

N° d'ordre :

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

UNIVERSITE MOULOUD MAMMERRI DE TIZI-OUZOU

FACULTE DES SCIENCES

DEPARTEMENT DE CHIMIE



DOMAINE : SCIENCES DE LA MATIERE

FILIERE : CHIMIE

## MEMOIRE DE MASTER

SPECIALITE : CHIMIE PHARMACEUTIQUE

*Soutenu publiquement, le 25/07/2019*

### THEME

**Mise au point et validation d'une méthode du dosage du metronidazole par HPLC dans les comprimés de 250mg.  
Application du protocole SFSTP 2006**

*Présenté par : M<sup>elle</sup> HADDADOU Silia et M<sup>elle</sup> ABDI Thiziri*

*Composition du Jury :*

Pr HOUCINE. S	Professeur	UMMTO	Président du jury
Pr MAMOU.M	MCAHU	UMMTO	Promoteur
Dr BOURSOUTI.M	RCA	UMMTO	Co-promoteur
Dr HIKEM.OUKACHA.D	MCA	UMMTO	Examinatrice
Dr BELMAHDI.L	MCB	UMMTO	Examinatrice
Dr TIGHRINE	Docteur	UMMTO	Invité d'honneur

## **Remerciements**

*Au terme de ce modeste travail,*

*Au premier lieu nous tenons à remercier notre bon DIEU pour la force et la patience qui nous a données pour achever ce mémoire.*

*Nous tenons à exprimer notre gratitude et nos sincères remerciements à notre promoteur*

***Pr. MAMOU MARZOUK**, qui nous a proposé le thème de ce mémoire et nous voudrions également lui témoigné notre gratitude et respect pour ces précieux conseils et son investissement et son écoute et surtout pour tout le temps qui l'a pu consacrer grandement à la contribution et la qualité de ce travail, malgré ces nombreuses responsabilités.*

*Merci professeur.*

*Nous remercions chaleureusement **Dr. BOURSOUTI** notre co-promoteur résident en chimie analytique pour son aide, pour le temps qu'il nous a consacré, ces précieux conseils et son large contribution qui nous a permis d'accomplir notre travail.*

*Nous tenons à exprimer notre grande gratitude à **Dr. ABDENOURI.H** résident en chimie analytique pour son soutien physique, moral, son sérieux, son aide, sa disponibilité et son temps précieux.*

*Toute notre gratitude à **Pr.HOUCINE**, qui nous a fait l'honneur de prendre connaissance de ce travail, l'évaluer et de présider notre jury de soutenance.*

*Toute notre gratitude à **Mme BELMAHDI.L**, pour nous avoir fait l'honneur de participer à ce jury et examiner ce travail.*

*Toute notre gratitude à **Mme HIKEM OUKACHA.D**, pour nous avoir fait l'honneur de participer à ce jury et examiner ce travail.*

*Et nous remercions aussi toutes l'équipe du laboratoire de chimie analytique.*

## ***Dédicaces***

*C'est avec joie et émotion que je dédie ce mémoire à*

*A mes parents, grâce à votre amour, abnégation, éducation et votre soutien.*

*Aucun hommage ne pourrait être à la hauteur de votre sacrifice.*

*Que dieu vous procure et prête bonne santé et longue vie.*

*Je vous suis entièrement reconnaissante, je vous aime.*

*A ma très chère tante FATIHA, qui ne cesse de m'encourager et de me soutenir et m'aider dans les moments difficiles.*

*Je lui dis je t'aime et merci.*

*A ma sœur SAMIA, qui ma soutenue et remonter le moral tout au long de mes études je t'aime et merci.*

*A mes autres frères et sœurs que j'aime tant, que dieu puisse exaucer tout leur vœux dans la vie.*

*A mon cher ami ABDERRAHMANE qui ma soutenu et participé a la réalisation de ce travail.*

*Un grand merci.*

*A mon binôme THIZIRI et à toute sa famille et à toute personne qui ma aider de prés ou de loin à la réalisation de ce modeste travail.*

**MERCI**

***Silia***

## *Dédicaces*

*C'est avec profonde gratitude et sincères mots, que je dédie ce  
modeste travail*

*A ma très chère mère Nadia, à qui je dois tout dans la vie, celle qui a sacrifiée pour que je  
parvienne a cette étape.*

*Tu n'as cessée de me soutenir et de m'encourager durant toutes les années de mes études, tu as  
toujours été présente à mes cotés pour me consoler quand il fallait.*

*Que dieu te procure et prête bonne santé et longue vie.*

*A mon unique frère Juba, qui m'a toujours poussé et su me motivé dans mes études.  
Les mots ne suffisent guère pour exprimer l'amour et l'affection que je porte pour toi, que dieu  
puisse exaucer tous tes souhaits.*

*A ma très chère grand mère Dehbia, grâce à ces prières, l'amour et son affection qui m'ont  
réconfortée tout au long de ma vie, je te souhaite une longue vie.*

*A mes chers Oncles et tantes maternels et leurs enfants chacun de vous est une pierre dans un  
mure solide de la famille.*

*A mon Oncle paternel Boussad et sa famille. Sachez que vous étiez le réconfort et la motivation  
celles qui m'ont accompagnés au long de mon parcours je vous remercie.*

*A mon cher binôme **Silia**, et à toute sa famille*

*A toute personne qui mon aider de prés et de loin à la réalisation de ce modeste travail.*

**MERCI**

**THIZIRI**

## Table des matières

Remerciement

Dédicaces

Table des matières

Définitions de quelques paramètres statistiques

Liste des abréviations

Glossaire

Liste des figures

Liste des tableaux

### Partie théorique

**Introduction générale..... 1**

**Chapitre I : Généralité sur le metronidazole..... 3**

1 Imidazole ..... 3

1.1 Historique ..... 3

1.2 Définition ..... 3

2 Nitroimidazole..... 3

2.1 Historique..... 3

2.2 Définition ..... 4

2.3 Classification des nitroimidazoles..... 4

3 Metronidazole..... 4

3.1 Définition ..... 4

3.2 Propriétés physico-chimiques ..... 5

3.3 Indications thérapeutiques..... 6

3.4 Mode d'action ..... 6

### Chapitre II : Validation analytique

1 Historique ..... 7

2 Définition..... 7

a Objectif..... 7

3 Critères de validation analytique ..... 8

4 Protocole en phase de validation ..... 10

### Partie expérimentale

1 Matériels et méthodes ..... 13

1.1	Matériels.....	13
1.1.1	Matière première.....	13
1.1.2	Equipements .....	13
1.1.3	Verreries et autres.....	14
1.1.4	Réactifs .....	14
1.2	Méthodes .....	14
1.2.1	Conditionsexpérimental.....	14
1.2.1.1	Choix du protocole de validation .....	14
1.2.1.2	Choix des paramètres de validation.....	14
1.2.2	Préparation des solutions.....	15
1.2.2.1	Diluant.....	15
1.2.2.2	Solution placebo.....	15
1.2.2.3	Solutions mères des standards.....	15
1.2.2.4	Solutions standards d'étalonnage et de validation .....	15
1.2.2.5	Phase mobile .....	16
1.2.3	Validation analytique : Spécificité – Linéarité – Fidélité – Exactitude et profil d'exactitude,limitesdedosage.....	16
1.2.4	Robustesse.....	16
2	Résultats et discussions.....	<b>18</b>
2.1	Résultats .....	18
2.1.1	Résultat de mise au point.....	18
2.1.2	Résultats de l'étape de validation .....	18
2.1.2.1	Spécificité .....	18
2.1.2.2	Fonction de réponse.....	20
2.1.2.3	Justesse-Fidélité-Exactitude-limites de dosage.....	24
A.	Alignement des observations.....	24
B.	Calcul des prédictions inverses .....	25
C.	Justesse.....	25
D.	Fidélité .....	26
E.	Exactitude.....	26
2.1.2.4	Linéarité de la méthode.....	27
F.	Limite de quantifications .....	29
2.1.2.5	Résultats de robustesse.....	30
2.2	Discussions.....	32

2.2.1Discussions des résultats de mise au point.....	32
2.2.2discussions de l'étape de validation.....	32
2.2.2.1Spécificité.....	32
2.2.2.2Choix de fonction de réponse .....	32
2.2.2.3Justesse.....	32
2.2.2.4Fidélité intermédiaire.....	32
2.2.2.5L'erreur totale et profil d'exactitude.....	32
2.2.2.6Intervalle de dosage.....	33
2.2.2.7Linéarité.....	33
2.2.2.8Robustesse.....	33
Conclusion générale.....	34
Références bibliographiques	
Annexes I	
Annexes II	
Résumé	

## **DEFINITION DE QUELQUES PARAMETRES STATISTIQUES**

### **Biais**

Différence entre l'espérance de résultats d'essai et une valeur acceptée comme référence.

### **Ecart type**

C'est la moyenne des écarts à la moyenne ramené à la probabilité.

### **Pente**

Angle que fait une droite sur un graphe par rapport à l'horizontale. Il est exprimé sous forme d'un rapport entre les valeurs d'Y et celle de X.

### **Variance**

La variance est un paramètre statistique mesurant la dispersion des individus autour de la Moyenne.

### **Ordonnée à l' origine**

C'est la valeur de l'ordonnée du point d'intersection entre la courbe de la fonction et la droite d'équation  $x = 0$ , aussi appelée axe des ordonnées.

### **Test de student**

Le test de student est un test statistique permettant de comparer les moyennes de deux groupes d'échantillons. Il s'agit donc de savoir si les moyennes de deux groupes sont significativement différentes au point de vue statistique.



## Liste des abréviations

**ADN** : Acide DésoxyriboNucléique

**BPF** : Bonnes Pratiques de Fabrication

**DCI** : Dénomination commune Internationale

**HPLC**: Hight Performance Liquid Chromatography

**ICH**: International Conference on Harmonization

**ISO**: International Standard Organisation

**IUPAC** : Union international de chimie pure et appliquée

**LD** : Limite de Détection

**LQ** : Limite de Quantification

**LQ inf** : Limite de Quantification inférieure

**LQ sup** : Limite de Quantification supérieure

**PA** : Principe Actif

**pH** : Potentiel d'hydrogène

**SE** : Standard d'Etalonnage

**SFSTP** : Société Française des Sciences et Techniques Pharmaceutiques

**SV** : Standard de Validation

**USP** : United States Pharmacopeia

**V/V** : volume/volume

## **Glossaire**

### **Conférence international d'harmonisation ICH**

L'ICH est une structure internationale qui rassemble les autorités de réglementation et les représentants de l'industrie pharmaceutique d'Europe, du Japon et des Etats-Unis pour harmoniser les exigences en matière d'AMM .le rôle de l'ICH est de travailler à l'harmonisation des principes de qualité, sécurité et l'efficacité des médicaments.

### **ISO/CEI 17025**

Est une norme internationale qui spécifie les « exigences générales concernant la compétence des laboratoires d'étalonnages et d'essais » ; elle est élaborée par le comité ISO pour l'évaluation de la conformité (CASCO).

### **Société française des sciences et techniques pharmaceutiques SFSTP**

La SFSTP est une association des industries de la santé, créé en 1946, elle rassemble les connaissances de l'université et des industries, et contribue à la progression des sciences et techniques pharmaceutiques, son objectif est d'aider les industriels pharmaceutiques à valider leurs procédures d'analyse et de constituer un support permettant à toute analyse une réflexion sur les méthodes statistiques applicables à la validation analytique .

### **Pharmacopée**

Est un ouvrage réglementaire destiné à être utilisé par les professionnels de santé. Elle définit notamment les critères de pureté des matières premières ou des préparations entrant dans la fabrication des médicaments (a usage humain ou vétérinaire) et les méthodes d'analyses a utiliser pour en assurer leur contrôle.

### **Bonnes pratiques de fabrication (BPF)**

Ensemble de règles et de procédures devant être respectées lors de la fabrication d'un médicament.

### **Protocole**

Document descriptif et normatif planifiant intégralement dans le détail un essai ou une étude avant sa mise en œuvre.

### **Méthode qualitative**

Méthode qui, à partir d'une quantité déterminée d'échantillon, permet la mise en évidence de la présence d'un analyte et fournit une réponse en termes de présence /absence.

### **Méthode quantitative**

Méthode d'analyse qui mesure la quantité ou la fraction pondérale d'un analyte de manière à pouvoir l'exprimer sous forme de valeur numérique dans les unités appropriés.

### **Chromatographie**

Méthode physique de séparation basée sur les différences d'affinités des substances à analyser à l'égard de deux phases, l'une stationnaire ou fixe ,l'autre mobile. Selon la technique chromatographique mise en jeu, la séparation des composants entraînés par la phase mobile, résulte soit de leur adsorption et de leur désorption successive sur la phase mobile, soit de leur solubilité différente dans chaque phase.

### **Etalonnage**

Est l'opération, dans des conditions spécifiées, établit en une première étape une relation entre les valeurs et les incertitudes de mesures associées qui sont fournies par des étalons, et les réponses correspondantes avec leur incertitudes associées. Dans une seconde étape, cette information est utilisée pour établir une relation permettant d'obtenir un résultat de mesure à partir d'une réponse.

### **Profil d'exactitude**

Est la combinaison sous la forme d'un graphique, de plusieurs intervalles de tolérance calculés à différents niveaux de concentrations et d'une limite d'acceptabilité. Son but est d'estimer à partir des résultats obtenus lors de la validation, quelle garantie aura l'utilisateur que la méthode utilisée en routine fournira des résultats acceptables.

### **Antibiotiques (antimicrobiens, antibactériens)**

Un antibiotique est un médicament qui agit spécifiquement sur une catégorie d'agents microbiens (les bactéries). Il a le pouvoir d'exercer un effet bactériostatique (il inhibe la prolifération bactérienne) ou un effet bactéricide (il détruit les bactéries).

### **Placebo**

Est un médicament sans principe actif .il n'a donc de ce fait aucun effet pharmacologique dans la pathologie qu'il est censé traiter.

### **Blanc**

C'est un terme de chimie analytique qui définit un mélange à tous les égards identique à l'échantillon à analyser, mais dépourvu de l'analyte d'intérêt.

Blanc est utilisé pour obtenir une indication de la façon dont analyte provient de sources externes ; ce qui est essentiel pour calculer la limite de détection et quantification. Il permet également d'identifier les contaminants présents dans le laboratoire ou

accidentellement ajoutés par l'opérateur et d'évaluer le niveau de propreté de l'équipement et le laboratoire en général.

**Matrice**

Milieu dans lequel se trouve l'analyte.

**Série**

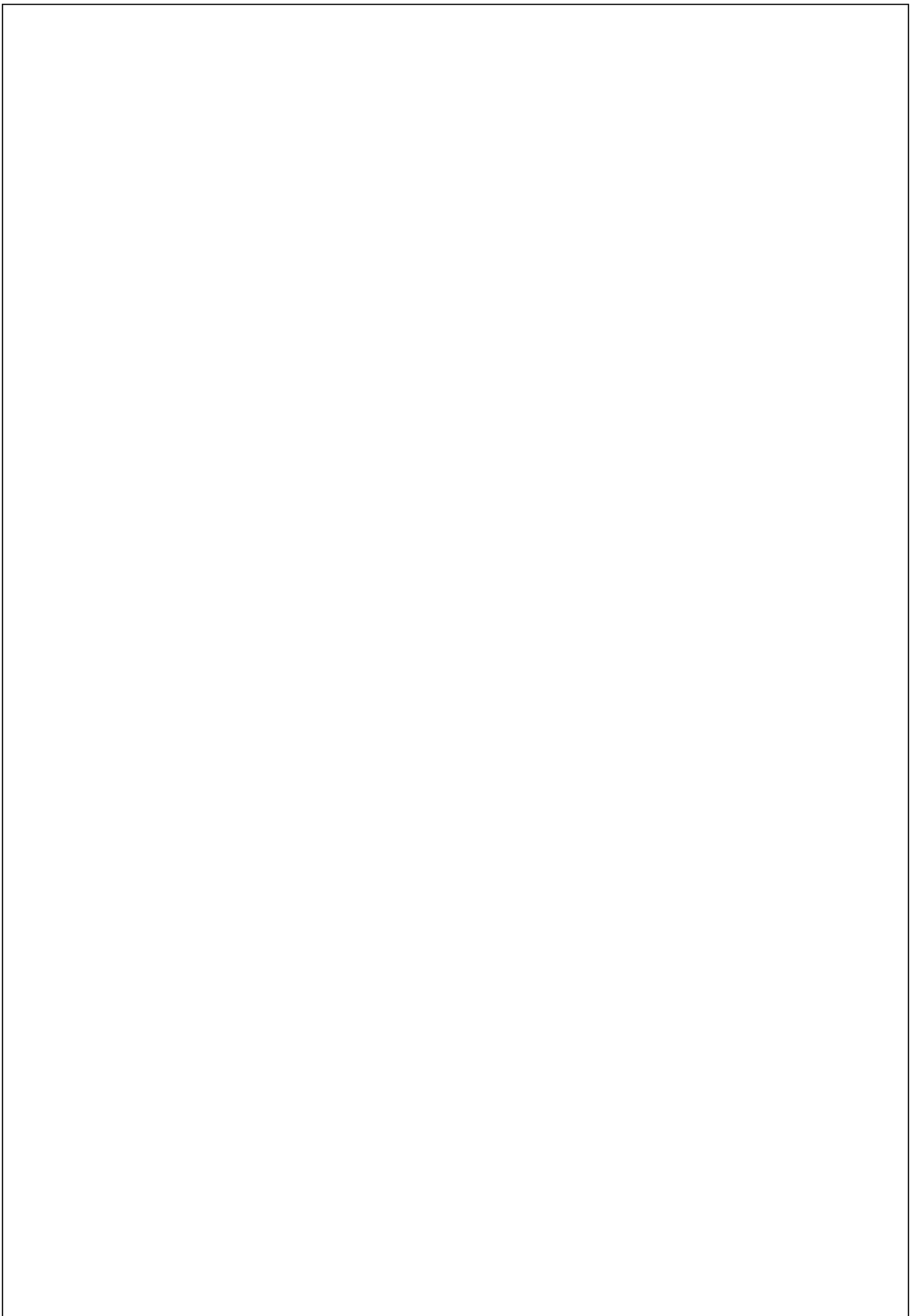
Ensemble de mesures consécutives effectuées sans interruption et dont les résultats sont obtenus à partir d'une phase unique de calibrage.

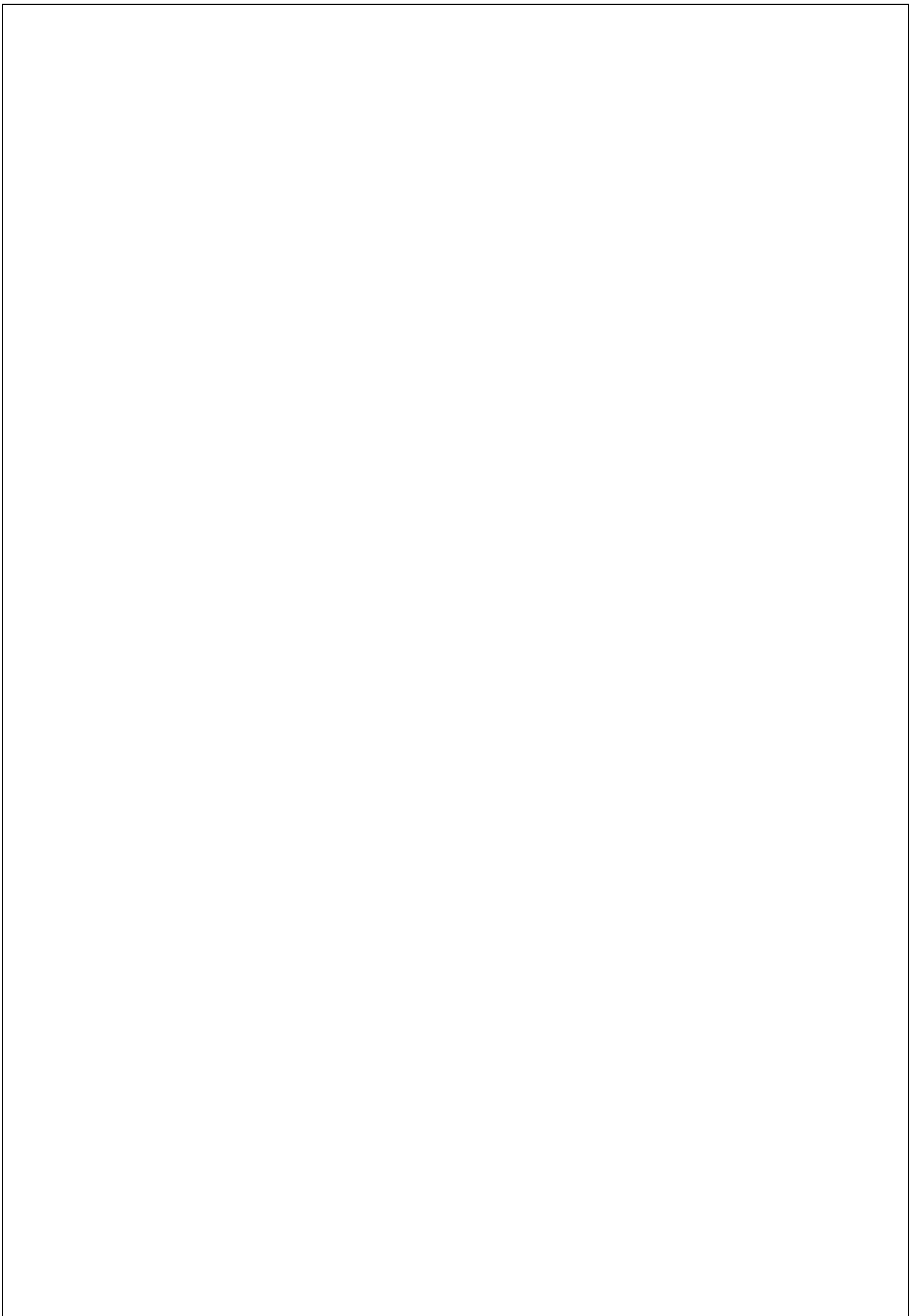
**Biais**

Différence entre l'espérance de résultats d'essai et une valeur acceptée comme référence.

## Liste des figures

<b>Numéro de la figure</b>	<b>Titre de la figure</b>	<b>Page</b>
Figure 01 :	Structure d'imidazole	03
Figure 02 :	Structure du nitroimidazole	03
Figure 03 :	Structure du metronidazole	05
Figure 04 :	Logigramme permettant de sélectionner un protocole de validation	11
Figure 05 :	Courbes d'étalonnage obtenues pour SE et SV du metronidazole.	19
Figure 06 :	Superposition des courbes d'étalonnage et de validation du metronidazole.	20
Figure 07 :	Profil d'exactitude de la méthode de dosage du métronidazole par HPLC.	27
Figure 08 :	Droite de régression linéaire : Masses prédites = f (masses introduites) (Obtenue à l'aide du logiciel Origin 6.0)	29





## Liste des tableaux

<b>Numéro du tableau</b>	<b>titre</b>	<b>page</b>
Tableau I	Produits commercialisés	04
Tableau II	Propriétés du metronidazole	05
Tableau III	Définition des critères de validation analytique	09
Tableau IV	Tests de validation recommandés par les ICH	10
Tableau V	Choix du nombre de standards d'étalonnage et de validation en fonction du Protocole	12
Tableau VI	Appareillage du laboratoire chimie analytique utilisés	13
Tableau VII	Verreries et autres matériels utilisés	14
Tableau VIII	Produits chimiques utilisés	14
Tableau IX	Préparation des solutions mères	15
Tableau X	Préparation des solutions des standards d'étalonnage	15
Tableau XI	Préparation des standards de validation	16
Tableau XII	Changement des paramètres pour l'étude de la robustesse	17
Tableau XIII	Plan d'expérience pour l'étude de la robustesse du dosage de Metronidazole par HPLC	17
Tableau XIV	Résultats de mise au point de la méthode du dosage de métronidazole : Conditions chromatographiques	18
Tableau XV	Valeurs de la Pente et de l'ordonnée à l'origine obtenues à partir des SE et SV	19
Tableau XVI	Comparaison des pentes des droites SE et SV	19
Tableau XVII	Données brutes obtenues pour les SE	21



Tableau XVIII	Critères de choix de la fonction de réponse pour le metronidazole.	23-24
Tableau XIX	Données brutes : Standard de validation (dans la matrice)	24
Tableau XX	Alignement des réponses observées sur les trois séries de validation pour le métronidazole	25
Tableau XXI	Prédictions inverses obtenus à partir des SV de metronidazole.	25
Tableau XXII	Justesse calculée pour chaque niveau de concentration des standards de validation pour le metronidazole	26
Tableau XXIII	Fidélité _ Calcul des écarts types et des coefficients de variations	26
Tableau XXIV	Calcul des limites des intervalles de tolérance	26
Tableau XXV	Masses introduites et masses prédites durant la validation analytique de la méthode de dosage du metronidazole par HPLC	28
Tableau XXVI	Moyennes des masses introduites et prédites par série _ Base de données de la linéarité	28
Tableau XXVII	Etude statistique de la linéarité : masse prédites en fonctions des masses introduites	30
Tableau XXVIII	Donnés brutes de l'étude de la robustesse	31
Tableau XXIX	Calcul des effets des paramètres et leurs intervalles de confiance pour l'étude la robustesse metronidazole	31



# Introduction générale

---

Dans l'industrie pharmaceutique, la qualité des médicaments est assurée par la mise en place d'un système d'assurance de qualité qui est d'une importance capitale, il permet de garantir la conformité des médicaments fabriqués et d'assurer en conséquence la sécurité des patients. Parmi les outils requis à cette qualité, le contrôle qualité y'est compris les méthodes d'analyse.

Ces techniques d'analyse ont pour but de fournir des résultats de sorte que toute décision prise soit faite en confiance, pour cela les autorités de régulation exigent aux industriels de valider leur techniques d'analyse.

La validation des méthodes d'analyse est aujourd'hui une composante essentielle qu'un laboratoire doit mettre en œuvre pour lui permettre de fournir des données analytiques fiables.

En industrie pharmaceutique, la validation des méthodes d'analyse figure parmi les mesures universellement reconnues comme faisant partie d'un système exhaustif d'assurance qualité [1].

Le présent manuscrit est subdivisé en deux parties ;

La première partie est une synthèse bibliographique, elle comporte deux chapitres, le premier est dédié à l'étude des imidazolés et leurs dérivés et le deuxième traite de la validation analytique.

La seconde partie est réservée à la partie expérimentale, elle est consacrée à l'aspect pratique de notre travail où nous définirons le matériel et les méthodes utilisées avec une description des protocoles expérimentaux et des tests statistiques appliqués. Nous présenterons et nous discuterons ensuite les résultats afférant.

Enfin, une conclusion générale résume l'ensemble des résultats obtenus.

Le présent travail a été réalisé au niveau du Laboratoire de Chimie Analytique du Département de Pharmacie de la Faculté de Médecine, Université Mouloud MAMMARI de Tizi-Ouzou durant la période allant du mois d'avril 2019 au mois de juillet 2019

# **Introduction générale**

---

L'objectif de notre travail est de mettre au point et de valider une méthode de dosage du metronidazole dans les comprimés de 250 mg par Chromatographie Liquide à Haute performance (HPLC) en vue de son utilisation future dans le contrôle de qualité par les industries pharmaceutiques. Cette validation est basée sur l'utilisation du profil d'exactitude comme outil de décision.

## 1 Imidazole

### 1.1 Historique

Du point de vue purement synthétique, les premières molécules imidazoliques ont fait leur apparition en 1858 avec Debus [2]. Les dernières ont été retrouvées fréquemment dans plusieurs molécules naturelles telles l'acide aminé histidine, la caféine, les purines ou encore la vitamine B12 [3].

Historiquement, les imidazoles étaient les 1<sup>ères</sup> antifongiques azolés à être utilisés [4].

Au début des années 80, le kétoconazole était le 1<sup>er</sup> composé utilisé pour le traitement oral des infections fongiques systémiques. L'introduction des triazoles a permis un avancement majeur dans le traitement des infections fongiques [5].

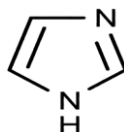


Figure 1 : Structure de l'imidazole [4].

### 1.2 Définition

Les imidazoles sont des composés hétérocycliques ayant pour structure de base l'imidazole de formule chimique brute  $C_3H_4N_2$ , ils sont solubles dans l'eau et autres solvants polaires. De nombreux médicaments sont constitués de cette classe chimique tels que les antifongiques et les nitroimidazoles comme antiparasitaires [6].

## 2 Nitroimidazole

### 2.1 Historique

L'histoire des nitroimidazoles du point de vue pharmacologique a commencé en 1953. Une étude menée par une équipe japonaise qui a étudié une souche de norcardia mensenterice d'un champignon à partir de laquelle une substance active a été extraite : le 2-nitroimidazole dénommé Azomycine. Actuellement les nitroimidazoles représentent une série de substances actives dans différents domaines [3].

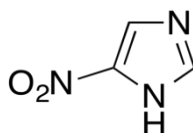


Figure 2 : Structure du 5-nitroimidazole [2].

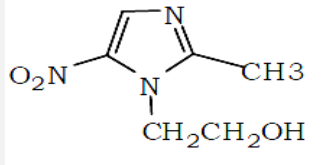
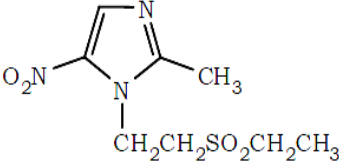
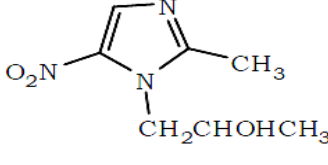
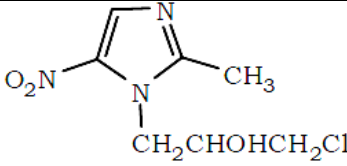
## Chapitre I : Généralités sur le metronidazole

### 2.2 Définition

Les nitromidazoles sont des composés organiques qui possèdent un groupement nitro sur le noyau imidazole définissant leur spectre d'action. Ils sont utilisés comme principe actif pour traiter certaines infections causées par des bactéries anaérobies ou des parasites [7].

### 2.3 Classification des nitromidazoles le tableau I nous fournit quelques dérivés du 5-nitromidazoles les plus commercialisés

Tableau I : Produits commercialisés [3].

DCI	Nom chimique	Formule	Classe thérapeutique
<b>METRONIDAZOLE</b>	1-(2-hydroxyéthyl)-2-méthyl-5-nitroimidazole-1-éthanol		Antifongique
<b>TINIDAZOLE</b>	1-(2-(Ethylsulfonyl)éthyl)-2-méthyl-5-nitroimidazole		Antiparasitaire et Antibactérien
<b>SECNIDAZOLE</b>	1-(2'-hydroxypropyl)-2-méthyl-5-nitroimidazole		Anti protozoaire
<b>ORNIDAZOLE</b>	1-(2'-hydroxy-3-chloropropyl)-2-méthyl-5-nitroimidazole		Infectiologie et Parasitologie

## 3 Metronidazole (FLAGYL®)

### 3.1 Définition

Le metronidazole est un antibiotique bactéricide dérivé du nitroimidazole largement utilisé dans la gestion des infections [8], bactériennes anaérobies (à la fois gram négative et gram positive) et protozoaires [9].

## Chapitre I : Généralités sur le metronidazole

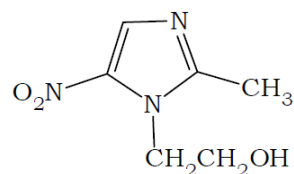


Figure 3 : Structure du metronidazole [2].

**3.2 Propriétés physicochimiques :** les propriétés physicochimiques sont présentées dans le tableau II ci-dessous ;

**Tableau II : Propriétés physicochimiques du metronidazole [10].**

Nom de propriétés	Valeurs de propriétés
Formule moléculaire (brute)	C <sub>6</sub> H <sub>9</sub> N <sub>3</sub> O <sub>3</sub>
Nom chimique	2-méthyl-5-nitroimidazole-1-éthanol
Nom selon l'IUPAC	2-(2-méthyl-5-nitroimidazole-1-yl) éthanol
Poids moléculaire	171.156 g/mol
pH	5.8 à 6.5
Point de fusion	159°C à 163°C
Indice de réfraction	1.5800
Solubilité dans l'eau	9500mg/l à 25°C
Point d'ébullition	301.12°C
Densité	1.3994
pKa	2.38
Stabilité	Stable. Incompatible avec un agent oxydant fort
Classe thérapeutique	Antifongique
Aspect	Poudre cristalline blanche à jaune pale avec un gout amer et salin.
Odeur	Inodore

### 3.3 Indications thérapeutiques

Les 5-nitroimidazoles possèdent la particularité d'avoir une action antiparasitaire sur les protozoaires et antibactérienne sur les germes anaérobies.

## Chapitre I : Généralités sur le metronidazole

---

Mais ils sont confrontés à l'apparition de souches résistantes, ce qui diminue leur efficacité et explique la recherche de nouveaux traitements plus efficaces [11].

### 3.4 Mode d'action

Le metronidazole diffuse dans la paroi cellulaire de la bactérie ou le parasite sous forme de prodrogue où il doit subir une étape d'activation pour engendrer des dommages de l'ADN des micro-organismes ciblés.

Il endure une réduction de son groupement nitro par une enzyme bactérienne ou parasitaire.

Les enzymes responsables sont appelées : nitro-réductase.

Le groupe nitro libère des radicaux libres qui causent la mort de la cellule.

Bien que le mode d'action des 5-nitroimidazoles ne soit pas encore bien connu [2].





### 1. Historique

- En 1985: Premières publications sur la validation analytique, à la suite à une rencontre entre l'industrie pharmaceutique américaine et USP.
- 1986 : Un texte publié officiellement intitulé «current concept for the validation of compendial assays».
- 1989: USP publie « validation of compendial methods ».
- 1992 : La SFSTP publie un guide pour la validation analytique.
- 1994 : SCH publie un premier document concernant les définitions Q2A, cette dernière est complétée en 1996 par une seconde publication Q2B expliquant comment peut on conduire une validation analytique [12].
- 2005 : Les deux lignes directrices Q2A et Q2B ont été regroupées en une seule Q2(R1) [13].

### 2. Définition

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

Selon la norme ISO/CEI 17025, la validation analytique correspond à la « confirmation par examen et l'apport de preuves objectives du fait que les exigences particulières en vue d'une utilisation prévue déterminée sont remplies » [14].

#### ➤ Validation dans le domaine pharmaceutique

Dans l'industrie pharmaceutique, la validation est une opération qui consiste à démontrer que tout procédé utilisé pour l'analyse d'un produit conduit effectivement au bon résultat [15].

#### a. Objectif

Selon la ligne directrice ICH Q<sub>2</sub>(R<sub>1</sub>) « l'objectif de la validation d'une procédure analytique est de démontrer qu'elle est appropriée à l'usage auquel elle est destiné » [1].

Elle montre aussi que la méthode employée permet d'atteindre des objectifs techniques définis à l'avance [16].

La validation analytique a pour principal objectif de démontrer l'aptitude de la fiabilité d'une méthode vis-à-vis des exigences réglementaires et normatives en vigueur. La définition des conditions d'utilisation de la méthode, permet de garantir que chaque mesure doit être réalisée en routine est comprise dans une limite d'acceptation appropriée au type de procédure analytique et au produit concerné.

## Chapitre II : Validation analytique

---

Les principes s'appliquent à toutes les méthodes utilisées par un fabricant de médicaments, qu'elles soient ou non décrites dans une pharmacopée [17].

### 3. Critères de validation analytique

Les principaux critères de validation sont ceux qui sont largement reconnus et couramment utilisés dans les laboratoires d'analyses et s'articulent comme suit :

- Justesse
- Fidélité (Répétabilité- Fidélité intermédiaire- Reproductibilité)
- Spécificité
- Fonction de réponse (courbe d'étalonnage)
- Limite de détection (LD)
- Limite de quantification (LQ)
- Linéarité
- Robustesse
- Exactitude
- Intervalle de dosage [1].

Le tableau III présente quelques définitions des critères de validation analytique ;

## Chapitre II : Validation analytique

**Tableau III : Définition des critères de validation analytique [1], [16].**

Critères	Définitions	
<b>Justesse</b>	« La justesse exprime l'écart entre la valeur moyenne obtenue à partir d'une série de résultats d'essais et une valeur qui est acceptée soit comme une valeur conventionnellement vraie, soit comme une valeur de référence acceptée » [1].	
<b>Fidélité</b>	Répétabilité	Exprime la fidélité sous les conditions identiques : même analyste, même équipement, même réactif, court intervalle de temps [16].
	Reproductibilité	Exprime la fidélité sous les conditions différentes : analystes, appareillages, laboratoires, réactifs et jours [16].
	Fidélité Intermédiaire	« conditions où les résultats d'essai indépendants sont obtenus par la même méthode sur des échantillons d'essai identiques dans le même laboratoire, avec différents opérateurs et utilisant des équipements différents et pendant un intervalle de temps donné » [1].
<b>Spécificité</b>	C'est la capacité d'évaluation de façon univoque la substance à analyser, en présence d'autres composés susceptibles de l'accompagner, ces composés comprennent typiquement les impuretés, les produits de dégradations et la matrice [16].	
<b>Fonction de réponse</b>	« 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 » [1].	
<b>Limite de Détection</b>	« la limite de détection d'une procédure d'analyse est la plus petite quantité de l'analyte dans un échantillon pouvant être détectée, mais non quantifiée comme une valeur exactes dans les conditions expérimentales décrites de la procédure » [1].	
<b>Limite de quantification</b>	« la limite de quantification est la plus petite quantité de l'analyte dans un échantillon pouvant être dosée dans les conditions expérimentales décrites avec une exactitudes définie » [1].	
<b>Linéarité</b>	« La linéarité d'une procédure d'analyse est sa capacité à l'intérieur d'un certain intervalle de dosage d'obtenir des résultats directement proportionnels à la quantité (exemple: concentration) en analyte dans l'échantillon » [1].	
<b>Robustesse</b>	C'est la capacité d'une méthode d'analyse à rendre des résultats exactes en présence de faibles changements de conditions expérimentales susceptibles de ce produire dans l'utilisation de cette procédure. Elle donne une indication de la fiabilité de la procédure dans les conditions normales d'application [16].	
<b>Exactitude</b>	« l'exactitude d'une procédure analytique exprime l'écart entre la valeur qui acceptée comme conventionnellement vraie, ou comme valeur de référence et la valeur trouvée » [1].	
<b>Intervalle de dosage</b>	« l'intervalle de dosage d'une procédure d'analyse est la région entre les niveaux supérieurs et inférieurs (ces valeurs incluses) pour laquelle il a été démontré que la procédure est appropriée quant à son exactitude (justesse+fidélité) et sa linéarité, en utilisant la méthode décrite » [1].	

## Chapitre II : Validation analytique

Les critères de validations illustrés dans le tableau IV, peuvent être requis suivant la nature de la méthode utilisée (exemple: dosage quantitatif).

**Tableau IV : Tests de validation recommandés par les ICH [13].**

Caractéristiques		Type d'analyse			
		Identification	Impureté		Dosage
			quantitatif	Essai limite	
<b>Exactitude</b>		-	+	-	+
<b>Précision</b>	<b>Répétabilité</b>	-	+	-	+
	<b>Précision intermédiaire</b>	-	+	-	+(1)
<b>Spécificité (2)</b>		+	+	+	+
<b>Limite de détection</b>		-	-(3)	+	-
<b>Limite de quantification</b>		-	+	-	-
<b>Linéarité</b>		-	+	-	+
<b>Intervalle de mesure</b>		-	+	-	+

(-) signifie que le test n'est normalement pas à réaliser.

(+) signifie que le test est à évaluer

(1) dans le cas où la reproductibilité est testée, la précision intermédiaire n'est pas obligatoire.

(3) Le test peut être obligatoire dans certains cas

### 4. Protocole de validation

Le profil d'exactitude ne s'applique qu'aux méthodes complètement développées et mises au point.

A la fin de la phase de validation et avant son exploitation en routine, la procédure d'analyse doit être complètement décrite sous forme d'un mode opératoire standardisé.

Les principaux objectifs de la phase de validation sont :

- Démontrer la spécificité (sélectivité) ;
- Valider la fonction de réponse ;
- Estimer la fidélité, la justesse ;
- Valider les seuils de quantifications, l'intervalle de dosage ;
- Vérifier la linéarité.

## Chapitre II : Validation analytique

Au terme, les Standards d'étalonnages(SE) doivent être préparés selon le protocole qui sera appliqué en routine, et peuvent être réalisés avec ou sans matrice.

Standards de validations(SV) doivent toujours être réalisés avec la matrice, utilisé dans le but de :

- Déterminer l'erreur totale à chaque niveau de concentration ;
- Calculer l'intervalle de tolérance ;
- Tracer le profil d'exactitude ;
- Déterminer les limites inférieures et supérieures de quantification (intervalle de dosage). Le logigramme de la figure ci-dessous présenté la démarche proposée dans le guide SFSTP 2003 pour sélectionner un protocole expérimental de la validation des méthodes de dosages pour la préparation des SE et SV [19].

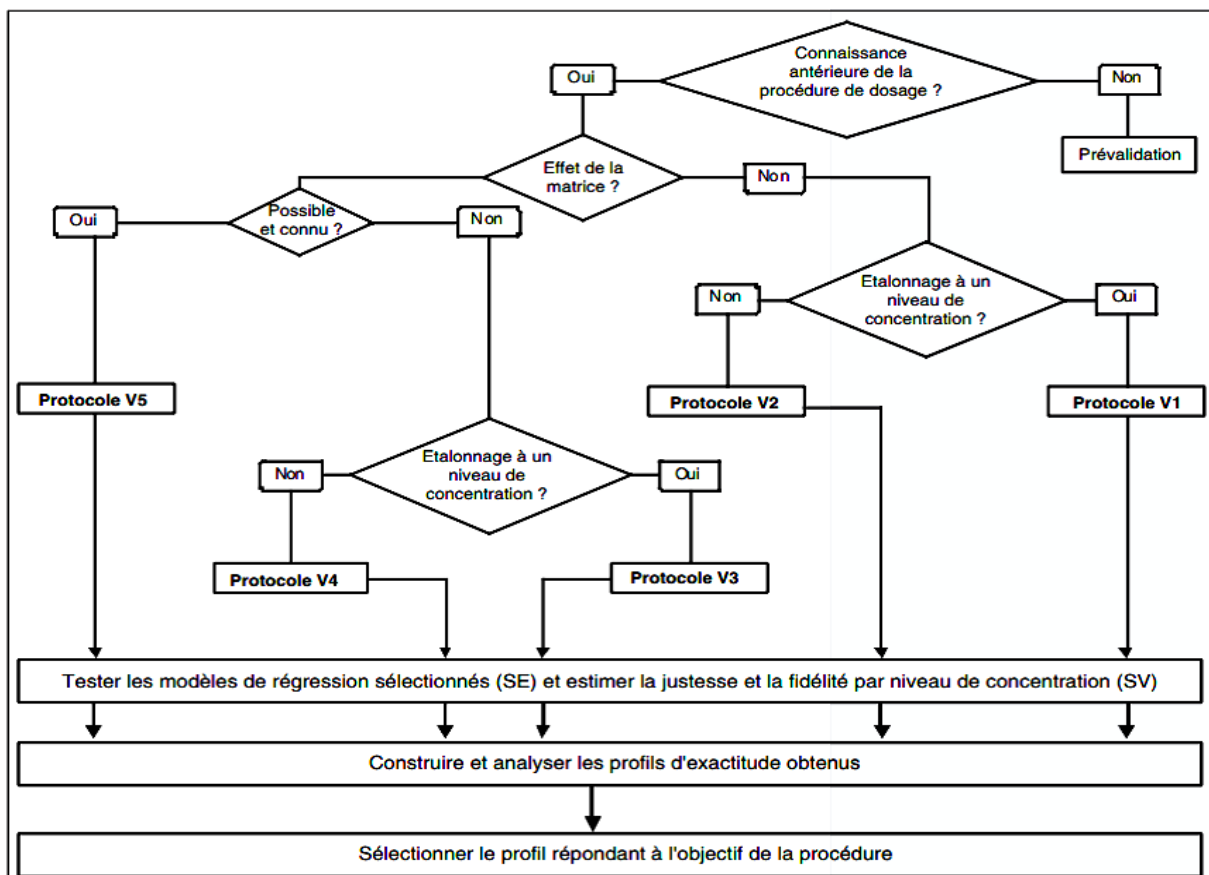


Figure 4: Logigramme permettant de sélectionner un protocole de validation. SE : standard d'étalonnage. SV : standard de validation.

Le tableau V ci-dessous présente le nombre total d'essai à réaliser pour valider une méthode analytique selon le Protocol choisi :

## Chapitre II : Validation analytique

**Tableau V: Choix du nombre de standards d'étalonnage et de validation en fonction du Protocol.**

Standards	Niveau de concentration	Protocole				
		V <sub>1</sub>	V <sub>2</sub>	V <sub>3</sub>	V <sub>4</sub>	V <sub>5</sub>
SE. étalonnage sans la matrice	Bas		2		2	
	Médian	2	2 <sup>(2)</sup>	2	2 <sup>(2)</sup>	
	haut	2 <sup>(1)</sup>	2	2 <sup>(1)</sup>	2	
SE. étalonnage avec la matrice	Bas				2	2
	Médian			2	2 <sup>(2)</sup>	2 <sup>(2)</sup>
	Haut			2 <sup>(1)</sup>	2	2
	Additifs					2 <sup>(3)</sup>
SV. Validation avec la matrice	Bas	3	3	3	3	3
	Médian	3	3	3	3	3
	Haut	3	3	3	3	3
Nombre minimum série		3	3	3	3	3
Nombre total essai (minimum)		33	45	39	63	45

<sup>1</sup>Les caractéristiques inscrites entre parenthèses sont recommandées

<sup>2</sup>Sans objet : caractéristique non pertinente

<sup>3</sup>Pour les méthodes analytiques quantitatives, l'exactitude représente toujours la combinaison de la justesse et de la fidélité

<sup>4</sup>ou taux de faux positifs dans certains référentiels

<sup>5</sup>ou taux de faux négatifs dans certains référentiels [19]





## Partie expérimentale

La partie pratique de ce travail a été réalisé au sein du laboratoire de chimie analytique de département de pharmacie de la Faculté médecine de l'Université de Mouloud Mammeri à Tizi-Ouzou. L'objectif principal était de mettre au point et de valider une méthode de dosage du metronidazole dans des comprimés de 250 mg par chromatographie liquide à haute performance.

### 1. Matériels et méthodes

#### 1.1. Matériels

##### 1.1.1. Matières premières

Le principe actif metronidazole (matière première) est gracieusement offert par l'entreprise Pharmaceutique National BIOPHARM. Il répond au critère de conformité décrit dans la pharmacopée européenne en vigueur.

Les matières premières des excipients cités ci-dessous sont de même offertes par l'entreprise Pharmaceutique National BIOPHARM.

Ces excipients sont ; Amidon de blé, povidone K30, stéarate de magnésium, hypromellose, macrogol 2000.

La composition du placebo est définit tout en suivant la notice du produit fini et les recommandations du Hand Book of Excipient.

1.1.2. Equipements le tableau VI illustre les appareils du laboratoire chimie analytique ;

**Tableau VI: Appareillage du laboratoire chimie analytique utilisés.**

Désignation	Spécification	Usage
<b>Appareil HPLC (SHMADZU LC20)</b>	Colonne	C25 (cationique)
	Pompe	LC20AT
	Injecteur automatique	SIL 20A
	Contrôleur	CBM-20
	Compartiment de la colonne	CTO-20 A
	Détecteur	Détecteur Spectrophotométrique
	Logiciel d'exploitation	LC-solution
<b>Bain ultrasons : sonicateur</b>	Advantage-LAB	Dissolution (solubilisation)
<b>Pompe à vide</b>	Fisher bioblok-scientific Pmax =4 bar	Filtration de la phase mobile
<b>Balance analytique</b>	Kern ALT 220-5 DAM (précision 0.01mg)	Pesée
<b>Etuve</b>	Memmert	Séchage

## Partie expérimentale

**1.1.3. Verreries et autres** les verreries utilisées pour la préparation des solutions sont illustrées dans le tableau VII ci-dessous ;

**Tableau VII: Verreries et autres matériels utilisés.**

Verreries	Autres
Béchers ; Fioles jaugées de 25ml, 50ml, 100ml, 250ml, 1000ml et 2000ml ; Entonnoir ; Eprouvettes graduée 100ml, 1000ml ; Pipettes jaugée et graduée de 5ml ; Viales ; Erlenmeyer.	Pro pipette ; Compte-goutte ; Pissette à eau distillée ; Papier d'aluminium ; Papier film ; Papier filtre (Filtres Whatman) ; Bavettes ; Spatule ; Des flacons pour phase mobile ; Gant et masque de sécurité.

### 1.1.4. Réactif

Outre le solvant eau, le seul réactif utilisé dans le présent travail en vue de la validation de la méthode du metronidazole est le méthanol, ses principales propriétés sont citées dans le tableau VIII ci-dessous:

**Tableau VIII: Produit chimique utilisé.**

Produit	Méthanol grade HPLC
Formule chimique	CH <sub>4</sub> O
Masse molaire (g/mol)	32.04
Fournisseur	BIOCHEM

## 1.2. Méthodes

### 1.2.1. Conditions expérimentales

#### 1.2.1.1. Choix du protocole de validation

Le logigramme de la figure 4 nous permet de sélectionner le protocole de validation.

Les études préalables (étape de mise au point) ont montré l'absence d'effet matrice de la méthode. En outre, le système d'étalonnage fait référence à une gamme de concentrations, ainsi le Protocole choisi pour notre travail est le **V2** qui consiste à préparer ;

- Trois séries du standard d'étalonnage (SE) : Chaque série comporte 5 niveaux de concentration avec deux répétitions par niveau.
- Trois séries du standard de validation (SV) : Chaque série comporte 5 niveaux de concentration avec trois répétitions par niveau [18].

#### 1.2.1.2. Choix des paramètres de validation

Dans le domaine pharmaceutique [19] ;

- Limite d'acceptabilité ( $\lambda$ ) :  $\lambda = 5\%$
- Probabilité de confiance ( $\beta$ ) :  $\beta = 95\%$

## Partie expérimentale

**1.2.2. Préparation des solutions :** Les protocoles de préparation des solutions sont développés au laboratoire de Chimie analytique en phase de mise au point de la technique d'analyse.

**1.2.2.1. Diluant :** Correspondant au mélange méthanol / eau 20/80 (V/V).

Dans une fiole jaugée de 2000 ml, mélanger 400 ml de méthanol grade HPLC avec 1600 ml d'eau distillée, agiter et mettre le mélange à l'ultrason pendant 5 minutes.

**1.2.2.2. Solution placebo**

Dans une fiole de 250 ml, peser une masse  $m = 250\text{mg}$  du placebo (préalablement préparé selon la formule quantitative du médicament), dissoudre dans un volume suffisant du diluant. Agiter jusqu'à dissolution complète aux ultrasons et compléter au trait de jauge avec le même diluant, filtrer à travers un papier filtre la solution est obtenue ainsi.

**1.2.2.3. Solutions mères des standards**

Chaque jour, pendant 03 jours, 05 niveaux de concentration sont préparés à raison de 03 répétitions par niveau selon le tableau suivant :

**Tableau IX: Préparation des solutions mères des standards**

Niveaux de concentrations	80%			90%			100%			110%			120%		
Répétitions	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3
Pesées en mg de metronidazole	40			45			50			55			60		
Protocole	Dans une fiole de 50 mL, introduire la prise d'essai du metronidazole correspondant à chaque niveau de concentration, dissoudre dans un volume suffisant du diluant, mettre à l'ultrason pendant deux minutes, compléter au trait de jauge avec le diluant.														

Nombre de solutions à préparer (SM) :  $SM=5 \times 3 \times 3=45$  solutions (5 niveaux, 3 séries, 3 répétitions)

**1.2.2.4. Solutions standards d'étalonnage (SE) et de validation (SV)**

Une série de SE comporte 05 niveaux de concentration, chaque niveau de concentration est préparé par dilution  $1/5^{\text{ème}}$  de la solution mère correspondant, le tableau suivant résume la préparation des différentes séries des SE. Le tableau X ci-dessous résume la préparation des SE.

**Tableau X: Préparation des solutions des standards d'étalonnage.**

Niveaux	80%		90%		100%		110%		120%	
Répétitions	1	2	1	2	1	2	1	2	1	2
Protocole	-Mettre 5 ml de chacune des solutions mères dans une fiole de 25 ml ; - Compléter au trait de jauge avec le diluant (une dilution $1/5^{\text{ème}}$ ) ; -Agiter par retournement pour chaque prise d'essais, et remplir les viales.									

## Partie expérimentale

Nombre de solutions d'étalonnage à préparer =  $5 \times 3 \times 2 = 30$  (5 niveaux, 3 séries, 2 répétitions)

Une série de SV comporte 05 niveaux de concentration, chaque niveau de concentration est préparé par dilution  $1/5^{\text{ème}}$  de la solution mère correspondant avec **l'ajout de 5 mL de la solution placebo pour reconstituer le médicament**, le tableau XI suivant résume la préparation des différentes séries des SV.

**Tableau XI: Préparation des Standards de validation.**

Niveaux	80%			90%			100%			110%			120%		
Répétitions	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3
Protocole	- Mettre 5 ml de la solution mère dans une fiole de 25 ml ; - Ajouter 5 ml de la solution placebo ; - Compléter au trait de jauge avec le diluant (une dilution $1/5^{\text{ème}}$ ) ; - Agiter par retournement à chaque fois et remplir les viales.														

Nombre de solutions de validation à préparer =  $5 \times 3 \times 3 = 45$  (5 niveaux, 3 séries, 3 répétitions)

### 1.2.2.5. Phase mobile

Correspond à un mélange binaire Eau / méthanol 80/20 (volume/volume)

Dans une fiole de 1000ml, verser 200 ml du méthanol grade HPLC; compléter au trait de jauge avec de l'eau distillée après l'avoir mis dans l'ultrason pendant 5 mn, puis verser dans le réservoir de la phase mobile.

### 1.2.3. Validation analytique : Spécificité – Linéarité – Fidélité – Exactitude et profil d'exactitude, limites de dosage.

Suivant le nouveau protocole de validation analytique décrit par la commission de la SFSTP [17], tous les critères de validation (linéarité, exactitude, fidélité) sont simultanément étudiés en préparant et en analysant deux types de solutions. Les standards d'étalonnage (SE) et les standards de validation (SV).

La méthodologie suivie pour l'étude statistique de chaque paramètre est décrite dans l'annexe 1 du présent manuscrit.

### 1.2.4. Robustesse

La robustesse d'une méthode signifie 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 [1].

Dans le cas de notre étude les paramètres à varier sont : Teneurs en PA (paramètre A) Le débit de la phase mobile (paramètre B) et longueur d'onde de détection (paramètre C).

## Partie expérimentale

La valeur nominale ainsi que les changements à apporter pour chaque paramètre sont explicités dans le tableau ci-dessous ;

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

	<b>Paramètre A Concentration en metronidazole en %</b>	<b>Paramètre B Débit de la phase mobile</b>	<b>Paramètre C Longueur d'onde de détection</b>
<b>Valeur nominale</b>	100 %	1 ml/min	254 nm
<b>Variation</b>	± 5 %	± 0,2 ml/mn	± 2 nm
<b>Niveau bas (-)</b>	95%	0,8 ml/min	252 nm
<b>Niveau haut (+)</b>	105%	1,2 ml/min	256 nm

Les solutions à préparer pour l'étude de la robustesse ;

- **Solutions échantillons (SV) :** au nombre de 02
  - Echantillon 01 : SV 95%
  - Echantillon 02 : SV 105%
- **Une solution standard (SE) 100%** pour la quantification des échantillons.

Les échantillons 01 et 02 sont analysés pour chacune des débits de la phase mobile à deux longueurs d'onde différentes ; 252 nm et 256 nm.

Le nombre d'essais par HPLC à réaliser est de 8 réparties selon le tableau suivant :

**Tableau XIII: Plan d'expérience pour l'étude de la robustesse du dosage de metronidazole par HPLC**

<b>N° de l'essai</b>	<b>Echantillons</b>	<b>Débit (ml/mn)</b>	<b>Longueur d'onde (nm)</b>
<b>Essai N° 01</b>	Echantillon 01	0,8	252
<b>Essai N° 02</b>	Echantillon 02	0,8	252
<b>Essai N° 03</b>	Echantillon 01	0,8	256
<b>Essai N° 04</b>	Echantillon 02	0,8	256
<b>Essai N° 05</b>	Echantillon 01	1,2	252
<b>Essai N° 06</b>	Echantillon 02	1,2	252
<b>Essai N° 07</b>	Echantillon 01	1,2	256
<b>Essai N° 08</b>	Echantillon 02	1,2	256

• **Calcul de l'intervalle de confiance d'un paramètre :** Pour chaque paramètre ou leurs interactions, on calcule l'intervalle de confiance donné par la formule suivante ;

$$\text{Intervalle de confiance} = \text{Effet} \pm \frac{\sigma_{exp} \times t_{student}}{\sqrt{N}}$$

$\sigma_{exp}$  : écart type expérimental des réponses expérimentales  $t_{student}$  : coefficient de Student pour une probabilité  $1-\alpha/2$  et un degré de liberté (ddl) = n- 1

Pour un plan d'expérience à 3 paramètres, N = 8 et  $t_{Student} (\alpha = 0.05 \text{ ddl}=7) = 2.365$  ;

## Partie expérimentale

Intervalle de confiance = Effet  $\pm$  0.836  $\sigma_{\text{exp}}$  [1].

### 2. Résultat et discussions

#### 2.1. Résultats

##### 2.1.1. Résultat de l'étape de mise au point

La mise au point a été faite par adaptation de la méthode des substances apparentées de la monographie du metronidazole décrite dans la pharmacopée européenne en vigueur. Les résultats obtenus sont un pré-requis à la validation analytique. La mise au point consiste d'une part les conditions chromatographiques et d'autre part la préparation des solutions.

Les conditions chromatographiques issues de la mise au point de la méthode sont présentées dans le tableau XIV ci-après ;

**Tableau XIV : Résultats de mise au point de la méthode du dosage de metronidazole : Conditions chromatographiques**

<b>Colonne</b>	Longueur	150mm
	Diamètre	4.6mm
	Taille des particules	5 $\mu\text{m}$
	Phase stationnaire	C18 : OctaDécylSilyle (ODS) post-greffée pour chromatographie
<b>Phase mobile</b>	Eau / méthanol 80/20 V/V	
<b>Volume d'injection</b>	20 $\mu\text{l}$	
<b>Temps d'analyse</b>	06 min	
<b>Débit</b>	1 ml/min	
<b>Détection</b>	Spectrophotomètre UV-Visible : longueur d'onde $\lambda=254$ nm	
<b>Température</b>	Ambiante	

Les préparations des solutions optimisées sont décrites précédemment et résumées comme suit ;

**Diluant** : Eau / méthanol 80/20 V/V

**Solution standard (SE 100%)** : dans une fiole de 50 ml, peser 50 mg de metronidazole standard, dissoudre dans un volume suffisant du diluant et compléter au trait de jauge avec le même diluant. Effectuer une dilution  $1/5^{\text{ième}}$  dans le diluant.

**Solution échantillon (SV 100%)** : dans une fiole de 50 ml, peser une quantité du médicament (forme pharmaceutique reconstituée) contenant 50 mg de metronidazole, dissoudre dans un volume suffisant du diluant et compléter au trait de jauge avec le même diluant. Effectuer une dilution  $1/5^{\text{ième}}$  dans le diluant.

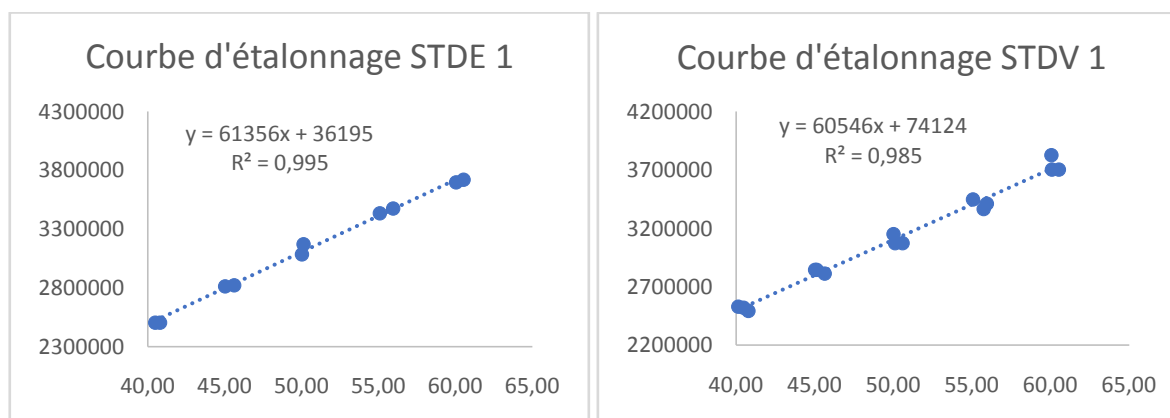
## Partie expérimentale

### 2.1.2. Résultats de l'étape de validation

#### 2.1.2.1. Spécificité

La spécificité de la méthode analytique est démontrée à l'aide d'une approche statistique qui consiste à comparer les pentes des droites de régression linéaire obtenues à partir des standards de validation (avec matrice) et des standards d'étalonnage (sans matrice).

La figure 5 ci-dessous présente les deux droites qui expriment la relation existante entre les masses introduites et les réponses pour le metronidazole pour le SE et le SV.



**Figure 5 : Courbes d'étalonnage obtenues pour les SE et SV du metronidazole.**

Le tableau XV présente les valeurs de la pente et de l'ordonnée à l'origine obtenues à partir des SE et SV ;

**Tableau XV: Valeurs de la Pente et de l'ordonnée à l'origine obtenues à partir des SE et SV**

	SE 1	SV 1
Pente (a)	61356,34	60641,75
Erreur de la pente ( $\sigma_a$ )	1386,85	1652,97
Ordonnée à l'origine (b)	36194,59	69300,69
Erreur de l'ordonnée à l'origine ( $\sigma_b$ )	70491,00	84008,76

Afin de comparer les pentes des droites obtenues à partir des SE et SV, le test t de student est appliqué pour un risque  $\alpha$  de 5%.

En cas de comparabilité des deux pentes ( $t$  calculé <  $t^\circ$  lue sur la table de student) on déduira la spécificité de la méthode.

Les résultats des comparaisons sont présentés dans le tableau XVI ci-dessous ;

## Partie expérimentale

Tableau XVI : Comparaison des pentes des droites SE et SV

Test de STUDENT	
ddl	21
$\beta$	0,95
$\alpha$	0,05
$t^\circ =$	2,08
$t_c =$	0,33
Condition : $t_c < t^\circ$	

La valeur de  $t_c$  est donnée par la formule suivante ;

$$t_c = \frac{|a_{SE} - a_{SV}|}{\sqrt{\sigma_{a_{SE}}^2 + \sigma_{a_{SV}}^2}} = \frac{|61356,34 - 60641,75|}{\sqrt{(1386,86)^2 + (1652,97)^2}} = 0,33$$

➤ Si  $t_c$  est inférieur à  $t^\circ$ , l'hypothèse est vérifiée, il en résulte que la méthode est spécifique.

La superposition des courbes d'étalonnage et de validation de metronidazole est présentée dans la figure 6 ci-dessous :

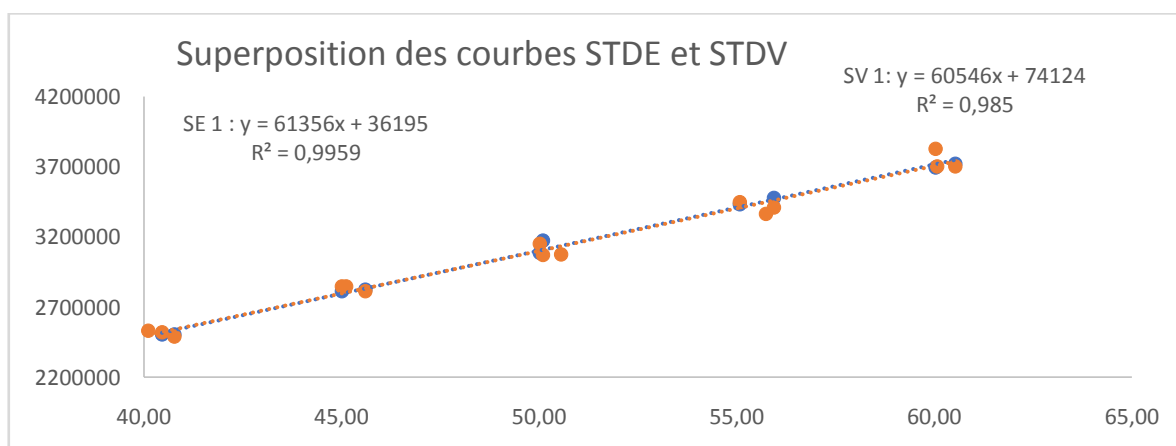


Figure 6 : Superposition des courbes d'étalonnage et de validation du metronidazole.

### 2.1.2.2. Fonction de réponse

Une fois l'expérience est réalisée et les données sont collectées, il convient d'établir une fonction de réponse qui est basée sur la relation existante entre la réponse instrumentale ( $Y$ ) et la quantité de la substance à doser ( $x$ ), autrement dit, l'aire du pic en fonction de la prise d'essai en metronidazole.

Le tableau XVII ci-dessous présente les données brutes obtenues pour les 3 séries de la gamme SE.



## Partie expérimentale

---

## Partie expérimentale

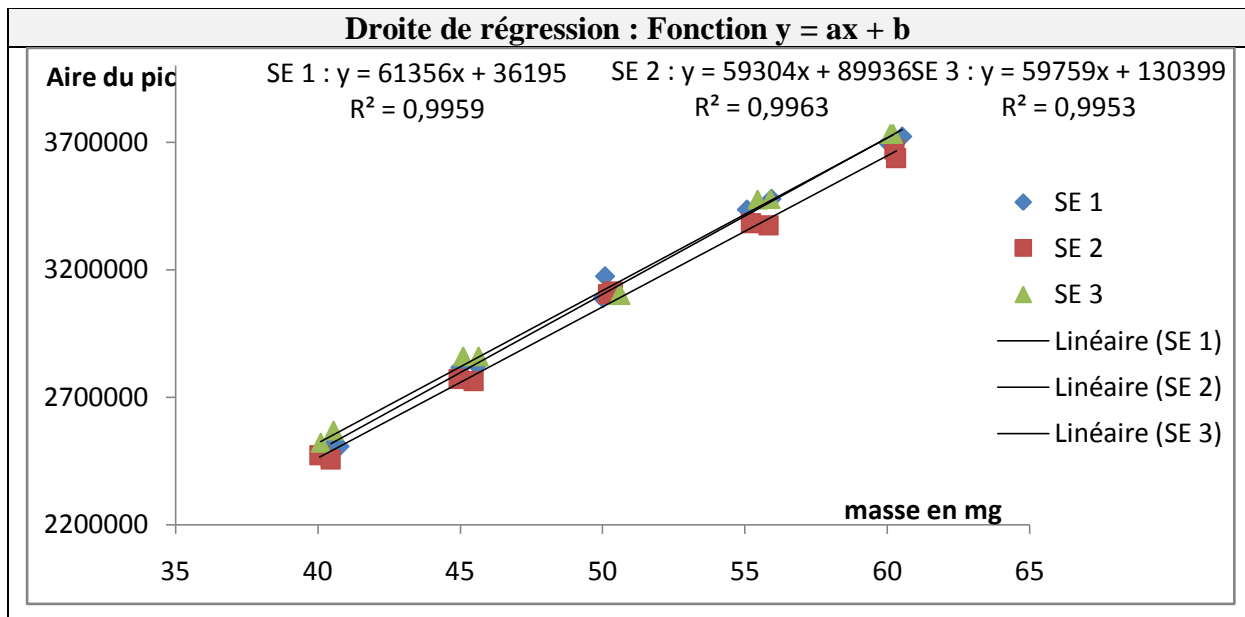
**Tableau XVII : Données brutes obtenues pour les SE.**

<b>Gamme standard d'étalonnage</b>					
<b>série 1</b>		<b>série 2</b>		<b>série 3</b>	
Prise d'essai en mg	Aire de pic du metronidazole	Prise d'essai en mg	Aire de pic du metronidazole	Prise d'essai en mg	Aire de pic du metronidazole
<b>40,76</b>	2507232	40,05	2471402	40,54	2569955
<b>40,45</b>	2506866	40,46	2455108	40,10	2522205
<b>45,00</b>	2815467	45,48	2762565	45,64	2860558
<b>45,59</b>	2825099	44,95	2771052	45,09	2860921
<b>50,00</b>	3088163	50,20	3103299	50,56	3100817
<b>50,09</b>	3174324	50,37	3112707	50,62	3100817
<b>55,93</b>	3477369	55,84	3372870	55,44	3476109
<b>55,06</b>	3435306	55,22	3381422	55,89	3477781
<b>60,52</b>	3722666	60,26	3670325	60,20	3732048
<b>60,02</b>	3697465	60,30	3636196	60,10	3732048

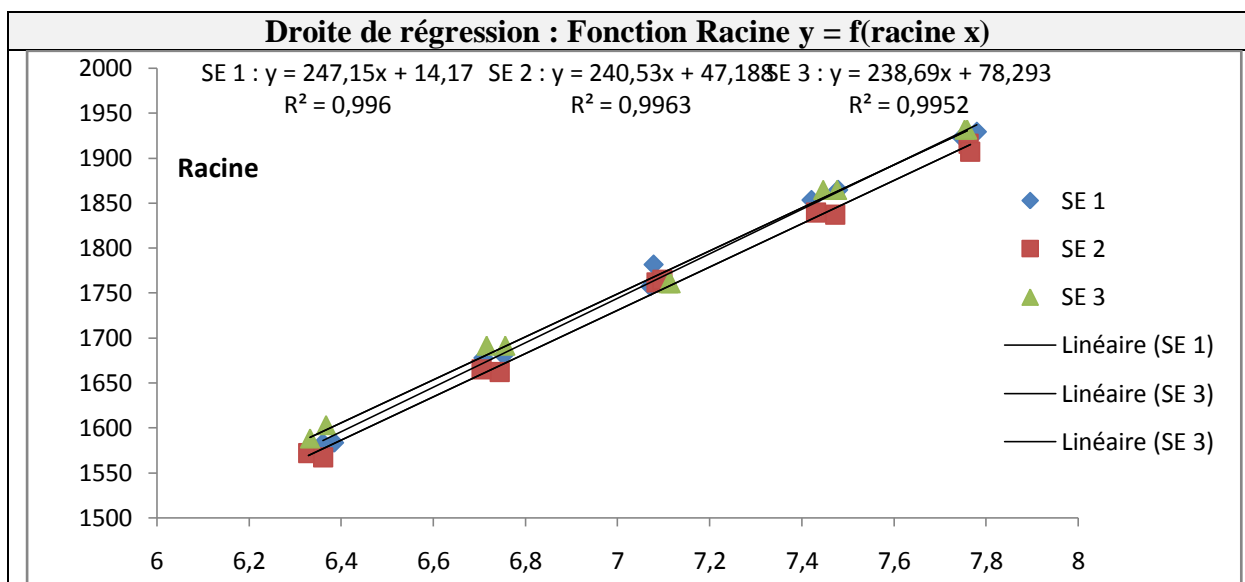
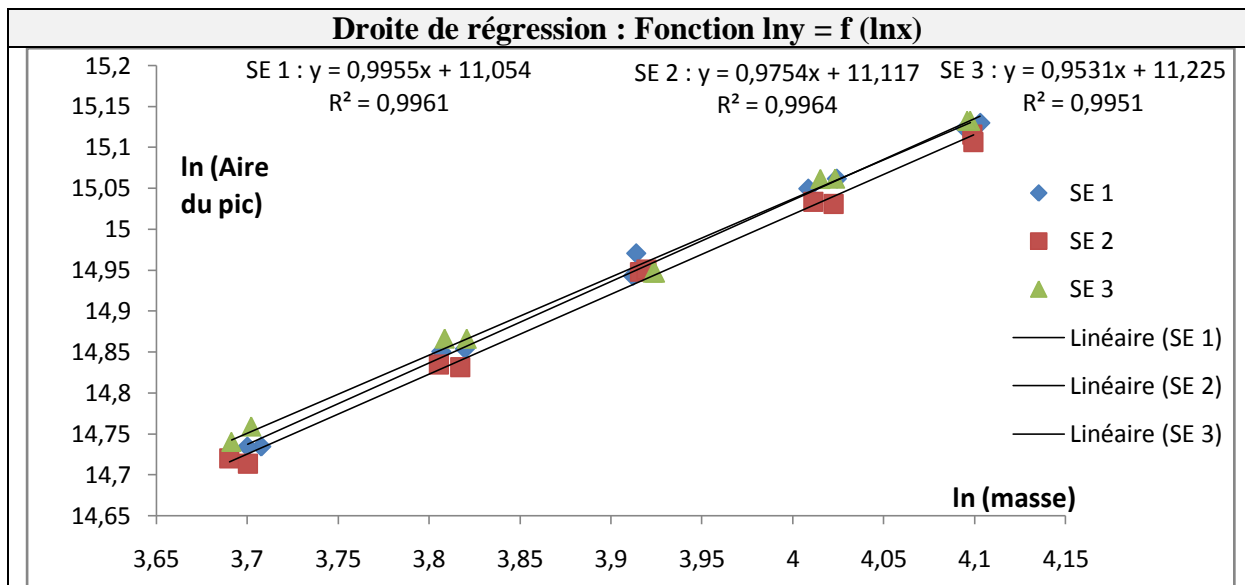
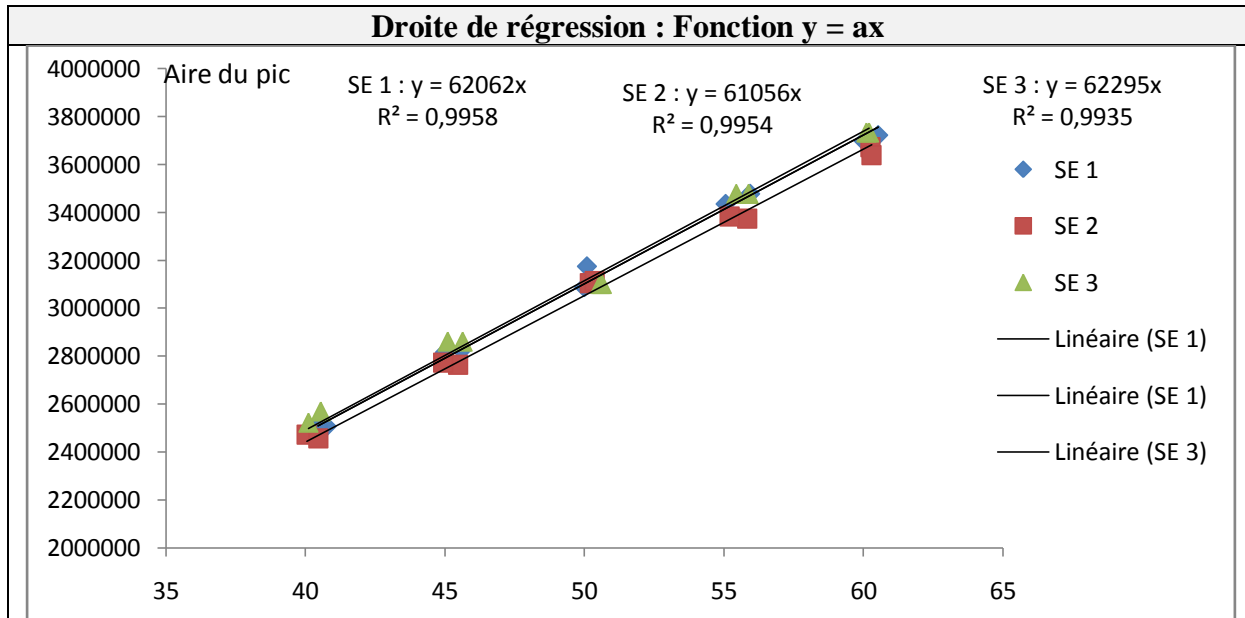
Les modèles mathématiques testés pour établir l'équation reliant les réponses expérimentales aux quantités du PA sont :

- $y = ax + b$
- $y = ax$
- $\ln(y) = f(\ln x)$
- racine  $y = f(\text{racine } x)$

Les droites de régression obtenues sont présentées ci-dessous ;



## Partie expérimentale



## Partie expérimentale

### – Choix de la fonction de réponse

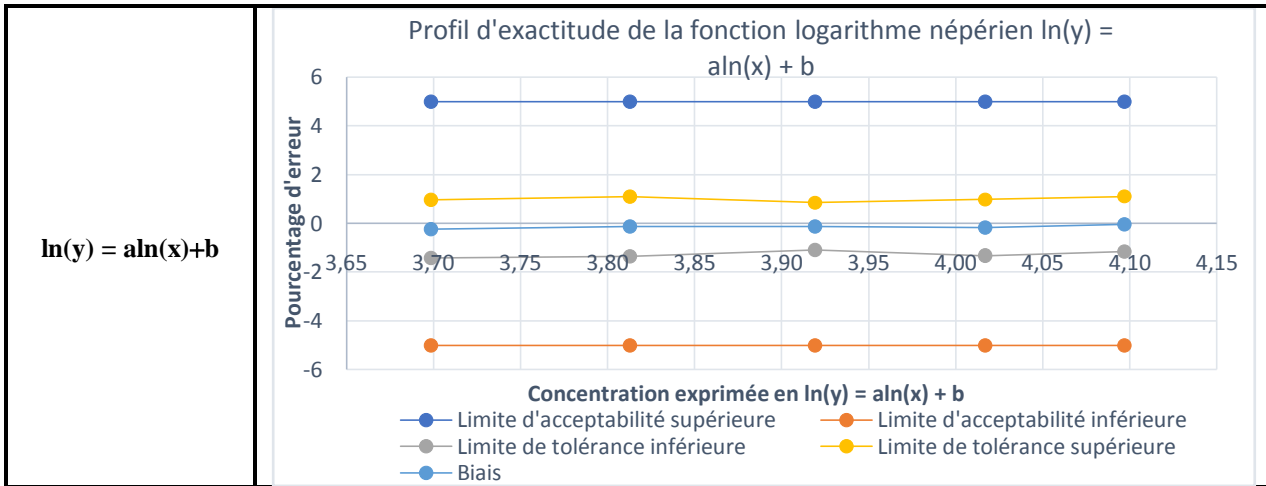
Le choix de la fonction de réponse repose sur le profil d'exactitude étant compris dans l'intervalle d'acceptabilité. En cas où deux (02) profils ou plus répondent à cette règle, le profil le plus simple dans l'utilisation de routine sera choisi.

Les différents profils obtenus pour chacune des équations testées sont présentés dans le tableau XVIII ci-après ;

**Tableau XVIII : Critères de choix de la fonction de réponse pour le metronidazole.**

Modèle de fonction de réponse	Profil d'exactitude
$y=ax+b$	<p style="text-align: center;">Profil d'exactitude de la fonction linéaire simple <math>y = ax + b</math></p> <p style="text-align: center;">Niveau de concentration exprimée en mg/50 mL</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>—●— Limite d'acceptabilité supérieure</li> <li>—●— Limite d'acceptabilité inférieure</li> <li>—●— Limite de tolérance inférieure</li> <li>—●— Limite de tolérance supérieure</li> </ul>
$y=ax$	<p style="text-align: center;">Profil d'exactitude de la fonction linéaire passant par zero <math>y = ax</math></p> <p style="text-align: center;">concentration exprimée en mg/50 mL</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>—●— Limite d'acceptabilité supérieure</li> <li>—●— Limite d'acceptabilité inférieure</li> <li>—●— Limite de tolérance inférieure</li> <li>—●— Limite de tolérance supérieure</li> </ul>
$\sqrt{Y} = a\sqrt{x}+b$	<p style="text-align: center;">Profil d'exactitude de la fonction racine carrée <math>Rac(y) = aRac(x) + b</math></p> <p style="text-align: center;">Concentration exprimée en Rac(mg/mL)</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>—●— Limite d'acceptabilité supérieure</li> <li>—●— Limite d'acceptabilité inférieure</li> <li>—●— Limite de tolérance inférieure</li> </ul>

## Partie expérimentale



### 2.1.2.3. Justesse – Fidélité – Exactitude – limites de dosage

#### A. Alignement des observations

Les données brutes obtenues pour les trois séries de standards de validation sont présentées dans le tableau XIX ci-dessous ;

Tableau XIX : Données brutes : Standard de validation (dans la matrice)							
Niv de Conc	Répétitions i	Série 1		Série 2		Série 3	
		Quantités introduites	signal (aire du pic)	Quantités introduites	signal (aire du pic)	Quantités introduites	signal (aire du pic)
1	1	40,76	2512956	40,94	2488636	40,54	2506413
	2	40,45	2521916	40,46	2487983	40,10	2506413
	3	40,09	2511302	40,04	2459415	40,08	2435429
2	1	45,00	2833795	45,62	2777763	45,64	2777137
	2	45,59	2837134	44,95	2730867	45,09	2731938
	3	45,10	2839279	45,42	2818874	45,10	2819224
3	1	50,00	3138561	50,20	3108857	50,56	3110277
	2	50,09	3065230	50,37	3055657	50,62	3108316
	3	50,55	3096140	50,70	3107291	50,07	3108695
4	1	55,93	3433516	55,84	3361088	55,44	3359667
	2	55,06	3418280	55,22	3390132	55,89	3392346
	3	55,73	3376232	55,48	3449216	55,12	3450570
5	1	60,52	3724232	60,26	3674679	60,10	3642874
	2	60,02	3818070	60,30	3701131	60,20	3699711
	3	60,06	3694355	59,89	3706405	60,00	3642874

L'alignement appliqué aux réponses obtenues avec les trois séries des standards de validation, sur la moyenne des masses introduites pour chaque niveau de concentration théorique est résumé dans le tableau suivant :

## Partie expérimentale

**Tableau XX: Aligement des réponses observées sur les trois séries de validation pour le metronidazole.**

Niveaux de concentration	Répétitions	Réponses alignées pour le model $y = ax + b$		
		série 1	série 2	série 3
80%	1	2492912,93	2460412,08	2488006,10
	2	2520893,39	2489210,13	2515002,89
	3	2532367,68	2486411,79	2445246,02
90%	1	2847906,96	2759969,66	2754844,19
	2	2815045,72	2754182,41	2743391,18
	3	2847255,32	2813351,93	2830063,62
100%	1	3151650,35	3122559,92	3101482,59
	2	3072797,28	3058929,34	3095840,21
	3	3075483,36	3090315,74	3129965,20
110%	1	3411632,24	3341044,93	3362325,77
	2	3449776,26	3408129,86	3367394,42
	3	3366619,51	3451261,21	3472862,81
120%	1	3704597,97	3667929,80	3642874,00
	2	3829114,14	3691927,55	3693575,37
	3	3702944,89	3722357,65	3649009,63

### B. Calcul des prédictions inverses

C'est les concentrations déterminées dans les standards de validation.

Les concentrations en analyte sont estimées à partir de l'équation de la fonction et les réponses (alignées ou pas), on parle des prédictions inverses. Les concentrations inverses prédites des standards de validation sont calculées en utilisant la fonction inverse du modèle d'étalonnage [17].

Les prédictions inverses obtenues à partir des SV sont présentées dans le tableau ci-dessous :

**Tableau XXI : Prédictions inverses obtenus à partir des SV de metronidazole.**

Niveaux de concentration	Répétitions	Prédictions inverses (en mg)		
		série 1	série 2	série 3
80%	1	40,04	39,97	39,45
	2	40,50	40,46	39,90
	3	40,68	40,41	38,74
90%	1	45,83	45,02	43,92
	2	45,29	44,93	43,73
	3	45,82	45,92	45,18
100%	1	50,78	51,14	49,72
	2	49,49	50,06	49,62
	3	49,54	50,59	50,19
110%	1	55,01	54,82	54,08
	2	55,64	55,95	54,17
	3	54,28	56,68	55,93
120%	1	59,79	60,33	58,78
	2	61,82	60,74	59,63
	3	59,76	61,25	58,88

## Partie expérimentale

### C. Justesse : Calcul du biais absolu, biais relatif et les recouvrements

La justesse fournit une indication sur les erreurs systématiques de la procédure analytique.

Elle est exprimée en termes de biais absolu ou de biais relatif (%) ou de taux de recouvrement pour chaque niveau de concentration [17]. Les résultats présentés dans le tableau XXII suivant ;

**Tableau XXII : Justesse calculée pour chaque niveau de concentration des standards de validation pour le metronidazole.**

Niveaux de concentrations	80%	90%	100%	110%	120%
Biais absolu	-0.37	-0.21	-0.23	-0.35	-0.04
Biais relatif (%)	-0.911	-0.463	-0.447	-0.629	-0.070
Recouvrements (%)	99,94	98,35	98,71	100,30	100,54

### D. Fidélité : Calcul des coefficients de variation de répétabilité et de fidélité intermédiaire.

La fidélité fournit une indication sur les erreurs dues au hasard. Elle est estimée en calculant l'écart type intra et inter séries pour chaque niveau de concentration de l'intervalle de dosage.

Elle est exprimée par les coefficients de variation, les résultats obtenus sont présentés dans les tableaux ci-dessous :

**Tableau XXIII : Fidélité \_ Calcul des écarts types et des coefficients de variations**

Paramètres de fidélité	Niveaux de concentration				
	80%	90%	100%	110%	120%
MSM	0,97	1,52	0,51	0,98	2,39
MSE <sub>1</sub>	0,18	0,34	0,30	0,81	0,61
Ecart type intra série	0,42	0,58	0,55	0,90	0,78
Ecart type Inter série	0,30	0,36	0,15	0,14	0,44
Écart type de F, I,	0,51	0,69	0,57	0,91	0,9
CV répétabilité	1,04	1,29	1,1	1,62	1,29
CV fidélité intermédiaire	1,27	1,51	1,14	1,64	1,49

### E. Exactitude : Erreur totale et profil d'exactitude

Les résultats du calcul des erreurs totales et relatives ainsi que les limites de l'intervalle de tolérance sont présentés dans le tableau suivant :

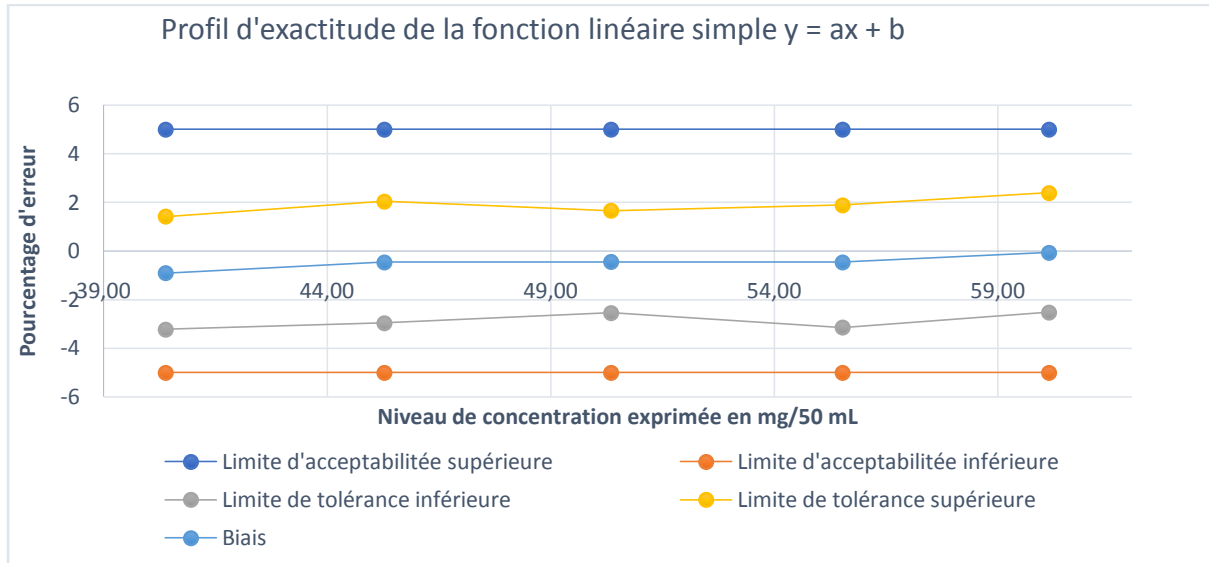
**Tableau XXIV : Calcul des limites des intervalles de tolérance**

Niveaux de concentrations	Erreur totale absolue	Erreur totale relative	Biais relatif (en %)	Intervalles de tolérance	
				Limite inférieure	Limite supérieure
80%	0,88	2,183	-0,911	-3,229	1,408
90%	0,90	1,978	-0,464	-2,960	2,033
100%	0,80	1,583	-0,448	-2,547	1,652
110%	1,26	2,268	-0,629	-3,147	1,889
120%	0,94	1,560	-0,070	-2,525	2,385

## Partie expérimentale

### Conception graphique du profil d'exactitude

Le profil d'exactitude est obtenu en reliant entre elles les bornes supérieures puis les bornes inférieures de l'intervalle de tolérance. Le profil obtenu pour notre méthode est présenté dans la figure ci-dessous :



**Figure 7: Profil d'exactitude de la méthode de dosage du metronidazole par HPLC.**  
**2.1.2.4. Linéarité de la méthode**

Linéarité de la méthode de dosage exprime la relation existante entre les masses (ou concentrations) prédites en fonction des masses (ou concentrations) introduites pour la préparation des standards de validation.

L'ensemble des données introduites et prédites pour chaque niveau, répétition et série ainsi que les moyennes calculées sont présentées dans le tableau ci-après ;



## Partie expérimentale

**Tableau XXV : Masses introduites et masses prédites durant la validation analytique de la méthode de dosage du metronidazole par HPLC.**

Niveaux	Répét	Masses introduites						Masses prédites					
		Valeurs des répétitions			Moyennes des répétitions			Valeurs des répétitions			Moyennes des répétitions		
		Série 1	Série 2	Série 3	Série 1	Série 2	Série 3	Série 1	Série 2	Série 3	Série 1	Série 2	Série 3
80%	1	40,76	40,94	40,54	<b>40,43</b>	<b>40,48</b>	<b>40,24</b>	40,04	39,97	39,45	<b>40,41</b>	<b>40,28</b>	<b>39,36</b>
	2	40,45	40,46	40,10				40,50	40,46	39,90			
	3	40,09	40,04	40,08				40,68	40,41	38,74			
90%	1	45,00	45,62	45,64	<b>45,23</b>	<b>45,33</b>	<b>45,28</b>	45,83	45,02	43,92	<b>45,65</b>	<b>45,29</b>	<b>44,28</b>
	2	45,59	44,95	45,09				45,29	44,93	43,73			
	3	45,10	45,42	45,10				45,82	45,92	45,18			
100%	1	50,00	50,20	50,56	<b>50,21</b>	<b>50,42</b>	<b>50,42</b>	50,78	51,14	49,72	<b>49,94</b>	<b>50,60</b>	<b>49,84</b>
	2	50,09	50,37	50,62				49,49	50,06	49,62			
	3	50,55	50,70	50,07				49,54	50,59	50,19			
110%	1	55,93	55,84	55,44	<b>55,57</b>	<b>55,51</b>	<b>55,48</b>	55,01	54,82	54,08	<b>54,98</b>	<b>55,82</b>	<b>54,73</b>
	2	55,06	55,22	55,89				55,64	55,95	54,17			
	3	55,73	55,48	55,12				54,28	56,68	55,93			
120%	1	60,52	60,26	60,10	<b>60,20</b>	<b>60,15</b>	<b>60,10</b>	59,79	60,33	58,78	<b>60,46</b>	<b>60,77</b>	<b>59,10</b>
	2	60,02	60,30	60,20				61,82	60,74	59,63			
	3	60,06	59,89	60,00				59,76	61,25	58,88			

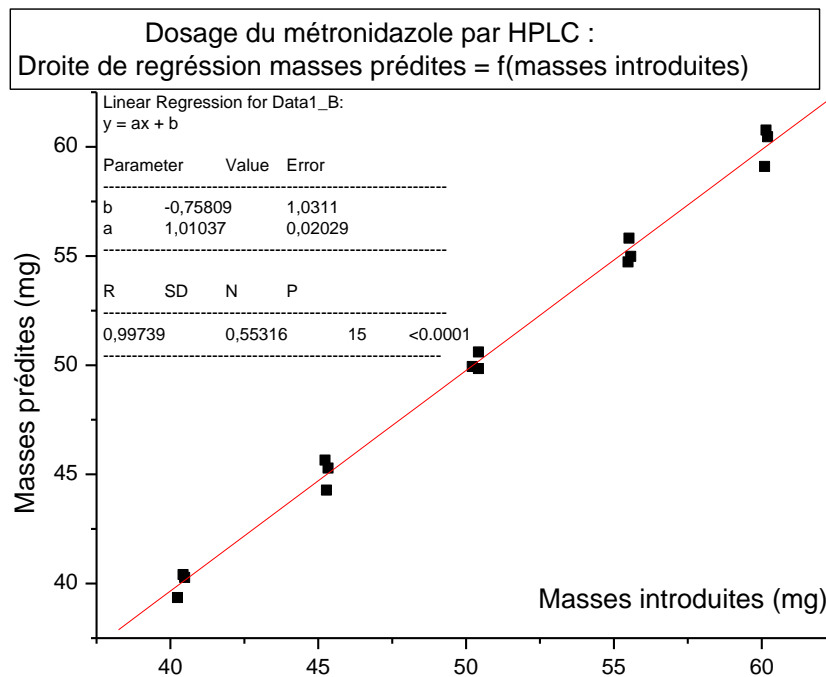
Les moyennes des répétitions par série des masses introduites et prédites servant à l'établissement de la droite de régression linéaire sont reprises dans le tableau ci-dessous ;

**Tableau XXVI : Moyennes des masses introduites et prédites par série \_ Base de données de la linéarité.**

Niveaux de concentration	Moyennes des répétitions	Masses introduites (mg)	Masses prédites (mg)
80%	Série 1	40,43	40,41
	Série 2	40,48	40,28
	Série 3	40,24	39,36
90%	Série 1	45,23	45,65
	Série 2	45,33	45,29
	Série 3	45,28	44,28
100%	Série 1	50,21	49,94
	Série 2	50,42	50,60
	Série 3	50,42	49,84
110%	Série 1	55,57	54,98
	Série 2	55,51	55,82
	Série 3	55,48	54,73
120%	Série 1	60,20	60,46
	Série 2	60,15	60,77
	Série 3	60,10	59,10

## Partie expérimentale

La droite de régression linéaire par la méthode des moindres carrés, masses prédites en fonction des masses introduites est présentée dans la figure 8 suivante :



**Figure 8 : Droite de régression linéaire : Masses prédites = f (masses introduites)  
(Obtenu à l'aide du logiciel Origin 6.0)**

La régression donne une équation de la droite ;  $y = 1,01037 x - 0,75809$  avec ;

- Erreur de la pente  $\sigma_a = 0,02029$
- Erreur de l'ordonnée à l'origine  $\sigma_b = 1,0311$
- Coefficient de corrélation  $R = 0,99739$

La pente est l'ordonnée à l'origine sont respectivement comparées avec 1 et 0 à l'aide du test t de student. Les formules appliquées sont les suivantes ;

$$t_{ca} = \frac{|a-1|}{\sigma_a}, \text{ et } t_{cb} = \frac{|b|}{\sigma_b}$$

Les valeurs ainsi obtenues sont comparées avec la valeur seuil lue sur la table de student pour un risque  $\alpha$  5% et un degré de liberté = n-2 soit  $t^\circ(0,05, 13) = 2,16$

Les résultats obtenues sont présentées dans le tableau XXVII ci-dessous ;

## Partie expérimentale

**Tableau XXVII: Etude statistique de la linéarité : masse prédites en fonctions des masses introduites**

	<b>Pente</b>	<b>Ordonnée à l'origine</b>
Valeur	1,01037	0,75809
Erreur	0,02029	1,0311
t calculé	0,51	0,74
t°(0,05 ; 13)	2,16	2,16
Condition	<b>t calculé &lt; t° (0,05 ; 13)</b>	
Résultats	La pente a est comparable avec 1	L'ordonnée à l'origine b est comparable avec 0

Le test t de student montre que les valeurs calculées pour la comparaison de la pente avec 1 et l'ordonnée à l'origine avec 0 sont inférieures à la valeur seuil lue sur la table de student. Il en résulte que la méthode est linéaire dans l'intervalle de concentration étudié. De plus, la comparaison de b avec 0 indique que le prolongement de la droite permet le passage par le point 0 (origine).

### **F. Limites de quantifications**

A partir du profil d'exactitude, l'intersection entre les tracés (inférieur et supérieur) et les limites d'acceptation définissent les limites de quantification basse et haute de la procédure.

Le profil d'exactitude obtenu montre que l'ensemble des intervalles de tolérance sont compris dans l'intervalle d'acceptabilité [-5%, +5%] ce qui atteste que l'intervalle de dosage de la méthode est couvert par toutes les concentrations étudiées. Il en découle de cette conclusion que les limites inférieure et supérieure sont définis comme suit ;

- **Limite inférieure de quantification = 0,16016 mg/mL**
- **Limite supérieure de quantification = 0,24208 mg/mL**

#### **2.1.2.5. Résultats de la robustesse**

L'étude statistique consiste en premier lieu à calculer des effets d'interactions à partir des réponses mesurées et de la matrice des expériences, qui sera suivie de la recherche de la significativité des effets. Les données brutes de l'étude de la robustesse sont présentées dans le tableau XXVIII et les résultats du calcul des intervalles de confiance sont présentés dans le tableau XXIX.

## Partie expérimentale

**Tableau XXVIII : Donnés brutes de l'étude de la robustesse**

N° de l'essai	A (teneur en %)	B (Débit de la phase mobile (ml/mn))	C longueur d'onde de détection (nm)	Masse introduite (Echantillon)	Masse (Standard) en mg	Teneur introduite (%)	Aire du pic (échantillon)	Aire du pic (standard)	Masse estimée en mg	Reponse (Teneur en %)
1	95%	0,8	252	47,5	50,00	95,00	3413277	3740743	45,62	91,25
2	105%	0,8	252	52,5	50,00	105,00	3822170	3740743	51,09	102,18
3	95%	1,2	252	47,5	50,00	95,00	3431121	3675794	46,67	93,34
4	105%	1,2	252	52,5	50,00	105,00	3869824	3675794	52,64	105,28
5	95%	0,8	256	47,5	50,00	95,00	2376133	2626142	45,24	90,48
6	105%	0,8	256	52,5	50,00	105,00	2713513	2626142	51,66	103,33
7	95%	1,2	256	47,5	50,00	95,00	2103511	2318876	45,36	90,71
8	105%	1,2	256	52,5	50,00	105,00	2413759	2253679	53,55	107,10
<b>Ecart type</b>									<b>7,16</b>	

**Tableau XXIX : Calcul des effets des paramètres et leurs intervalles de confiance pour l'étude la robustesse metronidazole.**

	Essais	Facteurs			interactions			
		A	B	C	AB	AC	BC	ABC
	1	-91.25	-91.25	-91.25	91.25	91.25	91.25	-91.25
	2	102.18	-102.18	-102.18	-102.18	-102.18	102.18	102.18
	3	-93.34	93.34	-93.34	-93.34	93.34	-93.34	93.34
	4	105.28	105.28	-105.28	105.28	-105.28	-105.28	-105.28
	5	-90.48	-90.48	90.48	90.48	-90.48	-90.48	90.48
	6	103.33	-103.33	103.33	-103.33	103.33	-103.33	-103.33
	7	-90.71	90.71	90.71	-90.71	-90.71	90.71	-90.71
	8	107.10	107.10	107.10	107.10	107.10	107.10	107.10
	<b>Somme</b>	52.10	9.21	-0.42	4.55	6.37	-1.19	2.54
	<b>Effet</b>	6.51	1.15	-0.05	0.57	0.80	-0.15	0.32
<b>Intervalle de confiance</b>	<b>limite inferieur</b>	<b>0.53</b>	<b>-4.83</b>	<b>-6.04</b>	<b>-5.42</b>	<b>-5.19</b>	<b>-6.13</b>	<b>-5.67</b>
	<b>limite supérieur</b>	<b>12.50</b>	<b>7.13</b>	<b>5.93</b>	<b>6.55</b>	<b>6.78</b>	<b>5.83</b>	<b>6.30</b>

## **2.2. Discussions**

### **2.2.1. Discussions des résultats l'étape de mise au point**

L'étape de mise au point s'est concrétisée par l'optimisation des conditions expérimentales que ça soit pour la préparation des différents types de solutions que pour les conditions chromatographiques. Ces conditions ont servi à la mise en place d'un protocole de validation authentique à notre méthode de dosage du metronidazole dans les comprimés par HPLC.

### **2.2.2. Discussions de l'étape de validation**

#### **2.2.2.1. Spécificité**

Le test t de student appliqué à la comparaison des pentes des SE et SV a donné une valeur de  $t_c = 0,33$ , cette valeur est inférieure à la valeur seuil lue sur la table de student pour un risque  $\alpha$  de 5% et un degré de liberté de 21. Ceci atteste que les deux pentes sont statistiquement comparables au risque de 5%, nous déduisons donc la spécificité de la méthode.

En effet, Selon la figure 6, les droites d'étalonnages et de validations sont graphiquement superposables.

#### **2.2.2.2. Choix de fonction de réponse**

D'après les profils d'exactitude établis pour les 4 models mathématiques, tous les profils sont compris dans l'intervalle d'acceptabilité [-5% - +5%] mais en raison de sa simplicité d'utilisation dans la pratique courante, la fonction linéaire simple  $y = ax + b$  est choisi comme fonction de réponse.

#### **2.2.2.3. Justesse**

Les biais relatifs obtenus fluctuent au tour de la valeur théorique de 0% avec un écart inférieur à 5%. Les recouvrements obtenus varient au voisinage de 100% avec une valeur minimale de 98,71% et une valeur maximale de 100,45%.

#### **2.2.2.4. Fidélité intermédiaire**

La dispersion des prédictions inverses des concentrations des trois séries de validation est assez étroite pour tous les niveaux de concentration, du fait que les coefficients de variation de la répétabilité et de fidélités intermédiaires de tous les niveaux sont inférieurs à **2% retenue comme norme de la fidélité.**

#### **2.2.2.5. L'erreur totale et le profil d'exactitude**

Selon les résultats du tableau XXIV, Les erreurs maximales de tous les niveaux de concentrations sont inférieures à la limite d'acceptation  $\pm 5\%$ .

Le model linéaire simple choisi comme fonction de réponse a donné un profil d'exactitude compris dans l'intervalle d'acceptation.

#### **2.2.2.6. Intervalle de dosage**

Les résultats obtenus concernant l'intervalle de dosage couvrent l'ensemble des concentrations étudiées ce qui donne une limite inférieure de quantification de 0,16016 mg/mL et une limite supérieur de quantification de 0,24203 mg/mL.

#### **2.2.2.7. Linéarité**

La méthode est linéaire dans l'intervalle de concentration de 0,16016 mg/mL – 0,24203 mg/mL avec une droite : Concentration prédite = **1,01037** Concentration introduite – **0,75809** et une régression satisfaisante (coefficient de corrélation **R = 0,99739**).

#### **2.2.2.8. Robustesse**

**Pour le paramètre A** : L'intervalle de confiance de son effet ne contient pas la valeur 0, la méthode n'est pas robuste pour le paramètre A. Ceci est prévisible, car la méthode est jugée linéaire donc sensible à la concentration en principe actif.

**Pour les paramètres B et C et leurs interactions** : Les intervalles de confiances de leurs effets contiennent la valeur 0. La méthode est jugée robuste pour les changements des paramètres : débit de la phase mobile et longueur d'onde de détection dans les limites étudiées.

## Conclusion générale

---

En industrie pharmaceutique, La fiabilité des résultats analytiques est primordiale et doit être en accord avec les exigences et les besoins de l'utilisateur final, ce qui fait de la validation l'élément crucial du cycle de vie d'une méthode analytique. Elle figure parmi les mesures universellement reconnues, comme faisant nécessairement partie d'un système exhaustif d'assurance qualité.

Les résultats issus des méthodes analytiques ont un rôle essentiel dans de nombreux domaines suite aux décisions qui sont prises sur leur base.

Au terme de notre étude, nous avons réussi à mettre au point et valider une méthode de dosage du métronidazole dans des comprimés de 250 mg par Chromatographie Liquide à Haute Performance « HPLC ».

La méthode de dosage du métronidazole objet d'étude est mise au point au niveau du laboratoire de Chimie Analytique du Département de Pharmacie de Tizi Ouzou, la validation de cette méthode a été réalisée selon le protocole proposé par une commission de la Société Française des Sciences et Techniques Pharmaceutiques publié dans la revue STP Pharma pratique en janvier 2006 basé sur le profil d'exactitude. Les résultats ont montré que la méthode est spécifique, linéaire, fidèle et juste dans l'intervalle de concentration de 0,16016 – 0,24203 mg/mL au risque de 5% avec une fonction de réponse  $y = ax + b$ .

La méthode est jugée aussi robuste pour de faibles variations du débit de la phase mobile et de la longueur d'onde de détection.

Suite aux résultats obtenus la méthode est jugée valide et peut être utilisée en analyse de routine pour le dosage du métronidazole dans les comprimés de 250 mg.

## Références bibliographiques

---

- [1] **MAMOU.M**« STRATEGIES DE VALIDATION DE NETTOYAGE EN INDUSTRIE PHARMACEUTIQUE : NOUVELLES RECOMMANDATIONS ET APPLICATIONS AUX EQUIPEMENTS DE FABRICATION DANS UN SITE MULTIPRODUIT », Thèse de doctorat, Université Mouloud MAMMERI T.O faculté médecine, département pharmacie, (2018).
- [2] **BAHNOUS. M**« SYNTHESE DE NITROIMIDAZOLES PAR SRN1, ESSAIS DE QUATERNISATION», Thèse de doctorat, Université Mentouri-Constantine Faculté des sciences exactes, département de chimie, (2007).
- [3]OECD, Screening Information Dataset Imidazole, CAS N°: 288-32-4: UNEP Publications, (2003).
- [4] **SIBRAC-PELAYO.C**«LES ANTIFONGIQUES AZOLES : UTILES ET EFFICACES MAIS NON DENUES DE DANGER. ADAPTATION DE LA THERAPIE ANTIFONGIQUE CHEZ UNE PATIENTE ATTEINTE D’HISTOPLASMOSE», Thèse de doctorat, Université Toulouse III Paul Sabatier Faculte des sciences pharmaceutiques,(2013).
- [5] <https://pharmacomedicale.org/médicaments/par spécialités/item/anti fongique –azoles>.
- [6] <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/imidazole>
- [7] <https://santé- médecine .journal des femmes .fr/faq/50593-nitroimidazole-definition>.
- [8] **A. Agarwal , S. Kanekar , S. Sabat et K. Thamburaj**Toxicité cérébelleuse induite par le métronidazole Neurol Int , 2016 .
- [9] **Jane E. Sykes , Mark G. Papich** , dans Maladies infectieuses canines et félines , 2014
- [10]Disponible sur le site internet  
<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/metronidazole#section=Effluent-Concentrations>
- [11] **ZINK.L**« SYNTHESE DE DERIVES 5-NITROIMIDAZOLES A POTENTIALITES ANTI-INFECTIEUSE», Université AIX Marseille Faculté pharmacie, (2012).
- [12]Disponible sur le site internet  
<https://www.etudier.com/dissertations/Validation-d'Une-Methode- Analytique/379477.html>
- [13] ICH harmonised tripartite guideline «Validation of analytical procedures: text and methodology Q2 (R1)» (2005).
- [14] ISO/IEC 17025« General requirements for the competence of testing and calibration laboratories, ISO, Geneva», (2005).
- [15] **BOUDIS.H** «Validation analytique». Publication. (Mai 2011).



## Références bibliographiques

---

- [16] **BOUABIDIA** «ETUDE CRITIQUE DES DIFFERENTES APPROCHES DE VALIDATION DES METHODES ANALYTIQUES», Thèse de doctorat , Université HASSAN II Faculté des sciences Ben M'SIK Casablanca, département pharmacie, (2013).
- [17] **Isabelle.P**« Validation analytique : application de la procédure SFSTP 2003-2006 au domaine de la phytothérapie », (2015).
- [18] ANSES/PR3/07/01, Guide de validation des méthodes d'analyses page 8-9,(2015).
- [19] **Hubert. Ph ; Nguyen-Huu J.J. ; Boulanger. E ; Chapuzet. E ; et al.** Validation des procédures analytiques quantitatives : Harmonisation des démarches.STP Pharma Pratiques, STP PHARMA PRATIQUES, 2003.

## Références bibliographiques

---

# ANNEXE 1 : Etude statistique de la validation analytique

---

## 1 Etude statistique de la validation analytique

### 1.1 Spécificité

La spécificité peut être démontrée de deux façons :

- Soit en comparant les chromatogrammes obtenus à partir des trois solutions précédemment préparées : les chromatogrammes obtenus à partir du **SV 100%** et **SE 100%** doivent renfermer des pics au même temps de rétention, avec des surfaces comparables. Le chromatogramme obtenu à partir de la solution placebo ne doit pas présenter un pic au même temps de rétention que l'analyte.
- Soit par la comparaison de la droite obtenue des standards de validation (avec matrice) avec celle obtenue à partir des standards d'étalonnage. La comparaison des droites est basée sur le test **t** de Student selon une stratégie statistique qui permet la recherche d'effet matrice et/ou de l'erreur systématique en vérifiant la spécificité de la méthode pour le dosage du principe actif seul et aussi pour la forme reconstituée.

### 1.2 Fonction de réponse

Les mesures effectuées sur les **SE** permettent de déterminer la relation entre la réponse **Y** donnée par l'instrument et la concentration **X** des solutions. Cette relation est une fonction de type :

$$Y=f(X) + \varepsilon$$

Avec  $\varepsilon$ , l'erreur résiduelle associée à la fonction de réponse. Cette fonction n'est pas nécessairement linéaire mais elle doit être strictement monotone sur l'intervalle de dosage envisagé. La fonction de réponse doit être ajustée, c'est-à-dire que ses paramètres doivent être évalués de sorte que l'erreur résiduelle  $\varepsilon$  soit minimisée. La procédure **SFSTP 2003-2006** propose d'appliquer le concept de « fitness-for-purpose » pour choisir la fonction de réponse la mieux adaptée pour la courbe d'étalonnage, et ainsi avoir un modèle d'étalonnage permettant de minimiser  $\varepsilon$  et donc de calculer les concentrations prédites les plus correctes possibles. Le Tableau A.1 illustre quelques exemples des différentes fonctions de réponse pouvant être envisagées lors d'une validation des méthodes analytiques.

# ANNEXE 1 : Etude statistique de la validation analytique

**Tableau A.1. : Exemples de fonction de réponses.**

Type	Equation	Paramètres	Linéaire
Droite passant par l'origine	$Y = \beta X$	$\beta$	Oui
Droite	$Y = \alpha + \beta X$	$\alpha, \beta$	Oui
Fonction quadratique	$Y = \alpha + \beta X + \gamma X^2$	$\alpha, \beta, \gamma$	Oui
Fonction logistique à 4 paramètres	$Y = \alpha + \frac{\delta - \alpha}{1 + \left(\frac{x}{\gamma}\right)^\beta}$	$\alpha, \beta, \gamma, \delta$	Non
Fonction logistique à 5 paramètres	$Y = \alpha + \frac{\delta - \alpha}{\left[1 + \left(\frac{x}{\gamma}\right)^\beta\right]^\psi}$	$\alpha, \beta, \gamma, \delta, \psi$	Non

Les modèles d'étalonnage vont être calculés pour chaque série de validation, et le calcul des concentrations prédites **X** des solutions d'échantillon, appelées Standards de Validation (**SV**) devra être effectué en utilisant le modèle d'étalonnage de la série correspondante.

Les paramètres des fonctions de réponse vont être estimés soit par la méthode des moindres carrés classique, soit par la méthode du maximum de vraisemblance, comme recommandé dans la procédure **SFSTP 2003-2006**. Très vraisemblablement, la plupart des méthodes physicochimiques auront recours à la droite (passant par **0** ou non). Pour les méthodes bioanalytiques, la fonction quadratique pourra être envisagée dans certains cas.

Dans le cas d'un immuno-dosage, le choix se portera sur les fonctions logistiques à **4** ou **5** paramètres.

### 1.3 Alignement des observations

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

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

## ANNEXE 1 : Etude statistique de la validation analytique

Où :  $\bar{X}_{ij}$ : Moyenne des concentrations introduites du niveau **j** de la série **i**.

$X_{ijk}$  : Concentration introduite du niveau **j** de la série **i** répétition **k**.

En résumé, pour les différentes fonctions de réponse

**Tableau B.1. : Règles d'alignement pour différentes fonctions de réponses.**

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

### 1.4 Prédiction inverses

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

Si les observations ont été alignées, il faut remplacer les  $y$  par les  $y_{calc}$  (la valeur de  $y$  alignée sur la moyenne des  $x$ ).

La fonction inverse est appelée équation de prédiction inverse. Le tableau ci-dessous fournit ces équations selon la fonction de réponse choisie.

**Tableau C.1. : Calcul des prédictions inverses pour différentes fonctions de réponse.**

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

## ANNEXE 1 : Etude statistique de la validation analytique

---

### 1.5 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 :

$$\text{biais } j = \hat{\mu}_j - \bar{x}_j.$$

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

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

Où :  $\hat{\mu}_j$ : moyenne des concentrations calculées du niveau  $j$  ;

$\bar{x}_j$ : moyenne des concentrations introduites du niveau  $j$ .

# ANNEXE 1 : Etude statistique de la validation analytique

## 1.6 Fidélité

L'estimation de la variance intra-série donne une estimation de la variance de répétabilité tandis que la somme des estimations des variances intra- et inter série donne une estimation de la variance de fidélité intermédiaire [24] :

L'écart-type de répétabilité:  $\hat{\sigma}^2_r$

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

## 1.7 Calcul de l'exactitude

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

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

Avec  $x$  : concentration prédite ;

$\mu$  : concentration introduite.

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

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

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

### 1.7.1 Erreur totale et profil d'erreur totale

$$\begin{array}{c} X = \mu + |\text{Biais}|_{\text{procédure}} + \text{Fidélité Intermédiaire}_{\text{procédure}} \\ \updownarrow \\ X - \mu = |\text{Biais}|_{\text{procédure}} + \text{Fidélité Intermédiaire}_{\text{procédure}} \\ \updownarrow \\ X - \mu = \text{Erreur Totale}_{\text{Procédure}} \end{array}$$

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 la validité d'une méthode.

Cette erreur totale, comme indiqué ci-dessus, est la somme de la justesse (biais) et de la fidélité.

L'erreur totale observée avec chaque modèle et pour chaque niveau de concentration est étroitement liée avec les erreurs maximales observées correspondantes.

## ANNEXE 1 : Etude statistique de la validation analytique

Il est normal que l'erreur maximale observée sur un grand nombre d'observations soit sensiblement plus grande que l'erreur totale vu que ces erreurs maximales représentent des événements rares tandis que l'erreur totale reflète plutôt les plus grandes erreurs aux quelles on peut s'attendre dans la plupart des cas. Si l'on considère la seconde erreur la plus grande, on voit alors que les points se répartissent bien autour de la bissectrice  $y=x$ , ce qui démontre bien que l'estimation de l'erreur totale rend compte des erreurs les plus grandes que la méthode produit. L'erreur totale d'une procédure analytique est donc bien un bon indicateur de l'exactitude des résultats qu'elle produit.

C'est la raison pour laquelle nous proposons ce critère pour une première évaluation simple de la procédure analytique.

### 1.7.2 Calcul de l'intervalle de tolérance

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

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

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

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

Où :

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

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

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

$$v = \frac{(R+1)2}{\frac{(R+1n)2}{p-1} + \frac{1-\frac{1}{n}}{pn}}$$

$$Qt = \left( v + \frac{1+\beta}{2} \right)$$

Le même intervalle en échelle relative devient :



## ANNEXE 1 : Etude statistique de la validation analytique

$$\text{biais \% } j - Q_t \left( v + \frac{1+\beta}{2} \right) \sqrt{1 + \frac{1}{P_n B_j^2}} \text{ CVF, } I, j;$$

$$\text{biais \% } j + Q_t \left( v + \frac{1+\beta}{2} \right) \sqrt{1 + \frac{1}{P_n B_j^2}} \text{ CVF, } I, j;$$

Deux termes sont contenus dans l'intervalle de tolérance :

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

### 1.7.3 Profil d'exactitude et décision

Le profil d'exactitude s'obtient en reliant entre elles les bornes supérieures puis les bornes

Inférieures de l'intervalle de tolérance :

$$L_j \text{ (borne supérieure)} = \text{biais \% } j - Q_t \left( v + \frac{1+\beta}{2} \right) \sqrt{1 + \frac{1}{P_n B_j^2}} \text{ CVF, } I, j;$$

$$U_j \text{ (borne inférieure)} = \text{biais \% } j + Q_t \left( v + \frac{1+\beta}{2} \right) \sqrt{1 + \frac{1}{P_n B_j^2}} \text{ CVF, } I, j;$$

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

### 1.8 Linéarité

La linéarité de la méthode de dosage est vérifiée sur l'intervalle de validation, en utilisant les données des premières répétitions de chaque niveau de concentration, pour les trois séries de validation.

- La linéarité est, dans un premier temps, évaluée par comparaison visuelle des représentations graphiques des réponses instrumentales en fonction des concentrations introduites ( $\mathbf{X}$ ) selon la fonction  $[\mathbf{Y}=(\mathbf{X})]$ , pour la forme pharmaceutique reconstituée et pour les standards d'étalonnage.

## ANNEXE 1 : Etude statistique de la validation analytique

---

- Dans un deuxième temps, la linéarité de la relation entre les concentrations retrouvées ( $x_{calc}$ ) et les concentrations introduites ( $x$ ) est évaluée en représentant graphiquement la fonction  $[x_{calc} = (x)]$  pour les trois séries de validation conjointement.

Une analyse statistique de la droite obtenue est effectuée, la pente est comparée à la valeur de référence **1**, l'ordonnée à l'origine est comparée à la valeur de référence **0**, et une vérification de l'ajustement est effectuée.

### 1.9 Limites de quantification

Le profil d'exactitude, construit à partir des intervalles de mesures attendues, permet donc de décider des niveaux de concentration pour lesquels une procédure est apte à fournir des résultats dans les limites d'acceptation. Ainsi, par définition, quand elle se produit, l'intersection entre le profil d'exactitude et les limites d'acceptation définissent les limites de quantification basse (**LQ inf**) et haute (**LQ sup**) 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.

### 1.10 Robustesse

Pour évaluer la robustesse d'une procédure d'analyse on utilise la technique des plans factoriels qui fait varier plusieurs paramètres en même temps. Ce procédé permet de diminuer de façon importante le nombre d'essais et l'étude des interactions entre paramètres, c'est-à-dire cela dépend de la modification simultanée de deux ou plusieurs paramètres.

Le premier paramètre introduit sera toujours la teneur en substance à analyser, à cause de ses interactions possibles avec les autres paramètres. L'étude de reproductibilité permet d'orienter le choix des paramètres opératoires à étudier grâce aux écarts observés. L'étude de ces écarts précisera la valeur de l'écart admissible de ces paramètres à inclure dans les essais des plans factoriels.

## **ANNEXE 2 : Chromatographie Liquide à Haute Performance**

---

Parmi les techniques chromatographiques dont la phase mobile est un liquide, la chromatographie sur colonne est la plus connue. Son succès est dû à la possibilité d'agir de manière très précise sur la sélectivité entre les composés par le choix de la colonne et de la composition de l'éluant, c'est-à-dire en exploitant les interactions soluté/phase mobile/phase stationnaire, aux grandes efficacités des phases stationnaires de plus en plus fines (3 $\mu$ m) et aux progrès importants effectués dans le domaine de l'appareillage.

### **1. Origine de HPLC**

La chromatographie liquide haute performance, souvent désignée par son abréviation CLHP – HPLC en anglais –, constitue une technique analytique très générale d'emploi. Elle dérive de la forme la plus ancienne de la chromatographie liquide sur colonne

La chromatographie sur colonne telle qu'elle était initialement utilisée ne nécessitait qu'un simple appareillage :

Elle utilisait la gravité pour faire couler les phases mobiles sur des colonnes remplies de phases stationnaires. Cette méthode classique, bien qu'étant la plus ancienne, a été peu utilisée en raison :

- De la lenteur des séparations (faible vitesse d'élution).
- Faible résolution et sélectivité
- Absence de détecteurs performants.

Grâce aux progrès de la technologie, il est possible d'obtenir :

- Des phases stationnaires de granulométrie fine et régulière (accroître la surface d'échange).
- Des pompes capables de distribuer la phase mobile sous pression élevée vers la colonne (augmenter le débit).

Ceci a permis d'augmenter les vitesses d'élution et limiter ainsi le temps d'analyse.

Cette nouvelle technique est appelée :

- Chromatographie liquide à grande vitesse.
- Chromatographie liquide à haute résolution.
- Chromatographie liquide à haute pression.
- Chromatographie liquide à haute performance.

### **2. Définition**

La chromatographie liquide à haute performance est une technique séparative utilisée en analyse quantitative, qualitative et principalement employée dans le domaine de la chimie analytique, elle permet l'identification, la séparation et le dosage des formes pharmaceutiques

## ANNEXE 2 : Chromatographie Liquide à Haute Performance

et des fluides biologiques grâce à sa simplicité, haute spécificité et large intervalle de sensibilité.

### 3. Appareillage

L'installation de la chromatographie liquide à haute performance (HPLC) nécessite un assemblage d'organe bien spécifique afin d'avoir une bonne séparation des composés.

Illustrés schématiquement dans la figure ci-dessous ; il est composé des éléments suivants :

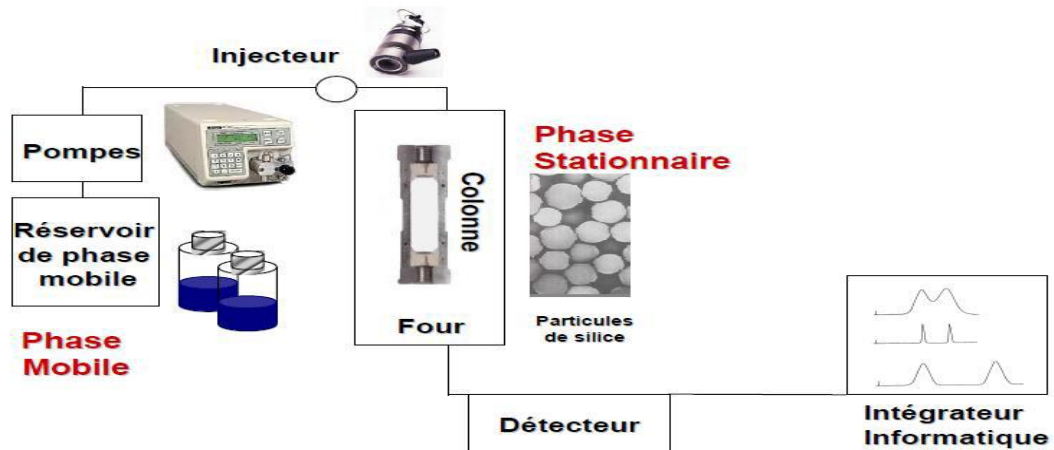


Figure A.1. : Schéma d'une chaîne d'HPLC.



Figure B.1. : Photo d'un appareil HPLC

#### 1.1. Réservoir de la phase mobile

Ces réservoirs sont plus souvent des bouteilles en verre ou en acier inoxydable. Ils sont étanches, contenant la phase mobile, obtenue en mélangeant instantanément plusieurs solvants (de polarités différentes).

## **ANNEXE 2 : Chromatographie Liquide à Haute Performance**

---

Les solvants de la phase mobile doivent être de « grade HPLC », ce qui permet de garantir leur degré de pureté ainsi que leur filtration (filtre de 0.2µm).

Le solvant de qualité HPLC peut être préparé au laboratoire par filtration à l'aide d'un montage approprié.

La filtration de solvant permet d'éviter de nombreux problèmes de fonctionnement de la pompe et la prolongation de sa durée de vie.

### ⇒ **Dégazage du solvant**

Pour éviter la contamination des solvants par des bulles de gaz et afin de ne pas perturber la régularité de la chromatographie, on doit les dégazer dans un premier lieu à l'aide des sonicateurs.

### ⇒ **Contraintes pratiques d'utilisation des solvants en HPLC**

- ✓ Solubilité des solutés
- ✓ Qualité HPLC (pas d'impuretés organiques)
- ✓ Volatilité
- ✓ Toxicité (solvants chlorés...)

La limite de l'utilisation des solvants est à 4 :

- ✓ Tetrahydrofurane(THF) : caractère polaire
- ✓ Acétonitrile : caractère basique
- ✓ Méthanol : caractère acide
- ✓ Eau : permet d'ajuster la polarité du milieu

Les caractéristiques de ces solvants sont :

- ✓ Faible viscosité
- ✓ Disponibilité avec une pureté élevée
- ✓ Bonne transparence en UV
- ✓ Bonne miscibilité les uns avec les autres.

### **1.2. Pompe**

Toutes les installations HPLC comportent au moins une pompe, son rôle est de forcer le passage de la phase mobile à travers la colonne dont le remplissage est très compact. Il en résulte une perte de charge en colonne très importante (50 à 100 bars), selon le débit imposé à la phase éluante, sa viscosité ainsi que selon la phase stationnaire.

Les pompes doivent répondre aux quelques exigences suivantes :

- Fournir des pressions allant jusqu'à 400 bars
- Absence de pulsations

## ANNEXE 2 : Chromatographie Liquide à Haute Performance

---

- Débit compris entre 0,1 à 10 ml/min
- Résistance à la corrosion quel que soit le solvant utilisé.

### 1.3. Injecteur

La méthode d'introduction la plus utilisée consiste à l'emploi des boucles échantillonnage. Ces dispositifs font généralement partie intégrante de l'appareillage de l'HPLC moderne. La solution à examiner est introduite dans la phase mobile circulante en tête de Colonne, doit se faire en un temps bref afin de perturber le moins possible le régime de circulation de la phase mobile qui doit être stable de la colonne au détecteur.

L'injection de l'échantillon se fait de deux manières :

- **Manuelle** : l'injecteur comporte une vanne à plusieurs voies montée sur le parcours de la phase mobile, juste avant la colonne. L'échantillon à analyser est introduit avec une micro-seringue dans un petit volume tubulaire appelé boucle ; l'échantillon est ainsi inséré avec un flux de phase mobile.
- **Automatique** : l'injection se fait automatiquement, l'injecteur utilisé comporte une vanne à boucle d'échantillonnage d'une capacité fixe, cette boucle permet d'introduire l'échantillon sans modifier la pression dans la colonne.

### 1.4. Colonne

La colonne est l'élément majeur de la chaîne HPLC, se présente comme un tube, souvent en acier inoxydable ou en verre (inerte aux produits chimiques), de longueur de 5 à 25 cm et de diamètre différents selon les modèles. Il renferme la phase stationnaire qui peut être polaire (phase normale) ou non polaire (phase inverse) (Anonyme, 2007).

Le choix, la construction et le remplissage d'une colonne HPLC est privilégié, car la qualité d'une séparation est toujours en fonction de celle de la colonne.

La colonne est souvent précédée d'une pré-colonne (colonne de garde), courte (0.4 à 1cm) remplie de la même phase stationnaire ce qui sert à retenir certaines impuretés, on augmente aussi la durée de vie de la colonne principale en préservant ses performances.

Le choix de la colonne HPLC est lié aux paramètres suivants :

- Type de la phase stationnaire
- Longueur
- Diamètre des particules
- Débit de la phase mobile supportable.

## ANNEXE 2 : Chromatographie Liquide à Haute Performance

---

### 1.5. Détecteur

Le détecteur est relié à la sortie de la colonne, permet de visualiser, de suivre en continu la séparation et de mesurer la concentration des solutés. Le choix d'un détecteur dépend à la fois des caractéristiques physiques des composés à séparer et des conditions opératoires. Le signal obtenu est enregistré en fonction du temps.

Deux types de détecteurs sont classiquement utilisés :

#### ⇒ **Détecteur UV-visible**

Il mesure l'absorption de la lumière par le produit et opère à longueur d'onde constante, celle-ci étant fixée par l'opérateur. La lampe Deutérium est utilisée pour des longueurs d'ondes variant de 190 à 350 nm et la lampe à vapeur de mercure est utilisée à la longueur d'onde non variable de 254 nm.

Pour que ce type de détecteur soit utilisable, il faut que :

- Le produit à détecter absorbe la lumière à une longueur d'onde accessible à l'appareil et que son coefficient d'absorption soit suffisamment grand,
- La phase mobile n'absorbe pas la lumière à la longueur d'onde choisie par l'opérateur.

⇒ **Le réfractomètre** : il mesure la variation de l'indice de réfraction du liquide à la sortie de la colonne. Cette mesure, extrêmement précise dépend néanmoins de la température du liquide. On compare cet indice avec celui de la phase mobile pure : il y a donc une référence d'où le terme de variation de l'indice. Ce détecteur exclut les variations de la composition de la phase mobile.

Il existe plusieurs autres détecteurs :

- Réfractomètre différentiel ;
- UV à barrette de diodes ;
- Electrochimique ;
- Fluorimétrique ;
- Résonance Magnétique Nucléaire...

Les données sont collectées par l'intermédiaire soit d'un intégrateur ou d'une station d'acquisition.

### 1.6. Intégrateur informatique

Il s'agit d'un petit ordinateur qui récupère les données issues du détecteur. Une intégration consiste à mesurer la surface sous un pic. La détection d'un pic chromatographique par l'intégrateur, dépend de 2 paramètres :

- La largeur attendue des pics.

## ANNEXE 2 : Chromatographie Liquide à Haute Performance

- Le seuil d'intégration (sensibilité).

### 2. Principe de fonctionnement

Un fluide appelé phase mobile parcourt un tube appelé colonne (phase stationnaire). A l'instant initial, le mélange à séparer est injecté à l'entrée de la colonne où il se dilue dans la phase mobile qui l'entraîne à travers la colonne. Si la phase stationnaire a été bien choisie, les constituants du mélange, appelés généralement les solutés, sont inégalement retenus lors de la traversée de la colonne. De ce phénomène appelé rétention il résulte que les constituants du mélange injecté se déplacent tous moins vite que la phase mobile et que leurs vitesses de déplacement sont différentes. Ils sont ainsi élués de la colonne les uns après les autres et donc séparés. Un détecteur placé à la sortie de la colonne couplé à un intégrateur-enregistreur permet d'obtenir un tracé appelé chromatogramme. En effet, il dirige sur un enregistreur un signal constant appelé ligne de base en présence du fluide porteur seul ; au passage de chaque soluté séparé il conduit dans le temps à l'enregistrement d'un pic. Dans des conditions chromatographiques données, le « temps de rétention » caractérise qualitativement une substance. L'amplitude de ces pics, ou encore l'aire limitée par ces pics et la prolongation de la ligne de base permet de mesurer la concentration de chaque soluté dans le mélange injecté.

Le principe est donc d'exploiter les interactions entre les solutés et les deux phases (mobile et stationnaire) pour séparer ces solutés en fonction de leurs affinités et ainsi de les identifier et ou de les doser.

### 3. Analyse des chromatogrammes

Une bonne séparation se traduira par une séparation distincte des pics correspondant à chacun des produits, la figure C.1 ci-dessous montre la différence entre un bon et un mauvais chromatogramme.

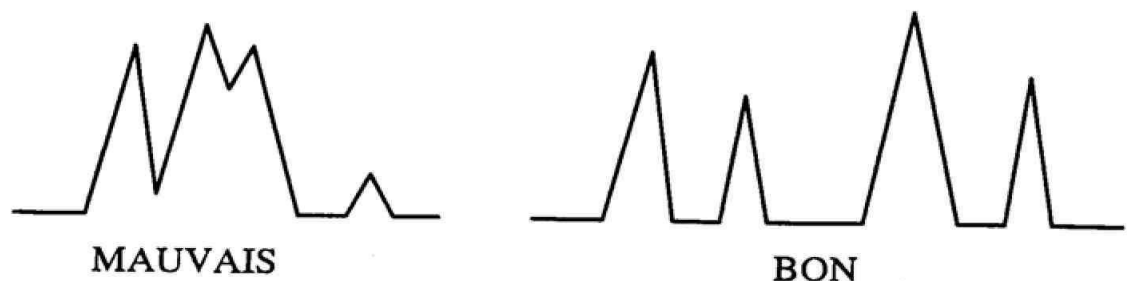


Figure C.1. : L'analyse qualitative d'un chromatogramme

#### 3.1. Analyse qualitative

- ✓ **Le temps de rétention ( $t_R$ )** = temps écoulé entre l'injection et le point maximal du pic.



## ANNEXE 2 : Chromatographie Liquide à Haute Performance

---

✓ **Le temps mort ( $t_M$ )** = temps écoulé pour qu'un constituant non retenu traverse la colonne ;

✓ **Temps réduit**

Est défini par la différence entre les deux temps précédents ;

$$t_R' = t_R - t_0$$

✓ **Volume de rétention**

Volume de la phase mobile nécessaire à entrainer la substance jusqu'au détecteur ;

$$V_R = t_R \times D$$

Une correction tenant compte du volume mort de la colonne  $V_M$  est généralement appliquée, définissant le volume de rétention corrigé  $V_R'$  ;

$$V_R' = V_R - V_M$$

✓ **Facteur de rétention ou de capacité ( $k'$ )**

C'est un paramètre important indépendant du débit (ne pas confondre avec le coefficient de distribution  $K$ ). Représente le rapport entre la quantité de soluté se trouvant dans la phase stationnaire et celle se trouvant dans la phase mobile ;

$$k' = (t_R - t_M) / t_M$$

✓ **Facteur de sélectivité ( $\alpha$ )**

Le facteur de sélectivité  $\alpha$  permet de préciser les positions relatives de deux pics adjacents A et B sur un chromatogramme, il est défini par :

$$\alpha = t_{R'(B)} / t_{R'(A)}$$

Il ne peut, par définition être, inférieur à 1

✓ **Efficacité de la colonne**

La largeur d'un pic est caractéristique de l'efficacité de la séparation ; plus le pic est fin plus la chromatographie est efficace. Elle est exprimée par deux grandeurs :

⇒ Nombre de plateaux théoriques  $N$  :

$$N = 5.54 (t_R / \omega_{1/2})$$

$t_R$  : temps de rétention

$\omega_{1/2}$  : largeur du pic à mi-hauteur

## ANNEXE 2 : Chromatographie Liquide à Haute Performance

---

⇒ La hauteur équivalente à un plateau théorique (HEPT)

$$HEPT=L/N$$

**L** : Longueur de la colonne

**N**: Nombre de plateaux théoriques

L'efficacité de la colonne augmente lorsque le nombre de plateau théoriques augmente.

✓ **La résolution (R)**

Elle quantifie la qualité de la séparation en caractérisant le fait qu'il y ait ou non chevauchement des 2 pics.

$$R = (t_{R(B)} - t_{R(A)}) / (\omega_{0B} - \omega_{0A})$$

✓  $R < 1$  : 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.

### 3.2. Analyse quantitative

La chromatographie est basée sur une relation entre la quantité massique du soluté injecté et l'aire du pic du chromatogramme donné par le détecteur, c'est à dire que l'aire des pics chromatographiques est proportionnelle à la concentration ou à la quantité du produit analysé d'où la relation :

$$m_i = K_i \cdot A_i$$

**$K_i$**  est le coefficient de réponse du détecteur pour le soluté  **$i$** , il dépend de la colonne utilisée, de la sensibilité du détecteur vis-à-vis du soluté  **$i$**  et des conditions expérimentales.

**$A_i$**  est l'aire du pic d'éluion du soluté  **$i$**  sur le chromatogramme.

Dans la pratique, il faut donc déterminer  **$K_i$**  et  **$A_i$**  pour un soluté  **$i$**  donné dans les conditions d'analyses données.

## 4. Avantages et désavantages de la chromatographie liquide à haute performance

### 4.1. Avantages de l'HPLC

La chromatographie en phase liquide présente les avantages suivants :

✓ Elle est utilisée pour des solutés de masse moléculaire élevée, peu volatils, sensibles aux hautes températures, ces solutés peuvent être non polaires, polaires ou ioniques ;

✓ Séparation rapide ;

✓ Mesure quantitative précise ;

## **ANNEXE 2 : Chromatographie Liquide à Haute Performance**

---

✓ Elle analyse de très petites quantités d'échantillons, présente une extrême sensibilité, possède un grand pouvoir de séparation et une excellente reproductibilité et répétabilité.

### **4.2. Inconvénients de l'HPLC**

#### **✓ Technologie chère**

Le coût de HPLC est beaucoup plus cher que ses prédécesseurs. Par conséquent, si vous travaillez dans un établissement de recherche ou d'un laboratoire qui a faible niveau de financement, vous pouvez trouver des équipements HPLC difficile d'acheter.

#### **✓ Complexité**

L'utilisation d'une machine HPLC nécessite une formation pour s'assurer qu'elle est correctement exécutée. Comme cette machine est complexe, les faux résultats sont fréquents lorsqu'elle n'est pas utilisée correctement.

#### **✓ Faible sensibilité**

Pour certains composés, on sait que la CLHP n'est pas extrêmement sensible, ce qui entraîne souvent une mauvaise lecture. Ceci est dû à la vitesse à laquelle le processus se déroule.

## **Conclusion**

La chromatographie liquide est une technique qui a fortement évolué depuis le début des années 2000, avec de nombreuses innovations technologiques (phases stationnaires, instruments HPLC et conditions analytiques).

Le but de ces améliorations est de répondre aux problèmes actuels qui sont la nécessité :

✓ De pouvoir réaliser des analyses rapides/ultrarapides, en particulier dans le domaine pharmaceutique ;

✓ D'obtenir des très hautes résolutions pour l'analyse de mélanges les plus complexes (extraits de plantes, protéomique, métabolomique humaine...) ;

✓ Des conditions analytiques permettant l'analyse de macromolécules biologiques (protéines).



## Résumé

---

La validation des méthodes figure 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.

Le but du présent travail est de mettre au point et de valider une méthode de dosage du metronidazole dans les comprimés de 250mg par chromatographie liquide à haute performance en utilisant une nouvelle approche qui se consiste dans le profil d'exactitude, qui est un outil de décision basée sur le risque associé, (l'erreur totale : le biais + l'écart type) à la méthode. La notion de risque est liée à la garantie concernant la future analyse des échantillons inconnus tout en appliquant la méthode validée.

Nous avons commencé dans un premier temps par une étude bibliographique concernant le principe actif étudié et l'approche adoptée au cours de la validation de la méthode d'analyse.

Dans l'étude expérimentale, au début nous avons pu démontrer la spécificité de la méthode d'analyse en se basant sur le test de comparaison des pentes. Ensuite et après réalisation des expériences sur une gamme d'étalonnage et une gamme de validation, nous avons calculé les différents critères statistiques des différents modèles afin de construire les profils d'exactitude.

La technique développée s'est avérée spécifique, linéaire, sensible, exacte dans l'intervalle [0.16016, 0.24203] mg/ml avec un risque d'avoir au maximum de 5 % des futures mesures en dehors des limites d'acceptations fixées à [-5, +5] %. Cela démontre la validité de la méthode développée et son aptitude à être appliquée en routine pour le dosage du metronidazole dans les comprimés de 250mg.

## Abstract

---

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

The validation of an analysis method is about bringing the evidence of its adaptation to the fixed goals. Therefore it is not enough to calculate some validation criteria, such as repeatability or rightness, an interpretation of the found values must also be done to come up with a clear and non ambiguous conclusion.

The purpose of the present work is putting at point and validating a dosage of metronidazole in 250 mg tablets by liquid chromatography with high performance using a new approach which is consisted in the exactitude profil that is a decision tool based on the associated risk to the method (Total error = Bias + Standard deviation). The notion of risk is linked to the guarantee concerning the futur analysis of the unknown samples while applying the validated method.

We have started in a first time by a bibliographic study, at first we had been able to demonstrate the specificity of the analysis method, based on the test of slopes comparison. Next, and after realising experiences on a range of calibrations and a range of validation, we calculated the different statistic criteria of different models to build the profils of exactitude.

The developped technic turned out to be specific, linear, sensitive, correct in the interval [0.16016,0.24203] mg/ml with a risk of having at most 5% of futur measures out of fixed acceptation limits at [-5,+5]%. This demonstrates the validation of the developped method and its aptitude to be applied routinely for metronidazole dosage in 250 mg tablets.