



## REMERCIEMENTS

Nous tenons tout d'abord à remercier Dieu le tout puissant et miséricordieux, qui nous a donné la force et la patience d'accomplir de modeste travail.

La réalisation de ce mémoire a été possible grâce au concours de plusieurs personnes à qui nous voudrions témoigner toute notre reconnaissance.

Nous tenons avant tout à exprimer notre reconnaissance à **Pr MAMOU MARZOUK** pour avoir accepté de nous encadrer dans cette étude, et apporté ses éclairages judicieux en particulier lorsque le chemin faisait plus sinueux. Nous le remercions aussi pour son implication, son soutien et ses encouragements tout au long de ce travail.

Nous tenons également à remercier vivement la co-promotrice **Dr AKLI KARIMA** pour son aide, sa disponibilité et ses très précieux conseils. Nous aimerions aussi gratifier sa flexibilité, sa confiance professionnelle et son orientation ficelée tout au long de la réalisation de ce travail.

Nos remerciements vont également au **Pr GHARBLA** et à **Dr BEN SI SAID.H** qui ont accepté de faire partie de notre jury et de nous consacrer leurs temps en examinant le manuscrit. Nous en sommes honorées et nous leurs exprimons toute notre profonde reconnaissance.

Nous voudrions aussi remercier **Dr BRAHIMI. R** et **Dr BOURSOUTI. M**, résidents en Chimie Analytique et monsieur **TIGHRINE. A**, doctorant en biochimie alimentaire pour leur aide et leurs encouragements afin de mener à bien ce travail.

Nous remercions enfin tous ceux qui, d'une manière ou d'une autre, ont contribué à la réussite de ce travail et qui n'ont pas pu être cités ici.

## ***Dédicaces***

*Je dédie ce mémoire de fin d'étude*

*A mes très chers parents*

*Grâce à leurs tendres encouragements et leurs sacrifices, ils ont pu créer le climat affectueux et propice à la poursuite de mes études.*

*Aucune dédicace ne pourrait expliquer mon respect, ma considération et mes profonds sentiments envers eux*

*A ma chère sœur kamelia et mes chers frères Idir, Azwaw et Yani ;  
à qui je souhaite un avenir radieux plein de réussite.*

*A toute ma famille.*

*A mes amies Tassadit, Mouna et Hassina  
avec tous mes vœux de les voir réussir dans la vie.*

*A ma très chère amie Zineb  
ensemble nous avons pu mener ce travail à terme*

*A tous ceux qui me sont chers.*

***Lylia***

## ***Dédicaces***

*Je dédie ce modeste travail*

*A ma très chère maman Malika,*

*A mon très cher père Rachid*

*Aucun mot ne saurait exprimer mon respect, mon amour éternel et ma considération pour les sacrifices que vous avez consenti pour mon instruction et mon bien être.*

*Grace à vous que j'ai pu faire mes études et gravir les pentes qui me semblaient infranchissables.*

*Puisse Dieu, le très Haut, vous accorde santé, bonté et longue vie Inshallah*

*A mes chers frères, Mohammed Mehdi, Bassel Abd Essamed et Taha El Amine à qui je souhaite une vie pleine de bonheur et de succès. Je vous aime*

*A la mémoire de mes chers grands-parents paternels et mon très cher cousin Amine ; que Dieu accueille leurs âmes dans son vaste paradis inshallah*

*A toute ma chère famille: mes grands-parents maternels, ma très chère tante Ouardia qui a été dans toutes les situations à mes côtés, mes tantes, mes oncles, mes cousins et cousines*

*A ma très chère amie Tassadit que j'aime profondément et à qui je voudrais souhaiter toute la réussite dans sa vie professionnelle et personnelle. Qu'Allah garde l'âme de sa mère dans son vaste paradis Inshallah*

*A toutes mes chères amies que j'aime beaucoup et à qui je souhaite un avenir plein de réussite et de bonheur: Hassina, Mouna, Lylia, Manel, Tassadit, Celina, Nassima et Ania.*

*Merci pour tous les bels moments, les fous-rires et la joie qu'on a partagé ensemble*

*A mon agréable amie et binôme Lylia que j'adore ensemble nous avons pu mener ce travail à terme*

*A tous ceux qui me sont chers.*

***Zineb***

# Tables des matières

---

Table de matière.....	i
Liste des abréviations.....	vii
Liste des figures.....	ix
Liste des tableaux.....	x
Introduction générale.....	01
Objectif.....	03

## Partie théorique

### Chapitre I: Irbésartan

1. Irbésartan.....	04
1.1. Propriétés .....	04
1.1.1. Aspect.....	04
1.1.2. Propriétés chimiques.....	05
1.1.3. Propriétés pharmacologiques.....	05
1.1.3.1. Pharmacocinétique.....	05
1.1.3.2. Pharmacodynamique.....	06
1.2. Mécanisme d'action.....	07
1.3. Indications thérapeutiques et posologie.....	09
1.4. Interactions médicamenteuses.....	09
1.5. Contres indications.....	10
1.6. Grossesse et allaitement.....	10
1.6.1. Grossesse.....	10
1.6.2. Allaitement.....	10
1.7. Toxicité.....	11

### Chapitre II : Comprimés

1. Les comprimés.....	12
1.1. Définition du comprimé.....	12
1.2. Différents aspects des comprimés.....	12
1.2.1. Comprimé à libération conventionnel (immédiate).....	12

# Tables des matières

---

1.2.1.1.	Comprimés nus ou non enrobés.....	12
1.2.1.2.	Comprimés enrobés.....	12
1.2.2.	Comprimés à libération modifiée.....	13
1.2.2.1.	Comprimés à libération prolongée.....	13
1.2.2.2.	Comprimés à libération retardée.....	13
1.2.2.3.	Comprimés à libération accélérée.....	13
1.2.2.4.	Comprimés à utiliser dans la cavité buccale.....	14
1.3.	Caractéristiques organoleptiques des comprimés.....	14
1.3.1.	Formes et dimensions.....	14
1.3.2.	Couleurs et marquage.....	15
1.3.3.	Structure.....	15
1.4.	Composition des comprimés.....	15
1.4.1.	Principes actifs.....	15
1.4.2.	Principaux excipients.....	16
1.5.	Fabrication des comprimés.....	16
1.5.1.	Mélange de poudre.....	17
1.5.2.	Granulation.....	17
1.5.3.	Compression.....	18
1.5.3.1.	Compression directe.....	18
1.5.3.2.	Compression après granulation.....	18
1.6.	Avantages et inconvénients.....	19
1.7.	Comprimé de l'irbésartan.....	19

## Chapitre III : Validation analytique

1.	Définition.....	20
2.	But de la validation.....	20
3.	Aspect réglementaire et normatif.....	20
3.1.	Document ISO 17025.....	20
3.2.	Documents ICH.....	21
3.3.	Documents de la FDA.....	21
3.4.	Guide de validation analytique rapport, des commissions, de la SFSTP.....	21
4.	Cycle de vie d'une méthode d'analyse.....	22
4.1.	Sélection de la méthode.....	23

# Tables des matières

---

4.2. Mise au point de la méthode.....	24
4.3. Validation de la méthode.....	24
4.4. Estimation de l'incertitude et vérification e l'aptitude.....	25
4.5. Utilisation en routine.....	25
4.6. Revalidation.....	26
5. Critères de la validation analytique.....	26
5.1. Spécificité /sélectivité.....	27
5.2. Exactitude.....	28
5.3. Linéarité.....	28
5.4. Fidélité.....	28
5.5. Justesse.....	29
5.6. Sensibilité.....	29
5.7. Limite de détection.....	29
5.8. Limite de quantification.....	30
5.9. Robustesse.....	30
5.10. Stabilité des solutions.....	30
6. Critères de choix de la validation analytique.....	31
7. Etapes de la validation.....	33
8. Etude statistique de la validation analytique.....	33
8.1. Spécificité.....	34
8.1.1. Protocole.....	34
8.1.2. Etude statistique.....	34
8.2. Fonction de réponse.....	38
8.3. Alignement des observations.....	40
8.4. Prédiction inverse.....	42
8.5. Calcul de la justesse et de la fidélité.....	43
8.5.1. Modèle.....	43
8.5.2. Justesse.....	45
8.5.3. Fidélité.....	45
8.6. Calcul de l'exactitude.....	45
8.6.1. Erreur totale et profile de l'erreur totale.....	46
8.7. Calcul de l'intervalle de tolérance.....	47
8.8. Profile d'exactitude et décision.....	48
8.8.1. Calcul.....	48

# Tables des matières

---

8.8.2. Choix de la fonction de réponse.....	49
9. Linéarité.....	49
10. Limite de quantification.....	50

## Chapitre IV : Chromatographie liquide à haute performance

1. Principe.....	51
2. Appareillage.....	52
2.1. Réservoirs de phase mobile (éluant).....	53
2.2. Systèmes de pompage.....	54
2.3. Les injecteurs.....	55
2.3.1. Injecteur à dépôt direct.....	55
2.3.2. Vanne à boucle.....	55
2.4. Colonnes.....	56
2.5. Phase stationnaire.....	56
2.5.1. Phase normale.....	56
2.5.2. Phase inverse.....	56
2.6. Phase mobile.....	56
2.7. Détecteurs.....	57
2.7.1. Détecteurs d'absorption dans l'UV-visible.....	57
2.7.2. Détecteurs d'absorption dans l'infrarouge.....	58
2.7.3. Détecteurs de fluorescence.....	58
2.7.4. Détecteurs réfractométriques.....	58
2.7.5. Détecteurs électrochimiques.....	58
2.7.6. Détecteurs par spectrométrie de masse.....	59
2.8. Intégrateurs-enregistreurs.....	59
3. Domaines d'application de l'HPLC.....	59
4. Application de chromatographie liquide à haute performance à l'analyse.....	59
4.1. Informations apportées par un chromatogramme.....	60
4.1.1. Caractéristiques du chromatogramme.....	60
4.1.2. Grandeurs de rétention.....	61
4.2. Analyse qualitative.....	61
4.2.1. Notions de concentration.....	61
4.2.2. Notions d'efficacité ou performance d'une colonne.....	62

# Tables des matières

---

4.2.3. Qualité de la séparation.....	64
4.3. Analyse quantitative.....	66

## Partie pratique

1. Matériels et méthodes .....	68
1.1. Matériels.....	68
1.1.1. Matières premières et réactifs.....	68
1.1.2. Appareillages et équipements.....	69
1.1.3. Verrerie.....	69
1.2. Méthodes .....	70
1.2.1. Méthodologie de la validation analytique.....	70
1.2.1.1. Choix du protocole de validation.....	70
1.2.1.2. Choix des paramètres de validation.....	71
1.2.1.3. Choix de diluant.....	71
1.2.1.4. Choix de dilution.....	71
1.2.2. Préparations des solutions .....	72
1.2.2.1. Diluant .....	72
1.2.2.2. Préparation des solutions standards .....	72
a. Solution standard de l'irbésartan.....	72
b. Préparation de la solution placebo.....	72
c. Solution des standards d'étalonnage.....	72
d. Solutions des standards de validation.....	73
1.2.2.3. Préparation de la solution pour la robustesse .....	73
1.2.2.4. Préparation de la solution pour la stabilité.....	73
1.2.2.5. Préparation de la phase mobile.....	73
1.2.2.6. Préparation de la feuille de calcul.....	74
1.3. Conditions chromatographiques.....	74
2. Résultats et discussion.....	75
2.1. Résultats .....	75
2.1.1. Spécificité.....	75
2.1.2. Fonction de réponse.....	79
2.1.3. Critères de choix de la fonction de réponse.....	85
2.1.4. Alignements des observations.....	88

# Tables des matières

---

2.1.5. Prédications inverses.....	90
2.1.6. Justesse.....	92
2.1.7. Fidélité.....	93
2.1.8. Exactitude.....	94
2.1.9. Erreur totale et profil d'erreur totale.....	95
2.1.10. Intervalle de tolérance.....	95
2.1.11. Profil d'exactitude.....	96
2.1.12. Linéarité.....	97
2.1.13. Limites de quantification et intervalle de dosage.....	98
2.1.14. Robustesse.....	98
2.1.15. Étude de stabilité.....	101
2.2. Discussion.....	102
2.2.1. Spécificité.....	102
2.2.2. Choix de la fonction de réponse.....	103
2.2.3. Critères de performance de la fonction de réponse choisie.....	103
2.2.3.1. Justesse.....	103
2.2.3.2. Fidélité.....	103
2.2.4. Critères de décision sur la validité de la méthode.....	104
2.2.4.1. Erreur totale.....	104
2.2.4.2. Profil d'exactitude.....	104
2.2.4.3. Limites de quantification et intervalle de dosage.....	104
2.2.4.4. Linéarité.....	104
2.2.5. Robustesse.....	105
2.2.6. Stabilité des solutions.....	105
Conclusion générale.....	107
Perspectives.....	108
Références bibliographiques	
Annexes	
Résumé	
Abstract	

## Liste des abréviations

---

ARA II : antagonistes des récepteurs de l'angiotensine II.

AT1 : angiotensine 1.

COX 2 : cyclo-oxygénase 2.

AINS : anti-inflammatoire non stéroïdien.

IUPAC: international union of pure and applied chemistry.

DCI: dénomination commune international.

CYP2C9: cytochrome 2C9.

IEC: inhibiteur de l'enzyme de conversion.

DEG : débit de filtration glomérulaire.

DL<sub>50</sub>: dose létale 50.

IARC: international agency for research on cancer.

OSHA: occupational safety and health administration.

SFSTP: société française des sciences et techniques pharmaceutiques.

CML : leucémie myéloïde chronique.

CMC : carboxyméthylcellulose.

PVP : polyvidone.

EEN: excipients à effet notoire.

ISO: international standard organization.

ICH: international conference of harmonization.

FDA: food and drug administration.

SE : standard d'étalonnage.

SV : standard de validation.

LLOQ : limite de quantification basse.

ULOQ : limite de quantification haute.

PA : principe actif.

UV-visible : ultraviolet-visible.

HPLC: high performance liquid chromatography.

## Liste des abréviations

---

KOH: hydroxyde de potassium.

pH: potentiel d'hydrogène.

ID : intervalle de dosage.

ACN : acétonitrile

## Liste des figures

---

<b>Figure n°1</b> : Mécanisme d'action de l'irbésartan.....	08
<b>Figure n°2</b> : La réglementation en vigueur concernant la validation des méthodes analytiques.....	22
<b>Figure n°3</b> : Cycle de vie d'une méthode d'analyse.....	23
<b>Figure n°4</b> : Logigramme permettant de sélectionner un protocole de validation.....	37
<b>Figure n°5</b> : Chromatographe HPLC.....	53
<b>Figure n°6</b> : Schéma d'une pompe en HPLC.....	54
<b>Figure n°7</b> : Schéma d'un injecteur à boucle externe.....	55
<b>Figure n°8</b> : Informations apportées par un chromatogramme.....	60
<b>Figure n°9</b> : Schéma montrant la performance d'une colonne.....	63
<b>Figure n°10</b> : Chromatogramme montrant la qualité de la séparation chromatographique.....	64
<b>Figure n° 11</b> : Chromatogramme de la gamme standard.....	76
<b>Figure n° 12</b> : Chromatogramme de la gamme placebo chargé.....	77
<b>Figure n°13</b> : Courbes d'étalonnage obtenues avec la fonction $y= ax$ .....	80
<b>Figure n°14</b> : Courbes d'étalonnage obtenues avec la fonction $y= ax+b$ .....	81
<b>Figure n°15</b> : Courbes d'étalonnage obtenues avec la fonction $\ln y=f(\ln x)$ .....	83
<b>Figure n°16</b> : Courbe d'étalonnage obtenues avec la fonction $\sqrt{y} = f(\sqrt{x})$ .....	85
<b>Figure n°17</b> : courbe du profil d'exactitude selon la fonction $y=ax$ .....	86
<b>Figure n°18</b> : Courbe du profil d'exactitude selon la fonction $\dots \ln y=f(\ln x)$ .....	86
<b>Figure n°19</b> : Courbe du profil d'exactitude selon la fonction $\sqrt{y} = f(\sqrt{x})$ .....	87
<b>Figure n° 20</b> : Courbe du profil d'exactitude selon la fonction $y=ax+b$ .....	87
<b>Figure n° 21</b> : Tracé du profil d'exactitude pour la fonction $y=ax+b$ .....	96
<b>Figure n° 22</b> : Courbe de linéarité obtenue avec la fonction $y=ax+b$ .....	97

# Liste des tableaux

---

<b>Tableau I</b> : Propriétés chimiques de l'irbésartan.....	05
<b>Tableau II</b> : Avantages et inconvénients des comprimés.....	19
<b>Tableau III</b> : Critères de la validation en fonction du type d'analyse.....	27
<b>Tableau IV</b> : Caractéristiques de performance à déterminer pour les méthodes qualitatives et les méthodes quantitatives.....	32
<b>Tableau V</b> : Choix du nombre de standards d'étalonnage et de validation en fonction du protocole choisi.....	38
<b>Tableau VI</b> : Exemples de fonction de réponses.....	39
<b>Tableau VII</b> : Règles d'alignement pour différents fonctions de réponse.....	41
<b>Tableau VIII</b> : Calculs des prédictions inverses pour différentes fonctions de réponse.....	42
<b>Tableau IX</b> : Calculs des prédictions inverses pour la droite ayant subit une transformation logarithmique ou racine carrée.....	43
<b>Tableau X</b> : Principaux solvants en HPLC.....	52
<b>Tableau XI</b> : Matières premières et réactifs.....	68
<b>Tableau XII</b> : Le matériel du laboratoire de chimie analytique utilisé dans le présent travail.....	69
<b>Tableau XIII</b> : Tableau présentant les masses théoriques des niveaux de concentrations des principes actifs.....	72
<b>Tableau XIV</b> : Résultats obtenus sur la gamme standard.....	75
<b>Tableau XV</b> : Comparaison de la pente à l'ordonnée à l'origine par rapport à 0.....	76
<b>Tableau XVI</b> : Résultats obtenus sur la gamme placebo chargé (appelée aussi gamme matrice).....	77
<b>Tableau XVII</b> : Comparaison de la pente et de l'ordonnée à l'origine par rapport à 0.....	78
<b>Tableau XVIII</b> : Comparaison des pentes et des ordonnées à l'origine.....	78
<b>Tableau XIX</b> : Résultats obtenus pour la fonction $y=ax$ .....	79

## Liste des tableaux

---

<b>Tableau XX</b> : Résultats obtenus pour la fonction $y=ax+b$ .....	81
<b>Tableau XXI</b> : Résultats obtenus pour la fonction $\ln y=f(\ln x)$ .....	82
<b>Tableau XXII</b> : Résultats obtenus pour la fonction $\sqrt{y}=f(\sqrt{x})$ .....	84
<b>Tableau XXIII</b> : Alignement des réponses observées avec les trois séries des SV.....	89
<b>Tableau XXIV</b> : Prédiction inverses obtenus avec le SV.....	91
<b>Tableau XXV</b> : Justesse calculée pour chaque niveau de concentration des standards de validation.....	92
<b>Tableau XXVI</b> : Fidélité calculée pour chaque niveau de concentration des standards de validation.....	93
<b>Tableau XXVII</b> : Résultats de calcul de l'exactitude.....	94
<b>Tableau XXVIII</b> : Calcul de l'erreur totale pour chaque niveau de concentration des standards de validation.....	95
<b>Tableau XXIX</b> : Calcul des limites de tolérances pour chaque niveau de concentration j.....	95
<b>Tableaux XXX</b> : Masses prédites en fonction des masses introduite.....	97
<b>Tableau XXXI</b> : Résultats de l'étude de la robustesse.....	99
<b>Tableau XXXII</b> : Tableaux montrant les interactions entre les facteurs influençant la robustesse.....	100
<b>Tableau XXXIII</b> : Résultats de l'étude de la stabilité.....	101
<b>Tableau XXXIV</b> : Signification des résultats des deux pentes et des deux ordonnées à l'origine entre elles.....	

# Liste des tableaux

---

# Introduction générale

---

La mise au point et la validation des méthodes d'analyse sont aujourd'hui un enjeu important pour les laboratoires pharmaceutiques, elles découlent de la mise en place des systèmes d'assurance qualité.

Chaque laboratoire est tenu de trouver que les méthodes d'analyse employées pour le contrôle des médicaments sont parfaitement valides et fiables et de s'assurer qu'elles répondent bien aux objectifs assignés.

En effet, si la validité d'une méthode analytique n'est pas confirmée, la décision de conformité ou non des produits finis basée sur les données obtenues par le contrôle qualité en utilisant cette procédure analytique devient contestable. C'est pourquoi l'assurance de la fiabilité de la méthode garantie par la validation est non seulement une exigence réglementaire, mais également un critère essentiel de l'assurance de la qualité.

Pour cela toute nouvelle méthode d'analyse mise au point au sein d'un laboratoire doit faire l'objet d'une validation analytique, avant sa mise en routine, cette dernière repose sur un ensemble de mesures expérimentales, de tests statistiques qui permettent de prouver qu'une procédure est suffisamment exacte et fiable et de nos jours une nouvelle tendance est de nouveaux concepts scientifiques apparaissent et proposent de revoir les bases mêmes de la validation analytique pour une démarche harmonisée, avec notamment l'apparition de l'utilisation de profil d'exactitude comme outil de décision, permettant de simplifier l'approche de la validation d'une procédure analytique tout en contrôlant le risque associé à son utilisation.

Dans notre étude nous sommes particulièrement intéressés à la mise au point et la validation de la méthode de dosage par HPLC de l'irbésartan qui est un antihypertenseur utilisé dans le traitement de l'hypertension essentielle seule ou accompagnée d'une néphropathie associée au diabète type II.

# Introduction générale

---

Le contenu de ce présent manuscrit est reparti en deux grandes parties, une partie bibliographique et une partie expérimentale.

La partie bibliographique est scindée en quatre chapitres :

Chapitre I : Irbésartan

Chapitre II : Comprimés

Chapitre III : Validation analytique

Chapitre IV : Chromatographie liquide à haute performance

La partie expérimentale est consacrée à la partie pratique de notre travail qui comprend la mise au point et la validation d'une méthode de dosage de l'irbésartan dans des comprimés à 150 mg par HPLC. Nous allons discuter et présenter les résultats obtenus et conclure à la fin la validité de la méthode analytique ; objet de l'étude.

# Objectifs

---

L'objectif de notre étude est de mettre au point et de valider une méthode analytique de dosage d'un principe actif dans des comprimés de 150 mg de l'irbésartan par chromatographie liquide à haute performance (HPLC) en vue d'être appliquée en routine en utilisant le profil d'exactitude comme outil de décision, décrit dans le guide de validation élaboré par la commission de la société française des sciences et techniques pharmaceutiques (SFSTP) publié dans la revue Pharma Pratique en janvier 2006.

# Chapitre I : Irbésartan

---

## 1. Irbésartan

Les antagonistes non peptidiques de l'angiotensine II, famille des antihypertenseurs qui baissent la pression artérielle d'une façon comparable à celle obtenue avec les autres antihypertenseurs, sans toutefois nécessiter une stimulation préalable du système rénine angiotensine.

L'indication des ARA II ne se résume pas seulement dans le traitement de l'hypertension artérielle mais aussi dans le traitement des patients atteints de néphropathies associées au diabète type II.

### 1.1. Propriétés

#### 1.1.1. Aspect

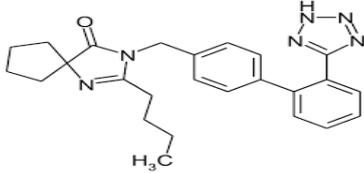
L'irbésartan est une poudre cristalline blanche ou sensiblement blanche. C'est un composé non polaire ayant un coefficient de partition (octanol/eau) de 10,1 à un pH de 7,4. Il est légèrement soluble dans l'alcool et dans le chlorure de méthylène et pratiquement insoluble dans l'eau.

L'irbésartan présente le phénomène du polymorphisme.

# Chapitre I : Irbésartan

## 1.1.2. Propriétés chimiques [1]

Tableau I : Propriétés chimiques de l'irbésartan.

DCI	Irbesartan
Nom chimique selon l'IUPAC	2-Butyl-3-[(2'-(1 <i>H</i> -tétrazol-5-yl) biphenyl-4-yl) méthyl]-1,3-diazaspiro [4.4] non-1-én-4-one.
Formule chimique brute	C <sub>25</sub> H <sub>28</sub> N <sub>6</sub> O
Formule développée	 The chemical structure of Irbesartan is shown. It features a central 1,3-diazaspiro[4.4]non-1-en-4-one ring system. A butyl group (H <sub>3</sub> C-CH <sub>2</sub> -CH <sub>2</sub> -CH <sub>2</sub> -) is attached to the 2-position of the spiro ring. A methylene group (-CH <sub>2</sub> -) is attached to the 3-position of the spiro ring, which is further connected to a biphenyl ring system. The biphenyl system consists of two benzene rings linked at their 1-positions, with a 1 <i>H</i> -tetrazol-5-yl group attached to the 2'-position of the second ring.
Masse molaire	428,5294 ± 0,0235 g/mol

## 1.1.3. Propriétés pharmacologiques

### 1.1.3.1. Pharmacocinétiques

#### Absorption

L'irbésartan est un agent actif par suite de l'administration par voie orale. Son absorption est rapide et totale, et sa biodisponibilité absolue moyenne se situe entre 60 et 80 %. La pharmacocinétique de l'irbésartan est linéaire sur toute la gamme des doses thérapeutiques, et sa demi-vie d'élimination finale moyenne se situe entre 11 et 15 heures.

Après administration par voie orale, les concentrations plasmatiques maximales d'irbésartan sont atteintes en 1,5 à 2 heures. Les concentrations à l'état d'équilibre sont atteintes dans les trois jours.[3]

#### Distribution

L'irbésartan se fixe aux protéines plasmatiques, surtout à l'albumine et à l'acide α1-glucoprotéinique à environ 96 %.

# Chapitre I : Irbésartan

---

Le volume de distribution moyen de l'irbésartan se situe entre 53 et 93 L. Les clairances rénales et plasmatiques totales se situent entre 3,0 et 3,5 ml/minute et entre 157 et 176 ml/min, respectivement.[3]

## Métabolisme

L'irbésartan est métabolisé par glucuroconjugaison et par oxydation principalement par l'isoenzyme CYP2C9 du cytochrome P-450. [3]

L'irbésartan est le substrat de la CYP2C9.[2]

L'administration par voie orale ou intraveineuse de l'irbésartan marqué au  $^{14}\text{C}$ , plus de 80 % de la radioactivité plasmatique circulante est attribuable au médicament inchangé. Le principal métabolite circulant est le glucuroconjugué inactif d'irbésartan (environ 6 %).

## Elimination

L'irbésartan et ses métabolites sont excrétés par les voies biliaire et rénale. Par suite de l'administration par voie orale ou intraveineuse de l'irbésartan marqué au  $^{14}\text{C}$ , environ 20% de la radioactivité se retrouve dans l'urine, et le reste dans les selles. Une fraction inférieure à 2 % de la dose est excrétée dans l'urine, à l'état inchangé.[3]

### 1.1.3.2. Pharmacodynamiques

L'irbésartan est un ARA II sélectif des récepteurs AT1, avec une forte liaison et une dissociation lente du récepteur. Il n'a aucune activité agoniste.[4]

L'inhibition des récepteurs de l'angiotensine II, suivant l'administration prolongée de l'irbésartan, élève de 1,5 à 2 fois les concentrations plasmatiques d'angiotensine II et de 2 à 3 fois les taux plasmatiques de rénine. [3]

# Chapitre I : Irbésartan

---

L'effet antihypertenseur de l'irbésartan s'est manifesté après l'administration de la première dose et il était très notable après une à deux semaines, l'effet maximal se produisant dans les quatre à six semaines. [3]

On n'a constaté aucun effet rebond après l'arrêt du traitement par l'irbésartan. [3]

## 1.2. Mécanisme d'action

Les antagonistes des récepteurs AT1, de l'angiotensine II bloquent la liaison de l'angiotensine II sur ses récepteurs. L'activation de ces récepteurs dans la paroi vasculaire produit principalement une vasoconstriction du muscle lisse. Elle stimule également la production d'aldostérone et entraîne donc indirectement une rétention de sels et d'eau. [4]

Les antagonistes des récepteurs de l'angiotensine empêchant la liaison de l'angiotensine II et du récepteur AT1 au niveau des vaisseaux sanguins des surrénales et tous les autres tissus, ce qui constitue le moyen le plus sélectif et le plus complet pour inhiber les effets de l'angiotensine II quelques soient ses voies de synthèse. [4]

# Chapitre I : Irbésartan

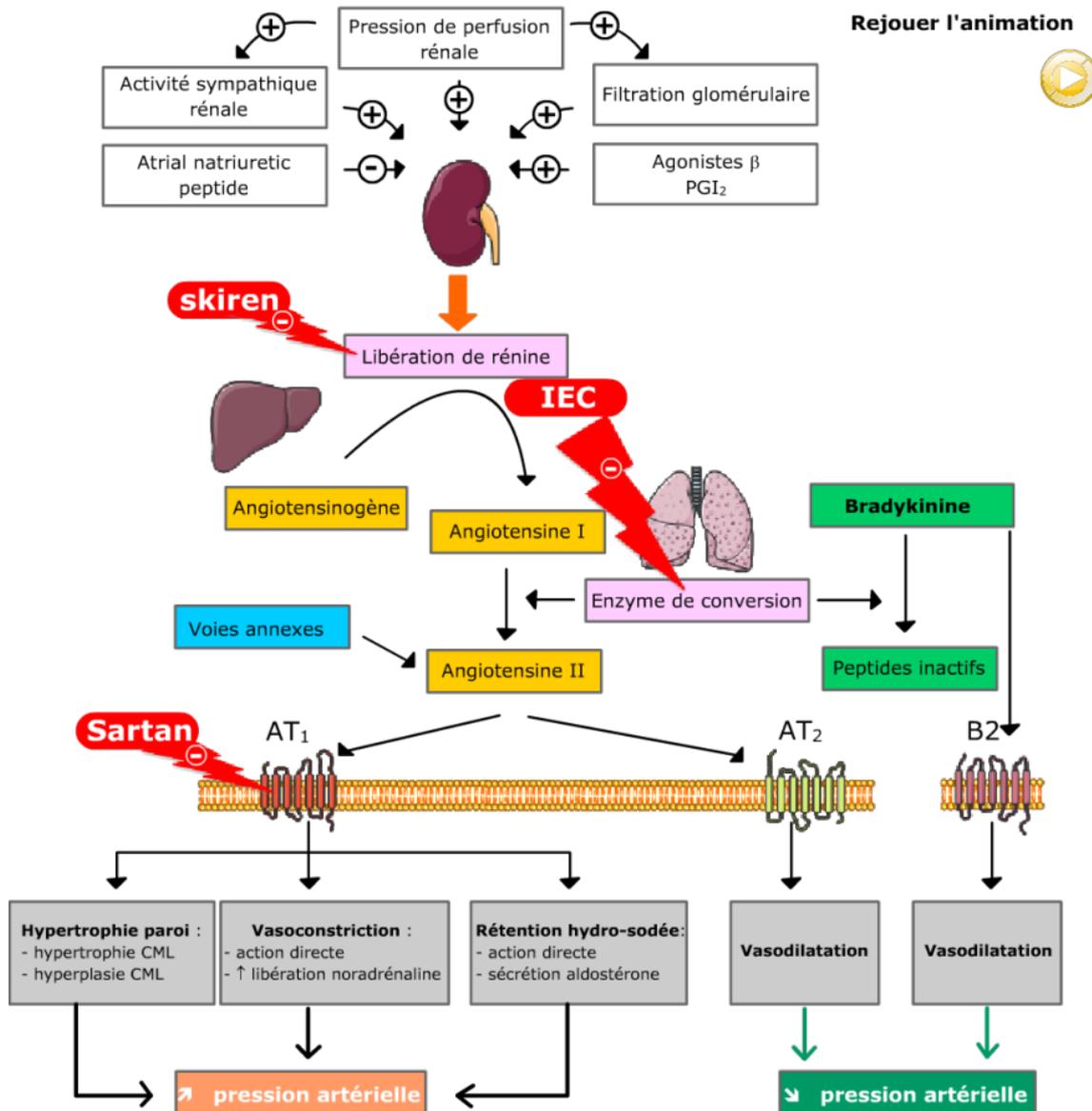


Figure n° 01 : Mécanisme d'action de l'irbésartan.

## Effets pharmacologiques

Les antagonistes des récepteurs AT1 de l'angiotensine II agissent au niveau cardiaque en diminuant le remodelage et la fibrose induits par la stimulation de ces récepteurs par l'angiotensine II à la suite d'un infarctus du myocarde. [4]

En inhibant les effets de l'angiotensine II sur la relâche de catécholamines par les neurones du système sympathique, ces agents réduisent la fréquence cardiaque. Cet effet contribue d'ailleurs à la baisse de pression observée après leur administration. [4]

# Chapitre I : Irbésartan

---

Les antagonistes des récepteurs AT1 de l'angiotensine sont reconnus pour avoir des effets bénéfiques sur la fonction endothéliale, en permettant à l'endothélium de produire ces agents vasodilatateurs. [4]

## 1.3. Indications thérapeutiques et posologie

Hypertension essentielle seule ou accompagnée d'une néphropathie associée au diabète de type 2 :

La dose initiale recommandée d'irbésartan est de 150 mg, une fois par jour. Chez les patients dont l'hypertension n'est pas adéquatement maîtrisée, on peut majorer la dose jusqu'à 300 mg par jour. [5]

Aucun ajustement de la dose initiale n'est nécessaire chez les patients âgés ou les patients présentant une déplétion du volume intramusculaire, une insuffisance rénale ou une insuffisance hépatique légère à modérée. [3]

## 1.4. Interactions médicamenteuses

En cas d'administration concomitante des diurétiques avec l'irbésartan, un ajustement de la dose doit être envisagé.

L'utilisation concomitante de diurétiques hyperkaliémisants, de supplément ou de potassium, de substituts du sel contenant du potassium ou d'autres médicaments peut augmenter les taux de potassium. Une surveillance régulière de la kaliémie doit être effectuée le cas échéant. [5]

Si l'association de lithium et de l'irbésartan est indispensable, une surveillance attentive des taux sériques de lithium est recommandée. [5]

Lorsque les ARA II sont administrés simultanément avec les AINS c'est-à-dire des inhibiteurs sélectifs de la COX2, de l'acide acétylsalicylique (> 3g /jr) et des AINS non sélectifs, l'effet antihypertenseur peut être atténué. [5]

# Chapitre I : Irbésartan

---

## 1.5. Contre-indications

- Hypersensibilité à l'irbésartan ou l'un des excipients ;
- 2<sup>ème</sup> et 3<sup>ème</sup> trimestre de la grossesse ;
- Antécédent d'angio-œdème avec un inhibiteur de l'enzyme de conversion (IEC) ;
- Insuffisance hépatique sévère, cirrhose biliaire et cholestase ;
- Insuffisance rénale aigue ;
- Créatinine sérique > 200 µmol/l ou clairance de créatinine ≤ 30 ml/min ;
- Persistance de l'hypercalcémie ou de l'hypokaliémie réfractaire ;
- Sténose bilatérale des artères rénales ou sténose rénale sur rein unique ;
- Prise concomitante d'inhibiteur de l'enzyme de conversion ou l'aliskirène (l'association de l'irbésartan à des médicaments contenant de l'aliskirène est contre-indiquée chez les patients présentant un diabète ou une insuffisance rénale [débit de filtration glomérulaire (DEG) < 60 ml/min/1,73 m<sup>2</sup>]. [6]

## 1.6. Grossesse et allaitement

### 1.6.1. Grossesse

- Au cours des 2<sup>èmes</sup> et 3<sup>èmes</sup> trimestres de la grossesse : l'utilisation des ARA II est contre-indiquée ;
- La découverte d'une grossesse chez une patiente traitée par ARA II doit conduire à l'arrêt immédiat du médicament quelque soit le trimestre d'exposition et à la substitution par une autre classe antihypertensive ;
- Il est recommandé d'informer les patientes en âge de procréer des effets fœto-toxiques des ARA II et de la nécessité de modifier le traitement antihypertenseur en cas de désir de grossesse. [7]

### 1.6.2. Allaitement

En raison de l'absence d'information disponible sur l'utilisation de l'irbésartan au cours de l'allaitement, ce dernier est déconseillé ; il est préférable d'utiliser d'autres traitements ayant un profil de sécurité bien établi. [8]

# Chapitre I : Irbésartan

---

## 1.7. Toxicité

Aucun symptôme associé au surdosage et aucune séquelle clinique importante n'ont été signalés avec l'irbésartan. Les surdosages chez l'adulte ont varié de 600 à 900 mg par jour. [5]

DL<sub>50</sub> (souris) > 2000 mg/kg

DL<sub>50</sub> (rat) > 2000 mg/kg [9]

En cas de surdosage, il est recommandé de surveiller le patient de près et de lui administrer un traitement symptomatique et de maintien. Les mesures suggérées consistent à provoquer les vomissements et (où) à effectuer un lavage gastrique. Le charbon activé peut s'avérer utile dans le traitement du surdosage. [3]

L'irbésartan n'a montré aucun signe de mutagénicité, de clastogénicité, de tératogénicité et de carcinogénicité selon IARC ou OSHA. [9]

# Chapitre II : Comprimés

---

## 1. Comprimés

### 1.1. Définition du comprimé

Selon la pharmacopée européenne les comprimés sont des préparations de consistance solide contenant une unité de prise d'un ou plusieurs principes actifs. Ils sont obtenus en agglomérant par compression un volume constant de particules. Ils sont destinés à la voie orale. Certains sont avalés ou croqués, d'autres sont dissous ou désagrégés dans l'eau avant administration. Certains, enfin doivent séjourner dans la cavité buccale pour y libérer le principe actif. Plusieurs catégories peuvent être distinguées. [1]

### 1.2. Différents aspects des comprimés

Les comprimés peuvent être classés en deux catégories selon le type de libération

- Comprimés à libération conventionnelle ;
- Comprimés à libération modifiée.

#### **Comprimés à libération conventionnelle (immédiate)**

Ce sont des formes pour lesquelles la libération du principe actif n'a pas fait l'objet d'une modification délibérée résultant de la mise en œuvre d'une formulation particulière et/ou d'un procédé de fabrication spécial. [15]

##### **1.2.1.1. Comprimés nus ou non enrobés**

Ils comprennent des comprimés à couche unique et des comprimés à couches multiples disposées parallèlement ou concentriquement. Les premiers résultent d'une seule compression, les autres de compressions successives. Ils peuvent avoir des formes très diverses,

##### **1.2.1.2. Comprimés enrobés**

Ce sont des comprimés dont la surface est recouverte d'une ou plusieurs couches de mélanges de substances diverses comme les résines, les gommes, la gélatine, les sucres, les cires, les polyols et les colorants. [16]

## Chapitre II : Comprimés

---

- Quand l'enrobage est constitué d'un film polymère très mince, le comprimé est dit pelliculé.
- Un comprimé dragéifié, quant à lui, est enrobé avec du sucre. [15]

### 1.2.1. Comprimés à libération modifiée

Ce sont des comprimés, enrobés ou non, qui sont préparés avec des excipients spéciaux ou par des procédés particuliers, ou les deux, visant à modifier la vitesse, le lieu où le moment de libération de la (ou des) substance(s) active(s). [15]

#### 1.2.2.1. Comprimés à libération prolongée

Il s'agit de préparations dont la vitesse de libération de la substance active est inférieure à celle qu'assurerait la forme à libération conventionnelle administrée par la même voie. La dose de principe actif total y'est toujours plus élevée que dans une forme à libération conventionnelle.

La vitesse de libération plus lente a pour but d'obtenir une concentration en principe actif la plus constante possible dans l'organisme tout en diminuant le nombre d'administration. [15]

#### 1.2.2.2. Comprimés à libération retardée

Les comprimés à libération retardée sont des formes galéniques où le principe actif est libéré à un moment ou un lieu différent par rapport à la forme conventionnelle administrée par la même voie. Le cas notamment des comprimés gastrorésistants. [15]

#### 1.2.2.3 Comprimés à libération accélérée

Ce sont des préparations dont la vitesse de libération de la substance active est plus rapide que celle de la forme à libération conventionnelle destinée à la même voie d'administration.

Elles sont généralement administrées après mise en solution. On trouve :

- Les comprimés dispersibles ;
- Les comprimés solubles ;
- Les comprimés effervescents ;
- Les comprimés orodispersibles ;
- Les lyophilisats oraux [15].

## Chapitre II : Comprimés

---

### 1.2.2.4 Comprimés à utiliser dans la cavité buccale

Ce sont le plus souvent des comprimés non enrobés. Leur formule est établie de façon à permettre une libération lente et une action locale de la ou des substances actives, ou la libération et l'absorption de la (ou des) substance(s) active(s) dans une partie définie de la cavité buccale. [15]

### 1.3. Caractéristiques organoleptiques des comprimés

Le comprimé doit être identifiable afin d'éviter toute confusion chez les patients mais également le personnel soignant. Le risque iatrogène est augmenté en cas de polymédication et ou déconditionnement des médicaments. Chaque comprimé est caractérisé visuellement par sa forme, ses dimensions, sa couleur et son marquage. [11]

#### 1.3.1. Formes et dimensions

Un comprimé correspond en général à « un cylindre droit dont les faces inférieures et supérieures peuvent être plates ou convexes et les bords biseautés ». En effet, lors de la production de comprimés par compression, la matrice et les poinçons définissent la forme du comprimé. Il faut souligner que la forme du comprimé n'est pas une caractéristique anodine : Certaines géométries sont facilement érodées et peuvent être difficilement enrobées.

A noter que la surface externe du comprimé peut avoir une influence sur la libération du principe actif selon les recommandations de la FDA relatives aux attributs physiques des comprimés et capsules génériques, les comprimés ronds doivent être privilégiés par rapport aux comprimés plats dont le risque d'adhérence aux parois de l'œsophage est favorisé par sa grande surface.

Il est également souligné que plus le comprimé est petit, plus son administration est aisée : Passage rapide à travers le pharynx et l'œsophage. Le diamètre recommandé n'excède pas 22 mm et est préférentiellement inférieure à 17 mm. [11]

## Chapitre II : Comprimés

---

### 1.3.2. Couleurs et marquage

La couleur du comprimé correspond à celle du mélange de matières premières ou à la coloration de l'enrobage. La réglementation relative à l'emploi de colorant diffère selon les pays, et l'ajout d'un colorant peut donc restreindre la commercialisation du comprimé à un territoire.

La coloration joue un rôle esthétique et constitue un critère d'identification discriminant dans le cadre de l'identification du comprimé pour preuve, le guide visuel d'identification des médicaments classe les médicaments photographiés par couleur.

Enfin, l'altération du médicament peut se traduire par un changement de couleur.

Le marquage des comprimés peut se faire à l'aide de motifs en relief, de gravures, ou des impressions. Les comprimés sécables présentent une ou plusieurs barres de cassure assurant la division des comprimés en fractions uniformes.[11]

### 1.3.3. Structure

En fonction des contraintes de formulation et du profil de libération souhaité, les comprimés peuvent présenter des structures variées, un comprimé peut être nu ou enrobé. A noter que si l'enrobage est très mince (tel un film ou pellicule), on parle de comprimé pelliculés.

La couverture en sucre est spécifique des comprimés dragéifiés. L'enrobage a pour but de masquer le goût ou l'odeur désagréable, protéger le principe actif (de la lumière, des agents atmosphériques, ...), contrôler la libération du principe actif, améliorer l'esthétique du comprimé et/ou faciliter l'identification (coloration).[11]

## 1.4. Composition des comprimés

### 1.4.1. Principes actifs

La substance active, ou le principe actif d'un médicament désigne chacun des composants de ce médicament qui possède un effet thérapeutique. Cette substance est souvent en très faible proportion dans le médicament par rapport aux excipients. Cela peut être une substance pure chimiquement définie (plus ou moins abusivement qualifiée de « molécule ») ou un mélange de plusieurs substances chimiquement proches (isomères, par exemple) ou encore une

## Chapitre II : Comprimés

---

substance définie par son mode d'obtention. Il est utilisé en vue de restaurer, corriger ou modifier des fonctions physiologiques en exerçant une action pharmaceutique, immunologique ou métabolique. [14]

### 1.4.2. Principaux excipients

Nature des Excipients et pourcentages moyens :

- **Diluant(s)** environ 20-90%, ce sont des excipients de charge : lactose, phosphate calcique, carbonate de calcium, sorbitol, mannitol ;

- **Liant(s)** environ 5-10%, on recherche les propriétés anti adhérente (ne colle pas aux parois de la machine), anti friction (évite forces de frottement et grippage) et antistatique (contre l'électricité statique) : gomme, gélatine, amidon, stéarate de magnésium, talc...

- **Lubrifiant** (glident) : facilitent l'écoulement dans la trémie. Environ 0,5 -1 %  
Silice colloïdale ;

- **Désagrégeant(s)** ou **délitant(s)** environ 5-10%, amidon de maïs, de blé de riz ; carboxyméthyl d'amidon, carboxyméthylcellulose (CMC), polyvidone (PVP) ;

- **Colorants** ;

- **Aromatisants**, masqueurs d'amertume.[12]

### 1.5. Fabrication des comprimés

Pour pouvoir fabriquer un comprimé à partir d'une poudre, il faut que celle-ci ait des propriétés physiques et mécaniques particulières:

- Un bon écoulement et une agglomération sous pression.

- Peu de principes actifs possèdent de façon spontanée ces deux propriétés et peuvent donc être comprimés directement.

- Dans la pratique, la grande majorité des principes actifs nécessite à la fois l'addition d'excipients et un traitement spécial: la granulation, pour obtenir les deux qualités essentielles des comprimés qui sont :

## Chapitre II : Comprimés

---

- Une cohésion suffisante entre les grains;
- Un délitement rapide. [13]

### 1.5.1. Mélange de poudre

Le mélange de poudre est une opération qui consiste à rendre aussi homogène que possible une association de plusieurs produits solides (principes actifs et excipients).

Cette opération doit assurer et conserver à la forme finie la précision du dosage thérapeutique, elle met en évidence deux facteurs indissociables :

Homogénéité = Activité thérapeutique [10]

### 1.5.2. Granulation

La granulation est une opération qui consiste à transformer des particules solides en agglomérats plus ou moins résistants et poreux appelés granulés ou grains.

Les particules sont liées entre elles par utilisation d'un liant.

Modes de granulation :

- Granulation par voie sèche ou compactage;
- Granulation par voie humide;
- Divers (frittage, extrusion-sphéronisation). [10]

But de la granulation :

- Modifier la texture du mélange pour augmenter sa densité, ceci afin qu'il coule bien dans la matrice et qu'il y ait le moins d'air possible entre les particules;
- Meilleure conservation de l'homogénéité du mélange;
- Réduction des problèmes de poussière et de contamination croisée;
- Plus grande aptitude à la compression par une première densification;
- Porosité supérieure facilitant la dissolution;
- Reproductibilité des caractéristiques du grain. [17]

## Chapitre II : Comprimés

---

### 1.5.3 Compression

#### 1.5.3.1. Compression directe

C'est le procédé par lequel les comprimés sont obtenus directement par compression du mélange de poudres : principe actif et excipients.

Peu de principes actifs peuvent donner des comprimés par compression directe, leur nature et leur proportion constituent une limite à cette technique qui ne peut être appliquée que si le **pourcentage du principe actif est inférieur à 25%**.

Les comprimés obtenus par compression directe sont essentiellement composés de diluants qui apportent au mélange à comprimer les propriétés physiques et mécaniques nécessaires à l'obtention de comprimés. [13]

#### 1.5.3.2. Compression après granulation

La granulation modifie la texture du mélange pour augmenter sa densité, ceci afin qu'il coule bien dans la matrice et qu'il y ait le moins d'air possible entre les particules ce qui donne une plus grande aptitude à la compression.[13]

## Chapitre II : Comprimés

### 1.6. Avantages et inconvénients

**Tableau II :** Avantages et inconvénients des comprimés. [10]

Les comprimés	
Avantages	Inconvénients
<ul style="list-style-type: none"><li>- Emploi facile : solidité suffisante pour le transport et le conditionnement, faciles à avaler</li><li>- Dosage précis</li><li>- Forme sèche : bonne conservation</li><li>- Prix de revient bas car fabrication industrielle à grande échelle</li><li>- Possibilité de masquer complètement la saveur par l'enrobage</li><li>- Possibilité de contrôler la libération du principe actif</li></ul>	<ul style="list-style-type: none"><li>- Si le délitement n'est pas rapidement assuré, il y a un risque pour la muqueuse digestive</li><li>- La mise au point est délicate</li><li>- Pas de principe actif liquide</li><li>- Nécessité d'utiliser de nombreux excipients qui peuvent présenter des effets secondaires(EEN).</li></ul>

### 1.7. Comprimé de l'irbésartan

Le produit fini de l'irbésartan est un comprimé pelliculé, il existe sous plusieurs dosages, 75 mg, 150 mg et 300 mg. Cette forme a été choisie pour sa déglutition facilitée, sa paroi lisse (pas de collage) et sa protection des muqueuses buccales ou stomacales (PA irritant) en modifiant la cinétique de libération par le choix convenable des polymères filmogènes.

Elle a aussi pour avantage l'absence de sucre dans le liquide de pelliculage ce qui permet son utilisation en toute sécurité dans certaines pathologies.

# Chapitre III : Validation analytique

---

Afin que le médicament puisse être commercialisé, un dossier d'autorisation de mise sur le marché (AMM) doit être réalisé. Pour cela une réglementation stricte a été mise en place afin de garantir l'efficacité et la sécurité du médicament sur l'Homme ou l'animal. C'est à cette étape qu'intervient la validation des méthodes analytiques. En effet, il est essentiel que chaque test et expérimentation réalisés sur la molécule thérapeutique soient 100% fiables.

## 1. Définition

Selon la norme ISO 17025 : la validation est : «la confirmation par examen et la démonstration par preuves que les performances de la méthode permettent de répondre aux exigences de l'usage auquel elle est destinée. Elle est basée sur une analyse statistique de plusieurs paramètres.» [18]

Selon la FDA : « Valider une méthode consiste à démontrer, avec un degré de confiance élevé et sous une forme documentée, que la méthode permet d'obtenir un résultat analytique qui atteint les spécifications à l'avance. » [35]

## 2. But de la validation

L'objectif de la validation est donné aux laboratoires ainsi qu'aux autorités compétentes les garanties que chaque mesure qui sera réalisée ultérieurement en routine, une fois la procédure validée, sera suffisamment proche de la « vraie valeur » inconnue de l'échantillon ou du moins comprise dans une limite acceptable, en fonction de la finalité de la procédure. Le but est de déterminer le risque tant au niveau du producteur que du consommateur.[19]

## 3. Aspect réglementaire et normatif

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

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

## **Chapitre III : Validation analytique**

---

### **3.2. Documents ICH:**

- ICH Q<sub>2</sub>A: text on validation of analytical procedures «definitions and terminology» 1995.
- ICH Q<sub>2</sub>B: text on validation of analytical procedures «methodology» 1997.
- ICH Q<sub>2</sub> (R<sub>1</sub>) validation of analytical procedures: text and methodology (2005).

### **3.3. Documents de la FDA (guidance for industry):**

Validation of Bioanalytical Method (2001).

### **3.4. Guide de validation analytique rapport, des commissions, de la SFSTP.**

- Méthodologie.
- Exemples d'application.

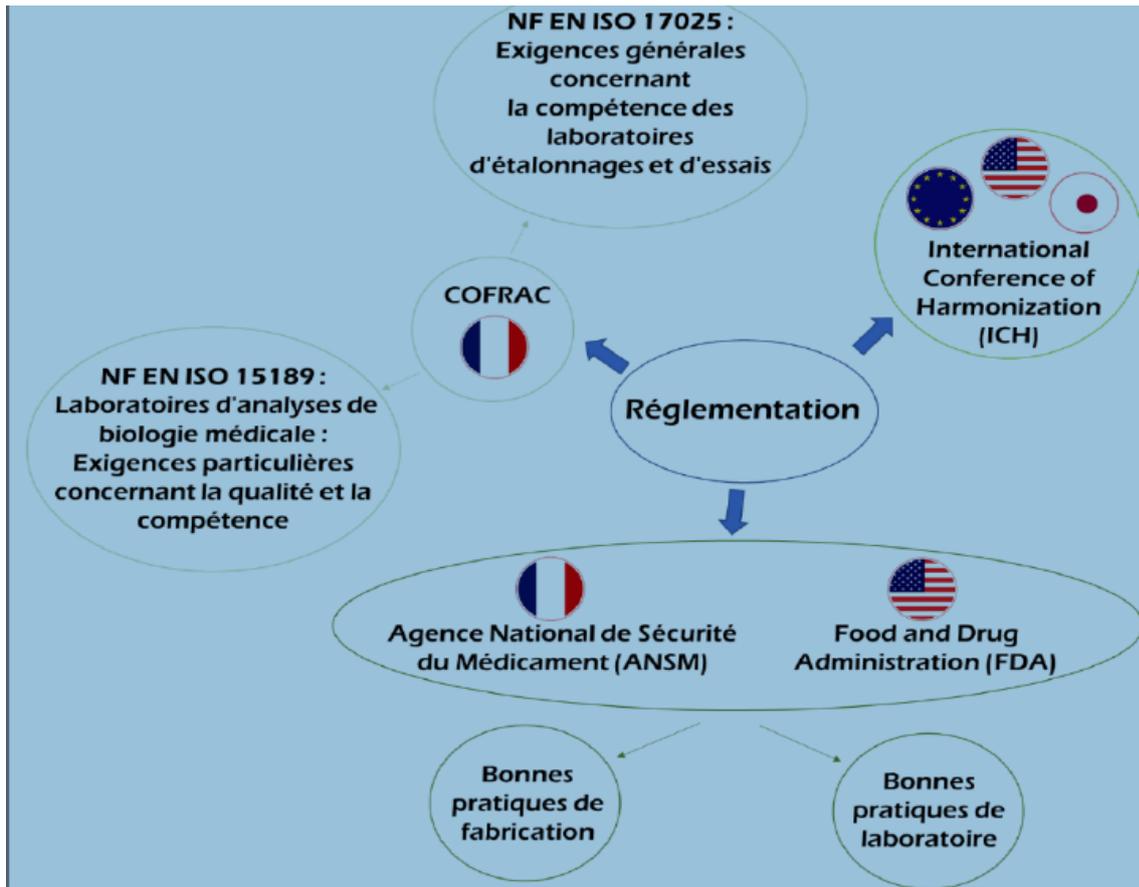
**Validation des procédures analytiques : harmonisation des démarches-guides SFSTP 1992.**

Partie I: Généralités (2003)

Partie II: Statistique (2006)

Partie II: Exemples d'application (2006). [20]

## Chapitre III : Validation analytique



**Figure n° 2:** La réglementation en vigueur concernant la validation des méthodes analytiques [37]

### 4. Cycle de vie d'une méthode analytique

Le cycle de vie d'une méthode est un concept souligné dans la norme ISO 17025 dont la finalité est l'alignement de manière globale de la variabilité de la méthode avec les exigences sur le produit à tester en améliorant la fiabilité de la méthode par la compréhension, la réduction et le contrôle des sources de variabilité. [28,29]

Les étapes clés du cycle d'une vie d'une méthode analytique (sélection, développement, validation et stratégie de contrôle/routine) peuvent être déclinées selon l'approche «quality by design» (QbD) qui assure la qualité du produit en définissant des caractéristiques de performances, scientifiques en réponse à des objectifs spécifiques en réponse à des objectifs spécifiques, peut donc être tout à fait appliquée au processus analytique dans le cadre du cycle de vie des méthodes analytiques. [29]

# Chapitre III : Validation analytique

Ainsi, pour bien comprendre le rôle et la place de la validation, il convient de décrire les différentes étapes de ce cycle.

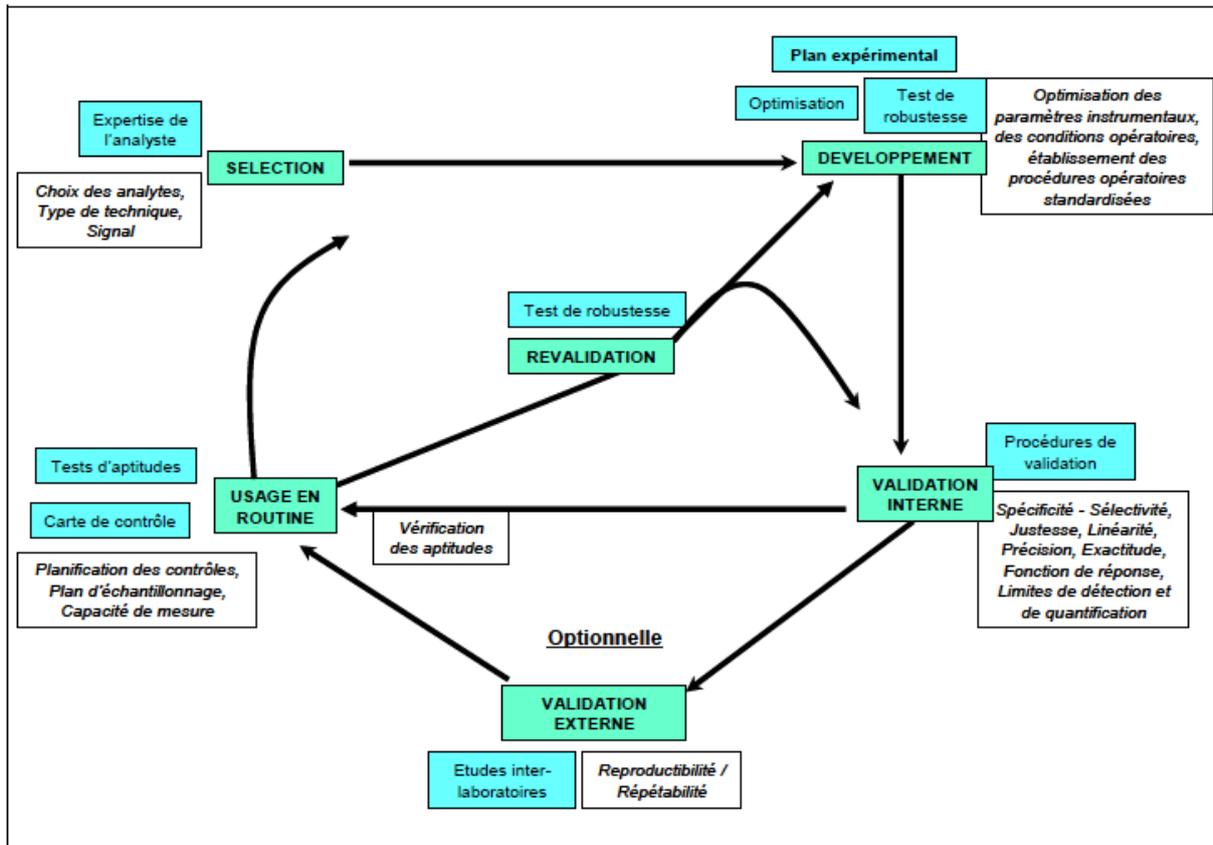


Figure n° 3 : cycle de vie d'une méthode d'analyse. [36]

Les différentes étapes du cycle de vie d'une méthode analytique sont :

## 4.1. Sélection de la méthode

Cette première étape va permettre de définir les objectifs de la méthode et les conditions opératoires initiales.

L'analyste va choisir parmi les diverses méthodes physico-chimiques possibles, la méthode la plus pertinente pour permettre le dosage de l'analyte à déterminer.

La norme ISO 17025 précise que :

« Le laboratoire doit utiliser des méthodes d'essai et/ou d'étalonnage, y compris des méthodes d'échantillonnage, qui répondent aux besoins du client et qui conviennent aux essais et/ou étalonnages qu'il effectue, de préférence les méthodes publiées comme normes internationales, régionales ou nationales ».

## Chapitre III : Validation analytique

---

Ce texte précise qu'il est préférable d'utiliser des méthodes officielles, lorsque cela est possible. Cependant, l'utilisation de méthodes développées par le laboratoire est acceptée. Dans ce deuxième cas, le développement de la méthode doit être confié à du personnel qualifié, avec des ressources adéquates, et la démarche de développement ainsi que les résultats obtenus doivent être correctement renseignés. [28,32]

### 4.2. Mise au point de la méthode

Il s'agit d'une étape de développement de la méthode sélectionnée, afin d'optimiser les différents paramètres du protocole opératoire pour les adapter à la matrice des échantillons qui seront dosés ainsi qu'aux conditions opératoires d'utilisation de la méthode.

Il est important, lors de cette étape de développement, de suivre un cheminement précis et non pas de simplement réaliser des expériences aléatoires, afin de maîtriser la programmation des essais et les délais.

En tenant compte de cette remarque, l'analyste peut utiliser des plans d'expériences, qui vont permettre d'optimiser le nombre d'expériences à réaliser pour trouver les valeurs optimales des variables susceptibles d'influencer le paramètre à optimiser.

Au terme de cette seconde étape, l'analyste devrait avoir recueilli des informations de base sur les performances de la procédure analytique, concernant la pertinence du modèle de régression utilisé pour établir la fonction de réponse, la variabilité des résultats, la limite de quantification et l'intervalle de dosage.

Ces pré-requis vont ainsi constituer une base pour l'étape suivante, qui est la phase de validation proprement dite. [28, 32]

### 4.3. Validation de la méthode

L'étape de validation intervient après le développement d'une nouvelle procédure d'analyse. En effet, les performances de la méthode vont évoluer tout au long du cycle de vie, et plus particulièrement au cours des deux premières étapes. Ainsi, la fiabilité du résultat analytique fourni par la méthode doit être améliorée lors de ces premières phases, pour tendre vers une confiance accrue qui sera attestée durant cette troisième étape de validation.

On distingue deux types de validation, la validation interlaboratoire et la validation intra-laboratoire.

## Chapitre III : Validation analytique

---

La validation inter laboratoire concerne principalement les méthodes analytiques destinées à être utilisées par plusieurs laboratoires, ou bien dont les résultats vont servir lors d'échanges commerciaux. Ainsi, ce type de validation se rencontre rarement dans l'industrie pharmaceutique où les méthodes sont utilisées en interne, et très fréquemment dans l'industrie agro-alimentaire. En effet, il faut impérativement réaliser une validation inter laboratoire pour des méthodes destinées à mesurer la conformité d'une denrée lors d'un échange commercial. Ce type de validation permet en outre de calculer les limites de reproductibilité de la méthode. La validation intra-laboratoire est une validation interne concernant l'ensemble des méthodes analytiques développées par un laboratoire. [28, 32]

### 4.4. Estimation de l'incertitude et vérification de l'aptitude

L'estimation de l'incertitude de mesure, tout comme la validation analytique, est une exigence de la norme ISO 17025 qui indique que :

« Les laboratoires d'essais doivent aussi posséder et appliquer des procédures pour estimer l'incertitude de mesure ».

Cette incertitude permet d'estimer la capacité de mesure de la méthode, et l'adéquation des résultats qu'elle fournit avec les exigences qui lui sont liées. En ce sens, l'estimation de l'incertitude de mesure et la vérification de l'aptitude de la méthode rejoignent le concept de « fitness-for-purpose ».

L'estimation de l'incertitude de mesure et la validation analytique de la méthode sont des concepts interdépendants et le protocole développé par la commission SFSTP et publié en 2003-2006 lors de la démarche d'harmonisation des validations analytiques permet de les combiner.

Ainsi, l'utilisation du profil d'exactitude comme outil de décision illustre comment l'incertitude peut être obtenue à partir des résultats de validation. Le calcul de l'intervalle de tolérance selon la méthode développée par Mee (1984) permet de démontrer clairement le « fitness-for-purpose » de la méthode. [28]

### 4.5. Utilisation en routine

L'objectif d'une méthode analytique n'est pas sa validation, mais bien son utilisation en routine pour l'analyse d'échantillons de valeur vraie inconnue. Le passage en routine de la méthode s'inscrit dans le cadre d'un système de contrôle de la qualité qui a pour objectifs de

## Chapitre III : Validation analytique

---

valider les résultats obtenus sur des échantillons inconnus, et de contrôler les performances de la méthode analytique au fil du temps. [28]

### 4.6. Revalidation

Au cours de l'utilisation en routine de la méthode analytique, certaines améliorations peuvent être apportées à la méthode. Ces modifications vont alors conduire à une procédure plus ou moins complète de revalidation. Un test simple devra être effectué pour déterminer l'impact de ces modifications. En règle générale, une modification de réglage est considérée comme mineure, tandis qu'une modification affectant le principe de la méthode est considérée comme majeure. Dans ce dernier cas, une procédure de validation complète devra de nouveau être appliquée. [32]

## 5. Critères de la validation analytique

Les principaux critères de validation sont ceux couramment utilisés dans les laboratoires d'analyse et dont la nécessité de l'étude a fait l'objet d'un large consensus. Ces critères sont : [19]

- Spécificité-sélectivité
- Linéarité
- Fidélité (répétabilité et fidélité intermédiaire)
- Justesse
- Exactitude
- Sensibilité
- Robustesse
- Limite de détection
- Limite de quantification

## Chapitre III : Validation analytique

**Tableau III** : Critères de la validation en fonction du type d'analyse [18]

Type de tests caractéristiques	Dosage	Impuretés		Identification	Dosage bioanalyse
		Qualitatif	Essais limites		
Justesse	✓	✓			✓
Fidélité répétabilité	✓	✓			✓
Fidélité fidélité intermédiaire	✓	✓			✓
Spécificité Sélectivité	✓	✓	✓	✓	✓
Limite de détection		✓	✓		✓
Limite de quantification		✓			✓
Linéarité	✓	✓			Fonction de réponse
Gamme	✓	✓			✓
Robustesse	✓	✓	✓		✓

### 5.1. Spécificité/sélectivité

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

→ Une procédure d'analyse est dite « spécifique » lorsqu'elle permet de garantir que le signal mesuré provient seulement de la substance à analyser ou qu'elle permet de mesurer quantitativement un paramètre physicochimique ou un groupement fonctionnel d'une ou de plusieurs substance(s) dans l'échantillon. [19]

→ Or pour les méthodes séparatives, on parle plutôt de sélectivité (notion relative) que de spécificité (notion absolue), exemples des techniques chromatographiques. Le degré de sélectivité de la procédure dépend donc de la séparation chromatographique et de la sélectivité intrinsèque du mode de détection. [19]

### 5.2. Exactitude

→ « L'exactitude exprime l'étroitesse de l'accord entre le résultat d'essai et la valeur de référence acceptée, aussi appelée « valeur conventionnellement vraie ». L'étroitesse de l'accord ainsi observée est la résultante de la somme des erreurs systématique et aléatoire, en d'autres termes l'erreur totale liée au résultat. Par conséquent, l'exactitude est l'expression de la somme de la justesse et de la fidélité». [19]

### 5.3. Linéarité

« La linéarité d'une procédure d'analyse est sa capacité à l'intérieur d'un certain intervalle de dosage d'obtenir des résultats directement proportionnels à la quantité (exemple : concentration) en analyte dans l'échantillon. L'exigence de linéarité s'applique aux résultats [concentration calculée =  $f(\text{concentration introduite})$ ], pas aux réponses [signal =  $f(\text{concentration introduite})$ ]. [19]

À l'inverse, l'existence d'une relation linéaire entre la concentration estimée et la concentration introduite n'implique pas que la méthode soit juste ». [19]

### 5.4. Fidélité

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

La fidélité fournit une indication sur les erreurs liées au hasard.

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

La fidélité traduit uniquement la distribution des erreurs aléatoires et n'a aucune relation avec la valeur vraie ou spécifiée. La mesure de fidélité est calculée à partir de l'écart type des résultats d'essais.

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

Peuvent ainsi être distinguées les conditions de :

## Chapitre III : Validation analytique

---

- Répétabilité : conditions où les résultats d'essai indépendants sont obtenus par la même méthode sur des échantillons d'essai identiques dans le même laboratoire, par le même opérateur, utilisant le même équipement et pendant un court intervalle de temps ;
- Fidélité intermédiaire : conditions où les résultats d'essai indépendants sont obtenus par la même méthode sur des échantillons d'essai identiques dans le même laboratoire, avec différents opérateurs et utilisant des équipements différents et pendant un intervalle de temps donné ;
- Reproductibilité : conditions où les résultats d'essai sont obtenus par la même méthode sur des échantillons d'essais identiques dans différents laboratoires, avec différents opérateurs et utilisant des équipements différents. [19]

### 5.5. Justesse

« La justesse exprime l'étroitesse de l'accord entre la valeur moyenne obtenue à partir d'une série de résultats d'essais et une valeur qui est acceptée soit comme une valeur conventionnellement vraie, soit comme une valeur de référence acceptée. La mesure de la justesse est généralement exprimée en termes de recouvrement et de biais absolu ou relatif ».

[19]

### 5.6. Sensibilité

« La sensibilité d'une procédure d'analyse peut être définie comme étant le rapport de la variation de la réponse de la méthode d'analyse à la variation de la quantité d'analyte. Une procédure est dite « sensible » si une faible variation de la concentration ou de la quantité d'analyte entraîne une variation significative de la réponse ».[19]

### 5.7. Limite de détection

« La limite de détection d'une procédure d'analyse est la plus petite quantité de l'analyte dans un échantillon pouvant être détectée, mais non quantifiée comme une valeur exacte dans les conditions expérimentales décrites de la procédure ».[19]

## Chapitre III : Validation analytique

---

### 5.8. Limite de quantification

« La limite de quantification est la plus petite quantité de l'analyte dans un échantillon pouvant être dosée dans les conditions expérimentales décrites avec une exactitude définie ».  
[19]

### 5.9. Robustesse

La robustesse d'une méthode est sa capacité à maintenir ses performances lorsqu'elle est soumise à de petites variations fortuites des conditions expérimentales, telles celles susceptibles de se produire lors de sa mise en œuvre par un autre opérateur, sur un autre matériel ou dans un autre laboratoire.

En fonction du nombre de paramètres à tester, on établit un plan d'expérience à 4, 8 ou 16 essais et on recherche les effets significatifs ou non selon la technique habituelle au traitement des plans d'expérience. [23]

### 5.10. Stabilité des solutions

Il s'agit de montrer que les solutions, témoins et essais, ne se dégradent pas pendant la durée des analyses. Donc si les résultats obtenus sont non conformes, cela permettra d'éliminer l'hypothèse d'une attente trop importante avant de l'analyser.

Ces deux derniers paramètres, robustesse et stabilité des solutions, ne sont pas obligatoires pour valider une méthode analytique cependant ils apportent des informations importantes et utiles.

L'intérêt est de définir les variations admissibles de chacun des paramètres opératoires susceptibles de modifier les résultats d'analyse. Le guide ICH déclare que cette étude doit être faite lors de développement de la méthode et non lors de la validation. [24]

## Chapitre III : Validation analytique

---

### 6. Critères de choix de la validation

Selon les méthodes analytiques étudiées, quantitatives ou qualitatives, il sera associé, à chaque caractéristique de performance, un ou des paramètres qui seront l'expression de la grandeur à estimer à partir de la série de mesures. [30]

Ces critères sont examinés et hiérarchisés en fonction du problème posé, le premier objectif étant toujours d'obtenir une information pertinente au moindre coût. On voit ainsi que le choix d'une méthode d'analyse constitue en tant que tel un problème analytique qu'il va falloir résoudre en empruntant la démarche de l'analyste, ce qui veut dire bien poser le problème au départ et le traduire en termes d'analyse(s) qu'il faudra réaliser. [33]

## Chapitre III : Validation analytique

**Tableau IV** : Caractéristiques de performance à déterminer pour les méthodes qualitatives et les méthodes quantitatives

Etape du processus de validation	Caractéristiques		Performance à déterminer en fonction du type de méthode	
			Qualitative	Quantitative
<b>Caractérisation Intra laboratoire</b>	Spécificité		X	(x)
	Sensibilité			X
	Fonction d'étalonnage/efficacité		(x)	X
	Fidélité	Répétabilité	(x)	
		Fidélité intermédiaire	X	X
	Justesse		Sans objet	X
	Exactitude (justesse +fidélité) <sup>a</sup>		Sans objet	X
	Linéarité		Sans objet	X
	Limite de	Quantification	Sans objet	X
		Détection	X	X
Domaine de validité				
<b>Caractérisation Inter laboratoire</b>	Reproductibilité		X	X
	Répétabilité		(x)	X
	LOD		(x)	Sans objet
	LOQ		Sans objet	
	Spécificité		(x)	Sans objet
	Sensibilité		(x)	Sans objet
	Autres caractéristiques non techniques à définir selon les points critiques est le cahier des charges (délai, rapidité, efficacité, coût... etc.)		X	X

Sans objet : caractéristique non pertinente.

(x) : les caractéristiques inscrites entre parenthèses sont recommandées.

Le choix d'une méthode d'analyse va conduire à examiner un autre ensemble de critères : justesse et fidélité (répétabilité), exactitude, reproductibilité. D'autres critères pourront être pris en compte à leur tour : étendue du domaine de linéarité, sensibilité, robustesse, spécificité, rapidité de la méthode et son aptitude à l'automatisation. [32,33]

En conclusion, le choix d'une méthode d'analyse exige de considérer l'ensemble des propriétés qui la caractérisent et qui sont présentées en détail dans quelques ouvrages spécialisés, autant de critères qu'il faudra hiérarchiser en fonction du problème posé, le but étant d'optimiser chaque fois le rapport coût sur bénéfice. [32,33]

### **7. Etapes de validation à l'aide du profil d'exactitude**

- Disposer du mode opératoire et définir l'analyte ;
- Définir le domaine de validation et l'objectif attendu de la méthode sous la forme d'un intervalle d'acceptabilité ;
- Sélectionner des échantillons de validation dont les valeurs de référence sont connues ;
- Choisir un plan d'expérience de validation ;
- Collecter les données ;
- Pour les méthodes indirectes, calculer les concentrations retrouvées par étalonnage inverse ;
- Calculer les critères de validation à partir des concentrations retrouvées : les écarts-types de fidélité, de fidélité intermédiaire et des biais de justesse ;
- Calculer les intervalles de tolérance et construire le profil d'exactitude ;
- Interpréter les résultats et décider si la méthode est valide ou non.

### **8. Etude statistique de la validation analytique**

L'évaluation des critères de validation repose sur l'utilisation du profil d'exactitude, qui intègre de façon statistiquement correcte dans un seul graphique l'ensemble des éléments

## Chapitre III : Validation analytique

---

essentiels de la validation. Cette démarche permet de simplifier l'approche de la validation d'une procédure analytique tout en contrôlant le risque associé à son utilisation. [21]

### 8.1. Spécificité

#### 8.1.1. Protocole

Cas de matière première : on s'assure que le signal n'est pas modifié par l'ajout volontaire de produits de structure chimique proche.

Cas de produit fini : on s'assure que l'ensemble des substances autres que la substance à doser ne donne aucun signal comparable à celui de la substance à doser.

L'étude de la spécificité nécessite la préparation et l'analyse des solutions suivantes :

- Une solution placebo ;
- Une solution standard à 100% (par rapport à la concentration théorique) ;
- Une solution échantillon à 100% (par rapport à la concentration théorique).

→ Le signal donné à partir de la solution placebo doit être normalement nulle.

→ Les signaux obtenus par les deux solutions standards 100% et échantillon 100% doivent être comparables. [22]

#### 8.1.2. Etude statistique

Le degré de sélectivité de la procédure de dosage dépend d'ailleurs de la qualité de la séparation chromatographique et de la sélectivité intrinsèque du mode de détection.

Très souvent la spécificité/sélectivité se fonde sur une absence d'interférences. Elle peut être démontrée par différents moyens.

- Soit par la comparaison des signaux instrumentaux obtenus à partir des solutions préparées : les spectres obtenus à partir de la solution standard 100% et la solution échantillon 100% doivent être superposables.

## Chapitre III : Validation analytique

---

- Soit en comparant la droite obtenue avec la gamme matrice (forme reconstituée) avec celle obtenue à partir de la gamme standard. [22]

### Test t de Student

→ Si les pentes sur standard et sur la forme reconstituée sont comparables, leur différence ne doit pas être différente de zéro.

→ Ceci revient donc à comparer une valeur observée ( $a_1 - a_2$ ) à une valeur théorique (zéro) connaissant l'erreur totale (l'écart-type) fait sur  $a_1$  et  $a_2$ .

$$t_{\text{calculé}} = \frac{|a_1 - a_2|}{\sqrt{\sigma_{a1}^2 + \sigma_{a2}^2}}$$

- $a_1$  et  $a_2$  : pentes respectives des droites de régression  $D_1$  (obtenue à partir de la gamme standard) et  $D_2$  (obtenue à partir de la gamme placebo chargé).
- $\sigma_{a1}^2$  et  $\sigma_{a2}^2$  : variances respectives des pentes  $a_1$  et  $a_2$ .
- $\alpha$  : risque d'erreur acceptée (5%).
- $n_1$  et  $n_2$  : nombre d'échantillon réalisé pour la forme standard et la forme placebo chargé.
- $n_1 + n_2 - 4$  : degré de liberté (ddl).

La valeur du  $t$  calculé est comparée à la valeur  $t^\circ$  ( $\alpha$  ;  $n_1 + n_2 - 4$ ) lue sur la table de Student. Si  $t_{\text{calculé}} < t^\circ$  → les pentes sont comparables  $\Leftrightarrow$  pas d'effet matrice donc la méthode est spécifique.

Après avoir vérifié la spécificité de la méthode analytique on travaille sur deux ensembles d'échantillons :

### Standard d'étalonnage (SE)

Les standards d'étalonnage sont les échantillons, avec ou sans matrice, de concentrations connues qui permettent d'établir les « points de la courbe d'étalonnage » ou « points de gamme ».

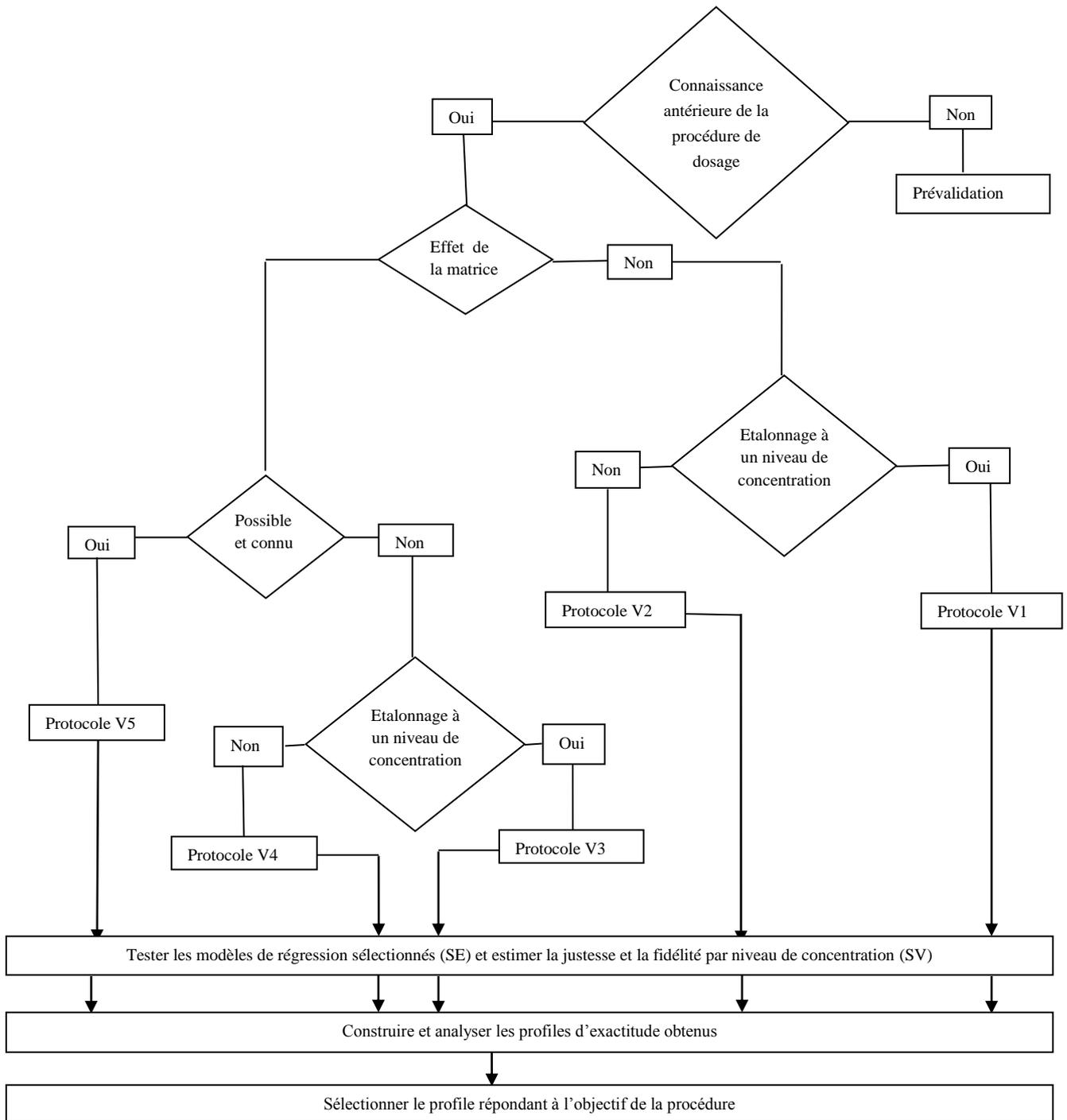
## Chapitre III : Validation analytique

---

### **Standards de validation (SV)**

Les standards de validation sont des échantillons, reconstitués dans la matrice ou tout autre analyte référence, dont la valeur vraie a pu être établie par consensus et qui sont utilisés pour la validation de la procédure d'analyse. [22]

En ce qui concerne la préparation des SE et SV, celle-ci dépend du protocole de validation choisi. Le logigramme de la figure n° 04 suivante, présente la démarche proposée dans le guide SFSTP 2003 pour sélectionner un protocole expérimental de validation en fonction des contraintes ou des spécificités liées à la procédure de dosage sous épreuve. [19]



**Figure n° 04** : Logigramme permettant de sélectionner un protocole de validation. [19]

Le tableau suivant présente selon le protocole choisi, le nombre total d'essai à réaliser pour valider la procédure analytique concernée.

## Chapitre III : Validation analytique

**Tableau V** : Choix du nombre de standards d'étalonnage et de validation en fonction du protocole choisi. [19]

Standards	Niv de conc	Protocole				
		V1	V2	V3	V4	V5
SE. Etalonnage 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. Etalonnage avec la matrice	Bas				2	2
	Médian			2	2 <sup>(2)</sup>	2 <sup>(2)</sup>
	Haut			2 <sup>(2)</sup>	2	2
	Addit					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
Nbre minimum séries		3	3	3	3	3
Nbre total essais (min)		33	45	39	63	45

Le protocole adopté dans notre étude est le **V2 modifié** : en utilisant cinq niveaux de concentration au lieu de trois pour les SE et les SV.

### 8.2. Fonction de réponse

Une fois les expériences réalisées et les données collectées, il convient tout d'abord de déterminer, sur la base des standards d'étalonnage (SE), la relation entre la réponse (signal ou réponse de l'instrument) Y et la quantité (concentration) X.

Cette relation se caractérise à l'aide d'une fonction f qui doit être strictement monotone (strictement croissante ou décroissante) sur l'intervalle de dosage envisagé:

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

## Chapitre III : Validation analytique

Où  $\varepsilon \sim N(0, \sigma^2)$  est l'erreur associée à la fonction de réponse  $f$  appelée communément erreur résiduelle. Il faut donc ajuster la fonction de réponse, c'est-à-dire évaluer les paramètres du modèle, de manière à ce que l'erreur résiduelle soit minimisée. Deux familles de fonctions se dégagent de cet ensemble : les fonctions dites linéaires en leurs paramètres et les fonctions non linéaires. Une fonction est dite linéaire si elle est une combinaison linéaire de ses paramètres.

On peut noter que la fonction quadratique, bien que sa représentation graphique ne soit pas droite, est effectivement linéaire en ses paramètres. Si ce n'est pas le cas, comme dans le cas des fonctions logistiques, la fonction est dite non linéaire en ses paramètres. La façon d'ajuster ces fonctions de réponse dépend de cette distinction.

→ Différentes fonctions de réponse peuvent être envisagées lors de la validation de la méthode, comme illustré au tableau suivant. Le choix dépend du type de méthode (méthode physicochimique, bioanalytique, immuno-dosage. [21])

**Tableau VI :** Exemples de fonction de réponses [21]

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

Très vraisemblablement, la plupart des méthodes physicochimiques auront recours à la droite (passant par 0 ou non). [21]

## Chapitre III : Validation analytique

---

### 8.3. 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 dès lors qu'un calcul de variance doit être effectué (estimation de la répétabilité et de la fidélité intermédiaire). 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 fonction de réponses obtenues avec les standards de d'étalonnage. Ainsi l'alignement des  $n_{ij}$  répétitions du niveau de concentration  $j$  de la série  $i$  s'effectue comme suit :

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

## Chapitre III : Validation analytique

---

En résumé, pour les différentes fonctions de réponse :

**Tableau VII** : Règles d'alignement pour différentes fonctions de réponses [21]

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

## Chapitre III : Validation analytique

### 8.4. Prédiction inverses

Avant d'effectuer les prédictions inverses, c'est-à-dire calculer des concentrations en retour avec la fonction de réponse, il est préférable de s'assurer qu'au sein d'un niveau de concentration, les concentrations sont toutes identiques. Si ce n'est pas le cas, il vaut alors mieux les aligner comme décrit dans la section précédente.

Les prédictions inverses pour les différents modèles de régression s'obtiennent comme suit :

**Tableau VIII** : Calcul des prédictions inverses pour différentes fonction de réponses. [21]

Fonction de réponse	Concentration calculée
Droite passant par l'origine	$x_{ijk,calc} = \frac{y_{ijk}}{\hat{\beta}_i}$
Droite	$x_{ijk,calc} = \frac{y_{ijk} - \hat{\alpha}_i}{\hat{\beta}_i}$
Fonction quadratique	$x_{ijk,calc} = \frac{-\hat{\beta}_i + \sqrt{\hat{\beta}_i^2 - 4\hat{\gamma}_i(\hat{\alpha}_i - y_{ijk})}}{2\hat{\gamma}_i}$
Logistique à 4 paramètres	$x_{ijk,calc} = \hat{\gamma}_i \left( \frac{\hat{\delta}_i - \hat{\alpha}_i}{y_{ijk} - \hat{\alpha}_i} - 1 \right)^{\frac{1}{\hat{\beta}_i}}$
Logistique à 5 paramètres	$x_{ijk} = \hat{\gamma}_i \left[ \left( \frac{\hat{\delta}_i - \hat{\alpha}_i}{y_{ijk} - \hat{\alpha}_i} \right)^{\frac{1}{\hat{\psi}_i}} - 1 \right]^{\frac{1}{\hat{\beta}_i}}$

Si les observations ont été alignées, il faut remplacer les  $y_{ijk}$  par  $y_{ijk}$ , c'est dans le tableau précédent. Si une transformation a été utilisée il ne faut pas oublier d'effectuer la transformation inverse après ce calcul en retour.

Par exemple, après une transformation logarithmique ou racine carrée de la droite les concentrations calculées se font de la manière suivante :

## Chapitre III : Validation analytique

**Tableau IX :** Calcul des prédictions inverses pour la droite ayant subi une transformation logarithmique ou racine carrée. [21]

Fonction de réponse	Concentration calculée (logarithme)	Concentration calculée (racine carrée)
Droite	$x_{ijk,calc} = e^{\frac{\ln(y_{ijk}) - \hat{\alpha}_i}{\hat{b}_i}}$	$x_{ijk,calc} = \left( \frac{\sqrt{y_{ijk}} - \hat{\alpha}_i}{\hat{b}_i} \right)^2$

### 8.5. Calcul de la justesse et de la fidélité [21]

#### 8.5.1. Modèle

La justesse d'une méthode analytique (par opposition à celle d'un résultat) exprime l'étroitesse de l'accord entre la moyenne (par opposition à celle d'une observation unique) des résultats d'essai avec la méthode et la valeur de référence acceptée, aussi appelée valeur conventionnellement vraie.

L'estimation de la justesse et de la fidélité de la méthode s'effectue avec les concentrations calculées provenant des standards de validation en phase de validation (ou des standards d'étalonnage eux-mêmes en phase de prévalidation).

Cette estimation est réalisée à chacun des  $j$  niveaux de concentration considérés à l'aide du modèle statistique suivant :

$$X_{ijk} = \mu_j + \alpha_{ij} + \varepsilon_{ijk}$$

Où

$X_{ijk}$  est la  $k$ -ième concentration calculée du niveau  $j$  de la  $i$ -ème série,

$\mu_j$  est la moyenne des concentrations calculées du niveau de concentration  $j$ ,

$\alpha_{ij}$  est au niveau  $j$  l'écart entre la moyenne de la  $i$ -ème série et la moyenne  $\mu_j$ ;

$\varepsilon_{ij}$  est considéré comme une variable aléatoire ayant une distribution normale de moyenne 0 et de variance  $\sigma_{w_j}^2$ ,  $\varepsilon_{ijk}$  est l'erreur expérimentale, considérée comme une variable aléatoire ayant une distribution normale de moyenne 0 et de variance.

L'erreur expérimentale est supposée indépendante de la série.

## Chapitre III : Validation analytique

---

Les variances  $\sigma_{Bj}^2$  et  $\sigma_{wj}^2$  représentent les variances inter-série et intra-série, respectivement. La méthode du maximum de vraisemblance restreint est utilisée pour estimer à chaque niveau de concentration  $j$  les paramètres  $\mu_j$ ,  $\sigma_{Bj}^2$  et  $\sigma_{wj}^2$  du modèle.

$$\hat{\mu}_j = \frac{1}{\sum_{i=1}^p n_{ij}} \sum_{i=1}^p \sum_{k=1}^{n_{ij}} x_{ijk,calc}$$

$$MSM_j = \frac{1}{p-1} \sum_{i=1}^p n_{ij} (\bar{x}_{ij,calc} - \bar{x}_{j,calc})^2$$

$$MSE_j = \frac{1}{\sum_{i=1}^p n_{ij} - p} \sum_{i=1}^p \sum_{k=1}^{n_{ij}} (x_{ijk,calc} - \bar{x}_{ij,calc})^2$$

Où

$MSM_j$  et  $MSE_j$  : Maximum de vraisemblances pour chaque niveau de concentration  $j$  ;

$\bar{x}_{ij,calc}$  : Moyenne des concentrations calculées au niveau  $j$  ;

$\bar{x}_{j,calc}$  : Moyenne des concentrations calculées au niveau  $j$  ;

$x_{ijk,calc}$  : Concentrations calculées au niveau  $j$  de la série  $i$  répétition  $k$  ;

$n$  : Nombre de répétition ;

$p$  : Nombre de séries.

Dans le cas d'un schéma équilibré (le nombre de répétitions est identique pour tout niveau de concentration dans chaque série), les composantes de la variance du niveau sont estimées comme suit ( $n$  étant le nombre de répétition dans chaque série) :

Si  $MSE_j < MSM_j$  alors :

$$\hat{\sigma}_{w,j}^2 = MSE_j$$

$$\hat{\sigma}_{B,j}^2 = \frac{MSM_j - MSE_j}{n}$$

Si non :

$$\hat{\sigma}_{w,j}^2 = \frac{1}{pn-1} \sum_{i=1}^p \sum_{j=1}^k (x_{ijk,calc} - \bar{x}_{j,calc})^2$$

$$\hat{\sigma}_{B,j}^2 = 0$$

## Chapitre III : Validation analytique

### 8.5.2. 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: [21]

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

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

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

Où :

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

$\bar{x}_j$  : Moyenne des concentrations introduites au niveau j.

### 8.5.3. 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 : [21]

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

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

### 8.6. Calcul de l'exactitude

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

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

## Chapitre III : Validation analytique

---

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

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

L'erreur maximale relative observée pour chaque modèle sur l'ensemble des séries montre l'impact du choix de la fonction de réponse sur l'exactitude des résultats. [21]

### 8.6.1. Erreur totale et profil de l'erreur totale

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

$$X = \mu + \text{Biais}_{\text{procédure}} + \text{Fidélité Intermédiaire}_{\text{procédure}}$$

⇕

$$X - \mu = \text{Biais}_{\text{procédure}} + \text{Fidélité Intermédiaire}_{\text{procédure}}$$

⇕

$$X - \mu = \text{Erreur Totale}_{\text{procédure}}$$

L'Erreur totale d'une procédure analytique évalue son aptitude à produire des résultats exacts. Donc l'estimation de l'erreur totale d'une procédure est fondamentale pour juger de la validité d'une méthode. [27]

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

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 auxquelles 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. [27]

## Chapitre III : Validation analytique

### 8.7. Calcul de l'intervalle de tolérance

L'important en validation, ce n'est pas la validité des résultats que nous obtenions avec l'erreur totale, mais plutôt la plus garantie ou une représentation de ce que la même procédure analytique pourra donner comme résultat dans le futur, c'est le rôle de l'intervalle de tolérance.

L'estimation des paramètres de justesse et fidélité  $\mu_j$ ,  $\sigma_{B,j}^2$ ,  $\sigma_{w,j}^2$ , et à chaque niveau de concentration  $j$  n'est pas une fin en soi, mais une étape indispensable pour calculer la proportion attendue de résultats qui se situent dans les limites d'acceptation.

L'intervalle de tolérance sera calculé pour chaque niveau de concentration envisagé avec les standards de validation et pour chaque modèle mathématique.

Pratiquement, l'intervalle de tolérance se calcule comme suit en valeur absolue :

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

Où :

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

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

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

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

$$Q_t\left(v; \frac{1+\beta}{2}\right)$$

$n$  : nombre de répétitions ;

$P$  : nombre de séries.

## Chapitre III : Validation analytique

Le même intervalle en échelle relative devient :

$$\left[ \text{biais}(\%)_j - Q_t\left(v; \frac{1 + \beta}{2}\right) \sqrt{1 + \frac{1}{pnB_j^2} CV_{FIJ}}; \text{biais}(\%)_j + Q_t\left(v; \frac{1 + \beta}{2}\right) \sqrt{1 + \frac{1}{pnB_j^2} CV_{FIJ}} \right]$$

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. [21]

### 8.8. Profil d'exactitude et décision

#### 8.8.1. Calcul

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.

$$L_j = \text{biais}(\%)_j - Q_t\left(v; \frac{1 + \beta}{2}\right) \sqrt{1 + \frac{1}{pnB_j^2} CV_{FIJ}}$$

$$U_j = \text{biais}(\%)_j + Q_t\left(v; \frac{1 + \beta}{2}\right) \sqrt{1 + \frac{1}{pnB_j^2} CV_{FIJ}}$$

Si le profil d'exactitude est entièrement inclus dans les limites d'acceptation  $[-\lambda, +\lambda]$  alors on peut affirmer que, en routine, le pourcentage de résultats dont la différence entre la valeur déterminée  $X$  et la valeur vraie  $V$  est inférieure, en valeur absolue à  $\lambda$  sera au moins égale à  $\beta$ . [21]

$$\text{Prob} (|X - V| < \lambda) \geq \beta$$

## Chapitre III : Validation analytique

---

### 8.8.2. Choix de la fonction de réponse

L'utilisation de certaines fonctions ne permet pas à la procédure analytique d'atteindre ses objectifs vu que pour certaines concentrations, les limites de tolérances sortent des limites d'acceptation (5%, + 5%) retenues pour cet exemple. Par ailleurs, parmi les fonctions de réponses acceptables, on pourra remarquer que certaines fournissent des résultats meilleurs que d'autres.

Ce seront ces dernières qui devront être retenues. Nous attirons également l'attention sur le fait, que pour l'ensemble de ces modèles, le coefficient de détermination  $R^2$  est toujours supérieur à 0.99 et pas en rapport ici avec la qualité des résultats.

Une fois de plus nous tenons à souligner ici que ce coefficient n'est pas une indication fiable de la qualité des résultats que la procédure rendra. [21]

### 9. Linéarité

La linéarité d'une procédure d'analyse est sa capacité à l'intérieur d'un certain intervalle de dosage d'obtenir des résultats directement proportionnels à la quantité (ex : concentration) en analyte dans l'échantillon. Rappelons que l'exigence de linéarité s'applique aux résultats (concentration calculée =  $f$ (concentrations introduites)), pas aux réponses (signal =  $f$ (concentrations introduites)). C'est un pré-requis à l'estimation de la justesse.

A l'inverse, l'existence d'une relation linéaire entre la concentration estimée et la concentration introduite n'implique pas que la méthode soit juste. [21]

## Chapitre III : Validation analytique

---

### 10. Limites de quantification

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

Entre ces deux limites, il y a bien sûr l'intervalle de dosage. De la sorte, les limites de quantification sont bien les valeurs extrêmes qui peuvent être quantifiées avec une exactitude définie. [21]



## Chapitre IV : HPLC

---

La chromatographie est une technique analytique séparative, permettant l'identification ou le dosage des constituants d'un mélange et/ou préparative permettant la récupération des composés.

Il consiste à faire migrer les constituants à séparer sur phase stationnaire et mobile à l'aide d'une phase mobile liquide ou gazeuse de nature différente. Chaque molécule sera plus ou moins rapidement entraînée selon son affinité pour la phase stationnaire et la phase mobile, permettant la séparation des différents constituants présents dans le mélange. A partir de ce principe très général, il existe de très nombreux types de chromatographies en fonction de la nature de la phase stationnaire et de la phase mobile, ainsi que la nature des interactions entre ces phases et les molécules à purifier ou à séparer.

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

### 1. Principe de l'HPLC

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

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

## Chapitre IV : HPLC

---

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

Dans des conditions chromatographiques données, le "temps de rétention" (temps au bout duquel un composé est élué de la colonne et détecté), caractérise qualitativement une substance. L'amplitude de ces pics, ou encore l'aire limitée par ces pics et la prolongation de la ligne de base permet de mesurer la concentration de chaque soluté dans le mélange injecté. [25]

### 2. Appareillage

Un chromatographe liquide haute pression comporte une ou plusieurs pompes qui propulsent l'éluant dans une colonne analytique.

L'injection de l'échantillon à analyser est pratiquée en introduisant un faible volume de produit (quelques  $\mu\text{L}$ ) dans l'éluant sous pression.

Après leur séparation, les différents constituants de l'échantillon sont détectés en sortie de colonne. Un logiciel assure l'acquisition et le traitement des données [26].

**Tableau X** : Principaux solvants en HPLC [26].

Phénomène	Solvants
Adsorption	Hexane, méthanol, acétonitrile dichlorométhane, chloroforme
Partition	Méthanol- eau, acétonitrile- eau
Echange d'ions	Solution tampon (pH contrôlé)
Exclusion	Tétrahydrofurane, toluène

## Chapitre IV : HPLC

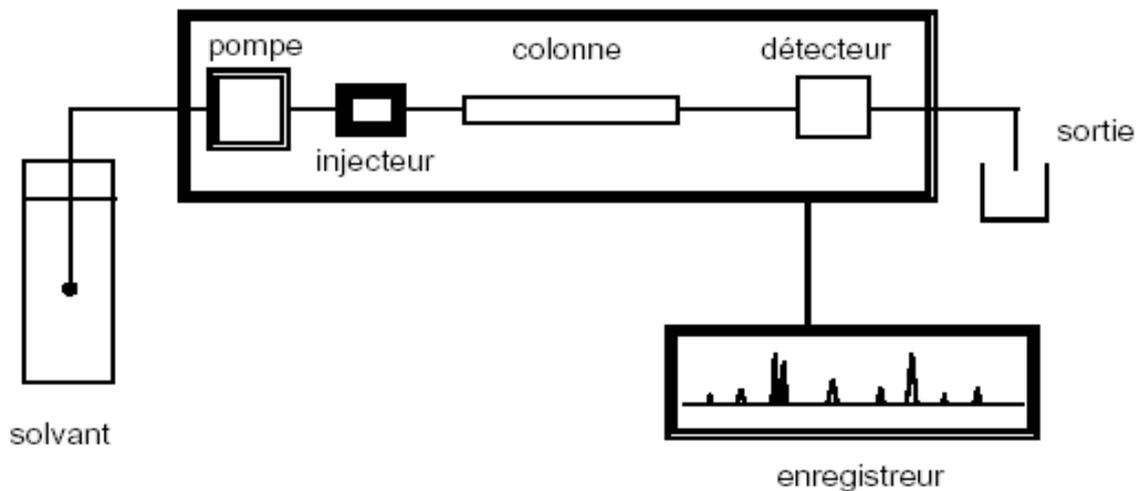


Figure n ° 05 : Chromatographe HPLC [26]

### 2.1. Réservoirs de phases mobiles (éluant)

Un appareil HPLC comprend un ou plusieurs réservoirs, en verre ou en acier inoxydable résistants à la corrosion et contenant les solvants.

Des gaz ambiants comme l'oxygène, peuvent être dissous dans les solvants, former des bulles dans la colonne et créer des perturbations dans la détection.

De même des poussières en suspension peuvent perturber les séparations et gêner le bon fonctionnement des pompes et des détecteurs. Il est donc souhaitable de dégazer et de filtrer les solvants. Plusieurs techniques sont utilisées:

Le dégazage peut être effectuée par une vive agitation, par ultrasons, par barbotage d'hélium ou par réaction catalytique (platine sur alumine) en présence de méthanol (dans la phase mobile) pour transformer l'oxygène en formaldéhyde ou acide formique. Un barbotage d'hélium permet de retirer environ 85% de l'oxygène en ~10min. L'hélium ayant une très faible solubilité dans les solvants ordinaires, après barbotage, les solvants sont exempts d'hélium; d'où l'intérêt du barbotage. Afin d'éviter la redissolution des gaz, un barbotage constant d'hélium peut être effectuée. De plus, l'utilisation du téflon, qui laisse passer l'air, est évitée dans les systèmes d'introduction du solvant. [27]

# Chapitre IV : HPLC

## 2.2. Systèmes de pompage

Toute installation d'HPLC comporte au moins une pompe, pour forcer le passage de la phase mobile à travers la colonne dont le remplissage est très compact. Elle délivre en continu la phase mobile et provoque un écoulement compatible avec la séparation chromatographique. [25]

Le système de pompage doit:

- Atteindre des pressions élevées: ~200 bars (20 000kPa) ou plus ;
- Etre exempt d'impulsions ;
- Imposer des débits reproductibles de 0,1 à 10 mL. Min<sup>-1</sup> ;
- Résister à la corrosion et aux solvants ;
- Permettre de délivrer un éluant de composition fixe en mode isocratique ou de composition variable pour travailler en en gradient d'éluant.

L'éluant effectuée avec un seul solvant de composition fixe, constante, est appelée "isocratique". La séparation est améliorée par une éluant avec programmation de solvants ou "gradient d'éluant". Deux ou plusieurs solvants de polarité différente sont utilisés. Les fractions volumiques des solvants sont modifiées selon un programme préétabli. [27]

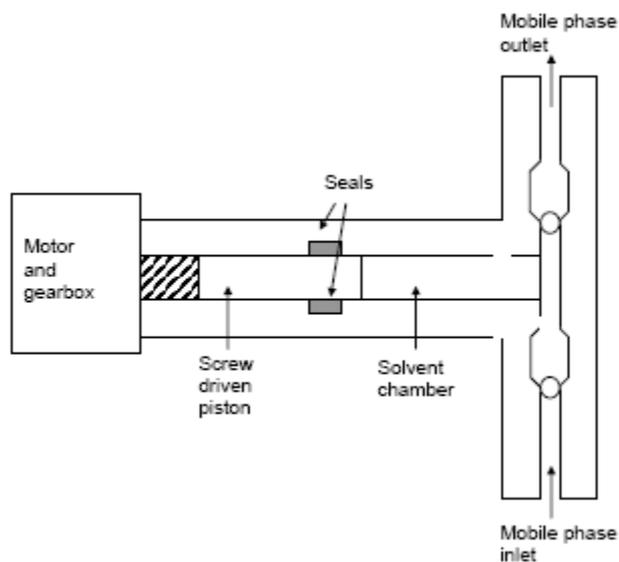


Figure n° 06 : Schéma d'une pompe en HPLC) [26]

# Chapitre IV : HPLC

## 2.3. Injecteurs

Pour réaliser une injection dans des bonnes conditions, il convient :

- De ne pas surcharger la colonne; si l'échantillon est trop important on aboutit à des pics très larges et des phénomènes de traîne, autant de facteurs qui concourent à diminuer le pouvoir de résolution de la chromatographie. [26]

- D'injecter très rapidement. La durée d'une injection est égale à :

$$d \text{ (secondes)} = \text{Volume de la boucle } (\mu\text{L}) / \text{Vitesse du flux } (\mu\text{L/s})$$

Pour injecter rapidement, on utilise des échantillons de faible volume. [26]

### 2.3.1. Injecteur à dépôt direct

L'injection du soluté se fait à l'aide d'une seringue à travers un septum (cloison séparant 2 cavités). La reproductibilité de cette technique est 2 à 3%. [27]

### 2.3.2. Vanne à boucle

Très utilisée. Des pressions de 600 bars peuvent être atteintes. Des boucles interchangeables permettent d'injecter des volumes entre 10 et 100  $\mu\text{L}$ . Certaines vannes d'injection ont des volumes de boucle de 0,5 à 5  $\mu\text{L}$  et descendent même à 40  $\mu\text{L}$ .

La reproductibilité est bonne si la boucle a été complètement remplie.

L'échantillon introduit dans la boucle déplace la phase mobile qui s'y trouve. Il est nécessaire d'introduire un volume d'échantillon au moins deux fois plus grand que le volume de la boucle afin d'éliminer toute trace d'échantillon dilué qui se crée dès que cet échantillon est introduit.

Les connexions de différents ports de la vanne permettent une séparation spatiotemporelle entre le remplissage de la boucle et l'injection dans la colonne. Lors du remplissage, l'échantillon est introduit dans la boucle à faible pression grâce à une seringue calibrée. [27]

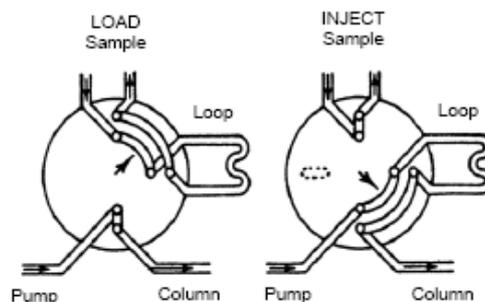


Figure n°07: Schéma d'un injecteur à boucle externe [26]

## Chapitre IV : HPLC

---

### 2.4. Colonnes

La colonne est la partie la plus importante du système, puisque c'est à cet endroit que se fait la séparation des composés. Les colonnes sont en acier inoxydable, de longueur variant de 5 à 25 cm avec un diamètre interne de 4 à 4,6 mm. Ces colonnes sont remplies de la phase stationnaire, dont le diamètre des particules varie de 3 à 10  $\mu\text{m}$ . Des compagnies se spécialisent dans la vente de colonnes pour HPLC.

Pour éviter l'obstruction et la détérioration des colonnes par les contaminants, on place habituellement une colonne de garde plus petite et moins dispendieuse au sommet de la colonne principale. Les colonnes de garde doivent être changées régulièrement. [26]

### 2.5. Phase stationnaire

#### 2.5.1. Phase normale

La phase normale est constituée de gel de silice. Ce matériau est très polaire. Il faut donc utiliser un éluant apolaire. Ainsi lors de l'injection d'une solution, les produits polaires sont retenus dans la colonne, contrairement aux produits apolaire qui sortent en tête.

L'inconvénient d'une telle phase, c'est une détérioration rapide au cours du temps du gel de silice, ce qui entraîne un manque de reproductibilité des séparations. [26]

#### 2.5.2. Phase inverse

La phase inverse est majoritairement composée de silice greffée par des chaînes linéaires de 8 ou 18 atomes de carbones (C8 et C18). Cette phase est apolaire et nécessite donc un éluant B polaire (ACN, Me OH, H<sub>2</sub>O). Dans ce cas, ce sont les composés polaires qui seront élués en premier. Contrairement à une phase normale, il n'y a pas d'évolution de la phase stationnaire au cours du temps, et la qualité de la séparation est donc maintenue constante. [26]

### 2.6. Phase mobile

L'interaction plus ou moins forte entre la phase mobile et la phase stationnaire normale ou à polarité inversée se répercute sur les temps de rétention des solutés. La polarité de la phase stationnaire permet de distinguer deux situations de principe :

- Si la phase stationnaire est polaire, on utilisera une phase mobile peu polaire la chromatographie est dite en phase normale ;

## Chapitre IV : HPLC

---

- Si la phase stationnaire est très peu polaire, on choisira une phase mobile polaire (le plus souvent des mélanges de méthanol ou d'acétonitrile avec de l'eau), c'est la chromatographie en phase inverse. En modifiant la polarité de la phase mobile, on agit sur les facteurs de rétention  $k$  des composés. Les silices greffées conduisent en général à une perte importante de polarité. Avec une phase greffée, l'ordre d'élution est opposé à celui auquel on est habitué avec les phases normales.

Ainsi avec un éluant polaire, un composé polaire migre plus vite qu'un composé apolaire. Dans ces conditions les hydrocarbures sont fortement retenus. On réalise des gradients d'élution en diminuant au cours de la séparation la polarité de l'éluant (ex : mélange eau /acétonitrile dont la concentration en acétonitrile va en croissant au cours de l'élution). On peut, en mélangeant plusieurs solvants, ajuster le pouvoir d'élution de la phase mobile. [26]

### 2.7. Détecteurs

Il n'existe pas de détecteur universel comme en chromatographie en phase gazeuse: détecteurs à ionisation de flamme et à conductivité thermique. En HPLC, les détecteurs sont spécifiques à chaque application.

Le volume de détecteur HPLC doit être le plus faible possible afin de diminuer l'élargissement des bandes. Il existe des détecteurs de propriétés de la phase mobile qui dépendent de la présence d'un soluté: indice de réfraction, constante diélectrique, densité.

Et des détecteurs de propriétés du soluté, que ne possèdent pas la phase mobile: absorbance dans l'ultraviolet, fluorescence ou courant de diffusion. [27]

#### 2.7.1. Détecteurs d'absorption dans UV-visible

Cette détection est basée sur l'absorption d'une lumière monochromatique.

Elle suit la loi de Beer Lambert:

$$A = \epsilon_{\lambda} \cdot l \cdot c$$

$\lambda$  = longueur d'onde dans UV-Vis;

$c$  = concentration molaire du soluté en mol. L<sup>-1</sup>

$A$  = absorbance du soluté; sans dimension

Remarque : La phase mobile doit être transparente (ne pas absorber) à  $\lambda$ .

$\epsilon_{\lambda}$  = coefficient d'absorption molaire du soluté (L.mol<sup>-1</sup>.cm<sup>-1</sup>) à  $\lambda$ .

## Chapitre IV : HPLC

---

$l$  = épaisseur (cm) de la solution traversée ou de la cellule.

La quantité minimale détectable est de l'ordre du nano-gramme.

Il existe plusieurs types d'appareils:

- A longueur d'onde fixe: ex:  $\lambda=254$  ou  $313$  ou  $365$  nm du Hg (source à vapeur de mercure dont la raie la plus intense est isolée avec des filtres).
- A longueur d'onde variable: 200 à 700 nm dans des spectrophotomètres à balayage utilisant une source continue et un monochromateur à réseau pour sélectionner la longueur d'onde.
- A barrettes de photodiodes, qui donnent la valeur simultanée des intensités lumineuses sur tout le spectre. [27]

### 2.7.2. Détecteurs d'absorption dans l'infrarouge

- De 2,5 à 14,5  $\mu\text{m}$  (4000 à 690  $\text{cm}^{-1}$ );

- A transformée de Fourier.

Ces deux types de détecteurs ont des cellules avec fenêtres en chlorure de sodium ou fluorure de calcium.  $L_{\text{cellule}} = 0,2$  à  $1,0$  mm  $V_{\text{cellule}} = 1,5$  à  $10$   $\mu\text{L}$ .

Toutefois les larges bandes d'absorption de l'eau et des alcools empêchent l'utilisation de ce détecteur infrarouge dans de nombreux cas. [27]

### 2.7.3. Détecteurs de fluorescence

Certains solutés sont fluorescents ou le deviennent suite à des réactions pré ou post colonne.

Des détecteurs de fluorescence à laser permettent des détections de 1 à 10 pg et même en dessous. [27]

### 2.7.4. Détecteurs réfractométriques

Ils mesurent la différence d'indice de réfraction entre la phase mobile et la phase mobile avec l'échantillon. Ils nécessitent une température régulée à  $0,01^\circ\text{C}$ , car les indices de réfraction varient avec la température. [27]

### 2.7.5. Détecteurs électrochimiques

Leur fonctionnement est basé sur l'ampérométrie, la polarographie, la coulométrie et la mesure de conductivité. [27]

## Chapitre IV : HPLC

---

### 2.7.6. Détecteurs par spectrométrie de masse

Le couplage HPLC / SM est plus difficile à réaliser qu'avec la CPG car il faut éliminer le solvant d'élution. On peut:

- Réaliser une vaporisation sélective du soluté ;
- Utiliser des micro-colonnes ( $L=10$  cm,  $d_{int}=1$  mm) à faible débit (quelques  $\mu\text{L}\cdot\text{min}^{-1}$ ) et un volume d'injection de  $\sim 1\mu\text{L}$  qui permettent d'introduire la totalité de l'effluent chromatographique dans le spectromètre de masse.

On peut travailler en nanochromatographie. [27]

### 2.8. Intégrateur-enregistreur

Les enregistreurs sont les mêmes que ceux utilisés en chromatographie en phase gazeuse.

Les logiciels d'application, comme le Millennium, sont également utilisés en HPLC. [26]

## 3. Domaines d'application de l'HPLC

La chromatographie liquide haute performance a pour objet plus une analyse quantitative que qualitative car il paraît difficilement envisageable de balayer tout l'intervalle de longueur d'onde accessible pour détecter n'importe quel produit contenu dans la solution étudiée.

- L'HPLC se développe de plus en plus pour des très nombreuses molécules (hormones, vitamines, médicaments, ....). C'est un appareil de base indispensable dans tous les laboratoires de recherches.
- L'HPLC est aussi employé en cosmétologie elle permet l'analyse soit des substances thermiquement instable soit des substances peu volatiles, soit encore des substances ionisées
- Les molécules d'intérêts biologiques comme les vitamines, les sucres et les acides aminés peuvent être analysées directement sans passer par la formation de dérivés, et la séparation des protéines et de polymères synthétiques peut être réalisée même si leur masse est élevée. [26]

## 4. Application de Chromatographie Liquide Haute Performance à l'analyse

### 4.1. Informations apportées par un chromatogramme

Un chromatogramme est un diagramme montrant l'évolution du signal du détecteur (proportionnel à la concentration en soluté) en fonction du temps d'élution (plus rarement du volume d'élution).

# Chapitre IV : HPLC

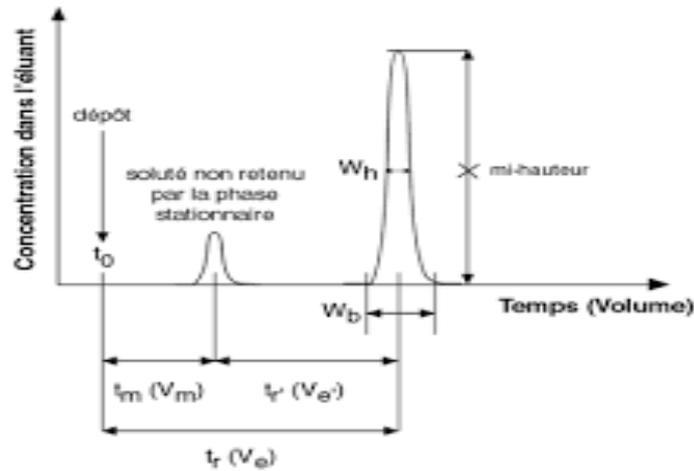


Figure n°8 : informations apportées par un chromatogramme.

## 4.1.1. Caractéristiques du chromatogramme [20]

$T=0$  : Le temps du début d'injection

$T_m$  : Le temps mort : est le temps mis par un composé non retenu par la phase stationnaire pour traverser la colonne (temps passé dans la phase mobile)

$t_r$  : Le temps de rétention : est le temps mis par le soluté pour traverser la colonne. C'est le temps passé dans la phase stationnaire et dans le volume mort dans la colonne. Ce temps est caractéristique d'un soluté dans des conditions d'analyse donnée.

La surface du pic est en fonction e la quantité du constituant dont il est la trace.

$t'_r$  ; Le temps de rétention réduit : est le temps passé par un soluté dans la phase stationnaire, soit :

$$t'_r = t_r - t_m$$

$\omega$  : La largeur du pic à la base, mesurée à 13,5 pour cent de la hauteur du pic.

$\omega_{1/2}$  ou  $\delta$  : La largeur du pic à mi hauteur exprimée en unité de temps.

$h$  : La hauteur du pic.

Ecart type relatif des aires du pic :  $\frac{1}{16} \sum (y_i - Y')^2$

## Chapitre IV : HPLC

---

Avec :

$y_i$  est l'aire du pic pour l'injection  $i$  donné par l'intégration du pic.

$Y' = 1/6 (y_1 + y_2 + \dots + y_6)$  la moyenne des aires du pic.

On peut calculer l'écart type relatif en pourcentage :

$$\% \text{ RSD} = 100 \sigma / Y'$$

RSD : Relative Standard Deviation.

### 4.1.2. Grandeurs de rétention [20]

Ce sont :

- Le temps de rétention  $t_r$  ;
- Le volume de rétention ou (volume d'élution)  $V_r$  : le volume de la phase mobile nécessaire à entrainer le soluté jusqu'à la sortie de la colonne. Sur le chromatogramme, il correspond au volume de la phase mobile qui s'est écoulé entre l'instant de l'injection et celui correspondant au sommet du pic.

Soit  $D$  le débit de la phase mobile, alors :  $V_m = t_r \times D$

$V_m$  : Volume mort est le volume de la phase mobile de la colonne, il peut être calculé sur le chromatogramme par introduction d'un composé non retenu par la phase stationnaire selon :

$$V_m = t_m \times D$$

## 4.2. Analyse qualitative

### 4.2.1. Notion de concentration

- **Le coefficient de partage  $K$  :**

A un instant donné, le soluté est à la concentration  $C_m$  dans la phase mobile et  $C_s$  dans la phase stationnaire. Leur rapport à l'équilibre est appelé coefficient de partage  $K$

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

Ce coefficient est en fonction de 3 types d'affinités :

- Celle entre le soluté et la phase mobile

## Chapitre IV : HPLC

---

- Celle entre le soluté et la phase stationnaire
- Celle entre les phases mobile et stationnaire

Le facteur de capacité  $K'$  : est le rapport de la quantité d'un soluté dans la phase stationnaire et dans la phase mobile.

$$K' = \frac{C_s \times V_s}{C_m \times V_m} = K \times \frac{V_s}{V_m}$$

$V_s$  : volume de la phase stationnaire

$V_m$  : volume de la phase mobile ou volume mort

$K'$  est aussi le rapport du temps passé par un soluté dans la phase stationnaire sur le temps passé par ce même soluté dans la phase mobile.

$$K' = \frac{t_r - t_m}{t_m}$$

### 4.2.2. Notions d'efficacité ou performance d'une colonne [20]

Elle se traduit par la finesse des pics obtenus par les composés. Plus le pic est fin plus la colonne est efficace. Elle s'exprime par deux grandeurs  $N$  et  $H$

- Nombre de plateaux théoriques  $N$  : il correspond au nombre d'équilibres successifs qu'a subi un composant du mélange.

$$N = 16 \frac{t_r^2}{\omega^2} = 5,54 \frac{t_r^2}{\delta^2}$$

$t_r$  : temps de rétention

$\delta$  : Largeur du pic à mi-hauteur

Plus le pic est fin, plus le  $N$  est grand et donc la colonne est efficace.

$N$  est caractéristique d'un système chromatographique (colonne + solvants + composés à séparer).

# Chapitre IV : HPLC

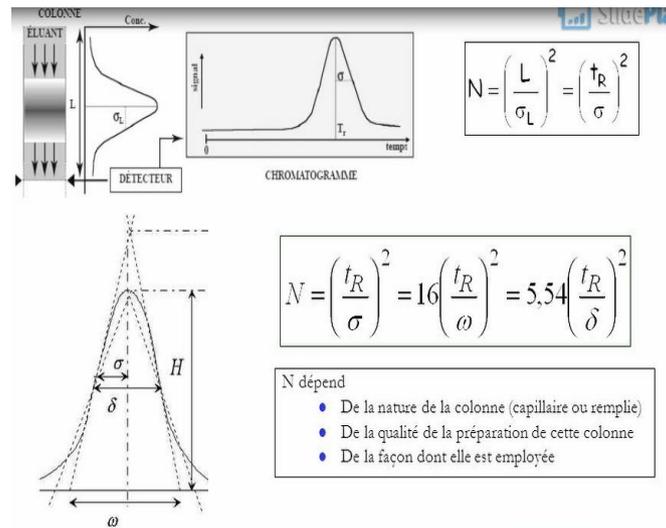


Figure n°09 : schéma montrant la performance d'une colonne.

- **La hauteur équivalente à un plateau théorique : HEPT ou H** qui est défini comme :

$$\text{HEPT} = \frac{L}{N}$$

**L** : longueur de la colonne

**N** : Nombre de plateaux théoriques

Si l'on tient compte des temps morts, on définit : le nombre de plateaux efficaces  $N'$  (=nombre de plateaux théoriques effectifs  $N_{\text{eff}}$ ) :

$$N' = 16 \left[ \frac{t_r - t_m}{\omega} \right]^2 = 5,54 \left[ \frac{t_r - t_m}{\delta} \right]^2$$

## Les facteurs d'élargissement des pics [20]

- **La diffusion turbulente** : l'élargissement est expliqué par le fait qu'il existe différents chemins parcourus par les molécules d'un soluté. La longueur des chemins

# Chapitre IV : HPLC

n'étant pas la même, elles ne mettent pas toutes le même temps pour traverser la colonne : le pic s'élargit.

Ce phénomène est fonction des particules et de la régularité du remplissage.

- **La résistance au transfert de masse** : l'élargissement est expliqué par l'accumulation de la phase mobile dans les anfractuosités du support. Les molécules qui y diffusent vont moins vite que celles qui n'y diffusent pas.
- **La diffusion longitudinale** : ce phénomène diminue plus la vitesse de la phase mobile augmente. Dans la pratique cette diffusion est négligeable en HPLC.

En conclusion l'efficacité calculée d'une chromatographie, représentée par la HEPT, est fonction de la vitesse de la phase mobile donc du débit, et de la qualité (régularité, remplissage) de la phase stationnaire.

## 4.2.3. Qualité de la séparation [20]

Une bonne séparation se traduira par une séparation distincte des pics correspondant à chacun des produits.

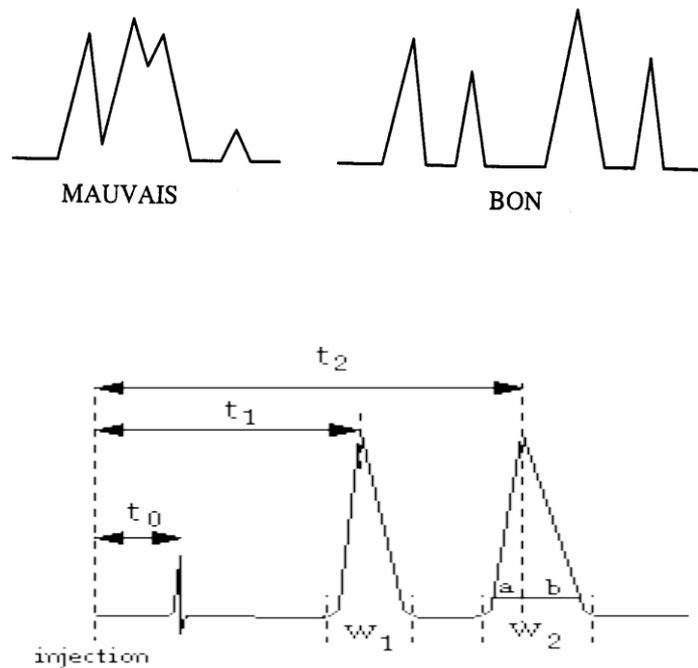


Figure n° 10 : chromatogramme montrant la qualité de la séparation chromatographique.

# Chapitre IV : HPLC

- **La sélectivité ( $\alpha$ )** : pour préciser la position relative de 2 pics adjacents A et B sur un chromatogramme on exprime le facteur de séparation (ou sélectivité)  $\alpha$  selon :

$$\alpha = \frac{t_{rB}}{t_{rA}}$$

Il ne permet pas de savoir à lui seul si la séparation est réellement possible, mais plus  $\alpha$  est élevé plus la séparation est facile.

En pratique  $\alpha$  toujours  $\geq 1$  car on choisit  $t'_{rB} > t'_{rA}$

$\alpha = 1$  pas de séparation

$\alpha > 1$  séparation plus facile plus  $\alpha$  augmente

## - Facteur de résolution ( $R_s$ ) [20]

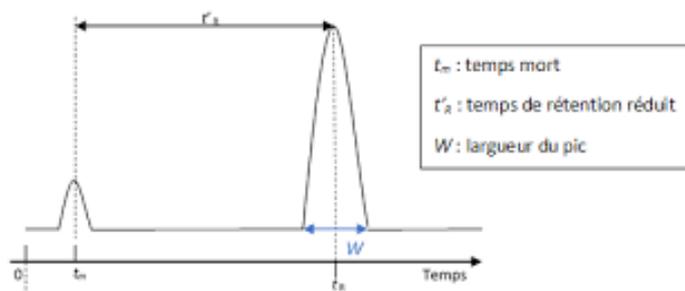
La résolution correspond à une grandeur numérique caractérisant l'aptitude du système chromatographique à séparer 2 composés d'un mélange.

Le facteur de résolution est calculé selon la formule suivante :

$$R_s = \frac{t_{r2} - t_{r1}}{\omega_1 + \omega_2}$$

$t_r$  : temps de rétention de chaque pic

$\omega$  : Largeur des pics à la base



On observe : que la séparation entre 2 pics est d'autant meilleure que  $R_s$  est plus grand.

$R_s \leq 0,8$  : séparation insuffisante

## Chapitre IV : HPLC

---

$R_s \leq 1$  : chevauchement des pics

$R_s = 1$  : 2 pour cent de chevauchement des pics

$R_s \geq 1,5$  : bonne séparation.

### 4.3. Analyse quantitative [20]

Cette analyse est basée sur le fait que l'aire des pics chromatographiques est proportionnelle à la concentration ou à la quantité du produit analysé.

Dans la pratique on injecte les composés en solution et on préfère utiliser des concentrations plutôt que les masses. Il y a une proportionnalité entre la masse injectée et la concentration du soluté, à condition de toujours injecter le même volume de solution.

On écrira donc :  $A = K_c C$

A= air du pic

$K_c$ = coefficient de réponse du détecteur

C= concentration du composé injecté.

La chromatographie liquide à haute performance est utilisée dans l'industrie pharmaceutique pour analyser les matières premières et les produits finis afin d'assurer que les niveaux de qualité préétablis sont respectés. L'HPLC est particulièrement utile pour la séparation de matériaux de masse élevée qui ont une très faible volatilité et ne peuvent pas être séparés par chromatographie en phase gazeuse. Sa large utilisation est due à sa capacité d'agir d'une manière très précise sur la sélectivité par le choix de la colonne et de la composition de l'éluant, autrement dit à la meilleure exploitation des interactions soluté-phase mobile-phase stationnaire.

## Partie pratique

---

L'objectif du présent travail est de mettre au point et de valider une méthode de dosage d'un principe actif « Irbésartan » dans des comprimés dosés à 150 mg par chromatographie liquide à haute performance.

La chromatographie est un procédé physico-chimique de séparation, au même titre que la distillation, la cristallisation ou l'extraction fractionnée, des constituants d'un mélange homogène liquide ou gazeux. Les applications de ce procédé sont donc potentiellement très nombreuses, d'autant plus que beaucoup de mélanges hétérogènes ou sous forme solide peuvent être mis en solution par emploi d'un solvant (celui-ci apparaissant comme un composé supplémentaire). [34]

Cette étude a été réalisée au sein du laboratoire de chimie analytique du département de pharmacie de Tizi Ouzou, et cela conformément au protocole de validation analytique décrit dans le guide de validation élaboré par une commission de la société française des sciences et techniques pharmaceutique (SFSTP), publié dans la revue STP Pharma Pratique en janvier 2006.

**1. Matériel et méthodes****1.1. Matériel****1.1.1. Matières premières et réactifs****Tableau XI** : Matières premières et réactifs.

Matières premières et réactifs	Fournisseurs
Irbésartan	Principe actif fourni gracieusement par le laboratoire Biopharm
Placebo	Fourni gracieusement par le laboratoire Biopharm
Hydroxyde de Potassium (KOH)	Fourni gracieusement par le laboratoire de Chimie Analytique de Tizi Ouzou
Acide phosphorique (H <sub>3</sub> PO <sub>4</sub> )	Fourni gracieusement par le laboratoire de Chimie Analytique de Tizi Ouzou
Acétonitrile (CH <sub>3</sub> CN)	Fourni gracieusement par le laboratoire de Chimie Analytique de Tizi Ouzou
Triéthylamine (C <sub>6</sub> H <sub>15</sub> N)	Fourni gracieusement par le laboratoire de Chimie Analytique de Tizi Ouzou
Eau distillée	Fourni gracieusement par le laboratoire de Chimie Analytique de Tizi Ouzou

## 1.1.2. Appareillage et équipement

**Tableau XII** : Tableau représentant le matériel du laboratoire de Chimie Analytique utilisé dans le présent travail.

Désignation		Spécification	Usage
<b>HPLC SHIMADZU (LC20)</b>	Pompe	Lc 20 at	Dosage (obtention des chromatogrammes)
	Injecteur automatique	SIL 20 A	
	Contrôleur	CBM-20	
	Compartiment de la colonne	CTO-20 A	
	Colonne SHIMADZU	C18 (25 cm)	
	Détecteur	Spectrophotomètre UV visible	
	Logiciel d'exposition	LC-solution	
Distillateur		Lab-Tech	Eau distillée
Pompe à vide		Fisher Bioblock Scientific $P_{\max}=4$ bar	Filtration de la phase mobile
Sonicateur		Advantage-LAB	Solubilisation
Agitateurs magnétiques		NAHITA Model690-1	Homogénéisation des solutions
Balances analytiques		KERN METLER TOLEDO	Pesée
pH-mètre		METLER TOLEDO	Préparation du tampon
Etuve		MEMMERT	Séchage

## 1.1.3. Verrerie

Durant notre travail nous avons utilisé la verrerie suivante fournie par le laboratoire de Chimie Analytique de Tizi Ouzou :

-Fioles jaugées de 50 ml, 100 ml, 1000 ml, 2000 ml, avec erreur de +/- 2% ;

-Pipettes jaugées de 5 ml, avec erreur de +/- 2% ;

- Pipettes graduées de 5 ml ;
- Béchers et Erlen Meyer ;
- Eprouvettes graduées de 2 L, 1L, 10 ml,
- Entonnoirs ;
- Verre de montre ;
- Compte goutte ;
- Spatules ;
- Pissettes à eau.

### 1.2. Méthodes

#### 1.2.1. Méthodologie de la validation analytique

Basée sur des exigences scientifiques et réglementaires d'une commission de la SFSTP Pharma Pratique 2003-2006 (profil d'exactitude), elle doit permettre d'évaluer les performances de la méthode par l'étude d'un certain nombre de paramètres appelés « critères de validation » au moyen d'outils statistiques appropriés. L'avantage de cette méthodologie par rapport à celle de 1992, est de pouvoir étudier simultanément plusieurs fonctions de réponse, donc permet de retenir celles qui répondent aux objectifs et rejeter celles dont les limites de tolérance sortent des limites d'acceptation.

Elle a pour but de :

- Identifier** les critères de validation. S'approprier les outils statistiques permettant de les étudier ;
- Connaître** les demandes des référentiels au regard de la validation et du transfert analytique ;
- Être en mesure** d'en comprendre les exigences et les objectifs.

##### 1.2.1.1. Choix du protocole de validation

Selon le logigramme des protocoles proposé par la SFSTP 2003 (figure n° 04) et le tableau V nous avons pu sélectionner le protocole de validation adéquat pour notre étude, sachant qu'il y a absence d'effet matrice, la procédure de dosage est connue ultérieurement et l'étalonnage

se fait à plusieurs niveaux de concentration, nous avons donc adopté le protocole V2 modifié ; en utilisant 5 niveaux de concentration au lieu de trois pour les SE et les SV quant à eux comportent 5 niveaux de concentration selon les exigences de l'ICH.

### 1.2.1.2. Choix des paramètres de validation

- **Limites d'acceptabilité ( $\lambda$ )** :  $\lambda = +/- 5\%$ .
- **Probabilité de confiance ( $\beta$ )** :  $\beta = 95\%$ , on choisit  $\geq 95\%$  dans le domaine pharmaceutique.
- **Risque d'erreur accepté ( $\alpha$ )** :  $5\%$ .

### 1.2.1.3. Choix de diluant

La British Pharmacopoeia recommande l'utilisation du méthanol comme solvant de dissolution de l'irbésartan, ce produit (le méthanol) est connu pour sa cancérogénicité et son coût élevé. Au sein de notre Laboratoire de Chimie Analytique de Tizi Ouzou, on a remplacé ce dernier par l'hydroxyde de potassium (KOH) pour des raisons de solubilité et de sécurité afin de pouvoir manipuler en toute fiabilité.

### 1.2.1.4. Choix de dilution

Pour réaliser un dosage direct, on a effectué des dilutions 1/10 à toutes les solutions mères de tous les niveaux de concentration des standards d'étalonnage et de validation (exemple : le niveau 100 % renferme 50 ml de diluant «KOH» pour 75 mg du principe actif « irbésartan»). Cette dilution a été sélectionnée pour des raisons de concentration adéquate à celle du comprimé et pour une meilleure lecture des résultats.

Remarque : selon les bonnes pratiques en HPLC, il est recommandé de vérifier l'absence de particules visibles après la dilution de l'échantillon

## 1.2.2. Préparation des solutions

### 1.2.2.1. Diluant

Dans une fiole jaugée de 1L, mettre 5,6 g de la poudre de KOH. Ajouter un volume de l'eau distillée, agiter jusqu'à la dissolution totale du KOH puis compléter au trait de jauge avec le même solvant.

### 1.2.2.2. Préparations des solutions standards

#### a. Solutions standards de l'irbésartan

Dans des fioles jaugées de 50 ml, peser les différentes masses correspondant à chaque niveau de concentration de l'irbésartan, dissoudre dans des volumes suffisants du diluant, mettre à l'ultrason pour une dissolution totale puis compléter au trait de jauge avec le même diluant.

**Tableau XIII** : tableau présentant les masses théoriques des niveaux de concentration des principes actifs

Niveaux de concentration en %	80	90	100	110	120
Masse théorique de l'Irbésartan	60 mg	67,5 mg	75 mg	82,5 mg	90 mg

#### b. Préparation de la solution placebo

Dans une fiole jaugée de 100 ml peser 98 mg du placebo, dissoudre dans un volume suffisant de diluant, ajuster jusqu'au trait de jauge puis filtrer à l'aide d'un papier filtre.

#### c. Solutions des standards d'étalonnage

Dans des fioles jaugées de 50 ml, mettre 5ml de la solution standard de l'irbésartan, compléter au trait de jauge avec le diluant. Effectuer deux répétitions pour chaque niveau de concentration.

### **d. Solutions des standards de validation**

Dans des fioles jaugées de 50 ml, mettre 5ml de la solution standard de l'irbésartan, ajouter 5 ml de la solution placebo, mélanger et compléter au trait de jauge avec le diluant. Effectuer trois répétitions pour chaque niveau de concentration.

### **1.2.2.3. Préparation de la solution pour la robustesse**

L'étude de la robustesse a été effectuée sur deux niveaux de concentration (90% et 110%).

Pour chaque niveau nous avons préparé une solution standard d'étalonnage et deux solutions standards de validation de l'irbésartan. Ensuite nous avons injecté ces solutions en variant le débit de 1,2 et 1,8 et la longueur d'onde de 250 et 254 nm.

### **1.2.2.4. Préparation de la solution pour la stabilité**

Afin d'étudier la stabilité, nous avons préparé une solution standard d'étalonnage et deux standards de validation à 100% de l'irbésartan. Ensuite nous avons soumis les viales remplies de ces solutions dans des conditions variables à des intervalles de temps différents.

### **1.2.2.5. Préparation de la phase mobile**

Dans une éprouvette graduée de 1L remplie au un tiers avec de l'eau distillée, ajouter 5 ml de l'acide phosphorique puis compléter jusqu'à 900 ml avec de l'eau distillée. Ajuster le pH jusqu'à 4,5 en ajoutant le triéthylamine tout en agitant à l'aide d'un barreau magnétique. Ensuite dans un erlenmeyer, mettre 40% d'acétonitrile et 60 % du tampon préparé précédemment, filtrer la phase mobile à l'aide d'un appareil de filtration (pompe à vide) dont le diamètre des pores du filtre est inférieur à 45 µm.

### 1.2.2.6. Préparation de la feuille de calcul

Afin de réaliser l'étude statistique et d'avoir les résultats suivants nous avons utilisé des feuilles de calcul développées par l'équipe du laboratoire de chimie analytique de Tizi Ouzou, à l'aide de logiciel Excel de Microsoft office 2016 enregistré et installé sur le système d'exploitation Windows 10 authentique.

### 1.3. Conditions chromatographiques

Colonne : C 18

Longueur : 25 cm

Taille des particules

Débit : 1,5 ml/min

Volume d'éjection : 20  $\mu$ l

Température ambiante

Détection à 252 nm

## 2. Résultats et discussion

### 2.1. Résultats

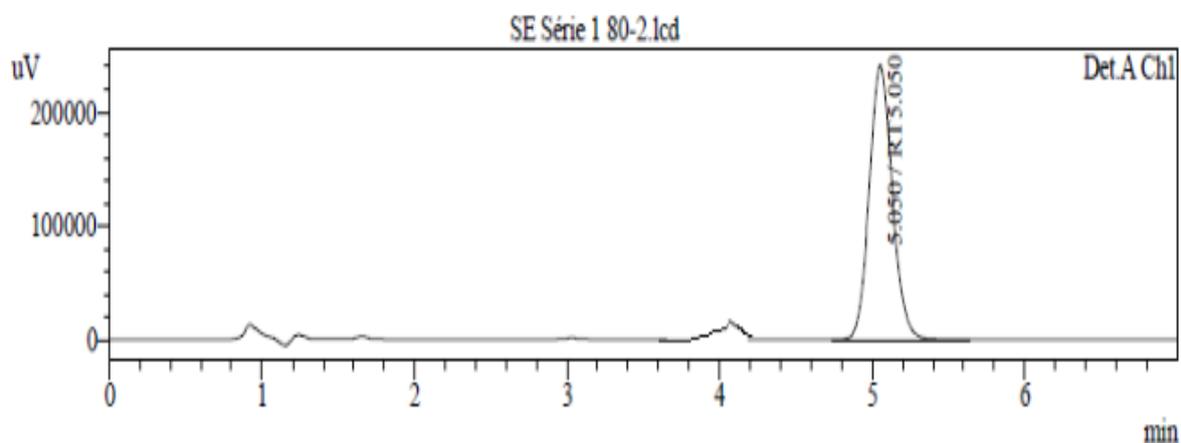
La technique utilisée dans notre méthode est la chromatographie liquide à haute performance (HPLC).

#### 2.1.1. Spécificité

Comparaison de deux pentes des deux droites de régression : les résultats de test de comparaison sont évalués dans les tableaux XI et XII suivants :

**Tableau XIV** : Résultats obtenus sur la gamme standard.

Gamme standard				
% théorique	Masse introduite (xi) (mg)	Air du pic(yi)	$(y_i - y^*)^2$	$(x_i - x')^2$
80	60,08	2387319	1052807809	0,1225
	60,78	2452213	1052807809	0,1225
90	67,73	2753843	4988522,25	0,0064
	67,57	2749376	4988522,25	0,0064
100	75,15	3039092	94458961	0,0016
	75,23	3058530	94458961	0,0016
110	82,51	3357768	201356100	0,0289
	82,85	3329388	201356100	0,0289
120	90,9	3790248	129240,25	0,0289
	90,56	3789529	129240,25	0,0289
Pente droite standard : $a_l =$		44102,1848		
Erreur pente $\sigma_{a_l} =$		1123,063653		
Ordonnée à l'origine $b_l =$		-251751,595		
Erreur ordonnée $\sigma_{b_l} =$		85456,13701		



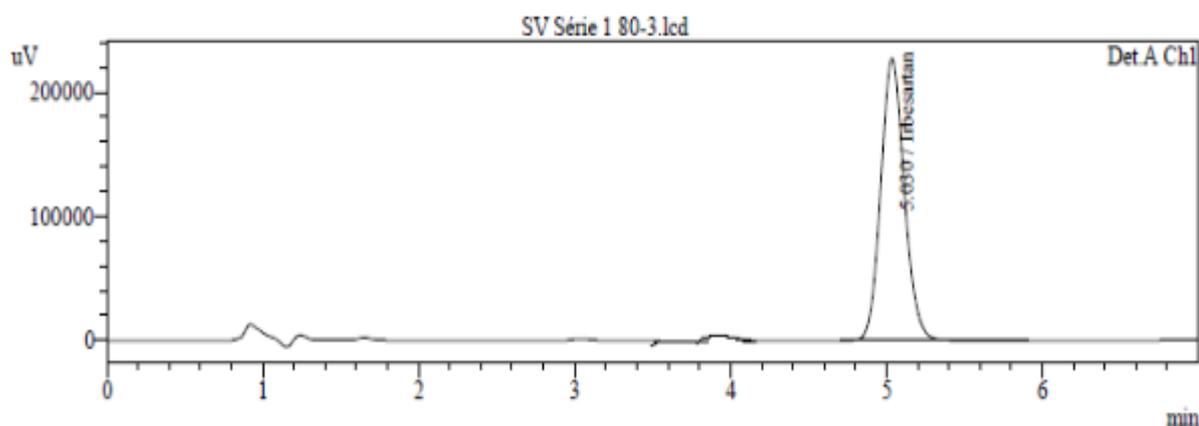
**Figure n° 11** : Chromatogramme de la gamme standard d'étalonnage.

**Tableau XV** : Comparaison de la pente et de l'ordonnée à l'origine par rapport à 0

Comparaison de la pente avec 0	t calculé	42,1578309	Différence significative
	$t^{\circ}(\alpha; 8)$	2,306	
	Condition	$t \text{ calculé} > t^{\circ}(\alpha; 8)$	
Comparaison de l'ordonnée à l'origine avec 0	t calculé	2,94597443	Différence significative
	$t^{\circ}(\alpha; 8)$	2,306	
	Condition	$t \text{ calculé} < t^{\circ}(\alpha; 8)$	

**Tableau XVI** : Résultats obtenus sur la gamme placebo chargée (appelée aussi gamme matrice).

Gamme placebo chargé				
% théorique	Masse introduite (xi) (mg)	Air du pic (yi)	$(y_i - y^*)^2$	$(x_i - x')^2$
80	60,08	2387319	440972000	0,05921111
	60,78	2452213	1926741762	0,20854444
	60,11	2385423	524196288	0,04551111
90	67,73	2753843	301971714	0,00694444
	67,57	2749376	166676707	0,00587778
	67,64	2706178	917342752	4,4444E-05
100	75,15	3039092	189062500	4,4444E-05
	75,23	3058530	32353344	0,00537778
	75,09	3060904	64995844	0,00444444
110	82,51	3357768	147968,444	0,01284444
	82,85	3329388	827406048	0,05137778
	82,51	3387302	849683634	0,01284444
120	90,90	3790248	631282375	0,09
	90,56	3789529	595669107	0,0016
	90,34	3715591	2453386003	0,0676
Pente droite standard : $a_2 =$		44188,83772		
Erreur pente $\sigma_{a_2} =$		747,753526		
Ordonnée à l'origine $b_2 =$		-261913,5484		
Erreur ordonnée $\sigma_{b_2} =$		56847,6308		



**Figure n° 12** : Chromatogramme de la gamme placebo chargé.

**Tableau XVII** : Comparaison de la pente et de l'ordonnée à l'origine par rapport a 0

Comparaison de la pente avec 0	t calculé	59,0954588	Différence significative
	$t^\circ (\alpha; 13)$	2,16	
	Condition	$t \text{ calculé} > t^\circ (\alpha; 13)$	
Comparaison de l'ordonnée à l'origine avec 0	t calculé	4,60729048	Différence significative
	$t^\circ (\alpha; 13)$	2,16	
	Condition	$t \text{ calculé} < t^\circ (\alpha; 13)$	

**Tableau XVIII** : Comparaison des pentes et des ordonnées à l'origine.

Comparaison des pentes $a_1$ et $a_2$ des deux droites de régression	t calculé	5,26675E-05
	$t^\circ (\alpha; 21)$	2,08
	Condition	$t \text{ calculé} < t^\circ (\alpha; 21)$
	Résultat	Non significatif
Comparaison des ordonnées à l'origine $b_1$ et $b_2$ des deux droites de régression	t calculé	9,64644E-07
	$t^\circ (\alpha; 21)$	2,08
	Condition	$t \text{ calculé} < t^\circ (\alpha; 21)$
	Résultat	Non significatif

A partir de ce tableau on déduit que :

La pente  $a_1$  de la droite de régression  $D_1$  de la gamme standard = 44102,1848

La pente  $a_2$  de la droite de régression  $D_2$  de la gamme placebo chargé = 44188,83772

Le test de student donne une valeur de  $t_{\text{calculé}} = 5,26675E-05$

La valeur seuil  $t^\circ (\alpha; 21) = 2,08$  est lue sur la table de student. (Annexe II)

L'ordonnée à l'origine  $b_1$  de la droite de régression  $D_1$  de la gamme standard = -251751,595

L'ordonnée à l'origine  $b_2$  de la droite de régression  $D_2$  de la gamme placebo = -261913,5484

Le test de student donne une valeur de  $t_{\text{calculé}} = 9,64644E-07$

La valeur seuil  $t^\circ (\alpha; 21) = 2,08$  est lue sur la table de student. (Annexe II)

## 2.1.2. Fonction de réponse

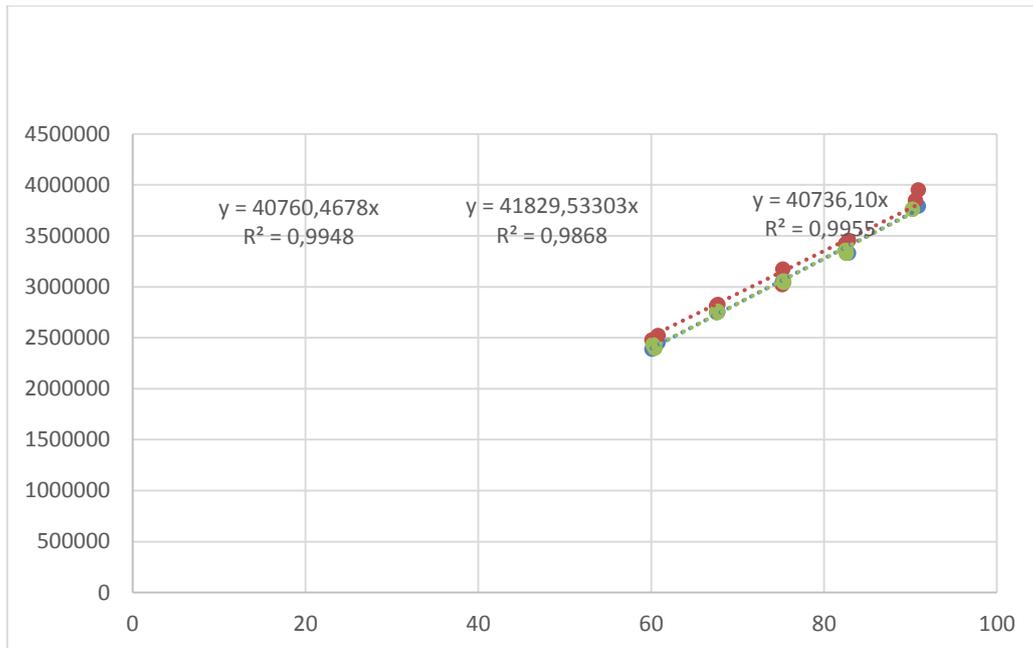
La relation existante entre la réponse de l'instrument (signal qui est l'aire du pic) et la concentration du principe actif introduite dans la solution, obtenue avec les trois (03) séries des SE, est représentée pour quatre modèles mathématiques testés comme suit :

**Premier modèle** : régression linéaire  $y = ax$  passant par 0

**Tableau XIX** : Résultats obtenus pour la fonction  $y = ax$

Série 01			Série 02			Série 03		
Variable	Réponse	Moyenne	Variable	Réponse	Moyenne	Variable	Réponse	Moyenne
60,08	2387319	60,43	60,08	2478504	60,43	60,41	2397346	60,31
60,78	2452213		60,78	2522801		60,21	2432222	
67,73	2753843	67,65	67,73	2825293	67,65	67,62	2743884	67,66
67,57	2749376		67,57	2814142		67,70	2759323	
075,15	3039092	75,19	75,15	3020245	75,19	75,34	3041093	75,325
75,23	3058530		75,23	3175550		75,31	3058556	
82,51	3357768	82,68	82,51	3420030	82,68	82,51	3357772	82,535
82,85	3329388		82,85	3455398		82,56	3327356	
90,9	3790248	90,73	90,9	3952222	90,73	90,22	3759690	90,21
90,56	3789529		90,56	3848512		90,20	3759570	
Moyenne totale		75,336	Moyenne totale		75,336	Moyenne totale		75,208
Pente	40760,4678		75,336	41829,53303		Pente	40736,10	
Origine	0		Origine	0		Origine	0	

A partir des données de ce tableau, on trace les courbes d'étalonnage des trois séries de SE :



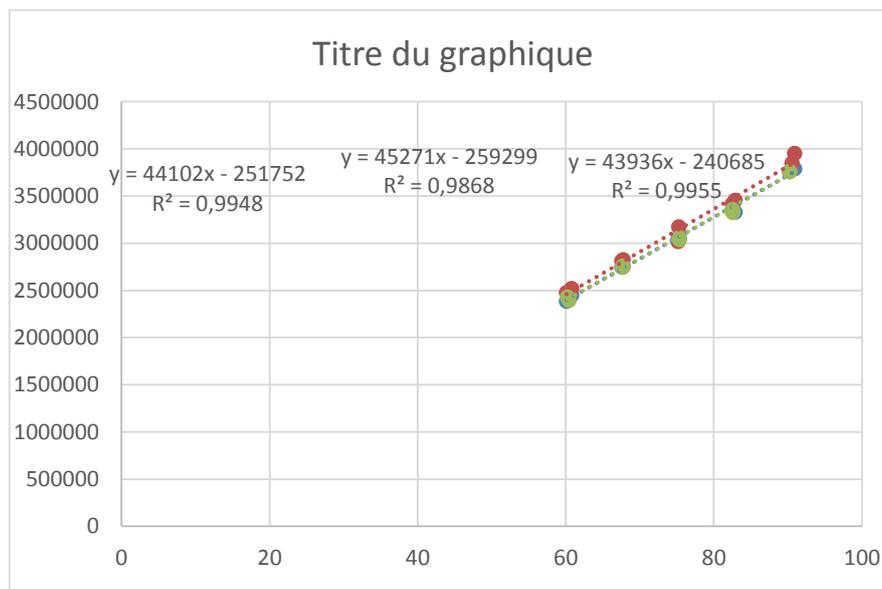
**Figure n° 13** : courbes d'étalonnage obtenues avec la fonction  $y = ax$

**Deuxième modèle** : régression linéaire  $y = ax + b$

**Tableau XX** : Résultats obtenus pour la fonction  $y = ax + b$ .

Série 01			Série 02			Série 03		
Variable	Réponse	Moyenne	Variable	Réponse	Moyenne	Variable	Réponse	Moyenne
60,08	2387319	60,43	60,08	2478504	60,43	60,41	2397346	60,31
60,78	2452213		60,78	2522801		60,21	2432222	
67,73	2753843	67,65	67,73	2825293	67,65	67,62	2743884	67,66
67,57	2749376		67,57	2814142		67,70	2759323	
75,15	3039092	75,19	75,15	3020245	75,19	75,34	3041093	75,325
75,23	3058530		75,23	3175550		75,31	3058556	
82,51	3357768	82,68	82,51	3420030	82,68	82,51	3357772	82,535
82,85	3329388		82,85	3455398		82,56	3327356	
90,90	3790248	90,73	90,90	3952222	90,73	90,22	3759690	90,21
90,56	3789529		90,56	3848512		90,20	3759570	
Moyenne totale		75,336	Moyenne totale		75,336	Moyenne totale		75,208
Pente	44102,1848		Pente	45271,4288		Pente	43936,7639	
Origine	-251751,595		Origine	-259298,664		Origine	-24067,936	

A partir des données de ce tableau, on trace les courbes d'étalonnage des trois séries de SE :



**Figure n°14** : courbes d'étalonnage obtenues avec la fonction  $y = ax + b$

Troisième modèle : logarithme népérien  $\ln Y = (\ln X)$

Tableau XXI : Résultats obtenus pour la fonction  $\ln Y = (\ln X)$

Série 01						Série 02						Série 03					
Variable	Réponse	Moyenne	Variable ln	Réponse ln	Moyenne	Variable	Réponse	Moyenne	Variable ln	Réponse ln	Moyenne	Variable	Réponse	Moyenne	Variable LN	Réponse LN	Moyenne
60,08	2387319	60,43	4,0956	14,6856	4,10146	60,08	2478504	60,43	4,09567	14,7231	4,10146	60,41	2397346	60,31		14,68986	4,09949655
60,78	2452213		4,1072	14,7125		60,78	2522801		4,10726	14,7408		60,21	2432222			14,70431	
67,73	2753843	67,65	4,2155	14,8285	4,21434	67,73	2825293	67,65	4,21552	14,8541	4,21434	67,62	2743884	67,66	4,21390	14,82487	4,214494
67,57	2749376		4,2131	14,82688		67,57	2814142		4,21316	14,8501		67,70	2759323		4,21508	14,83051	
75,15	3039092	75,19	4,3194	14,92706	4,32001	75,15	3020245	75,19	4,31948	14,9208	4,32001	75,34	3041093	75,325	4,32201	14,92772	4,321812
75,23	3058530		4,3205	14,93344		75,23	3175550		4,32055	14,9709		75,31	3058556		4,32161	14,93344	
82,51	3357768	82,68	4,4129	15,02678	4,41497	82,51	3420030	82,68	4,41291	15,0451	4,41497	82,51	3357772	82,535	4,41291	15,02678	4,413222
82,85	3329388		4,4170	15,01829		82,85	3455398		4,41703	15,0554		82,56	3327356		4,41352	15,01769	
90,9	3790248	90,73	4,5097	15,14794	4,50788	90,9	3952222	90,73	4,50976	15,1897	4,50788	90,22	3759690	90,21	4,50225	15,13983	4,502140
90,56	3789529		4,5060	15,14775		90,56	3848512		4,5060126	15,1631		90,20	3759570		4,50202	15,13980	
Moyenne totale		75,336	Moyenne totale		4,31173912	Moyenne totale		75,336	Moyenne totale		4,31173912	Moyenne totale		75,208	Moyenne totale		4,310233
Pente	44102,18		Pente	1,07706		Pente	45271,42		Pente	1,070643		Pente	43936,23		Pente	1,07405	
Origine	-		Origine	10,2814823		Origine	-		Origine	10,3350417		Origine	-		Origine	10,2940519	
	251751,59						259298,664						240714,936				

A partir des données de ce tableau, on trace les courbes d'étalonnage des trois séries :

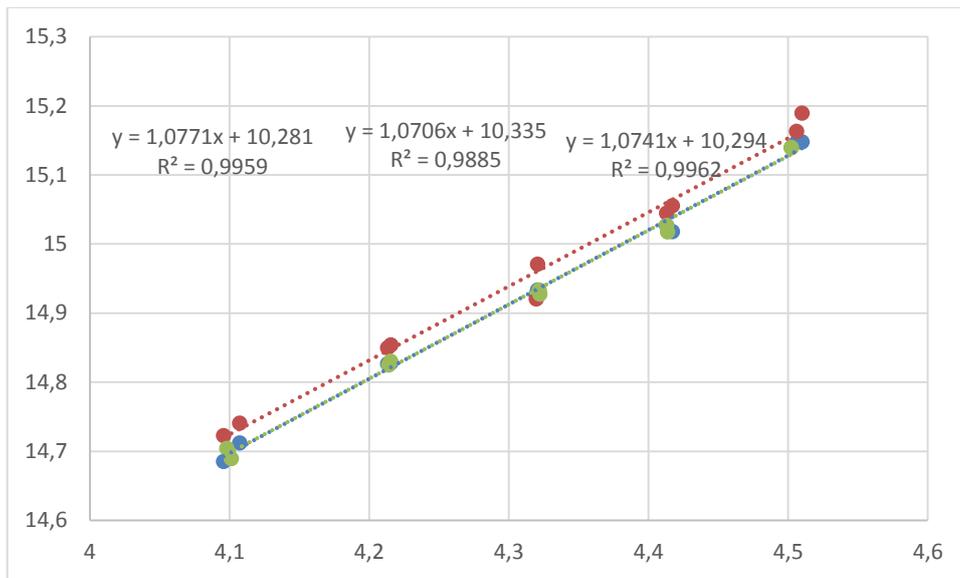


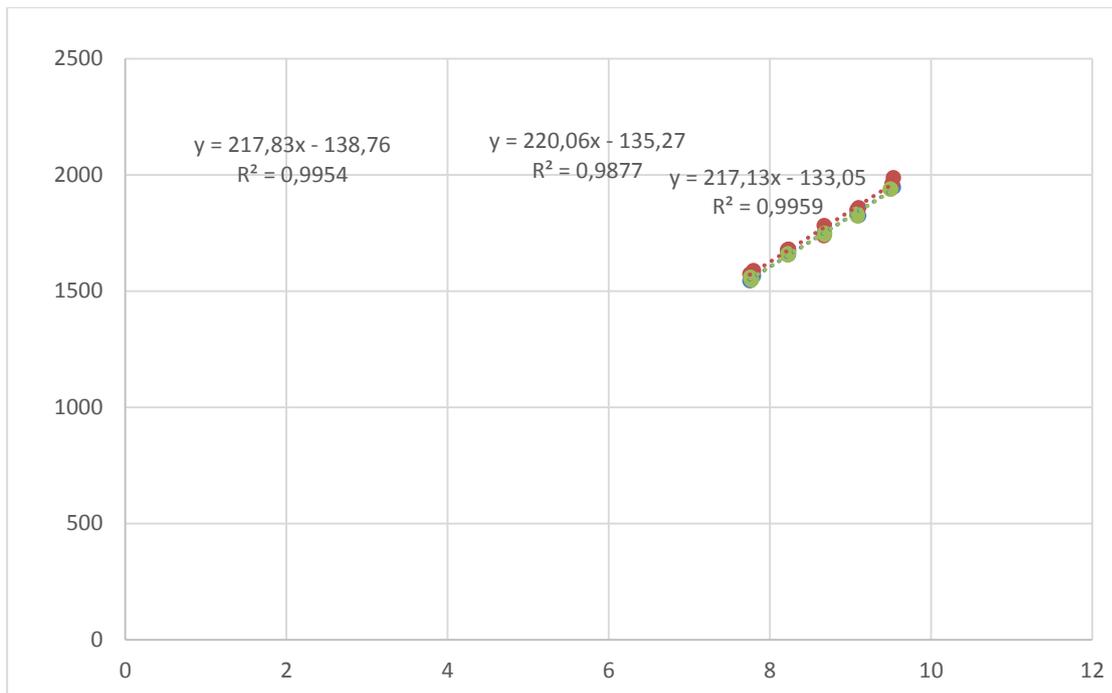
Figure n° 15 : courbes d'étalonnage obtenues avec la fonction  $\ln y = f(\ln x)$

Quatrième modèle : Racine carrée  $\sqrt{Y} = f(\sqrt{X})$

**Tableau XXII:** Résultats obtenus pour la fonction  $\sqrt{Y} = f(\sqrt{X})$

Série 01					Série 02					Série 03				
Variable	Réponse	Variable ra	Réponse ra	Moyenne	Variable	Réponse ra	Variablera	Réponse ra	Moyenne	Variable ra	Réponse	Variable ra	Réponse ra	Moyenne
60,08	2387319	7,7511	1545,095	7,7736	60,08	2478504	7,7511	1574,32	7,7736	60,41	2397346	7,7723	1548,32	8,6506
60,78	2452213	7,7961	1565,954		60,78	2522801	7,7961	1588,33		60,21	2432222	7,7595	1559,55	
67,73	2753843	8,2298	1659,47	8,2249	67,73	2825293	8,2298	1680,86	8,2249	67,62	2743884	8,2231	1656,45	8,2255
67,57	2749376	8,2200	1658,124		67,57	2814142	8,22009	1677,54		67,70	2759323	8,2280	1661,13	
75,15	3039092	8,6689	1743,299	8,6712	75,15	3020245	8,6689	1737,88	8,8086	75,34	3041093	8,6798	1743,87	8,6789
75,23	3058530	8,6735	1748,865		75,23	3175550	8,6735	1782,01		75,31	3058556	8,6781	1748,86	
82,51	3357768	9,0835	1832,421	9,0928	82,51	3420030	9,0835	1849,33	9,0928	82,51	3357772	9,0835	1832,42	9,0848
82,85	3329388	9,10219	1824,661		82,85	3455398	9,1021	1858,87		82,56	3327356	9,0862	1824,11	
90,90	3790248	9,5341	1946,855	9,5252	90,9	3952222	9,5341	1988,02	9,5252	90,22	3759690	9,4984	1938,98	9,4978
90,56	3789529	9,51630	1946,671		90,56	3848512	9,5163	1961,76		90,20	3759570	9,4973	1938,95	
Pente	44102,18	Pente	217,8329		Pente	45271,42	Pente	220,057		Pente	43936,76	Pente	217,13	
Origine	-251751,5	Origine	-138,76		Origine	-259298,6	Origine	-135,26		Origine	240714,-9	Origine	-133,057	

A partir des données de ce tableau, on trace les courbes d'étalonnage correspondantes :



**Figure n° 16** : courbes d'étalonnage obtenues avec la fonction  $\sqrt{Y} = f(\sqrt{X})$

### 2.1.3. Critères de choix de la fonction de réponse

Pour le choix de la fonction de réponse, qui est capable de produire une proportion suffisante des futurs résultats qui se situeront à l'intérieur de la zone d'acceptabilité  $[-5, +5]$ , nous pouvons procéder par deux méthodes soit :

-Par le calcul des indices : d'intervalle de dosage, de justesse, de fidélité et d'exactitude.

(Annexe IV)

-Par comparaison des profils d'exactitude.

Dans le présent travail nous avons généré pour chaque fonction un profil d'exactitude présenté dans les figures 17, 18, 19 et 20 suivantes :

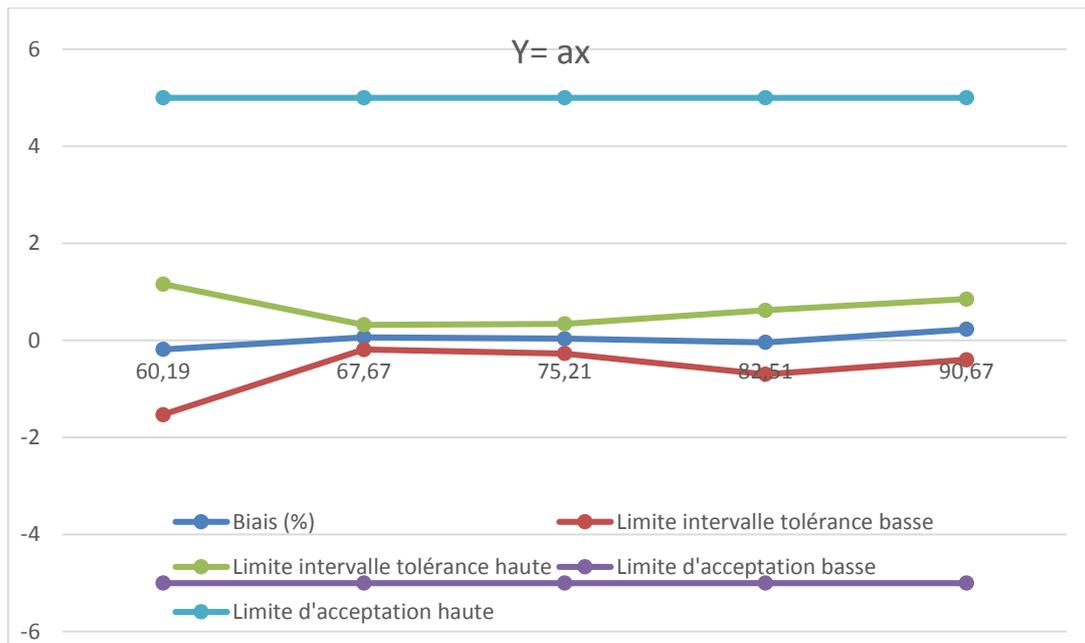


Figure n°17 : courbe du profil d'exactitude avec la fonction  $y = ax$

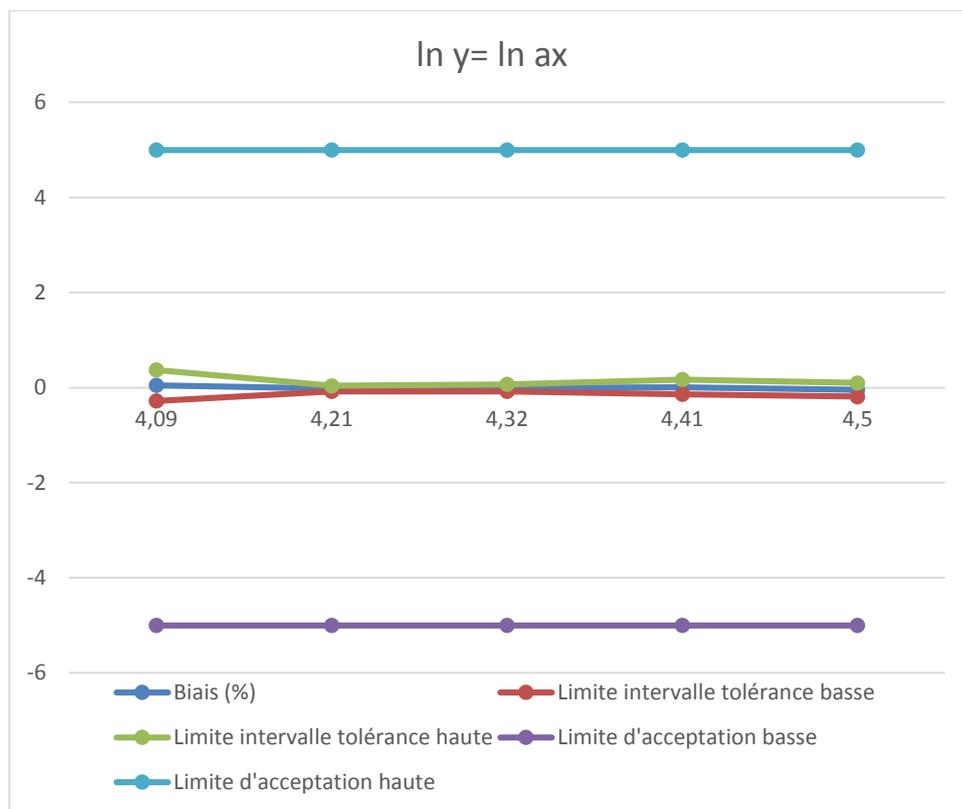


Figure n°18 : courbe du profil d'exactitude obtenue avec la fonction  $\ln y = (\ln x)+b$

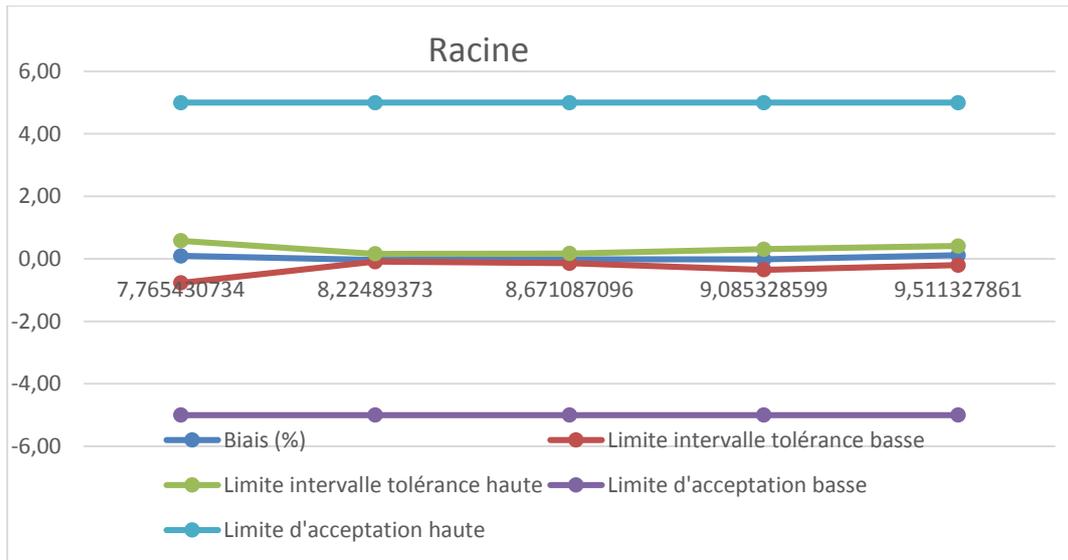


Figure n°19 : courbe du profil d'exactitude obtenue avec la fonction  $\sqrt{Y} = f(\sqrt{X})$

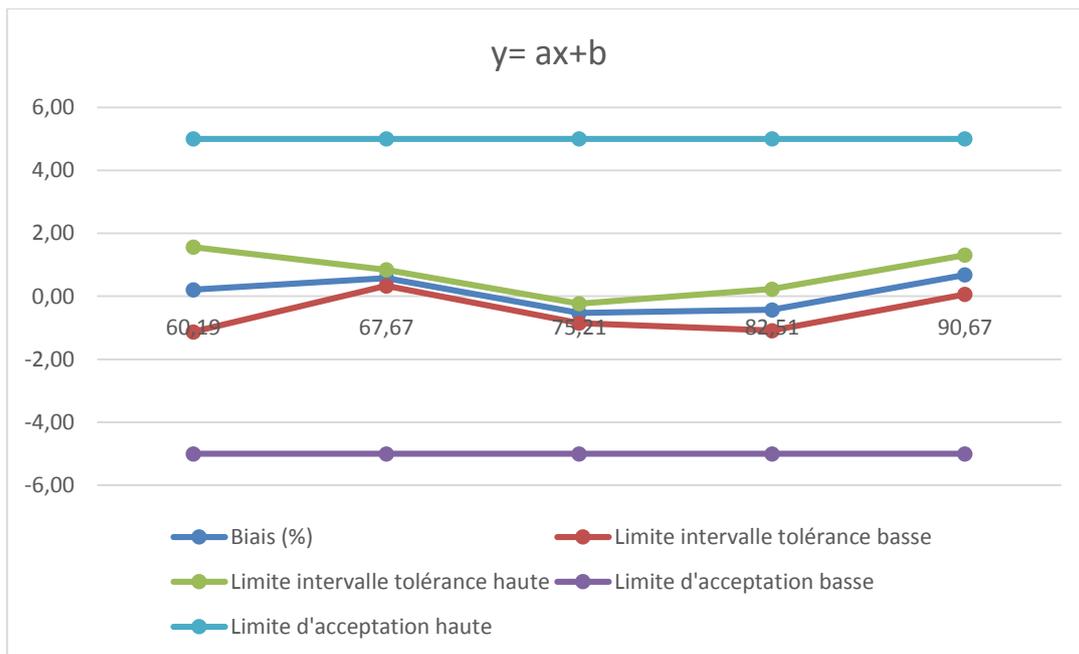


Figure n° 20 : courbe du profil d'exactitude obtenue avec la fonction  $y = ax + b$

Le choix du profil d'exactitude est basé sur l'objectif de trouver des biais plus proches à zéro, avec un intervalle de tolérance le plus étroit et situé à l'intérieur des limites d'acceptabilité, pour avoir une méthode valide dans l'intervalle de concentration étudiée.

Après avoir examiné soigneusement les profils d'exactitude des différents modèles et en fonction de ces motifs de choix, nous avons sélectionné :

- Le modèle régression linéaire  $y = ax + b$

Vu sa simplicité et sa facilité de mise en œuvre dans l'analyse de routine le modèle régression linéaire est le plus adéquat.

### 2.1.4. Alignement des observations

Comme pour chaque niveau de concentrations, les quantités introduites ne sont pas identiques, l'alignement des réponses sur la moyenne des concentrations introduites est exigé.

L'alignement des réponses obtenues avec les échantillons de validation est résumé dans le tableau XXIII suivant :

Tableau XXIII: Alignement des réponses observées avec les trois séries des SV

	Rp	Série 01			Série 02			Série 03		
		Pe (mg)	Air du pic	Réponses Alignées	Pe (mg)	Air du pic	Réponses Alignées	Pe (mg)	Air du pic	Réponses Alignées
80	1	60 ,08	2387319	2398071,62	60 ,08	2478504	2489454,37	60,41	2397346	2390760,28
	2	60,78	2452213	2432033,43	60,78	2522801	2502250,3	60,21	2432222	2432222
	3	60,11	2385423	2384849,95	60,11	2385423	2395023,33	60,16	2375423	2379813,48
90	1	67,73	2753843	2750160,6	67 ,73	2825293	2821542,87	67,62	2743884	2745347,49
	2	67,57	2749376	2752763,81	67,57	2814142	2817592,12	67,70	2759323	2757274,11
	3	67,64	2706178	2746472,59	67,64	2706178	2706478,01	67,64	2746178	2746763,4
100	1	75,15	3039092	3039386,59	75,15	3020245	3020545,01	75,34	3041093	3037141,57
	2	75,23	3058530	3055289,49	75,23	3175550	3172249,89	75,31	3058556	3055921,71
	3	75,09	3060904	3043849,92	75,09	3060904	3063904,1	75,10	3040904	3047489,72
110	1	82,51	3357768	3362776,07	82,51	3420030	3425130,17	82,51	3357772	3352210,73
	2	82,85	3329388	3319371,86	82,85	3455398	3445197,65	82,56	3327356	3319599,49
	3	82,51	3387302	3332310,07	82,51	3387302	3392402,17	82,08	3327302	3340619,78
120	1	90,90	3790248	3776991,35	90,90	3952222	3938721,54	90,22	3759690	3758665,56
	2	90,56	3789529	3791296,55	90,56	3848512	3850312,06	90,20	3759570	3759423,65
	3	90,34	3715591	3727080,1	90,34	3715591	3727291,4	90,17	3715591	3716761,79

### 2.1.5. Prédiction inverses

Les prises d'essai prédites avec la fonction de réponse choisie sont présentées dans le tableau

XXIV ci-dessous :  $y=ax+b$

Tableau XXIV : Prédications inverses obtenues avec le SV

%	Rep	Série 1		Série 2		Série 3		Prédications inverses $x_{ijk,calc}$		
		Prise d'essai en mg	Aire du pic	Prise d'essai en mg	Aire du pic	Prise d'essai en mg	Aire du pic	Série 1	Série 2	Série 3
80	1	60,08	2387319	60,08	2478504	60,41	2397346	59,9525284	61,0622842	60,14343493
	2	60,78	2452213	60,78	2522801	60,21	2432222	61,4210893	62,0466285	60,93779043
	3	60,11	2385423	60,11	2385423	60,16	2375423	59,6833201	58,9938881	59,64410429
90	1	67,73	2753843	67,73	2825293	67,62	2743884	68,2470213	68,7684438	68,0363804
	2	67,57	2749376	67,57	2814142	67,70	2759323	68,1459324	68,5206523	68,38802779
	3	67,64	2706178	67,64	2706178	67,64	2746178	68,0735612	66,121534	68,08862984
100	1	75,15	3039092	75,15	3020245	75,34	3041093	74,7022488	73,1005628	74,80578066
	2	75,23	3058530	75,23	3175550	75,31	3058556	75,1421336	76,5516674	75,20352782
	3	75,09	3060904	75,09	3060904	75,10	3040904	74,7432546	74,0040654	74,80147589
110	1	82,51	3357768	82,51	3420030	82,51	3357772	81,9139343	81,9843712	82,01864065
	2	82,85	3329388	82,85	3455398	82,56	3327356	81,2716906	82,7702999	81,32586863
	3	82,51	3387302	82,51	3387302	82,08	3327302	81,2244841	81,257107	81,3246387
120	1	90,90	3790248	90,90	3952222	90,22	3759690	91,7010213	93,810457	91,17295231
	2	90,56	3789529	90,56	3848512	90,20	3759570	91,6847502	91,5058688	91,17021912
	3	90,34	3715591	90,34	3715591	90,17	3715591	90,0115222	88,5521695	90,16852855

### 2.1.6. Justesse

Comme indiqué dans le tableau XXV ci-dessous, la justesse est exprimée en termes de biais relatif (%) ou de taux de recouvrement (%) pour chaque niveau de concentration des standards de validation.

**Tableau XXV** : Justesse calculée pour chaque niveau de concentration des standards de validation.

Niveau de concentration (ratio)	Moyenne des concentrations introduites (unit)	Moyenne des concentrations calculées (unit)	Biais absolu (unit)	Biais relatif (%)	Taux de recouvrement (%)
1.0	60,3022222	60,43	0,1277778	0,2118956	100,211896
2.0	67,6488889	68,04	0,3911111	0,5781486	100,578149
3.0	75,1877778	74,78	-0,4077778	- 0,53	99,4576542
4.0	82,5433333	82,19	-0,3533333	-0,428058	99,571942
5.0	90,4655556	91,04	0,6244444	0,6902566	100,690257

## 2.1.7. Fidélité

La fidélité de notre méthode est évaluée dans de conditions de répétabilité et de fidélité intermédiaire. Elle est calculée pour chaque niveau de concentration, exprimée en écart type et en terme de coefficient de variation est résumée dans le tableau XXI suivant :

**Tableau XXVI:** fidélité calculé pour chaque niveau de concentration des standards de validation.

Niveau de concentration (ratio)	MSM	MSE	Ecart type Intra-série	Ecart type inter-série	CV de répétabilité	CV de fidélité intermédiaire
1.0	0,00401111	0,11025556	0,06333333	0	0,1049394	0,1049394
2.0	4,44E-05	0,00486667	6,67E-03	0	1,06E-02	1,06E-02
3.0	0,00871111	0,00898889	0,09333333	0	0,1428016	0,1428016
4.0	0,0576	0,0489	0,24	0,0062183	0,3521359	0,352254
5.0	0,16267	0,05327778	0,40333333	0,0220504	0,5736725	0,574529

### 2.1.8. Exactitude

Le tableau XXVII ci-dessous présente l'exactitude relative calculée pour chaque niveau de concentration des standards de validation

**Tableau XXVII** : résultats de calcul de l'exactitude.

%	Répétition	Exactitude relative ijk			Exactitude relative ij
		Série 1	Série 2	Série 3	
80	1	0,2126209	-1,6086595	0,4432156	-0,3247148
	2	-1,043761	-2,0414139	-1,194317	-1,4291917
	3	0,7149064	1,8919111	0,8649568	1,154482
90	1	-0,757573	-1,5100586	-0,611997	-0,9616327
	2	-0,845146	-1,3873952	-1,006065	-1,080011
	3	-0,636901	2,2964772	-0,658891	0,3145458
100	1	0,5993812	2,803586	0,7141418	1,3617658
	2	0,1169336	-1,7265038	0,1415787	-0,4968454
	3	0,4639153	1,4673986	0,3990885	0,7744189
110	1	0,7276732	0,641133	0,5990825	0,6559344
	2	1,9420162	0,0962907	1,5175139	1,1786959
	3	1,5826704	1,5418872	0,9288222	1,3509787
120	1	-0,873514	-3,1024867	-1,045214	-1,6858305
	2	-1,226758	-1,0336701	-1,064184	-1,1083354
	3	0,3649286	2,0189573	1,63189E-03	0,7880632

### 2.1.9. Erreur totale et profil d'erreur totale

L'erreur totale et l'erreur totale relative calculées pour chaque niveau de concentration sont présentées dans le tableau XXVIII suivant :

**Tableau XXVIII** : Calcul de l'erreur totale pour chaque niveau de concentration des standards de validation

Niveau de concentration (ratio)	Erreur totale absolue	Erreur totale relative	Erreur maximale
1.0	0,19111108	0,31683504	0,42177444
2.0	3,98E-01	5,89E-01	5,99E-01
3.0	0,50111108	0,68514743	0,82794903
4.0	0,59333333	0,78031206	1,13244796
5.0	1,02777774	1,26478568	1,83845818

### 2.1.10. Intervalle de tolérance

Les limites de tolérance sont calculées pour chaque niveau de concentration, les résultats obtenus sont dans le tableau XXIX ci-dessous :

**Tableaux XXIX** : Calcul des limites de tolérance pour chaque niveau de concentration j.

	<b>60,19</b>	<b>67,67</b>	<b>75,21</b>	<b>82,51</b>	<b>90,67</b>
<b>Biais (%)</b>	0,21	0,58	-0,53	-0,43	0,68
<b>Limite intervalle tolérance basse</b>	-1,13	0,33	-0,85	-1,09	0,06
<b>Limite intervalle tolérance haute</b>	1,56	0,84	-0,23	0,23	1,31
<b>Limite d'acceptation basse</b>	-5,00	-5,00	-5,00	-5,00	-5,00
<b>Limite d'acceptation haute</b>	5,00	5,00	5,00	5,00	5,00

2.1.11. Profil d'exactitude

Parmi les différents modèles, nous avons opté pour le modèle de régression linéaire pour la validation de la méthode de dosage de l'irbésartan qui est illustré dans le profil d'exactitude indiqué dans la figure suivante :

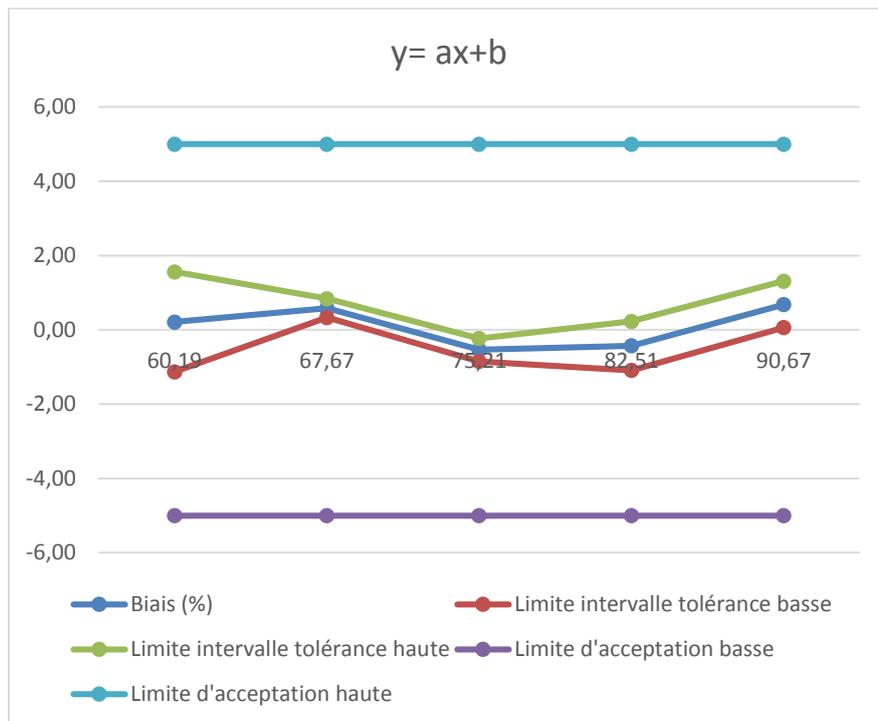


Figure n° 21 : Tracé du profil d'exactitude pour la fonction  $y = ax + b$ .

2.1.12. Linéarité

Un modèle de régression linéaire a été ajusté sur les concentrations calculées en fonction des concentrations introduites dans le but d'obtenir l'équation suivante :

$$y = 0,997x + 0,174$$

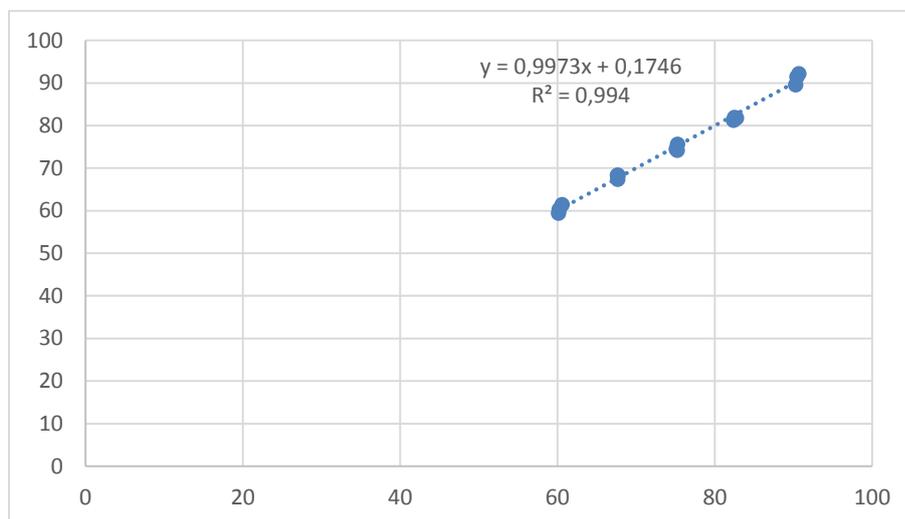


Figure n° 22 : courbe de linéarité obtenue avec la fonction  $y = ax + b$

Tableau XXX : Masses prédites en fonction des masses introduites

Variables (masses introduites en mg)	Prédictions inverses (masses prédites en mg)
60,19	60,3858902
60,59	61,4684493
60,1266667	59,4404488
67,6933333	68,3503381
67,6133333	68,3519751
67,64	67,4279427
75,2133333	74,2029092
75,2566667	75,6322994
75,0933333	74,516318
82,51	81,9723574
82,7533333	81,7895999
82,3666667	81,2688138
90,6733333	92,227922
90,44	91,4533988
90,2833333	89,5775014
la pente	0,99734527
L'écart type de la pente	0,02143426
L'ordonnée à l'origine	0,17456973
L'écart type de l'ordonnée à l'origine	1,62853677

**2.1.13. Limites de quantification et intervalle de dosage**

Les limites de quantification sont obtenues en calculant la plus petite et la plus grande concentration pour lesquelles les limites d'exactitudes, c'est-à-dire les limites de l'intervalle de tolérance attendu au niveau  $\beta$  sortent des limites d'acceptation.

Selon les profils d'exactitude des modèles adéquats représentés précédemment, aucune concentration ne sort de l'intervalle de tolérance, donc nous pouvons considérer la limite de quantification inférieure comme étant la plus petite concentration étudiée, et la limite de quantification supérieure correspondant à la plus grande concentration.

L'intervalle de dosage est l'intervalle compris entre les limites inférieures et supérieures de quantification ou la procédure analytique atteint l'exactitude souhaité

Limite inférieure de quantification ( $LQ_{inf}$ ) (Unit) = 1,2024 mg/ml.

Limite supérieure de quantification ( $LQ_{sup}$ ) = 1,8134 mg/ml.

**2.1.14. Robustesse**

On a établi un plan d'expérience factoriel partiel à trois facteurs qui sont le débit, la concentration et la longueur d'onde.

**Tableau XXXI :** Résultats de l'étude de la robustesse.

Masse (concentration) pour une teneur théorique de 100%		100	Mg							
N° de l'essai	Facteur A (teneur en %)	Facteur B	Facteur C	Masse introduite de l'échantillon	Masse du standard	Teneur	Aire de pic Echantillon	Aire De pic Standard	Masse estimée	Réponse (teneur en %)
1	90%	1,2	250	67,7	75,34	67,70	4650313	5358971	65	65
2	110%	1,2	250	82,56	75,34	82,56	5965394	5358971	84	84
3	90%	1,8	250	67,7	75,34	67,70	4293301	4833753	67	67
4	110%	1,8	250	82,56	75,34	82,56	5497263	4833753	86	86
5	90%	1,2	254	67,7	75,34	67,70	3074110	3418682	68	68
6	110%	1,2	254	82,56	75,34	82,56	3884589	3418682	86	86
7	90%	1,8	254	67,7	75,34	67,70	2797606	3148979	67	67
8	110%	1,8	254	82,56	75,34	82,56	3592914	3148979	86	86
									<b>Ecartype</b>	9,95
									<b>t°(0,05,7)</b>	2,36

**Tableau XXXII :** Tableau montrant les interactions entre les facteurs influençant la robustesse

Essai	Facteurs			Interactions				
	A	B	C	AB	AC	BC	ABC	
1	-65,38	-65,38	-65,38	65,38	65,38	65,38	-65,38	
2	83,87	-83,87	-83,87	-83,87	-83,87	83,87	83,87	
3	-66,92	66,92	-66,92	-66,92	-66,92	-66,92	66,92	
4	85,68	85,68	-85,68	85,68	85,68	-85,68	-85,68	
5	-67,75	-67,75	67,75	67,75	67,75	-67,75	67,75	
6	85,61	-85,61	85,61	-85,61	-85,61	-85,61	-85,61	
7	-66,93	66,93	66,93	-66,93	-66,93	66,93	-66,93	
8	85,96	85,96	85,96	85,96	85,96	85,96	85,96	
<b>Somme</b>	74,14	2,90	4,41	1,44	1,44	-3,81	0,89	
<b>Effet</b>	9,27	0,36	0,55	0,18	0,18	-0,48	0,11	
<b>Intervalle de confiance</b>	<b>Limite inférieur</b>	0,95	-7,96	-7,77	-8,14	-8,14	-8,79	-8,21
	<b>Limite supérieur</b>	17,58	8,68	8,87	8,50	8,50	7,84	8,43
<b>Facteur significatif (S) ou Non significatif (NS)</b>	<b>S</b>	<b>NS</b>	<b>NS</b>	<b>NS</b>	<b>NS</b>	<b>NS</b>	<b>NS</b>	

## 2.1.15. Etude de la stabilité

On prépare 3 solutions à un niveau de concentration 100% pour les mettre dans 3 conditions différentes.

**Tableau XXXIII :** Résultats de l'étude de la stabilité.

	Prise d'essais (mg)	0	1	2	4	5	1 <sup>er</sup> jour		4 <sup>ème</sup> jour	
		heure	heure	heures	heures	heures	Prise d'essais (mg)	Aire du pic	Prise d'essais (mg)	Aire du pic
<b>Blanc</b>	0	0					0	0	0	0
<b>SE</b>	75,3	5358971					75,16	5338971	75,08	5328432
<b>SV à l'abri de la lumière</b>	75,18	5256470					5214567		4313456	
<b>SV à l'air libre</b>	75,18	5136445					4678900		3398765	
<b>SV à température élevée (40 °C)</b>	75,18	4367891					4298564		3854321	
<b>SV à température basse (-4 °C)</b>	75,18	4993435					4913469		4223459	
<b>SV à l'abri de la lumière</b>		98,47964992%					97,8782505%		81,03804308%	
<b>SV à l'air libre</b>		96,23098875%					87,82369586%		63,85350042%	
<b>SV à température élevée (40 °C)</b>		81,83217569%					80,68472876%		72,41215194%	
<b>SV à température basse (-4 °C)</b>		93,55170498%					92,22659324%		79,34724555%	

## 2.2. Discussion

### 2.2.1. Spécificité

Comparaison des deux pentes  $a_1$  et  $a_2$  :

$$t_{\text{calculé}} = 5,26675E-05$$

$t^{\circ}(\alpha ; 21)$  lu sur la table de student = 2,08. (Annexe II)

$t_{\text{calculé}} < t^{\circ}(\alpha ; 21) \rightarrow$  les deux pentes ne sont pas significativement différentes au risque

$\alpha = 5\%$  considéré, donc on conclue l'absence d'effet matrice.

Comparaison des deux ordonnées à l'origine  $b_1$  et  $b_2$  :

$$t_{\text{calculé}} = 9,46644E-07$$

$t^{\circ}(\alpha ; 21)$  lu sur la table de student = 2,08

$t_{\text{calculé}} < t^{\circ}(\alpha ; 21) \rightarrow$  les deux pentes ne sont pas significativement différentes au risque

$\alpha = 5\%$  considéré, ce qui explique une absence d'erreur systématique.

La discussion des résultats obtenus est résumée dans le tableau suivant :

**Tableau XXXIV :** Signification des résultats des deux pentes et des deux ordonnées à l'origine entre elles.

Test	résultat	Signification
Les pentes sont-elles comparables ?	Oui	Absence d'effet matrice
Les ordonnées à l'origine sont-elles comparables ?	Oui	Absence d'erreur systématique

On peut dire qu'avec un risque de 5%, statistiquement la méthode est **spécifique** ainsi qu'une absence d'effet matrice et d'erreurs systématique confirmée.

### 2.2.2. Choix de la fonction de réponse

D'après les profils d'exactitude représentés dans les figures précédentes (n° :15, 16, 17, 18) le modèle d'étalonnage sélectionné est soit :

Régression linéaire avec une équation  $y = ax + b$

Ou :

Fonction logarithmique népérien  $\ln y = (\ln x)$

Ou :

Fonction racine carrée  $\sqrt{y} = f(\sqrt{x})$

En raison de la simplicité du modèle nous avons opté pour **la fonction linéaire  $y = ax + b$** .

### 2.2.3. Critères de performance de la fonction de réponse choisie

#### 2.2.3.1. Justesse

L'accord entre la valeur de la concentration moyenne prédite obtenue à partir des trois séries de validation et la valeur de la moyenne des concentrations théoriques considérée comme étant la valeur de référence est assez étroit pour tous les niveaux en tenant compte que les biais relatifs de ces derniers sont inférieurs à 1%, donc la méthode est **juste**.

#### 2.2.3.2. Fidélité

La fidélité de la méthode de dosage est exprimée par le coefficient de variation (% CV) obtenu en effectuant le rapport entre l'écart-type et la moyenne des réponses.

La répétabilité et la fidélité intermédiaires ont été observées à tous les niveaux de concentration. La méthode sera considérée comme **fidèle** si les coefficients de variation de la fidélité intra-série sont inférieurs à 1%.

Compte tenu des valeurs obtenues des CV, la fidélité intra-série de la méthode est jugée satisfaisante, la méthode est donc **fidèle**.

## 2.2.4. Critères de décision sur la validité de la méthode

### 2.2.4.1. Erreur totale

Selon le tableau montrant les résultats de l'erreur totale, on juge que tous les niveaux de concentration sont inclus dans l'intervalle d'acceptabilité. Et ceci est confirmé par l'erreur maximale observée qui est inférieure à 1%.

### 2.2.4.2. Profil d'exactitude

- Les limites de tolérance supérieure et inférieure n'interceptent pas avec les limites d'acceptabilité supérieure et inférieure, donc la méthode est considérée comme **valide** pour l'intervalle de dosage où le profil d'exactitude est compris dans les limites d'acceptation fixées à priori ;

- Cela signifie que l'analyste peut garantir que la méthode est capable de produire une proportion de **95%** des résultats acceptables et seulement 5% des futures mesures d'échantillons inconnus peuvent être en dehors de ces limites ;

- Le domaine de validité de la méthode est donc compris entre les niveaux de concentrations 80% et 120%.

### 2.2.4.3. Limites de quantification et intervalle de dosage

La méthode est considérée comme **valide** dans l'intervalle **[0,12024 mg/ml ; 0,18134 mg/ml]** pour lequel le profil d'exactitude est inclus dans les limites d'acceptation choisies : [-5% ; +5%] avec un risque d'avoir au maximum 5% des mesures en dehors des limites d'acceptation.

### 2.2.4. Linéarité

La linéarité a été évaluée à partir de cinq niveaux de concentration (80, 90, 100, 110, 120) avec trois répétitions indépendantes pour chaque (n= 3). La droite de régression linéaire est obtenue sous la forme  $y = 0,997x + 0,174$ , où 0,997 représente la pente de la droite et 0,174 l'ordonnée à l'origine (figure n° 19). y représente la concentration prédite et x la concentration introduite en mg/ml.

Le coefficient de détermination **R<sup>2</sup>** vaut 0,994, ce qui signifie que la variabilité totale de l'aire du pic est expliquée à **99,40%** par la variabilité de la concentration de l'échantillon en

solution. L'analyse de variance de la régression permet de vérifier l'existence d'une pente significative différente de zéro et l'existence d'une ordonnée à l'origine.

**La linéarité** de la droite : concentrations prédites = f (concentrations introduites) est **confirmée** par :

- Un coefficient de détermination acceptable  $R^2 = 0,994$
- Une pente significativement différente de zéro donc il existe une relation linéaire. De plus elle est comparable à 1 au risque 5% ( $a = 0,997$ )
- Une ordonnée à l'origine comparable à zéro au risque 5% ( $b = 0,174$ )

### 2.2.5. Robustesse

D'après les résultats du tableau XXXII, nous avons constaté que la méthode est influencée par le facteur A (concentration) et non pas par le facteur B (débit) et facteur C (longueur d'onde). Ce qui nous permet de juger la méthode comme **sensible aux variations des paramètres expérimentaux**.

### 2.2.6. Stabilité des solutions

Selon les résultats du tableau XXIII, nous avons remarqué que **la stabilité** des solutions incubées est **altérée** par l'effet de **la lumière** et de **la température**. Cette altération est due aux forces électrostatiques de l'irbésartan, c'est pour cela il est recommandé de conserver l'irbésartan à l'abri de la lumière et à température ambiante.

### Synthèse des résultats

La spécificité, la linéarité de la méthode de dosage de l'irbésartan dans des comprimés dosés à 150 mg par HPLC mise au point dans le présent travail sont démontrés dans l'intervalle de dosage [120,24 ; 181,34] mg/L avec une probabilité de confiance de 95% dans les limites d'acceptation définies  $\pm 5\%$ . Autrement dit, 95% des futurs résultats fournis par la méthode analytique développée seront inclus dans les limites d'acceptabilité et les limites de dosage.

**L'utilisation de l'HPLC** avec une détection dans le domaine de l'Ultraviolet comme méthode de dosage a permis d'obtenir des résultats **plus exacts, plus précis et plus spécifiques** (méthode séparative) dans un intervalle de dosage [120,24 ; 181,34] mg/L.

## Conclusion générale

---

La réglementation en vigueur dans l'industrie pharmaceutique, est stricte et complexe afin de protéger au maximum les patients mais aussi les entreprises elles-mêmes. Le contrôle et la validation des méthodes sont essentiels pour la commercialisation des médicaments.

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

L'objectif de notre étude a été de mettre au point et de valider une méthode de dosage de l'irbésartan dans des comprimés de 150 mg, et ce par chromatographie liquide à haute performance en utilisant le profil d'exactitude et l'intervalle de tolérance comme outil de décision de la validation : Démarche harmonisée proposée par une commission de la SFSTP publiée en 2006 dans la revue STP Pharma Pratique.

Il est primordial d'appliquer le concept du profil d'exactitude à tous les contrôles de qualité obtenus en routine, cette approche offrant toutes les garanties requises en termes de sources de variation inhérentes à l'utilisation de la méthode en routine mériterait certainement aussi d'être comparée à celles utilisant les études de robustesse et inter-laboratoires.

Les résultats obtenus ont répondu à toutes les exigences et performances spécifiques élaborées dans cette approche harmonisée ; ce qui atteste de la validité de la méthode utilisée et son aptitude à être appliquée en routine par les laboratoires de contrôle qualité pour le dosage de l'irbésartan dans les comprimés dosés à 150 mg.

## Perspectives

---

Les résultats présentés dans ce mémoire de fin d'étude sont une petite partie de ce qui pourrait être fait dans le cadre de l'évaluation de la fiabilité des résultats obtenus par des méthodes analytiques au long de leur cycle de vie. La validation de la méthode est un bon point de départ.

Des perspectives potentielles de recherches peuvent être envisagées :

- Etude critique des différentes pratiques, parfois erronées, rencontrées dans les laboratoires de contrôle.
- Développer et proposer des protocoles standards pour la validation des méthodes analytiques des différents tests dans l'industrie pharmaceutique : tests des impuretés, de dissolution ...
- Proposer des limites d'acceptation de ces méthodes toujours en relation avec l'objectif des méthodes et ce afin de combler les lacunes dans les guidelines concernant ces limites
- Orienter les recherches vers un autre type de méthodes analytiques, celles semi-quantitatives et en particulier vers la validation de ces méthodes ou leur transfert.

Ces travaux pourraient avoir une finalité commune: ouvrir la voie vers le principe de la qualité totale exigée par l'industrie pharmaceutique, tout en améliorant la confiance entre le consommateur et les acteurs économiques vers les principales décisions prises à l'aide des méthodes analytiques.

## Références bibliographiques

---

[1] Pharmacopée européenne 7ème édition publiée le 15 juillet 2010 remplace la 6ème édition à date du 1er janvier 2011.

[2] CBIP Centre Belge d'Informations Pharmaco-thérapeutiques, répertoire commenté des médicaments 2017, mise à jour mensuelle sur [www.cbip.be](http://www.cbip.be).

[3] Sanofi-aventis Canada, Inc. 2905 Place Louis-R-Renaud Laval (Québec) H7V 0A3, version s-a 5.0 datée du 09 septembre 2015, No de contrôle de la préparation : 185026, Date de révision : 9 septembre 2015.

[4] Précis de pharmacologie du fondamentale à la clinique sous la direction de PIERRE BEAULIEU et CHANTAL LAMBERT, les presses de l'université de Montréal. Imprimé au Canada en mars 2010.

[5] Le dictionnaire Vidal 2015, 91<sup>e</sup> Edition. 21, rue Camille-Desmoulins-92789 ISSY-LES-MOULINEAUX Cedex 9 France.

[6] HSCM : Hôpital du Sacré-Cœur de Montréal. Règles d'utilisation des médicaments, RUM-002 : antagonistes des récepteurs de l'angiotensine II, date de mise en vigueur : 1<sup>er</sup> avril 2015.

[7] CRAT- Centre de Référence sur les Agents Tératogènes. Hôpital Armand Trousseau, 26 Avenue du Docteur Arnold Netter, Paris.

[8] ANSM : Agence Nationale de sécurité du médicament et des produits de santé, notice patient (Irbésartan, comprimés pelliculés 150 mg), ANSM- mis à jour : 04/11/2016, agence-  
[prd.ansm.santé.fr](http://prd.ansm.santé.fr)

[9] U.S. Pharmacopeial convention. Material name : Irbésartan5543 Version # : 02 Révision date : 03-20-2014 Issue date : 01-21-2011.

[10] A. Le Hir, J.-C. Chaumeil, D. Brossard. Abrégé de Pharmacie galénique. Bonne Pratique de Fabrication de médicaments. Préface de Pr. M.-M. Janot 9<sup>ème</sup> édition.

## Références bibliographiques

---

[11] Myriam VO. Les comprimés, une forme d'avenir ? [Thèse pour obtenir le diplôme de docteur en pharmacie]. Université de Lorraine, faculté de pharmacie ; 25 sept 2015.

[12] L'essentiel sur les comprimés

[www.alainrusenholtz.com/content/uploads/2013/10/comprim%25C3%25](http://www.alainrusenholtz.com/content/uploads/2013/10/comprim%25C3%25).

[13] Cours, les comprimés de Dr S. Djebara

[14] Késia Yekpe. Relier les attributs de matériaux et les paramètres de procédés de fabrication à un test de contrôle qualité, une application du concept quality by design [thèse]. Université de Montpellier 1 ; université de Sherbrooke ; 22 juillet 2014.

[15] **V. Grenouilleau**, Modification galéniques des formes orales sèches, diplôme d'état de docteur en pharmacie, Université Bordeaux 2 UFR des sciences pharmaceutiques, 2014, pp13-16.

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

[17] Granulation-PharmaEtudes, <http://www.pharmaetudes.com/ressources/3-année-pharmacie/galénique>

[18] VIAL.J. Journée de formation scientifique en spectrométrie atomique. Définition de la validation de méthode et outils associés. Laboratoire environnement et chimie analytique de l'ESPCI. Paris. 14 Nov. 2006.

[19] Hubert Ph, Nguyen JJ, Boulanger B, Chapuzet E, Chiap P, Cohen N, et al. SFSTP. Validation des procédures analytiques quantitatives, Harmonisation des démarches. Partie I ; Généralités ; 2003.

[20] Validation analytique d'une méthode de dosage simultanée du Paracétamol et du Tramadol dans les comprimés par HPLC. Application de la démarche harmonisée [Mémoire de fin d'études, en vue de l'obtention du diplôme en pharmacie] Tizi Ouzou : Université Mouloud Mammeri, faculté de médecine département de pharmacie.

## Références bibliographiques

---

- [21] Hubert Ph, Nguyen JJ, Boulanger B, Chapuzet E, Chiap P, Cohen N, et al. SFSTP. Validation des procédures analytiques quantitatives, Harmonisation des démarches. Partie II ; Statistiques ; 2006.
- [22] Mimoun N, Sahraoui N. Validation analytique d'une méthode de dosage du diclofénac de sodium dans les suppositoires de 100 mg par HPLC [thèse]. Tizi Ouzou, université Mouloud Mammeri ; 2016.
- [23] Pharmacopée européenne 1998.
- [24] Logeais Maxime. Optimisation de la productivité des méthodes analytiques de contrôle d'un médicament [thèse]. Université de Poitiers, faculté de médecine et pharmacie, année 2013.
- [25] HPLC principe et appareillage. [Extrait du Biotechnologie & Biologie et physiopathologie humaine-Académie de Rouen.  
[http://biotech.spip.ac-rouen.fr/spip.php?article9/ressources\\_pédagogiques-Biochimie et Biomoléculaire/](http://biotech.spip.ac-rouen.fr/spip.php?article9/ressources_pédagogiques-Biochimie_et_Biomoléculaire/) Date de mise en ligne : Mercredi 20 janvier 2010.
- [26] Mémoire Présenté pour l'obtention du diplôme de Magister en médecine vétérinaire  
Option : hygiène alimentaire Spécialité : surveillance de la chaîne alimentaire de la filière viande  
DEPARTEMENT DES SCIENCES VETERINAIRES EL KHROUB
- [27] La chromatographie en phase liquide CPL  
MariePauleBassez <http://chemphys.ustrasbg.fr/mpb>
- [28] Isabelle Pinguet. Validation analytique application de la procédure SFSTP2003-2006 au domaine de la phytothérapie. Sciences pharmaceutiques 2015. [Thèse pour l'obtention du diplôme de docteur en pharmacie].  
HALID: dumas-01188779-<http://dumas.ccsd.cnrs.fr>
- [29] ICHQ3D et validation des méthodes analytiques  
[www.ichq3d.fr/ICH-Q3D-validation-des-methodes-analytique](http://www.ichq3d.fr/ICH-Q3D-validation-des-methodes-analytique)

## Références bibliographiques

---

[30] ANSES : agence nationale de sécurité sanitaire, alimentation, environnement, travail. Guide validation des méthodes d'analyse. ANSES/PR3/07/01 version a. Date : 28 octobre 2015.

[31] Le cahier Des Techniques de l'Inra, validation des méthodes d'analyse quantitative par le profil d'exactitude.

[32] LABO-STAT, guide de validation des méthodes d'analyse, Max Feinberg, ingénieur agronome, directeur de recherche à l'Inra, Institut National de la Recherche Agronomique, Unité Met@risk-Méthodologies d'analyse de risque alimentaire.

[33] Choix et validation d'une méthode d'analyse, Christian Ducauze, Arlette Baillet-Guffroy et Thanh X. Bui

[34] Francis Rouessac et Annick Rouessac. Analyse chimique : Méthodes et techniques instrumentales modernes. Dunod, 6<sup>ème</sup> édition. Paris; 2004.459. (Format électronique).

[35] US Food and Drug Administration, Guideline on general principles of process validation 1987.

[36] Marini.R, Evaluation des différentes approches pour l'obtention du grade pour l'estimation de l'incertitude des mesures analytiques, thèse présentée en vue de docteur en sciences pharmaceutiques, Université de Liège, 2005-2006.

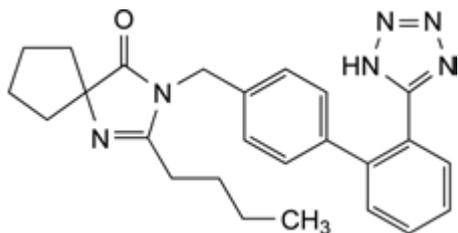
[37] Marlène Ferderin, VALI-MEDIC' : Une aide à la démarche de validation des méthodes analytiques. Mémoire d'intelligence méthodologique, Master 2 Qualité et Performance dans organisations. Université De Technologie de Compiègne 22 juin 2017.

# **Annexes**

**Monographie de l'irbésartan**

04/2010:2465

Corrigé 7.0

**IRBÉSARTAN****Irbesartanum**C<sub>25</sub>H<sub>28</sub>N<sub>6</sub>O Mr 428,5

[138402-11-6]

**1. Définition**

2-Butyl-3-[[2'-(1*H*-tétrazol-5-yl) biphényl-4-yl] méthyl] -1,3-diazaspiro [4.4] non-1-én-4-one.

Teneur : 99,0 pour cent à 101,0 pour cent (substance anhydre).

**2. Caractères**

Aspect : poudre cristalline blanche ou sensiblement blanche.

Solubilité : pratiquement insoluble dans l'eau, assez soluble dans le méthanol, peu soluble dans le chlorure de méthylène. L'irbésartan présente le phénomène du polymorphisme (5.9).

**3. Identification**

Spectrophotométrie d'absorption dans l'infrarouge (2.2.24).

Comparaison : irbésartan SCR.

Si les spectres obtenus à l'état solide présentent des différences, dissolvez séparément la substance à examiner et la substance de référence dans du méthanol R, évaporez à siccité à 60 °C et enregistrez de nouveaux spectres à partir des résidus.

#### 4. Essai

**Aspect de la solution.** La solution est limpide (2.2.1) et n'est pas plus fortement colorée que la solution témoin B7 (2.2.2, Procédé II). Dissolvez 0,50 g d'irbésartan dans un mélange de 1 volume d'hydroxyde de sodium 2M R et de 9 volumes de méthanol R2, puis complétez à 10 ml avec le même mélange de solvants.

**Impureté B.** Chromatographie liquide (2.2.29).

Solution à examiner. Dissolvez 0,100 g d'irbésartan dans la phase mobile et complétez à 5,0 ml avec la phase mobile.

Solution témoin. Dissolvez 25,0mg d'azide de sodium R (sel de sodium de l'impureté B) dans la phase mobile et complétez à 100,0 ml avec la phase mobile. Prélevez 0,25 ml de cette solution et complétez à 200,0 ml avec la phase mobile.

Colonne :

— dimensions : l = 0,25 m, Ø = 4 mm,

— phase stationnaire : résine échangeuse d'anions fortement basique pour chromatographie R (8,5 µm).

Phase mobile : solution d'hydroxyde de sodium R à 4,2 g/L dans de l'eau exempte de dioxyde de carbone R.

Débit : 1,0mL/min.

Détection : détecteur conductimétrique ayant une sensibilité de 3 µS ; utilisez un suppresseur d'anions auto-régénéré.

Neutralisation de l'éluant : soit chimique, soit électrochimique :

— chimique : par circulation continue à contre-courant dans une micro-membrane de neutralisation, avant la détection :

— solvant de neutralisation : acide sulfurique 0,025 M,

— débit : 10mL/min,

— pression : équivalente à environ 100 kPa,

— électrochimique : 300 mA (par exemple).

Injection : 200 µL.

Enregistrement : 25min.

Temps de rétention : impureté B = environ 14 min.

Conformité du système : solution témoin :

— rapport signal/bruit : au minimum 10 pour le pic dû à l'impureté B.

Limite :

— impureté B : au maximum la surface du pic correspondant dans le chromatogramme obtenu avec la solution témoin (10 ppm).

**Substances apparentées.** Chromatographie liquide (2.2.29).

Solution tampon pH 3,2. Mélangez 5,5 mL d'acide phosphorique R et 950 mL d'eau R.

Ajustez à pH 3,2 avec de la triéthylamine R.

Solution à examiner. Dissolvez 50 mg d'irbésartan dans du méthanol R2 et complétez à 50,0 mL avec le même solvant.

Solution témoin (a). Prélevez 1,0 mL de la solution à examiner et complétez à 20,0 mL avec du méthanol R2. Prélevez 1,0 mL de cette solution et complétez à 50,0 mL avec du méthanol R2.

Solution témoin (b). Dissolvez 5 mg d'irbésartan et 5 mg d'impureté A d'irbésartan SCR dans du méthanol R2 et complétez à 10,0 mL avec le même solvant. Prélevez 1,0 mL de cette solution et complétez à 10,0 mL avec du méthanol R2.

Colonne :

— dimensions : l = 0,25 m, Ø = 4 mm,

— phase stationnaire : gel de silice octadécylsilylé postgreffé pour chromatographie R (5 µm).

Phase mobile : acétonitrile R1, solution tampon pH 3,2 (33 :67 V/V).

Débit : 1,0 mL/min.

Détection : spectrophotomètre à 220 nm.

Injection : 10 µL.

Enregistrement : 1,4 fois le temps de rétention de l'irbésartan.

Identification des impuretés : utilisez le chromatogramme obtenu avec la solution témoin (b) pour identifier le pic dû à l'impureté A.

Rétention relative par rapport à l'irbésartan (temps de rétention = environ 23 min) : impureté A = environ 0,7.

Conformité du système : solution témoin (b) :

— résolution : au minimum 3,0 entre les pics dus à l'impureté A et à l'irbésartan.

**Limites :**

- impureté A : au maximum 1,5 fois la surface du pic principal du chromatogramme obtenu avec la solution témoin (a) (0,15 pour cent),
- impuretés non spécifiées : pour chaque impureté, au maximum la surface du pic principal du chromatogramme obtenu avec la solution témoin (a) (0,10 pour cent),
- total : au maximum 2 fois la surface du pic principal du chromatogramme obtenu avec la solution témoin (a) (0,2 pour cent),
- limite d'exclusion : 0,5 fois la surface du pic principal du chromatogramme obtenu avec la solution témoin (a) (0,05 pour cent).

**Métaux lourds** (2.4.8) : au maximum 20 ppm.

Mélange de solvants : acétone R, méthanol R (20:80 V/V).

0,25 g d'irbésartan satisfait à l'essai H. Préparez la solution témoin avec 0,5 mL de solution à 10 ppm de plomb (Pb) R.

**Eau** (2.5.12) : au maximum 0,5 pour cent, déterminé sur 1,00 g d'irbésartan.

**Cendres sulfuriques** (2.4.14) : au maximum 0,1 pour cent, déterminé sur 1,0 g d'irbésartan.

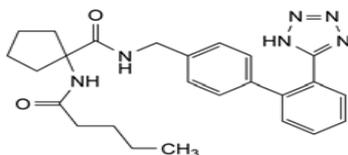
**6. Dosage**

Dissolvez 0,300 g d'irbésartan dans 50 mL d'acide acétique anhydre R. Titrez par l'acide perchlorique 0,1 M. Déterminez le point de fin de titrage par potentiométrie (2.2.20).

1 mL d'acide perchlorique 0,1 M correspond à 42,85 mg de C<sub>25</sub>H<sub>28</sub>N<sub>6</sub>O.

**IMPURETÉS**

Impuretés spécifiées : A, B.



A. 1-(pentanoylamino)-N-[[2'-(1*H*-tétrazol-5-yl) biphényl-4-yl]-méthyl] cyclopentanecarboxamide,

B. trinitrure (azoture).

Table de Student

k	$\gamma$										
	0.25	0.20	0.15	0.10	0.05	0.025	0.010	0.005	0.0025	0.0010	0.0005
1	1.000	1.376	1.963	3.078	6.314	12.71	31.82	63.66	127.3	318.3	636.6
2	0.816	1.061	1.386	1.886	2.920	4.303	6.965	9.925	14.09	22.33	31.60
3	0.765	0.978	1.250	1.638	2.353	3.182	4.541	5.841	7.453	10.21	12.92
4	0.741	0.941	1.190	1.533	2.132	2.776	3.747	4.604	5.598	7.173	8.610
5	0.727	0.920	1.156	1.476	2.015	2.571	3.365	4.032	4.773	5.893	6.869
6	0.718	0.906	1.134	1.440	1.943	2.447	3.143	3.707	4.317	5.208	5.959
7	0.711	0.896	1.119	1.415	1.895	2.365	2.998	3.499	4.029	4.785	5.408
8	0.706	0.889	1.108	1.397	1.860	2.306	2.896	3.355	3.833	4.501	5.041
9	0.703	0.883	1.100	1.383	1.833	2.262	2.821	3.250	3.690	4.297	4.781
10	0.700	0.879	1.093	1.372	1.812	2.228	2.764	3.169	3.581	4.144	4.587
11	0.697	0.876	1.088	1.363	1.796	2.201	2.718	3.106	3.497	4.025	4.437
12	0.695	0.873	1.083	1.356	1.782	2.179	2.681	3.055	3.428	3.930	4.318
13	0.694	0.870	1.079	1.350	1.771	2.160	2.650	3.012	3.372	3.852	4.221
14	0.692	0.868	1.076	1.345	1.761	2.145	2.624	2.977	3.326	3.787	4.140
15	0.691	0.866	1.074	1.341	1.753	2.131	2.602	2.947	3.286	3.733	4.073
16	0.690	0.865	1.071	1.337	1.746	2.120	2.583	2.921	3.252	3.686	4.015
17	0.689	0.863	1.069	1.333	1.740	2.110	2.567	2.898	3.222	3.646	3.965
18	0.688	0.862	1.067	1.330	1.734	2.101	2.552	2.878	3.197	3.610	3.922
19	0.688	0.861	1.066	1.328	1.729	2.093	2.539	2.861	3.174	3.579	3.883
20	0.687	0.860	1.064	1.325	1.725	2.086	2.528	2.845	3.153	3.552	3.850
21	0.686	0.859	1.063	1.323	1.721	2.080	2.518	2.831	3.135	3.527	3.819
22	0.686	0.858	1.061	1.321	1.717	2.074	2.508	2.819	3.119	3.505	3.792
23	0.685	0.858	1.060	1.319	1.714	2.069	2.500	2.807	3.104	3.485	3.767
24	0.685	0.857	1.059	1.318	1.711	2.064	2.492	2.797	3.091	3.467	3.745
25	0.684	0.856	1.058	1.316	1.708	2.060	2.485	2.787	3.078	3.450	3.725
26	0.684	0.856	1.058	1.315	1.706	2.056	2.479	2.779	3.067	3.435	3.707
27	0.684	0.855	1.057	1.314	1.703	2.052	2.473	2.771	3.057	3.421	3.690
28	0.683	0.855	1.056	1.313	1.701	2.048	2.467	2.763	3.047	3.408	3.674
29	0.683	0.854	1.055	1.311	1.699	2.045	2.462	2.756	3.038	3.396	3.659
30	0.683	0.854	1.055	1.310	1.697	2.042	2.457	2.750	3.030	3.385	3.646
40	0.681	0.851	1.050	1.303	1.684	2.021	2.423	2.704	2.971	3.307	3.551
50	0.679	0.849	1.047	1.299	1.676	2.009	2.403	2.678	2.937	3.261	3.496
60	0.679	0.848	1.045	1.296	1.671	2.000	2.390	2.660	2.915	3.232	3.460
80	0.678	0.846	1.043	1.292	1.664	1.990	2.374	2.639	2.887	3.195	3.416
100	0.677	0.845	1.042	1.290	1.660	1.984	2.364	2.626	2.871	3.174	3.390
120	0.677	0.845	1.041	1.289	1.658	1.980	2.358	2.617	2.860	3.160	3.373
$\infty$	0.674	0.842	1.036	1.282	1.645	1.960	2.326	2.576	2.807	3.090	3.291

# Annexe III : Calcul des indices pour le tri des modèles d'étalonnage

---

## 1. Indice d'intervalle de dosage

L'intervalle de dosage (ID) est l'intervalle à l'intérieur duquel la méthode est valide. Il est obtenu en calculant la différence entre la borne supérieure et inférieure des limites de quantification. L'indice d'intervalle de dosage est un nombre sans dimension variant dans l'intervalle [0,1].

L'indice prend la valeur 1 si la procédure d'analyse est apte à doser sur la totalité de l'intervalle envisagé (concentration minimale et maximales introduites). Il est calculé selon la formule :

$$D(\text{ID}) = \frac{\text{ID}}{C_{\max} - C_{\min}}$$

Où  $C_{\max}$  et  $C_{\min}$  sont la plus grande et la plus petite concentration introduite.

Remarque : si un seul niveau de concentration est introduit, l'indice d'intervalle de dosage est fixé à 0 ou 1.

## 2. Indice de fidélité

L'aire utilisée pour le calcul de l'indice de fidélité est l'aire, à l'intérieur des limites de quantification, entre la limite inférieure et supérieure du profil d'exactitude. Cette aire est calculée par la règle de trapèzes. L'indice de fidélité est sans dimension et varie dans l'intervalle [0,1]. Plus cet indice est proche de 1, plus la méthode est fidèle. Il est calculé selon la formule :

$$D(\text{aire}) = \begin{cases} \frac{2\lambda(C_{\max} - C_{\min}) - \text{aire}}{2\lambda(C_{\max} - C_{\min})} & \text{Si aire} < 2\lambda(C_{\max} - C_{\min}) \\ 0 & \text{Si non} \end{cases}$$

Où  $\lambda$  est la limite d'acceptation et  $C_{\max}$ ,  $C_{\min}$  sont les concentrations maximale et minimale.

# Annexe III : Calcul des indices pour le tri des modèles d'étalonnage

---

## 3. Indice de justesse

La somme du carré des biais (SCB) est calculée en sommant le carré des biais estimés à chaque niveau de concentration. L'indice de justesse est un nombre sans dimension variant dans l'intervalle [0,1] où 1 est l'optimum et signifie qu'il n'y a pas de biais pour tous les niveaux de concentrations observés. L'indice est calculé de la façon suivante :

$$D(\text{SCB}) = \begin{cases} -\frac{\text{SCB}}{m\lambda^2} & \text{Si } \text{SCB} \leq m\lambda^2 \\ 0 & \text{Si non} \end{cases}$$

Où  $\lambda$  est la limite d'acceptation de la méthode, et  $m$  est le nombre de niveau de concentration.

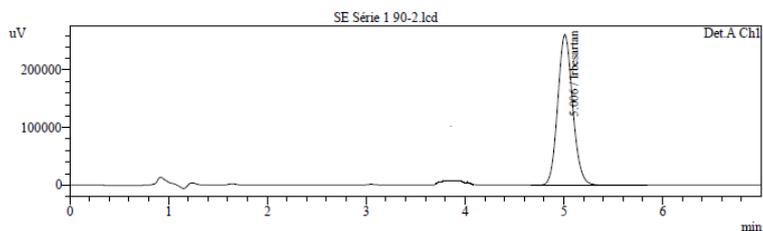
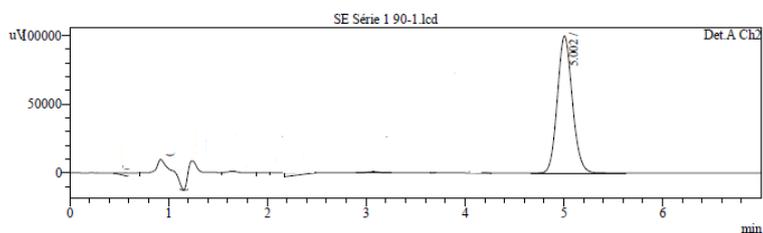
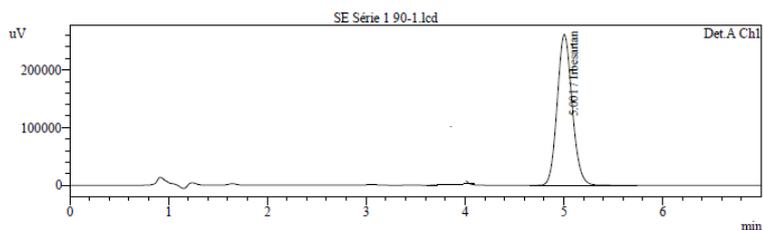
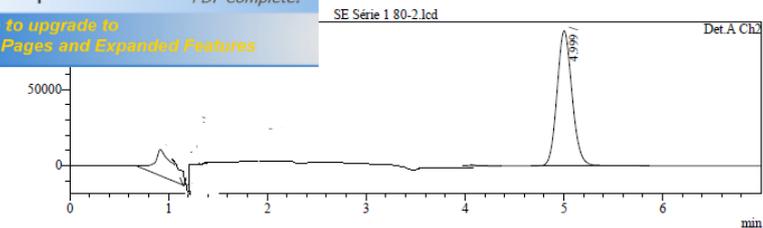
## 4. Indice d'exactitude

Ces 3 indices sont compilés dans l'indice d'exactitude qui correspond à la moyenne géométrique  $D^*$  des indices respectifs. L'indice d'exactitude varie de 0 à 1. Plus l'indice est proche de 1 meilleure est la méthode. Ce chiffre sans dimension est seulement utilisé pour comparer les différents modèles d'étalonnage et non pour comparer les procédures analytiques. L'indice est calculé de la façon suivante :

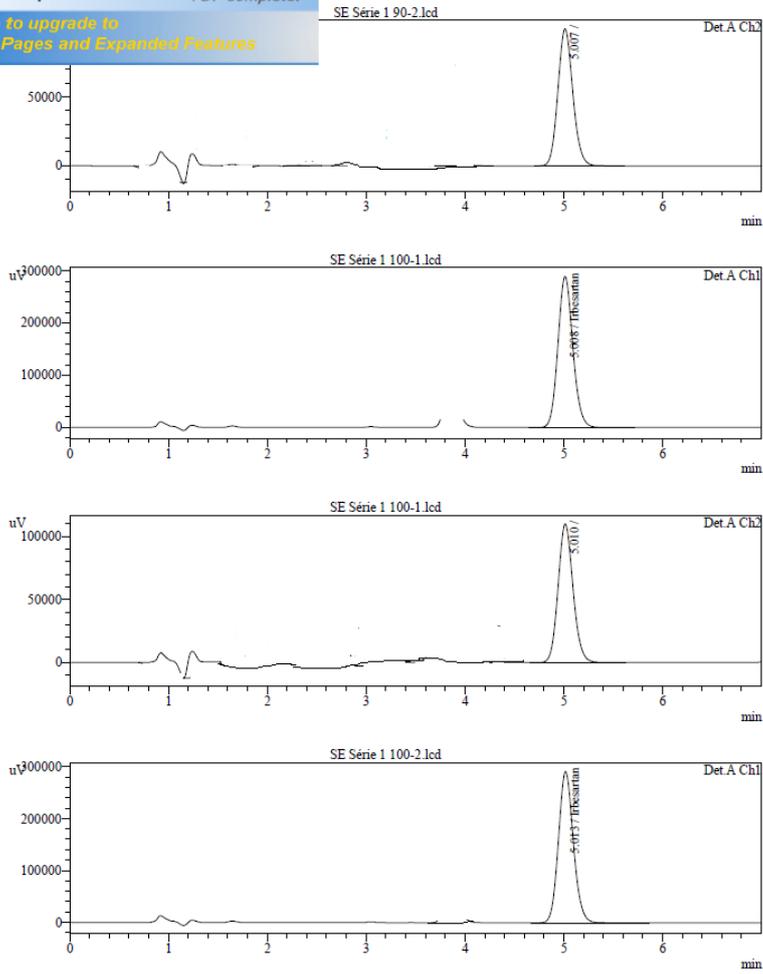
$$D^* = \sqrt[3]{D(\text{aire}) \times D(\text{ID}) \times D(\text{SCB})}$$



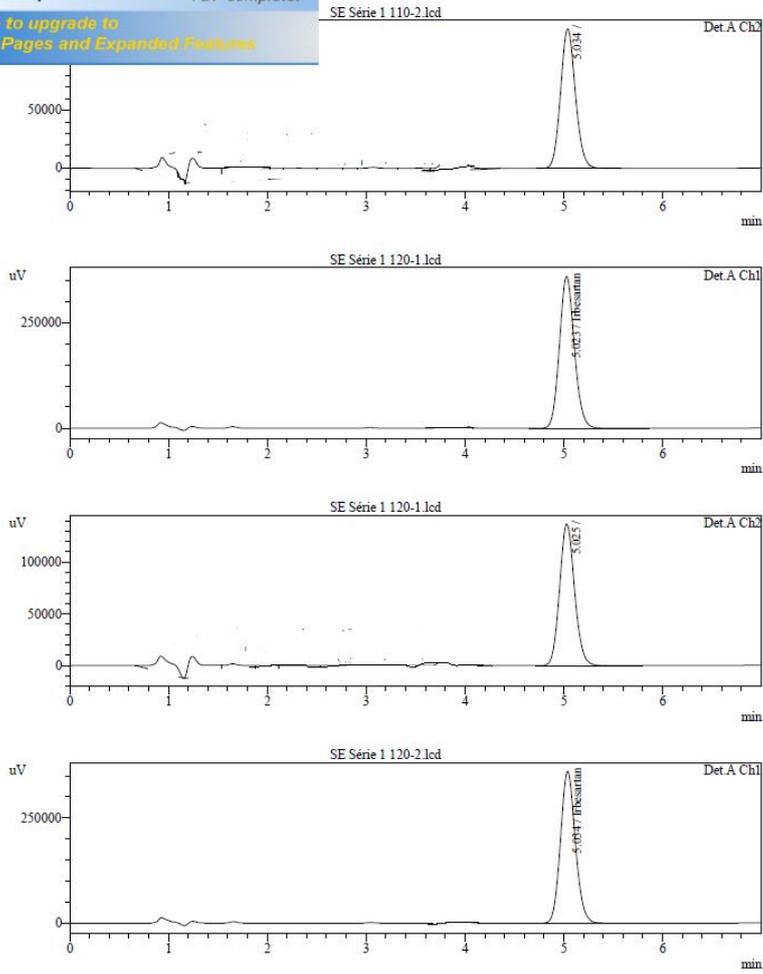
[Click Here to upgrade to Unlimited Pages and Expanded Features](#)



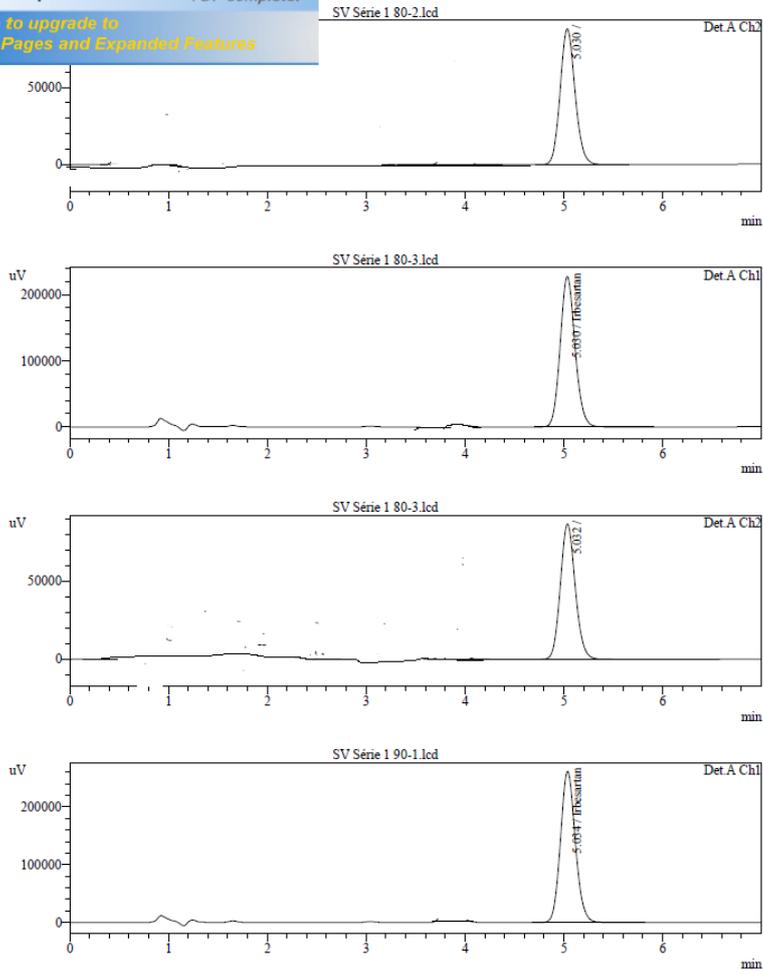
 **PDF Complete**  
Your complimentary use period has ended.  
Thank you for using PDF Complete.  
[Click Here to upgrade to Unlimited Pages and Expanded Features](#)

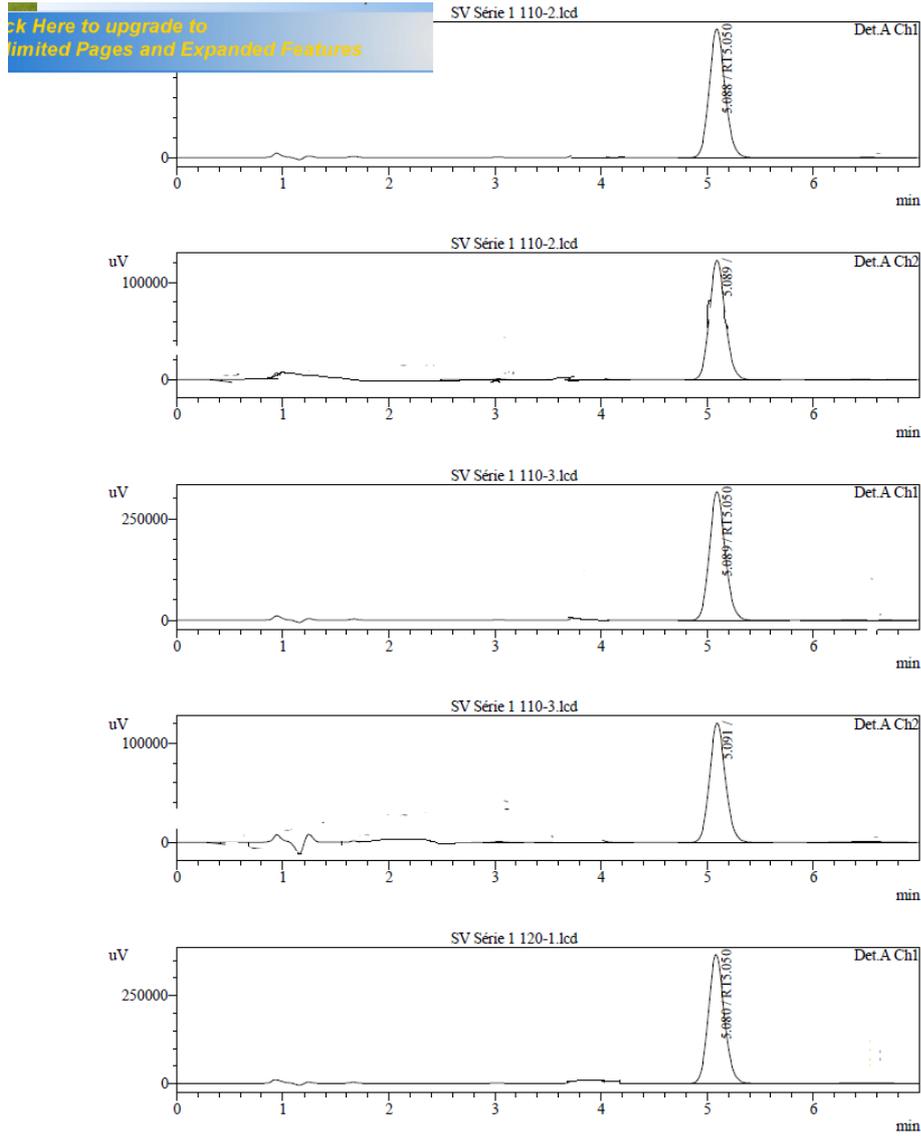


 **PDF Complete**  
Your complimentary use period has ended. Thank you for using PDF Complete.  
[Click Here to upgrade to Unlimited Pages and Expanded Features](#)



 **PDF Complete**  
Your complimentary use period has ended.  
Thank you for using PDF Complete.  
[Click Here to upgrade to Unlimited Pages and Expanded Features](#)









## **RESUME**

Le contrôle analytique avant libération d'un médicament sur le marché est une étape importante et nécessaire pour garantir la qualité du produit qui va être délivré aux patients. Les laboratoires pharmaceutiques sont tenus de prouver que les méthodes utilisées lors de ce contrôle sont parfaitement valides et fiables, en procédant à leur validation.

Le but du présent travail est de mettre au point et de valider une méthode de dosage de l'irbésartan dans des comprimés par chromatographie liquide à haute performance en utilisant le profil d'exactitude couplé à l'intervalle de tolérance comme outil de décision de validation ; démarches harmonisées par une commission de la SFSTP parue en 2003 et en 2006 dans les guides STP Pharma Pratiques.

Nous avons initié ce travail par une étude bibliographique concernant le principe actif étudié et l'approche adoptée au cours de la validation de la méthode d'analyse.

Dans la partie expérimentale et pour la mise au point de la technique, nous avons effectué plusieurs tests afin d'optimiser les conditions analytiques,

Au début de la validation, nous avons pu démontrer la sélectivité 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 générés pour pouvoir construire les profils d'exactitude.

La méthode développée s'est révélée spécifique, linéaire, sensible, exacte dans l'intervalle [1,2024 ; 1,8134] mg/ml pour l'irbésartan avec un risque d'avoir au maximum de 10% des futures mesures en dehors des limites d'acceptations fixées à [-5%, +5%]. Cela démontre la validité de la méthode et son aptitude à être appliquée en routine pour le dosage de l'irbésartan dans les comprimés dosés de 150 mg.

**Mots clés : Irbésartan, validation analytique, profil d'exactitude, intervalle de tolérance, HPLC**

## **ABSTRACT**

Analytical control of a medicinal product before its release on the market is an important and necessary step to guarantee the quality of the product that is going to be delivered to patients. Pharmaceutical laboratories are required to prove that analytical procedures used for this control are highly valid and reliable, by performing an analytical validation.

The purpose of this work is to develop and validate a method for the determination of irbesartan in tablets using high performance liquid chromatography. The method is validated according to the approach of the total error proposed by SFSTP commission using accuracy profile as decision tool.

We started with a bibliographic study of the irbesartan and the approach adopted during the validation of the analytical protocol.

After that, before the validation step, we have demonstrated the selectivity of the analytical method using student test for the comparison of the two-slope with and without the matrix. Then, a series calibration and validation standard were used to calculate the different statistical criteria for the different models tested and the accuracy profiles were built for each model.

The results demonstrated that the develop method was accurate with good selectivity and linearity in the range of [1,2024 ; 1,8134] mg/ml for irbesartan with a risk of having a maximum of 10% of the futures measurements outside the acceptance limits settled at [-5; +5] %. This confirms the validity of the develop method and its suitability for its routine application in the determination of irbesartan in the tablets of 150 mg.

**Key words: irbesartan, analytical validation, accuracy profile, acceptance limits, HPLC.**