

الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية

REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE

Ministère de l'Enseignement Supérieur
et de la Recherche Scientifique

Université Mouloud Mammeri
De Tizi Ouzou
Faculté de Médecine
Département de Pharmacie



وزارة التعليم العالي والبحث العلمي

جامعة مولود معمري
بتيزي وزو
كلية الطب
قسم الصيدلة

†.⊙∶∧∧.⊥ξ† ∑∶∩∶∧ † ∑∣∶∑∑∶⊙

Département de Pharmacie
N° D'ORDRE :

MEMOIRE DE FIN D'ETUDES

En vue de l'obtention du diplôme de docteur en pharmacie

Présenté et soutenu publiquement
Le 18 JUILLET 2024

Thème

**Validation de dosage analytique à l'état de traces
de l'Amoxicilline en vue d'une validation de
méthode de nettoyage de la turbine par HPLC**

Réalisé par :

LOUCIF Chaima
MEZIANE Samah

Membres du jury :

Dr. BEN SI SAID Hassan	MAHU	Faculté de Médecine	UMMTO	Président de jury
Pr. MAMOU Marzouk	Professeur	Faculté de Médecine	UMMTO	Promoteur
Dr. AIT TALEB Boualam	Résident	Faculté de Médecine	UMMTO	Co-Promoteur
Dr. BELAICH Anfal	MAHU	Faculté de Médecine	UMMTO	Examinatrice

ANNEE UNIVERSITAIRE : 2023/2024

Résumé

Introduction Les médicaments jouent un rôle essentiel dans la santé. Dans le secteur pharmaceutique, il est crucial de gérer les risques de contamination, en particulier la contamination croisée, présente à des concentrations de trace. Le but est de concevoir et de confirmer une méthode à haute performance par chromatographie liquide pour évaluer l'état des traces d'Amoxicilline, en utilisant le profil d'exactitude pour guider une éventuelle validation du nettoyage.

Matériels et méthodes : nous avons mené une étude expérimentale basée sur l'évaluation des paramètres statistiques de validation selon la revue de SFSTP 2003/2006, en reliant la réponse instrumentale de l'HPLC-UV Visible à notre méthode de dosage et de prélèvements, au sein de laboratoire de Chimie Analytique de notre faculté.

Résultats : les résultats tombent conformément dans l'intervalle de validation établie, et par conséquent ils sont jugés validés.

Conclusion : la méthode de dosage des traces de l'Amoxicilline appliquée est adéquate pour une mise au point d'une validation de nettoyage éventuelle.

Mots clés : validation, HPLC, UV Visible, dosage, trace, nettoyage, SFSTP, exactitude, écouvillonnage, prélèvement, taux de recouvrement, amoxicilline, gamme SV, gamme SE, fonction de réponse, intervalle de dosage.

Abstract

Introduction Medicines play an essential role in health. In the pharmaceutical sector, it is crucial to manage the risks of contamination, particularly cross-contamination, presented at trace concentrations. The aim is to de confirm by high-performance liquid chromatography method for assessing trace levels of Amoxicillin, using the accuracy profile to guide potential cleaning validation.

Materials and methods: we conducted an experimental study based on the evaluation of statistical validation parameters according to the SFSTP 2003/2006 review, linking the instrumental response of HPLC-UV Visible to our method of assay and sampling, within the Analytical Chemistry laboratory of our faculty.

Results: The results fall within the established validation range, and are therefore considered validated.

Conclusion: the method for determining traces of Amoxicillin applied is suitable for the development of a possible cleaning validation.

Keywords: validation, HPLC, UV Visible, assay, trace, cleaning, SFSTP, accuracy, swabbing, sampling, recovery rate, amoxicillin, SV range, SE range, response function, assay interval.

Introduction

Les médicaments jouent un rôle essentiel dans le maintien de la santé et du bien-être d'un individu, en contribuant à la prise en charge d'une variété d'affections et de maladies. Cependant la qualité et la sécurité des médicaments doivent être rigoureusement contrôlées pour garantir leur efficacité et minimiser les risques pour les patients. La qualité requise continue de croître au fur et à mesure de l'évolution des connaissances scientifiques, dans un cadre réglementaire rigoureux qui a entériné le passage des systèmes de contrôle de la qualité, à l'assurance de la qualité, et aujourd'hui à la maîtrise des risques.

En industrie pharmaceutique, le risque de contamination croisée est une préoccupation majeure et cette contamination se réfère à la présence de contaminants d'un produit dans un autre, un risque significatif pouvant impacter la qualité d'un médicament, nécessitant une gestion adéquate. Ce risque revêt une importance particulière car il peut survenir à n'importe quelle étape de la fabrication d'un médicament. Par conséquent, la maîtrise des risques de contamination est essentielle pour les industriels, ce qui implique de savoir comment les détecter. Des moyens de lutte et de prévention doivent être mis en place pour répondre aux exigences réglementaires en constante évolution (1).

Le nettoyage des équipements de fabrication est capital dans la lutte contre les risques de contamination, il fait partie intégrante du procédé de fabrication et comme toute opération pharmaceutique, il doit faire objet de validation (2), qui consiste à démontrer de manière scientifique et documentée l'efficacité et la reproductibilité de ce procédé. Cette validation permet de prouver que les différentes étapes du nettoyage permettent d'obtenir une surface ne comportant pas de contamination résiduelle supérieure à une limite préalablement fixée dans des conditions préétablies (3).

La validation du nettoyage est donc un outil de la maîtrise de la qualité, en termes réglementaires, elle est désormais considérée comme une exigence fondamentale pour toutes les installations pharmaceutiques (4).

Le processus de validation de nettoyage repose sur des éléments essentiels, parmi lesquels l'étude portée dans cet article concentrera sur la validation de la méthode de dosage de l'Amoxicilline tri hydraté exposer comme un contaminant selon une stratégie déjà élaborer au sein du Laboratoire pharmaceutique GSK, présenter dans un état de traces tout en nécessitant une validation de la méthode de prélèvement.

L'objectif de ce présent travail est de mettre au point et de valider une méthode analytique de dosage de l'Amoxicilline à l'état de traces par Chromatographie Liquide à Haute performance avec un détecteur UV Visible au sein de laboratoire de Chimie Analytique de la faculté de Médecine de Tizi Ouzou en utilisant le profil d'exactitude comme outil de décision et cela dans un but ultérieur de validation de nettoyage.

Cet outil décisionnel est décrit dans le guide de validation élaboré par une commission de la Société Française des Sciences Techniques et Pharmaceutiques (SFSTP), publié dans la revue STP Pharma Pratique en Janvier 2006.

Notre méthode de dosage des traces d'amoxicilline par HPLC est-elle considérée comme valide ? Et peut-elle être appliquée dans le cadre de la validation du nettoyage de la turbine de pelliculage de la ligne des formes sèches de l'entreprise pharmaceutique GSK située à Boudouaou – Algérie ?

MATERIELS ET METHODES

1. Matériels

– Appareillages

Tableau I : Appareillage utilisé

Equipement	Marque
HPLC à détecteur UV Visible	SHIMADZU LC20
Distillateur	Lab-Tech
Pompe à vide	Fisher Bioblock Scientific
Balance analytique	METLER TOLEDO
Sonicateur	Advantage-LAB
Agitateur magnétique	NAHITA Mode390-1
pH-mètre	METLER TOLEDO
Etuve	Memert

– Verreries

Tableau II : Verrerie utilisée

Verreries	Autres
-Fioles : 20 ml, 25ml, 50ml, 100 ml, 2000ml. -Pipettes jaugées : 1ml, 2ml, 5ml, 10ml, 15ml, 25ml. -Verre de montre. -Eprouvettes : 100ml,200ml. -Béchers.	-Pisettes. -Spatules. -Baron --magnétique. -Papiers filtres Ø 110mm. -Ecouillons. -Plaques en inox pharmaceutique (100 cm ²).

– Matières premières


Le principe actif Amoxicilline tri hydraté, provenance GSK industry .

– Réactifs

Tableau III : Réactifs utilisés

Réactif	Marque	Données physicochimiques
Phosphate Mono-sodique	FLUKA	Formule brute : NaH_2SO_4 Mr : 119,98 g/mol
Hydroxyde de potassium	BIOCHEM Chemopharma	Formule brute : CH_4O Mr : 32,04 g/mol ρ : 0,79 g / cm ⁻³
Méthanol grade HPLC	LiChrosolv®	Formule brute : $\text{C}_2\text{H}_3\text{N}$ Mr : 41,05 g/mol
Acétonitrile grade HPLC	Honeywell Riedel-de Haën™	Formule brute : $\text{C}_2\text{H}_3\text{N}$ Mr : 41,05 g/mol ρ : 0,8g / cm ⁻³

Tableau IV : Caractéristiques des écouvillons utilisés lors de validation de dosage de l'Amoxicilline à l'état de traces

Ecouvillons	Dimensions	Provenance
CleanTips® Swabs TX 714A, model Large Alpha® Swab. Matériaux Polyester	Largeur de la tête : 12,7 mm. Largeur du manche : 5,2 mm. Longueur de la tête : 25,7 mm. Longueur du manche : 101,8 mm. Longueur totale : 127,5 mm.	ITW Texwipe Philippines.
		

2. Méthodes

S'agissant d'une méthode de dosage de traces de principe actif dans le cadre de nettoyage des équipements de production pharmaceutique, le point repère pour la mise au point de la méthode analytique étant la limite d'acceptation du nettoyage retenue comme égale à 20µg/100 cm². Cette qualité de substance résiduelle est prélevée par 3 écouvillons (2 imbibés avec l'éthanol 96° et le 3^{ème} à sec) puis extraite par 10 ml du solvant d'extraction. Il en résulte une concentration à limite d'acceptation de 2µg/ml.

La solution standard de l'amoxicilline tri hydraté pour un dosage à l'état de trace est fixée donc à une concentration nominale de 2µg/ml (100%).

Compte tenu de l'absence de l'effet matrice connu préalablement ; le protocole choisi est le V2 (4).

La méthodologie suivie pour la validation analytique dans le présent travail est celle décrite dans le guide de la SFSTP 2006, basée sur le profil d'exactitude.(5)

Les critères évalués sont :

- Spécificité.
- Fonction de réponse.
- Fidélité.
- Justesse.
- Exactitude et profil d'exactitude.
- Linéarité.
- Robustesse.

2.1. Protocole analytique

Après plusieurs essais et optimisation, nous avons amélioré un processus analytique pour doser l'amoxicilline à l'état de traces par HPLC-UV/Visible en utilisant les données de la monographie de l'amoxicilline tri hydraté fournies par l'USP. Les détails de cette optimisation sont exposés ci-après :

Préparation des solutions

Phase mobile : acétonitrile (ACN)/tampon phosphate (NaH_2PO_4).

Préparation : Peser 19,92g du tampon phosphate (NaH_2PO_4) dans une fiole de 2000ml, mettre sur un agitateur magnétique jusqu'à qu'il soit complètement dissout. Vérifier la stabilité du pH de la solution a pH =4.48 à l'aide d'un pH-mètre déjà calibrer. Une proportion d'ACN de 3,5% équivalente à 70ml d'ACN est ajoutée. Compléter au trait de jauge avec l'eau distillé. Mélanger par retournement et filtrer à l'aide d'un filtre 0,45 μm .

Diluant : acétonitrile (ACN)/tampon phosphate (NaH_2PO_4).

Préparation : peser 20g du tampon phosphate (NaH_2PO_4) dans une fiole de 4000ml, compléter au trait de jauge avec l'eau distillé. Mettre sur un agitateur magnétique jusqu'à qu'il soit complètement dissout. Ajouter une proportion de 5% d'ACN équivalente à 200 ml. Agiter bien la solution diluant.

Tableau V : Conditions chromatographiques de la méthode de dosage par HPLC

Colonne C18	Longueur	250 mm
	Diamètre	4.6 mm
	Taille des particules	5 μm
Détection	Spectrométrie UV-Visible avec une longueur d'onde $\lambda=230$ nm	
Débit	1.2 ml/min	
Volume d'injection	50 μL	
Température	Ambiante	
Phase mobile	Acétonitrile/Tampon phosphate NaH_2PO_4	
Mode d'élution	Isocratique	
Temps d'analyse	07 minutes	

2.2.Critères de validation

2.2.1. Spécificité

La spécificité d'une procédure analytique est sa capacité à établir de manière univoque l'existence de la substance à analyser en présence d'autres composants potentiellement présents (5).

La spécificité de la méthode analytique vis-à-vis de l'Amoxicilline tri hydraté doit être démontrée en étudiant l'interférence des éléments ci-après :

- Solvant de dilution : Mélange tampon- : Acétonitrile.
- Le support d'essuyage : écouvillons.
- Le support à prélever : plaque en inox pharmaceutique.
- La comparaison est faite par rapport à une solution standard d'Amoxicilline à 100%.

L'interférence est réalisée en préparant et analysant les solutions suivantes (5) :

Blanc solvant : correspondant au diluant.

Blanc écouvillon : dans un tube à vis, mettre 10 ml de diluant. Plonger 3 écouvillons (deux humectés avec le solvant de récupération le diluant et le troisième est sec). Agiter au vortex pendant une minute, mettre aux ultrasons pendant 5 minutes, laisser pendant 1 heure à l'abri de la lumière.

Blanc plaque : Sur une plaque en inox de 10 cm x 10 cm. Déposer 1 ml du diluant. Laisser sécher sur une plaque chauffante.

Prélever la surface de la plaque à l'aide de deux écouvillons mouillés avec le solvant récupération le diluant suivi d'un écouvillon sec. Récupérer les 03 écouvillons dans le même tube à vis rempli de 10 ml de diluant. Agiter au vortex pendant une minute, mettre aux ultrasons pendant 5 minutes et pendant 1 heure à l'abri de la lumière.

Solution standard 100% :(concentration de l'Amoxicilline à 2µg/ml).

Dans une fiole de 50 ml peser 20 mg de l'Amoxicilline standard. Dissoudre dans un volume suffisant de diluant et compléter au trait de jauge avec le même solvant.

Diluer cette solution au 1/200^{ème} dans le diluant.

Ces échantillons seront analysés et observés pour la présence d'interférence au même temps de rétention que celui de l'Amoxicilline obtenue avec la solution standard 100%.

Sachant que la procédure de dosage est connue (absence d'effet matrice), le protocole adopté dans notre étude est le **V2** en utilisant **5 niveaux de concentrations** pour les **Solutions d'étalonnages** et les **Solutions de validations** à savoir ; 25%, 50%, 100%, 150% et 250% de la limite fixée 2µg/ml, préparer à partir de solution de stock.

Préparation de la solution de stock : peser 50 mg de l'amoxicilline tri hydraté standard dans une fiole de 100ml, dissoudre dans un volume suffisant de diluant puis continuer au trait de jauge avec le même diluant.

Gamme de concertations : le tableau VI ci-dessous résume la gamme des concentrations préparé à partir de la solution de stock.

Tableau VI : Préparation des standards d'étalonnage

Solution de stock : 50 mg/100ml						
1^{ère} dilution	V prélevé (ml)	2	5	10	15	25
	V final (ml)	20	25	25	25	25
	[C1] (µg/ml)	50	100	200	300	500
2^{ème} dilution	V prélevé (ml)	5	5	5	5	5
	V final (ml)	50	50	50	50	50
	[C1] (µg/ml)	5	10	20	30	50
3^{ème} dilution	V prélevé (ml)	5	5	5	5	5
	V final (ml)	50	50	50	50	50
	[C1] (µg/ml)	0.5	1	2	3	5
[C] finale	% par rapport à la limite acceptée	25	50	100	150	250

Choix des limites d'acceptabilité (λ)

S'agissant d'un dosage à l'état de traces (concentrations très faibles), la limite d'acceptabilité λ est retenue à ± 10 % (limite intermédiaire entre le domaine pharmaceutique et biologique). (4)

Choix de la probabilité de confiance (β)

$\beta = 90\%$, ceci signifie que dans l'application en routine de la méthode, plus de 90% des résultats futurs seront compris dans l'intervalle d'acceptabilité $\pm 10\%$.(4)

2.2.2. Fonction de réponse

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

Afin de valider ce paramètre les standards d'étalonnage et de validation sont préparés de manière indépendante selon le protocole V2 .(5)

Préparation des standards d'étalonnage : Chaque jour, pendant une période de trois jours, cinq niveaux de concentration sont préparés à partir de la solution de stock avec deux répétitions par niveau, le tableau ci-dessous résume la gamme des standards d'étalonnage préparée ;

Tableau VII : les standards d'étalonnage préparés

Solution de stock : 50mg/100ml (pour chacune des 3 séries)		
Solutions	Niveaux de [C]	% de [C]
SE 25% répétition	1	25%
SE 25% répétition 2	1	25%
SE 50% répétition	2	50%
SE 50% répétition 2	2	50%
SE 100% répétition	3	100%
SE 100% répétition 2	3	100%
SE 150% répétition	4	150%
SE 150% répétition 2	4	150%
SE 250% répétition	5	250%
SE 250% répétition 2	5	250%

Préparation des solutions de validation : Chaque jour, pendant une période de trois jours, on prépare cinq niveaux de concentration à partir de la solution de stock, des volumes de 10 ml sont prélevés pour chaque niveau, **en présence de 03 écouvillons (2 imbibés avec l'éthanol 96°, le 3^{ème} est sec) dans le but de reconstituer la matrice de validation.** Les écouvillons ont été utilisés au préalable dans l'écouvillonnage à blanc des surfaces en inox (100cm²). Le tableau ci-dessous résume la gamme des solutions de validation préparée :

Tableau VIII: les solutions de validation préparées

Prise d'essai solution de stock 50 mg/100ml (pour chaque série)			
Solutions	Ecouvillons	Volume SE	% de [C]
SV 25% répétition 1	2 imbibés + 1 sec	10 ml du SE 25 %	25 %
SV 25% répétition 2	2 imbibés + 1 sec	10 ml du SE 25 %	25 %
SV 25% répétition 3	2 imbibés + 1 sec	10 ml du SE 25 %	25 %
SV 50% répétition	2 imbibés + 1 sec	10 ml du SE 50 %	50 %
SV 50% répétition 2	2 imbibés + 1 sec	10 ml du SE 50 %	50 %
SV 50% répétition 3	2 imbibés + 1 sec	10 ml du SE 50 %	50 %
SV 100% répétition	2 imbibés + 1 sec	10 ml du SE 100 %	100 %
SV 100% répétition 2	2 imbibés + 1 sec	10 ml du SE 100 %	100 %
SV 100% répétition 3	2 imbibés + 1 sec	10 ml du SE 100 %	100 %
SV 150% répétition	2 imbibés + 1 sec	10 ml du SE 150 %	150 %
SV 150% répétition 2	2 imbibés + 1 sec	10 ml du SE 150 %	150 %
SV 150% répétition 3	2 imbibés + 1 sec	10 ml du SE 150 %	150 %
SV 250% répétition	2 imbibés + 1 sec	10 ml du SE 250 %	250 %
SV 250% répétition 2	2 imbibés + 1 sec	10 ml du SE 250 %	250 %
SV 250% répétition 3	2 imbibés + 1 sec	10 ml du SE 250 %	250 %

A partir des résultats obtenus pour l'analyse des standards d'étalonnage, les fonctions de réponse suivantes sont étudiées (6).

- Fonction linéaire simple : $y = ax + b$
- Fonction linéaire passant par 0 : $y = ax$
- Régression linéaire après transformation racine-racine
- Régression linéaire après transformation racine-racine
- Autres fonction (quadratique, pondération $1/x...$ etc.).

2.2.3. Prédiction inverses (6)

Après avoir choisi le modèle mathématique adéquat des concentrations en retour avec la fonction de réponse sont calculées.

Tableau IX: calculs des prédictions inverses pour chaque fonction de réponse

Fonction de réponse	Concentration calculée
Droite passant par l'origine	$x_{ijk,cal} = \frac{y_{ijk}}{\beta}$
Droite	$x_{ijk,cal} = \frac{y_{ijk} - \alpha}{\beta}$

2.2.4. Justesse

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

$$biais_j = \hat{\mu}_j - \bar{x}_j$$

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

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

μ_j : Moyenne des concentrations calculées du niveau j

\bar{x}_j : Moyenne des concentrations introduites du niveau j. (6)

2.2.5. Fidélité (6) :

La fidélité de la procédure représente la qualité de l'accord entre des mesures répétées effectuées sur un même échantillon dans des conditions constantes et déterminées.

La fidélité rend compte de la variabilité des résultats effectués sur des produits identiques et dans des conditions présumées identiques. Cette variabilité peut provenir de différents facteurs ;

- L'opérateur
- Matériel utilisé
- L'environnement (température, humidité ...)
- Réactifs utilisés (changement de lot...).

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

$$\text{Répétabilité} : \hat{\sigma}_{Re,j}^2 = \hat{\sigma}_{W,j}^2$$

$$\text{Fidélité intermédiaire} : \hat{\sigma}_{IP,j}^2 = \hat{\sigma}_{W,j}^2 + \hat{\sigma}_{B,j}^2$$

$$\text{CV}_{\text{répétabilité}} = 100 \hat{\sigma}_{W,j} / \bar{x}_{j,calc}$$

$$\text{CV}_{\text{Fidélité intermédiaire}} = 100 \hat{\sigma}_{I,P} / \bar{x}_{j,calc}$$

2.2.6. Exactitude (6) :

L'exactitude exprime l'étroitesse de l'accord entre le résultat d'essai et la valeur de référence acceptée, aussi appelée « valeur conventionnellement vraie ».

L'étroitesse de l'accord ainsi observée est la résultante de la somme des erreurs systématique et aléatoire, en d'autres termes l'erreur totale liée au résultat. Par conséquent. L'exactitude est l'expression de la somme de la justesse et de la fidélité.

A partir des standards de validation et après alignement des réponses sur les valeurs moyennes de chaque niveau de concentration, les prédictions inverses sont calculées. Le biais et la justesse sont établis.

Le profil d'exactitude est obtenu en calculant l'erreur totale (absolue et relative) et l'intervalle de tolérance pour chaque niveau de concentration.

Le choix de la fonction de réponse repose sur le profil d'exactitude le plus rétrécit (Ayant l'intervalle de dosage le plus large), l'erreur résultant est plus faible, ce qui correspond au meilleur model.

L'étude statistique et l'établissement des profils d'exactitude sont réalisés par Excel 2019.

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

Avec :

X : le résultat d'essai

μ : la valeur de référence acceptée

-Pour chaque modèle et chaque observation, l'exactitude relative est calculée comme suit :

$$\text{Exactitude (\%)} = \frac{(x - \mu) \times 100}{\mu}$$

2.2.7. Erreur totale et profil d'erreur totale (6) :

Chaque mesure obtenue est le reflet de la vraie valeur, du biais de la méthode et de sa fidélité, ce qui s'exprime comme suit :

$$x = \mu + |\text{biais}|_{\text{procédure}} + \text{fidélité intermédiaire procédure}$$

$$x - \mu = |\text{biais}|_{\text{procédure}} + \text{fidélité intermédiaire procédure}$$

$$x - \mu = \text{erreur totale procédure}$$

L'Erreur Totale d'une procédure analytique évalue son aptitude à produire des résultats exacts. Donc l'estimation de l'erreur totale d'une procédure est fondamentale pour juger de la validité d'une méthode. Cette erreur totale, comme indiqué ci-dessus, est la somme de la justesse (biais) et de la fidélité.

2.2.8. Profil d'exactitude et décision (6) :

Calcul : Le profil d'exactitude s'obtient en reliant entre elles les bornes supérieures puis les bornes Inférieures de l'intervalle de tolérance :

$$L_j = \text{biais}(\%)_j - Q_t\left(v; \frac{1 + \beta}{2}\right) \sqrt{1 + \frac{1}{PnB_j^2}} CV_{F,I,j}$$

$$U_j = \text{biais}(\%)_j + Q_t\left(v; \frac{1 + \beta}{2}\right) \sqrt{1 + \frac{1}{PnB_j^2}} CV_{F,I,j}$$

n : nombre de répétitions.

p : nombre de séries.

v:degré de liberté.

β: (expectation tolerance interval) : représente le pourcentage des résultats dont la différence entre la valeur déterminée X et la valeur vraie V est inférieure, en valeur absolue à λ.

Q_t : quantile β de la distribution t de Student à v degré de liberté.

Le profil d'exactitude de la méthode s'obtient en reliant d'une part les bornes L_j entre elles (L₁ → L₂ → ... → L_m) et d'autre part les bornes U_j entre elles (U₁ → U₂ → ... → U_m).

Choix de la fonction de réponse : Parmi les fonctions de réponse testées, seules sont retenues celles dont les profils d'exactitude sont compris dans l'intervalle de tolérance. Outre ce critère de sélection, la fonction de réponse la plus simple est choisie (Exemple : fonction linéaire simple ou passant par zéro).

Il est à noter, qu'en plus de ces critères de choix, le modèle retenu doit donner une linéarité avec une droite ayant un coefficient de détermination satisfaisant ($R^2 \geq 0,99$ est souhaitable) (6).

2.2.8. Linéarité

La linéarité d'une procédure d'analyse est sa capacité à l'intérieur d'un certain intervalle de dosage d'obtenir des résultats directement proportionnels à la quantité en analyte dans l'échantillon. L'exigence de linéarité s'applique aux résultats (concentration calculée = f (concentration introduite)).(5)

2.2.9. Limites de quantification

Le profil d'exactitude, construit à partir des intervalles des mesures attendues, permet donc, de décider des niveaux de concentration pour lesquels une procédure est apte à fournir des résultats dans les limites d'acceptation. Ainsi, par définition quand elle se produit, l'intersection entre le profil d'exactitude et les limites d'acceptation définissent les limites de quantification basse (LLOQ) et haute (ULOQ) de la procédure. Entre ces deux limites, il y a bien sûr l'intervalle de dosage. De la sorte, les limites de quantification sont bien les valeurs extrêmes qui peuvent être quantifiées avec une exactitude définie (6).

2.2.10. Robustesse (6) :

La robustesse d'une méthode est sa capacité à rendre des résultats exacts en présence de faibles changements des conditions expérimentales susceptibles de se produire dans l'utilisation de cette technique.

Ce changement consiste en tout écart pouvant se produire pour un paramètre donné par rapport à sa valeur nominale définie dans la procédure d'analyse.

Paramètres opératoires :

Les paramètres opératoires à considérer pour l'étude de la robustesse sont ;

- paramètre A : Teneur en principe actif de l'amoxicilline.
- Débit de la phase mobile, noté paramètre B.
- Longueur d'onde de détection, notée paramètre C.

Tableau X: Changement des paramètres pour l'étude de la robustesse

	Paramètre A [C]en l'Amoxicilline en %	Paramètre B Débit de la phase mobile	Paramètre C Longueur d'onde de Détection
Valeur nominale	100 %	1,2 ml/min	230 nm
Variation	± 20 %	± 0.2/mn	± 2 nm
Niveau bas (-)	80%	1.0 ml/min	228 nm
Niveau haut (+)	120%	1.4 ml/min	232 nm

Solutions échantillons (SV) : au nombre de 02

-Echantillon 01 : SV 80%

-Echantillon 02 : SV 120%

- Une solution standard (SE) 100% pour la quantification des échantillons.

Préparation de la feuille de calcul

En utilisant le logiciel Excel de Microsoft office enregistré, installé sur le système d'exploitation Windows authentique.

L'ensemble des équations rentrant dans l'étude statistique de la validation et la construction du profil d'exactitude sont introduites dans un tableur, pour avoir les résultats complets en tableaux et en graphes si nécessaires juste en introduisant les données brutes en termes de prises d'essais et de leurs réponses instrumentales.

RESULTATS ET DISCUSSION

La méthode de dosage de l'amoxicilline est validée selon le protocole SFSTP 2006 basé sur le profil d'exactitude. Le risque α est considéré à 5%, l'intervalle d'acceptabilité λ est pris de $\pm 10\%$ et le nombre $\beta = 90\%$.

1- Spécificité :

La spécificité de la méthode est démontrée par l'approche empirique.

La figure 1 ci-dessous donne les chromatogrammes obtenus à partir des solutions préparées et analysées : Diluant, blanc écouvillon, blanc plaque, standard et échantillon (solution écouvillon).

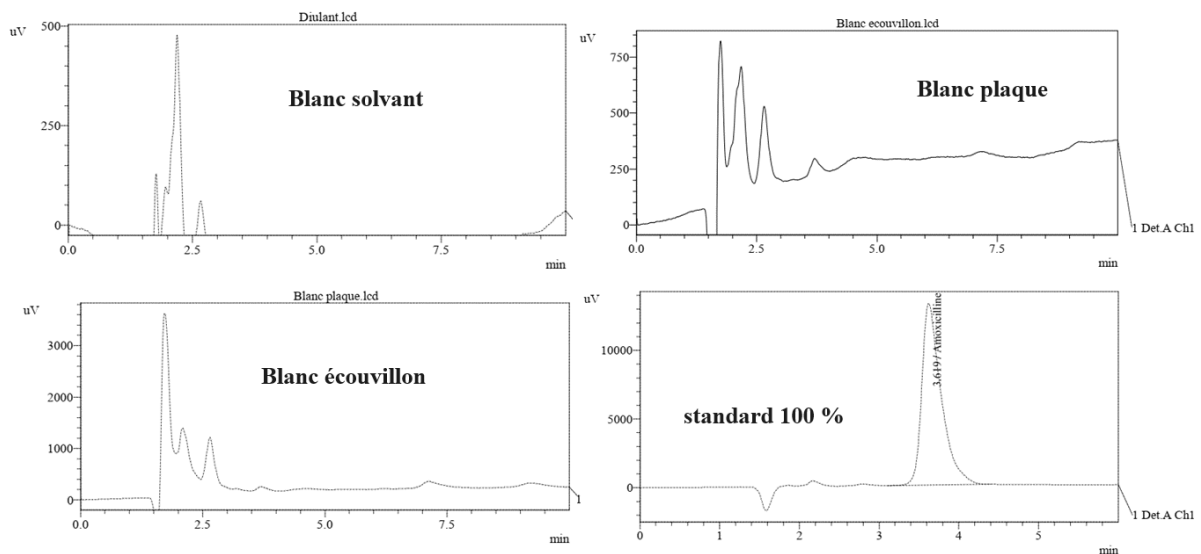


Fig 1 : Chromatogrammes obtenus pour l'étude de la spécificité

Discussion : sur les chromatogrammes obtenus à partir des blancs solvants, écouvillon et plaque, absence de pic au temps de rétention de l'amoxicilline comparé au chromatogramme obtenu à partir de la solution standard à 100% et la solution échantillon à 100%. La méthode est donc jugée spécifique.

2. Fonction de réponse

Les profils d'exactitude obtenus pour les quatre fonctions de réponse testées, en l'occurrence, model linéaire simple $y=ax+b$, model linéaire passant par 0, transformation racine-racine et ln-ln sont présentés dans le tableau XI ci-après. La figure 2 donne les droites de régression linéaire de la fonction de réponse retenue.

Tableau XI : Fonctions de réponse - amoxicilline

Fonction de réponse	Profil d'exactitude
$Y = a x + b$	
$Y = a x$	
Transformation ln-ln	
Transformation racine - racine	

Discussion

La fonction de réponse retenue dans notre étude est la fonction $y = a x + b$ pour des raisons de sa simplicité d'application en analyse de routine.

L'intervalle de dosage avec cette fonction de réponse se trouve rétréci de manière non significative soit de : $5,974 - 50,00 \mu\text{g}/100 \text{ cm}^2$.

Les droites de régression linéaires du dosage de l'amoxicilline à l'état de trace pour les trois séries sont présentées dans la figure 2 ci-dessous ;

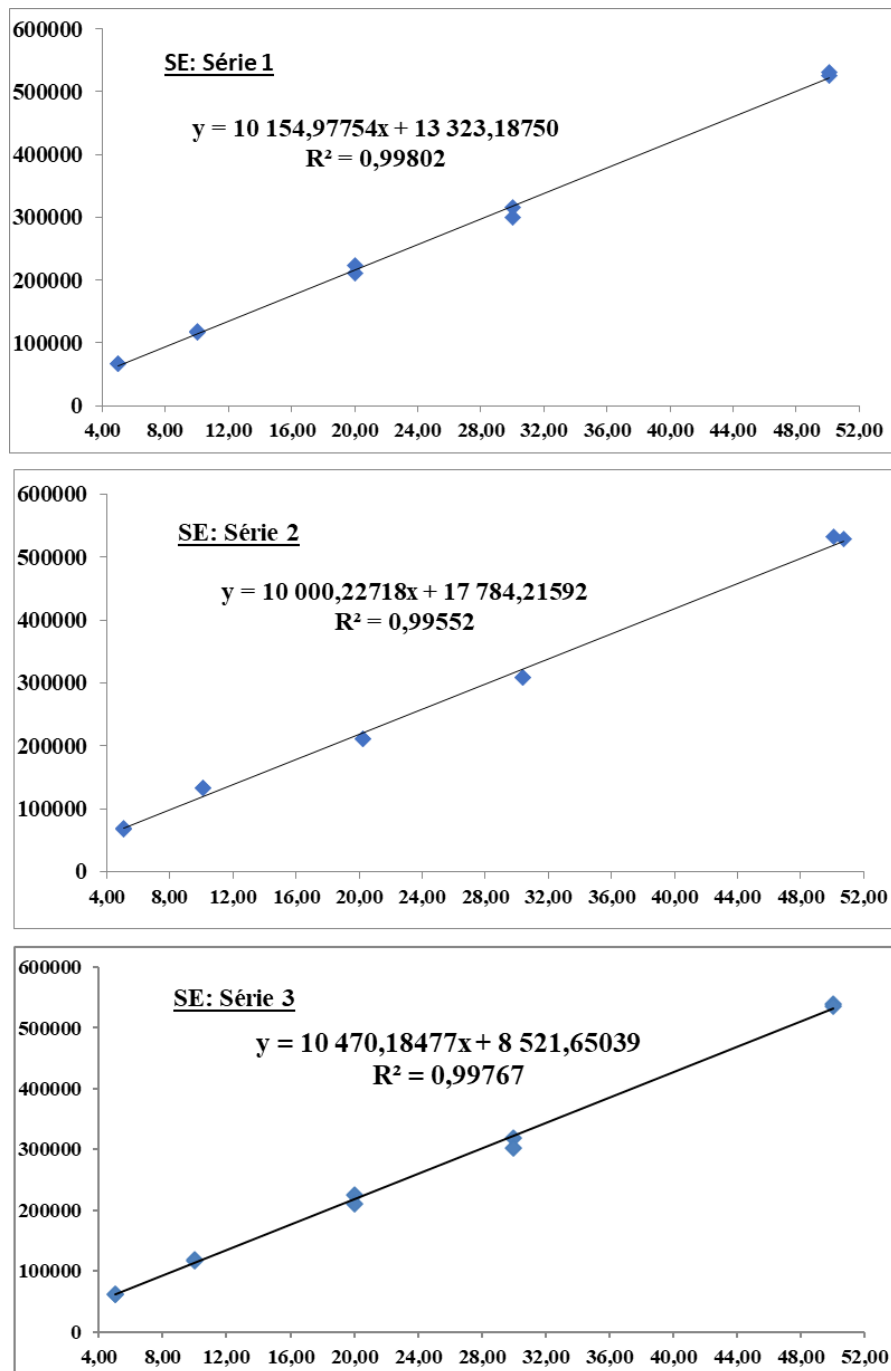


Fig 2 : Droite de régression linéaire – dosage des traces d'amoxicilline

3. Prédiction inverses

Les prédictions inverses calculées après alignement des réponses pour le model $y = ax + b$ sont présentées dans le tableau XII suivant ;

Tableau XII : Prédiction inverses- Dosage de l'amoxicilline

Niv de Conc j	Répétitions i	Valeurs introduites $x_{i,j,k}$ en $\mu\text{g}/100\text{cm}^2$			Moy des $x_{i,j,k}$			Moy x_j introduite	Valeurs introduites $x_{i,j,k}$ en $\mu\text{g}/100\text{cm}^2$			Valeurs introduites $x_{i,j,k}$ en $\mu\text{g}/100\text{cm}^2$			mj, calc=1/n $\sum \sum x_{ijk,cal}$
		Série 1	Série 2	Série 3	Série 1	Série 2	Série 3		Série 1	Série 2	Série 3	Série 1	Série 2	Série 3	
1	1	5,01	5,00	5,07	5,01	5,00	5,07	5,030	4,92	4,94	4,65	4,86	4,94	4,66	4,817
	2	5,01	5,00	5,07					4,85	4,93	4,70				
	3	5,01	5,00	5,07					4,80	4,94	4,62				
2	1	10,02	10,00	10,14	10,02	10,00	10,14	10,050	9,75	10,16	10,36	9,67	10,08	10,31	10,023
	2	10,02	10,00	10,14					9,58	10,05	10,26				
	3	10,02	10,00	10,14					9,68	10,04	10,33				
3	1	20,04	20,00	20,28	20,04	20,00	20,28	20,110	20,32	19,78	20,24	20,32	19,73	20,28	20,109
	2	20,04	20,00	20,28					20,40	19,66	20,38				
	3	20,04	20,00	20,28					20,23	19,77	20,21				
4	1	30,06	30,00	30,42	30,06	30,00	30,42	30,160	29,17	29,13	29,85	29,13	29,18	29,78	29,365
	2	30,06	30,00	30,42					29,11	29,23	29,81				
	3	30,06	30,00	30,42					29,11	29,18	29,69				
5	1	50,10	50,00	50,70	50,07	50,00	50,70	50,260	49,11	49,20	52,15	49,80	49,17	52,22	50,395
	2	50,10	50,00	50,70					50,34	48,79	52,08				
	3	50,00	50,00	50,70					49,95	49,51	52,41				

4. Fidélité

Les résultats de l'étude de la fidélité sont présentés dans le tableau XIII ci-après ;

Tableau XIII : Résultats de la fidélité pour le dosage des traces de l'amoxicilline

Niv de	MSM	MSE	MSE ₂	(MSM - MSE)/3	$\sigma^2_{w,j}$	$\sigma^2_{B,j}$	Ecat type de répétabilité $\sigma_{w,j}$	Ecat type intersérie $\sigma_{B,j}$	Ecat type de Fidélité intermédiaire Racine	CV répétabilité	CV fidélité intermédiaire
1	0,0633	0,0019	0,0172	0,0205	0,0019	0,0205	0,0430	0,1431	0,1495	0,86	2,97
2	0,3186	0,0049	0,0833	0,1046	0,0049	0,1046	0,0699	0,3234	0,3309	0,70	3,29
3	0,3162	0,0066	0,0840	0,1032	0,0066	0,1032	0,0813	0,3212	0,3314	0,40	1,65
4	0,3961	0,0036	0,1017	0,1308	0,0036	0,1308	0,0600	0,3617	0,3667	0,20	1,22
5	7,7767	0,1864	2,0839	2,5301	0,1864	2,5301	0,4317	1,5906	1,6482	0,86	3,28
									Normes	< 2%	< 5%

Discussion : les coefficients de variation de répétabilité et de fidélité intermédiaires sont inférieurs aux normes retenues, la méthode est donc jugée fidèle.

5. Exactitude

Les résultats de l'étude de l'exactitude sont présentés dans le tableau XIV suivant ;

Tableau XIV : Résultats de l'étude de l'exactitude obtenus pour le dosage des traces de l'amoxicilline

Niv de	Répétitions i	Biais absolu	Biais relatif	Recouvrement	Exactitude relatif ijk			Exactitude relatif
					Série 1	Série 2	Série 3	
1	1	-0,209	-4,166	95,834	-1,790	-1,214	-8,336	-3,780
	2				-3,160	-1,306	-7,218	-3,894
	3				-4,170	-1,197	-8,939	-4,769
2	1	-0,030	-0,300	99,700	-2,660	1,572	2,148	0,353
	2				-4,412	0,532	1,155	-0,908
	3				-3,363	0,386	1,873	-0,368
3	1	0,002	0,011	100,011	1,390	-1,117	-0,213	0,020
	2				1,799	-1,701	0,493	0,197
	3				0,947	-1,160	-0,343	-0,185
4	1	-0,795	-2,636	97,364	-2,955	-2,884	-1,876	-2,572
	2				-3,150	-2,570	-1,991	-2,570
	3				-3,171	-2,738	-2,409	-2,773
5	1	0,139	0,277	100,277	-1,979	-1,594	2,869	-0,235
	2				0,485	-2,423	2,730	0,264
	3				-0,103	-0,981	3,383	0,766

Discussion : l'exactitude pour l'ensemble des valeurs obtenues varie entre -8,939% et 3,383 %.

6. Erreur totale et intervalle de tolérance

Les résultats de l'erreur totale et le calcul des limites inférieur et supérieur de l'intervalle de tolérance sont présentés dans le tableau XV ci-dessous :

Tableau XV : résultats de l'erreur totale et le calcul des limites inférieur et supérieur de l'intervalle de tolérance pour le dosage des traces de l'amoxicilline.

Niv de Conc j	Conc	R _j	B _j	V	Q _t	Erreur totale absolue	Erreur totale relative	Limite de tolérance inférieure	Limite de tolérance supérieure
1	5,03	11,068	0,594	2,238	1,886	0,359	7,139	-10,595	2,263
2	10,05	21,376	0,586	2,124	1,886	0,361	3,591	-7,439	6,839
3	20,11	15,602	0,589	2,170	1,886	0,334	1,659	-3,559	3,582
4	30,16	36,385	0,583	2,073	1,886	1,162	3,852	-5,277	0,005
5	50,26	13,577	0,591	2,195	1,886	1,788	3,557	-6,822	7,377

7- profil d'exactitude

Le profil d'exactitude correspondant au dosage des traces de l'amoxicilline est présenté dans les figures 3 ci-dessous ;

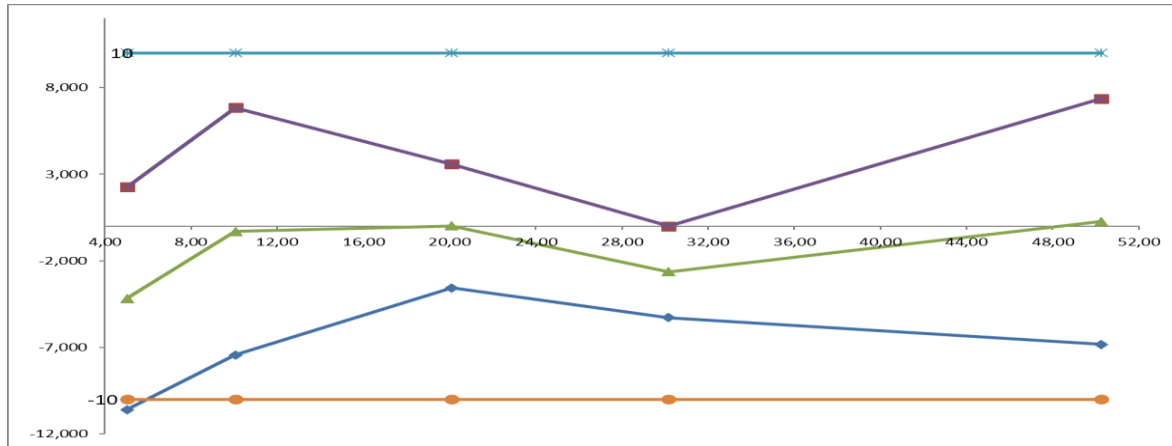


Figure 3 : profil d'exactitude – dosage de l'amoxicilline

Discussion : Les intervalles de tolérances pour le dosage des traces de l'amoxicilline sont compris dans l'intervalle d'acceptabilité [-10% – 10%], à l'exception du premier niveau de concentration pour lequel la valeur inférieure de l'intervalle de tolérance est de -10,595%, ceci entraîne un rétrécissement non significatif de l'intervalle de dosage de 5,97 – 50 µg/100 cm² au lieu de 5 – 50 µg/100cm².

7. Linéarité

La linéarité des résultats quantité prédites en fonction des quantités introduites sont présentés dans les figures 5 ci-après ;

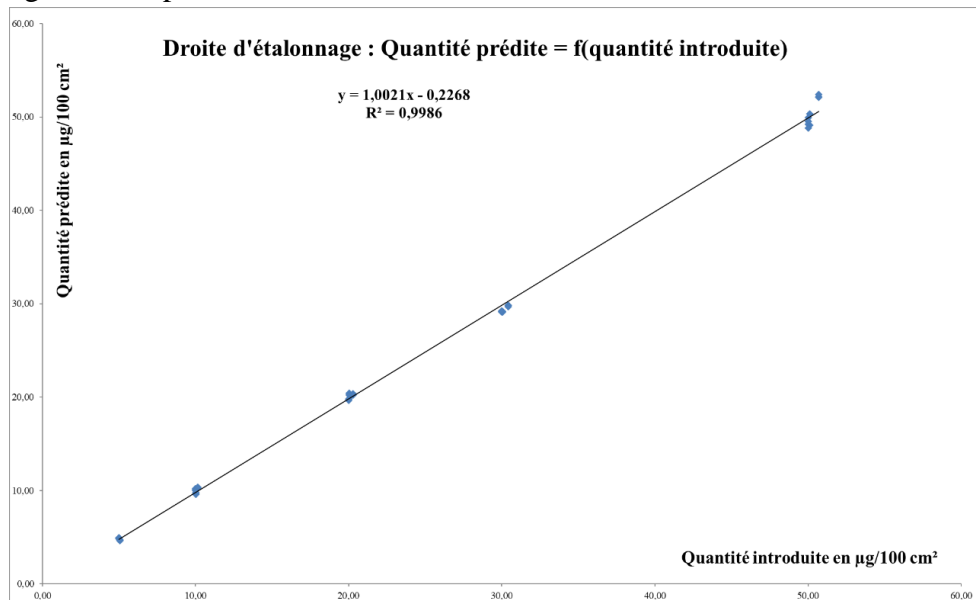


Figure 5 : Linéarité – dosage des traces de l'amoxicilline

Discussion

La droite d'étalonnage quantité prédite en fonction de la quantité introduite, présente des pentes proches de 1 et des ordonnées à l'origine sont proches de 0. La méthode est jugée linéaire.

8. Robustesse

L'étude de la robustesse a été étudiée en considérant un plan d'expérience à trois facteurs 2³

- **Facteur A** : dosage en principe actif avec un niveau bas de 80% et un niveau haut de 120%.
- **Facteur B** : Débit de la phase mobile, avec un niveau bas de 1 ml/min et un niveau haut de 1,4 ml/min.
- **Facteur C** : Longueur d'onde de détection avec un niveau haut de 228 nm et un niveau haut de 232 nm.

Tableau XVI: Résultats de la robustesse obtenus pour le dosage des traces

Masse (concentration) pour une teneur théorique de 100% = 20 mg											
N° de l'essai	A (teneur en %)	B (Débit de la phase mobile)	C (longueur d'onde)	Masse introduite - Echantillon	Masse Standard	Teneur introduite (%)	Aire échantillon	Aire standard	Masse Estimée	Reponse (Teneur en %)	
1	80%	1,0	228	16,00	20,00	50,00	222210	266549	16,67	83,37	
2	120%	1,0	228	24,00	20,00	150,00	322009	266549	24,16	120,81	
3	80%	1,4	228	16,00	20,00	50,00	158482	192592	16,46	82,29	
4	120%	1,4	228	24,00	20,00	150,00	232798	192592	24,18	120,88	
5	80%	1,0	232	16,00	20,00	50,00	215058	260482	16,51	82,56	
6	120%	1,0	232	24,00	20,00	150,00	315666	260482	24,24	121,19	
7	80%	1,4	232	16,00	20,00	50,00	154520	188033	16,44	82,18	
8	120%	1,4	232	24,00	20,00	150,00	225641	188033	24,00	120,00	
										Ecart type	20,38
										t°(0,05,7)	2,36

Essai	facteurs			interactions				
	A	B	C	AB	AC	BC	ABC	
1	-83,37	-83,37	-83,37	83,37	83,37	83,37	-83,37	
2	120,81	-120,81	-120,81	-120,81	-120,81	120,81	120,81	
3	-82,29	82,29	-82,29	-82,29	82,29	-82,29	82,29	
4	120,88	120,88	-120,88	120,88	-120,88	-120,88	-120,88	
5	-82,56	-82,56	82,56	82,56	-82,56	-82,56	82,56	
6	121,19	-121,19	121,19	-121,19	121,19	-121,19	-121,19	
7	-82,18	82,18	82,18	-82,18	-82,18	82,18	-82,18	
8	120,00	120,00	120,00	120,00	120,00	120,00	120,00	
Somme	152,48	-2,58	-1,41	0,35	0,42	-0,56	-1,95	
Effet	19,06	-0,32	-0,18	0,04	0,05	-0,07	-0,24	
Intervalle de confiance	Limite inférieur	2,02	-17,36	-17,22	-17,00	-16,99	-17,11	-17,28
	Limite supérieur	36,10	16,72	16,86	17,08	17,09	16,97	16,80
Facteur signification (S) ou Non significatif (NS)	S	NS	NS	NS	NS	NS	NS	

Discussion

L'intervalle de confiance du facteur dosage ne contient pas la valeur 0, ce qui signifie que la méthode est non robuste pour le dosage en principe actif. Ceci est prévisible car la méthode est sensible à la teneur en principe actif.

Par ailleurs, les intervalles de confiance des deux paramètres expérimentaux liés aux conditions chromatographiques de la méthode contiennent la valeur cible de 0. Ceci démontre que les changements imposés au débit de la phase mobile et à la longueur d'onde de détection n'influencent pas les résultats de dosage de l'amoxicilline, conséquemment, la méthode est jugée robuste.

CONCLUSION

Le présent travail est réalisé au laboratoire de chimie analytique du département de pharmacie de l'université Mouloud MAMMERI de Tizi Ouzou en collaboration avec l'établissement pharmaceutique Glaxo-Smith-Kline situé à Boudouaou – Algérie.

Dans un premier lieu, après une suite d'expériences, nous avons optimisé les conditions analytiques et par suite mis au point une méthode de dosage des traces et de l'amoxicilline en vue de son application ultérieure dans le cadre de la validation du nettoyage de la turbine de pelliculage de la ligne des formes sèches de l'établissement GSK.

La méthode ainsi développée est validée selon le protocole décrit par la commission de la SFSTP en 2006 basé sur le profil d'exactitude comme outil de décision.

- La méthode s'est révélée spécifique pour le dosage de l'amoxicilline, ni le support de prélèvement (plaque en inox), ni l'outil de prélèvement (écouvillons) n'interfèrent dans le dosage.
- La fonction de réponse retenue est la fonction linéaire simple $y = ax + b$. Cette fonction a fourni des profils d'exactitude complètement compris dans l'intervalle d'acceptabilité. L'avantage de cette fonction est sa simplicité d'utilisation en pratique. Pour cette fonction, l'intervalle de dosage se trouve réduit de manière non significative pour des valeurs de 5,975 à 50 $\mu\text{g}/100 \text{ cm}^2$ au lieu de 5 à 50 $\mu\text{g}/100 \text{ cm}^2$.
- Les coefficients de variation de la répétabilité et de la fidélité intermédiaire sont tous inférieurs aux normes retenues pour le principe actif. La méthode est donc jugée fidèle.
- Les taux de recouvrement pour le dosage de l'amoxicilline avoisinent les 100% avec une valeur inférieure de 95,834 % et une valeur supérieure de 100,277%.
- Les profils d'exactitude pour le dosage sont compris dans l'intervalle d'acceptabilité de $\pm 10\%$ à l'exception du premier niveau de concentration pour lequel la valeur inférieure de l'intervalle de tolérance est de -10,595%, ceci entraîne un rétrécissement non significatif de l'intervalle de dosage de 5,97 – 50 $\mu\text{g}/100 \text{ cm}^2$ (soit de 29,85 % à 250 %) au lieu de 5 – 50 $\mu\text{g}/100 \text{ cm}^2$ (25% – 250%)
- La méthode est jugée linéaire dans un intervalle de dosage de 28,95% à 250% avec une équation : $y = 1,0021 x - 0,2268$ et un coefficient de détermination $R^2=0,9986$.
- La méthode est robuste pour le changement délibéré de deux paramètres de la méthode à savoir, le débit de la phase mobile et la longueur d'onde de détection.

La méthode de dosage des traces de l'amoxicilline par HPLC est considérée comme valide dans un intervalle de 5,975 à 50 $\mu\text{g}/100 \text{ cm}^2$, soit 28,95 % à 250 %. Avec une valeur nominale de 2 $\mu\text{g}/\text{ml}$ en amoxicilline. Cette méthode peut être appliquée dans le cadre de la validation du nettoyage de la turbine de pelliculage de la ligne des formes sèches de l'entreprise pharmaceutique GSK située à Boudouaou – Algérie.

Références bibliographiques :

1. Lechat. Ph , Pharmacologie - Service de pharmacologie clinique , Université Pierre et Marie Curie., faculté de médecine , 2006.
2. Ledoux C. Analyse de risques appliquée à la validation du nettoyage des équipements de fabrication de médicaments aérosols, 2014.
3. Lacosse M. Validation et optimisation du nettoyage dans l'industrie pharmaceutique: cas pratique dans un flux de production dédié.
4. Pr.Mamou Marzouk, Stratégies de validation de nettoyage en industrie pharmaceutique : Nouvelles recommandations et applications aux équipements de fabrication dans un site multiproduits. Thèse de doctorat en sciences médicales, Université Mouloud Mammeri de Tizi Ouzou, Faculté de Médecine, Département de Pharmacie, 2018.
5. Boulanger B, Chapuzet E, Chiap P, Cohen N, Compagnon PA, Dewe W, et al. Validation des procédures analytiques quantitatives Harmonisation des démarches, 2003.
6. Boulanger B, Chapuzet E, Cohen N, Compagnon PA, Dewé W, Feinberg M, et al. Validation des procédures analytiques quantitatives : Harmonisation des démarches Partie II - Statistiques, 2006.