,8214	3,2498	3,6896	4,7809
10	0,1289	0,2602	0,3966	0,5415	0,6998	0,8791	1,0931	1,3722	1,8125	2,2281	2,7638	3,1693	3,5814	4,5868
11	0,1286	0,2596	0,3956	0,5399	0,6974	0,8755	1,0877	1,3634	1,7959	2,2011	2,7181	3,1058	3,4966	4,4369
12	0,1283	0,2597	0,3947	0,5386	0,6955	0,8726	1,0832	1,3562	1,7823	2,1788	2,6813	3,0545	3,4284	4,3178
13	0,1281	0,2586	0,3945	0,5375	0,6938	0,8702	1,0795	1,3502	1,7709	2,1604	2,6503	3,0123	3,3725	4,2209
14	0,128	0,2582	0,3933	0,5366	0,6924	0,8681	1,0763	1,3453	1,7613	2,1448	2,6245	2,9768	3,3257	4,1403
15	0,1278	0,2579	0,3928	0,5357	0,6912	0,8662	1,0735	1,3406	1,7531	2,1315	2,6025	2,9467	3,2868	4,0728
16	0,1277	0,2576	0,3923	0,535	0,6901	0,8644	1,0711	1,3368	1,7459	2,1199	2,5835	2,9208	3,2529	4,0149
17	0,1276	0,2573	0,3919	0,5344	0,6892	0,8633	1,0691	1,3334	1,7396	2,1098	2,5669	2,8982	3,2224	3,9651
18	0,1275	0,2571	0,3915	0,5338	0,6884	0,8624	1,0672	1,3304	1,7341	2,1009	2,5524	2,8784	3,1966	3,9217
19	0,1274	0,2569	0,3912	0,5333	0,6876	0,8616	1,0655	1,3277	1,7291	2,0931	2,5395	2,8609	3,1737	3,8833
20	0,1273	0,2567	0,3909	0,5329	0,687	0,8608	1,064	1,3253	1,7247	2,086	2,5283	2,8453	3,1534	3,8496
21	0,1272	0,2566	0,3906	0,5326	0,6864	0,8599	1,0627	1,3232	1,7207	2,0796	2,5176	2,8314	3,1352	3,8193
22	0,1271	0,2565	0,3904	0,5324	0,6858	0,8583	1,0614	1,3212	1,7171	2,0739	2,5083	2,8188	3,1188	3,7922
23	0,1271	0,2564	0,3902	0,5322	0,6853	0,8575	1,0603	1,3195	1,7139	2,0687	2,4999	2,8073	3,1046	3,7676
24	0,127	0,2563	0,39	0,532	0,6848	0,8566	1,0593	1,3178	1,7109	2,0639	2,4922	2,7975	3,0905	3,7454
25	0,1269	0,2562	0,3898	0,5318	0,6844	0,8556	1,0584	1,3163	1,7081	2,0595	2,4851	2,7874	3,0782	3,7251
26	0,1269	0,2561	0,3896	0,5316	0,684	0,855	1,0575	1,315	1,7056	2,0555	2,4786	2,7787	3,0669	3,7067
27	0,1268	0,256	0,3894	0,5314	0,6836	0,8545	1,0567	1,3137	1,7033	2,0518	2,4727	2,7707	3,0565	3,6895
28	0,1268	0,2559	0,3893	0,5313	0,6833	0,854	1,056	1,3125	1,7014	2,0484	2,4671	2,7633	3,0479	3,6739
29	0,1267	0,2558	0,3892	0,5312	0,683	0,8536	1,0553	1,3114	1,6991	2,0452	2,4623	2,756	3,0385	3,6595
30	0,1267	0,2557	0,3891	0,5311	0,6828	0,8533	1,0547	1,3104	1,6973	2,0423	2,4573	2,75	3,0298	3,646
31	0,1266	0,2556	0,389	0,531	0,6826	0,853	1,0541	1,3095	1,6955	2,0395	2,4528	2,7441	3,0221	3,6335
32	0,1266	0,2555	0,3889	0,5309	0,6824	0,8526	1,0535	1,3086	1,6939	2,0369	2,4487	2,7385	3,0149	3,6218



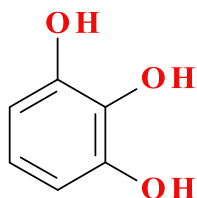
## Annexes

33	0.126 6	0.255 4	0.388 7	0.529 5	0.682	0,852	1,053	1.307 7	1.692 4	2.034 5	2.444 8	2.733 3	3.008 2	3.610 9
34	0.126 6	0.255 3	0.388 6	0.529 4	0.681 8	0.852 3	1.052 5	1.307 9	1.690 9	2.032 2	2.441 1	2.728 4	3.002 4	3.600 7
35	0.126 6	0.255 3	0.388 5	0.529 2	0.681 6	0,852	1,052	1.306 2	1.689 6	2.030 1	2.437 7	2.723 8	2.996 1	3.591 1
36	0.126 6	0.255 2	0.388 4	0.529 1	0.681 4	0.851 7	1.051 6	1.305 5	1.688 3	2.028 1	2.434 5	2.719 5	2.990 5	3.582 1
37	0.126 5	0.255 2	0.388 3	0.528 9	0.681 2	0.851 4	1.051 2	1.304 9	1.687 1	2.026 2	2.431 4	2.715 4	2.985 3	3.573 7
38	0.126 5	0.255 1	0.388 2	0.528 8	0.681	0.851 2	1.050 8	1.304 2	1.686	2.024 4	2.428 6	2.711 6	2.980 3	3.565 7
39	0.126 5	0.255 1	0.388 2	0.528 7	0.680 8	0.850 9	1.050 4	1.303 6	1.684 9	2.022 7	2.425 8	2.707 9	2.975 6	3.558 1
40	0.126 5	0.255	0.388 1	0.528 6	0.680 7	0.850 7	1,05	1.303 1	1.683 9	2.021 1	2.423 3	2.704 5	2.971 2	3.551
41	0.126 4	0.255	0.388	0.528 5	0.680 5	0.850 5	1.049 7	1.302 5	1.682 9	2.019 5	2.420 8	2.701 2	2.967	3.544 3
42	0.126 4	0.255	0.388	0.528 4	0.680 4	0.850 3	1,049 4	1.302 4	1.682	2.018 1	2.418 5	2.698 1	2.963	3.537 7
43	0.126 4	0.254 9	0.387 9	0.528 3	0.680 2	0.850 1	1.049 1	1.301 6	1.681 1	2.016 7	2.416 3	2.695 1	2.959 2	3.531 6
44	0.126	0.254 9	0.387 8	0.528 2	0.680 1	0.849 9	1.048 8	1.301 1	1.680 2	2.015 4	2.414 1	2.692 3	2.955 5	3.525 8
45	0.126 4	0.254 9	0.387 8	0.528 1	0,68	0.849 7	1.048 5	1.300 7	1.679 4	2.014 1	2.412 1	2.689 6	2.952 1	3.520 3
46	0.126 4	0.254 8	0.387 7	0.528 1	0.679 9	0.849 5	1.048 2	1.300 2	1.678 7	2.012 9	2.410 2	2.687	2.948 8	3.514 9
47	0.126 3	0.254 8	0.387 7	0.528	0.679 7	0.849 3	1,048	1.299 8	1.677 9	2.011 7	2.408 3	2.684 6	2.945 6	3.509 9
48	0.126 3	0.254 8	0.387 6	0.527 9	0.679 6	0.849 2	1.047 8	1.299 4	1.677 2	2.010 6	2.406 6	2.682 2	2.942 6	3.505
49	0.126 3	0.254 7	0.387 6	0.527 8	0.679 5	0.849	1.047 5	1.299 1	1.676 6	2.009 6	2.404 9	2,68	2.939 7	3.500 5
50	0.126 3	0.254 7	0.387 5	0.527 8	0.679 4	0.848 9	1.047 3	1.298 7	1.675 9	2.008 6	2.403 3	2.677 8	2,937	3,496
60	0.126 2	0.254 5	0.387 2	0.527 2	0.678 6	0.847 7	1.045 5	1.295 8	1.670 6	2.000 3	2.390 1	2.660 3	2.914 6	3.460 2
70	0.126 1	0.254 3	0.386 9	0.526 8	0,678	0.846 8	1.044 2	1.293 8	1.666 9	1.994 4	2.380 8	2.647 9	2.898 7	3,435
80	0.126 1	0.254 2	0.386 7	0.526 5	0.677 6	0.846 1	1.043 2	1.292 2	1.664 1	1.990 1	2.373 9	2.638 7	2,887	3,416 4
90	0,126	0.254 1	0.386 6	0.526 3	0.677 2	0.845 6	1.042 4	1,291	1,662	1.986 7	2.368 5	2.631 6	2.877 9	3,401 9
100	0,126	0.254	0.386 4	0.526 1	0,677	0.845 2	1.041 8	1.290 1	1.660 2	1,984	2.364 2	2.625 9	2.870 7	3,390 5
110	0,126	0.254	0.386 3	0.525 9	0.676 7	0.844 9	1.041 3	1.289 3	1.658 8	1,981 8	2.360 7	2.621 3	2.864 8	3,381 1
120	0.125 9	0.253 9	0.386 2	0.525 8	0.676 5	0.844 6	1.040 9	1.288 6	1.657 6	1.979 9	2.357 8	2.617 4	2.859 9	3.373 4
130	0.125 9	0.253 9	0.386 2	0.525 7	0.676 4	0.844 4	1.040 6	1.288 1	1.656 7	1.978 4	2.355 4	2.614 2	2.855 7	3,367
140	0.125 9	0.253 8	0.386 1	0.525 6	0.676 2	0.844 2	1.040 3	1.287 6	1.655 8	1.977 1	2.353 3	2.611 4	2.852 2	3,361 3
Infini (loi normale)	0.125 7	0.253 3	0.385 3	0.524 4	0.674 4	0.841 6	1.036 4	1.281 6	1.644 9	1,96	2.326 4	2.575 9	2.807 2	3.290 8

# Annexe 3

## Description des impuretés utilisées lors de la validation et leurs Fiches techniques

**Impureté-A : Benzène-1, 2, 3-triol (pyrogallol),**



ISO 9001-2008 REGISTERED

**LOBA**  
Chemie  
LABORATORY REAGENTS  
& FINE CHEMICALS

**CERTIFICATE OF ANALYSIS**

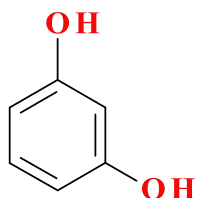
Product Name : - RESORCINOL EXTRA PURE Analyzed on: - 08/08/16  
 Mol. Formula : - C<sub>6</sub>H<sub>6</sub>O<sub>3</sub>  
 Mol. Weight : - 110.11  
 Code no. : - 05560  
 CAS no. : - 108-46-3  
 Lot no. : - L205941608  
 Mfg date : - AUG-2016  
 Exp date : - JUL-2019


Sr. no.	Tests	Specifications	Results
1	Description	White to yellow-beige to pink coloured crystals, granules or flakes	Light yellow flakes
2	Assay	Min. 99.0%	99.85%
3	Melting point	108 - 111°C	110.8°C
4	Phenol	Passes test	<0.1%
5	Sulphated ash	Max. 0.05%	0.005%

*This above product complies as per the specifications of LOBA CHEMIE PVT. LTD.*

## Fiche technique de l'impureté-A (Pyrogallol)

**Impureté-B : Benzène-1,3-diol (résorcinol),**



  
**LOBA Chemie**  
 LABORATORY REAGENTS  
 & FINE CHEMICALS

ISO 9001-2008 REGISTERED

**CERTIFICATE OF ANALYSIS**

Product Name : - RESORCINOL EXTRA PURE  
 Mol. Formula : - C<sub>6</sub>H<sub>6</sub>O<sub>2</sub>  
 Mol. Weight : - 110.11  
 Code no. : - 05560  
 CAS no. : - 108-46-3  
 Lot no. : - L205941608  
 Mfg date : - AUG-2016  
 Exp date : - JUL-2019

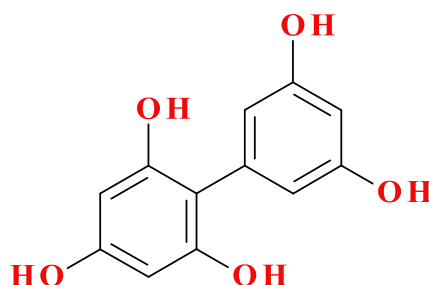
Analyzed on: - 08/08/16


Sr. no.	Tests	Specifications	Results
1	Description	White to yellow-beige to pink coloured crystals, granules or flakes	Light yellow flakes
2	Assay	Min. 99.0%	99.85%
3	Melting point	108 - 111°C	110.8°C
4	Phenol	Passes test	<0.1%
5	Sulphated ash	Max. 0.05%	0.006%

*This above product complies as per the specifications of LOBA CHEMIE PVT. LTD.*

### Fiche technique de l'impureté-B (Résorcinol).

Impureté-D : 2,3', 4, 5', 6-biphénylpentol (phloroglucide).



  
**BIOCHEM**  
 Chemopharma

(100g) at Div / P134

**Certificate Of Analysis**

---

**PYROGALLOL**  
 Analytical Reagent

Manufacture date : 01/2017  
 Expiry date : 01/2022

Product code: 301980100  
 C.A.S. : 87-66-1  
 EINECS : 201-762-9  
 Batch N°: 301980100-0117-011  
 Formula: C<sub>6</sub>H<sub>6</sub>O<sub>3</sub>  
 Mass weight : 126.11

---

**Analysis :**

	Specifications:	Results:
Description	White powder	White powder
Assay	Min.98.5%	99.69%
Melting range	131 -135°C	131°C
Chloride (Cl)	Max. 0.002%	NO.002%
Sulphate (SO <sub>4</sub> )	Max. 0.005%	<0.005%
Ash	Max. 0.02%	0.019%
Loss on drying	Max. 0.04%	0.039%
Gallic acid	To pass the test	To pass the test

### Fiche technique de l'impureté-D (phloroglucide).

## *Annexe 4*

# *Tables des données statistiques selon l'SFSTP de linéarité et d'exactitude*

Tableau 1: Résultats globale de Linéarité sur gamme standard et sur FR : Comparaison des pentes et des ordonnées à l'origine

Linéarité sur gamme standard					Linéarité sur gamme forme pharmaceutique reconstituée				
% théorique	Masse introduite (Concentration)	Aire du pic (absorbance)	(yi-y*) <sup>2</sup>	(xi-x') <sup>2</sup>	% théorique	Masse introduite (Concentration)	Aire du pic (absorbance)	(yi-y*) <sup>2</sup>	(xi-x') <sup>2</sup>
80	48,30	599470,00	1699099,833	148,84	80,00	47,40	584752,00	2076821,452	157,7536
	49,40	611484,00	9529328,011	123,21		47,00	576672,00	20246816,86	167,9616
	48,20	598586,00	870825,2306	151,29		47,90	592715,00	60045,62937	145,4436
90	54,00	674768,00	6242732,016	42,25	90,00	54,10	670846,00	295097,5917	34,3396
	54,40	677178,00	11818,79579	37,21		54,30	678314,00	30255422,66	32,0356
	54,20	680825,00	36565191,27	39,69		54,00	667376,00	2793588,613	35,5216
100	60,30	751357,00	4316,069451	0,04	100,00	60,00	740829,00	12535002,28	0,0016
	60,50	754769,00	939090,2044	5,04871E-29		59,80	745024,00	10018841,72	0,0256
	60,60	752730,00	5402130,623	0,01		59,60	739472,00	15373,84406	0,1296
110	66,60	832546,00	4985608,487	37,21	110,00	66,00	819232,00	211193,4121	36,4816
	66,90	829797,00	18310676,1	40,96		66,10	826731,00	33455514,36	37,6996
	66,30	826311,00	57220,07614	33,64		65,80	822300,00	26205984,08	34,1056
120	72,10	897266,00	4139113,068	134,56	120,00	72,30	892535,00	38996765,67	152,2756
	72,80	907366,00	510776,7878	151,29		72,90	903646,00	7107272,191	167,4436
	72,90	912546,00	10310510,97	153,76		72,20	897566,00	1732,966675	149,8176
Pente droite standard: a1 =		<b>12543,15066</b>			Pente droite FR : a2 =		<b>12553,67955</b>		
SCE/n-2		<b>7659879,811</b>			SCE/n-2		<b>14175036,41</b>		
Erreur pente sa1 =		<b>83,67780055</b>			Erreur pente sa2 =		<b>110,9730796</b>		
Ordonnée à l'origine b1 =		<b>-5060,681817</b>			Ordonnée à l'origine b2 =		<b>-8851,29277</b>		
Erreur ordonnée sb1 =		<b>5112,693527</b>			Erreur ordonnée sb2 =		<b>6724,581608</b>		
Comparaison de la pente a1 avec 0	t calculé	149,898			Comparaison de la pente a2 avec 0	t calculé	113,124		
	t° (0,05, 13)	2,160				t° (0,05, 13)	2,160		
	Condition	t calculé > t°				Condition	t calculé > t°		
	Résultat	<b>VRAI</b>				Résultat	<b>VRAI</b>		
Comparaison de l'ordonnée à l'origine b1 avec 0	t calculé	0,990			Comparaison de l'ordonnée à l'origine b2 avec 0	t calculé	1,316		
	t° (0,05, 13)	2,160				t° (0,05, 13)	2,160		
	Condition	t calculé < t°				Condition	t calculé < t°		
	Résultat	<b>VRAI</b>				Résultat	<b>VRAI</b>		
Comparaison des pentes a1 et a2: METHODE SPECIFIQUE	t calculé	<b>0,076</b>			t calculé	<b>0,076</b>			
	t° (0,05, 26)	<b>2,056</b>			t° (0,05, 26)	<b>2,056</b>			
	Condition	t calculé < t° (0,05, 26)			Condition	t calculé < t° (0,05, 26)			
	Résultat	<b>VRAI</b>			Résultat	<b>VRAI</b>			
Comparaison des ordonnées à l'origine b1 et b2 : ABSENCE D'ERREURS SYSTEMATIQUES	t calculé	<b>0,449</b>			t calculé	<b>0,449</b>			
	t° (0,05, 26)	<b>2,056</b>			t° (0,05, 26)	<b>2,056</b>			
	Condition	t calculé < t° (0,05, 26)			Condition	t calculé < t° (0,05, 26)			
	Résultat	<b>VRAI</b>			Résultat	<b>VRAI</b>			

Tableau 2 : Résultats du traitement statistique de l'exactitude pour la gamme STD et FR.

Linéarité sur gamme standard			Linéarité sur FR		Homogénéité des variances						Moy. du groupe	Variance intra-groupe	Variance inter-groupe	F Calculé	F° (0,05, 4,10)	Validité des moyennes	Index de recouvrement	
% théorique	Masse introduite (Concentration)	Aire du pic (absorbance)	Masse introduite (Concentration)	Aire du pic (absorbance)	masse estimée (xi')	Index de recouvrement	Variance du groupe	C <sub>Calculé</sub>	C° (0,05, 5,2)	Variances homogènes?								
80	48,3	599470	47,4	584752	47,0	99,2	0,171	0,31	0,68	VRAI	99,13	0,191	0,38	1,98	3,48	VRAI	99,2	
	49,4	611484	47,0	576672	46,4	98,7											98,7	
	48,2	598586	47,9	592715	47,7	99,5											99,5	
90	54,0	674768	54,1	670846	53,9	99,6	0,293				99,74						99,6	
	54,4	677178	54,3	678314	54,5	100,3											100,3	
	54,2	680825	54,0	667376	53,6	99,3											99,3	
100	60,3	751357	60,0	740829	59,5	99,1	0,199				99,57						99,1	
	60,5	754769	59,8	745024	59,8	100,0											100,0	
	60,6	752730	59,6	739472	59,4	99,6											99,6	
110	66,6	832546	66,0	819232	65,7	99,6	0,172				100,05						99,6	
	66,9	829797	66,1	826731	66,3	100,3											100,3	
	66,3	826311	65,8	822300	66,0	100,2											100,2	
120	72,1	897266	72,3	892535	71,6	99,0	0,121	99,34	99,0									
	72,8	907366	72,9	903646	72,4	99,4			99,4									
	72,9	912546	72,2	897566	72,0	99,7			99,7									
<b>Pente</b>	<b>12543,15066</b>																<b>Moyenne</b>	<b>99,56</b>
<b>Orodonée</b>	<b>-5060,681817</b>																<b>Ecart type</b>	<b>0,49</b>
																<b>Limite inférieur de l'Intervalle de Confiance</b>	<b>99,29</b>	
																<b>Limite supérieur de l'Intervalle de Confiance</b>	<b>99,84</b>	
																<b>VRAI</b>		

<b>Noms et Prénoms :</b>		
M <sup>elle</sup> . Boukhalfa Imen		<b>Date de soutenance :</b> 23/07/2019
M <sup>elle</sup> . Belkhalfa Oumeima fatma baya		
<b>Thème : Validation d'une méthode analytique physico-chimique selon l'ICH</b>		
<b>Résumé :</b>		
<p>A travers ce travail, nous avons effectué une étude analytique sur les différents essais physico-chimiques existants, pour la validation de la méthode analytique dosage par HPLC de la substance actif dans une spécialité pharmaceutique : Phloroglucinol LDM® 80 mg / 160 mg, appartenant à la classe thérapeutique des antispasmodique, en se basant dans cette démarche sur les critères décrite par le référentiel ICH thème Q2(R1). L'utilisation de la HPLC comme technique de dosages du générique Phloroglucinol LDM® 80 mg et 160 mg, a été testée pour les critères suivant : Spécificité, Sélectivité, Exactitude, Linéarité, Fidélité, dans le cadre d'une validation interne au laboratoire.</p> <p>Durant la période de notre formation effectué au sein de l'unité de contrôle qualité «LDM groupe » où nous faisons partie de l'équipe responsable du contrôle qualité physico-chimique pour réaliser un dosage par HPLC du principe actif «Phloroglucinol » dans une spécialité pharmaceutique / produit fini qui est un comprimé orodispersible.</p> <p>Nos résultats expérimentaux montrent que pour la méthode choisi pour cette étude est : sélective/spécifique, linéaire, fidèle, et exacte. La technique s'est montrée valide pour les utilisations définies et en conformité parfaite avec les critères de validation définis par l'ICH 2005 Q2(R1).</p>		
<b>Mot clés :</b> Dosage par HPLC, validation analytique, ICH Q2(R1), critères de validation, Phloroglucinol LDM®, Spécificité, Sélectivité, Exactitude, Linéarité, Fidélité.		
<b>LDM groupe, la Zone industrielle Oued Hamimime El Khroub 25100 Constantine ALGERIE.</b>		
<b>Président :</b>	<b>Mr. HAMIDECHI MOHAMED ABD ELHAFID</b>	<b>Prof. UFM. Constantine 1.</b>
<b>Encadreur et Rapporteur:</b>	<b>Mme. BELLOUM ZAHIA</b>	<b>MAA. UFM. Constantine 1.</b>
<b>Examinatrice:</b>	<b>Mme. GHERBOUDJ OUISSEM</b>	<b>Dr. UFM. Constantine 1.</b>
<b>Maitre de stage:</b>	<b>Mr. BENATIA ZAKARIA</b>	<b>Laboratoire LDM-groupe</b>

