

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

SCIENTIFIQUE

UNIVERSITE MOULOUD MAMMERI DE TIZI-OUZOU

FACULTE DES SCIENCES

DEPARTEMENT DE CHIMIE



DOMAINE : SCIENCES DE LA MATIERE

FILIERE : CHIMIE

MEMOIRE DE MASTER

SPECIALITE : CHIMIE PHARMACEUTIQUE

THEME

Mise au point et validation d'une méthode de dosage d'un produit fini chlorhydrate de metformine par HPLC selon la procédure SFSTP 2006

Présenté par : LAKHDARI Sara

KHIMOUD Fazia

Soutenu publiquement, le 25/ Juillet / 2019, devant le Jury composé de :

Pr. HOCINE SMAIL	professeur	Président
Pr. MAMOU MARZOUK	MCHU	Promoteur
Dr .AKLI KARIMA	RCA	Co-Promoteur
Dr. BRAHIMI RABAH	RCA	Co- Promoteur
Mme. HIKAM DJAMILA	MCA	Examinatrice
Mme.BELMAHDI LILA	MCB	Examinatrice

Année universitaire : 2018/2019



Remerciements

*Avant tout propos, nous remercions DIEU le tout puissant de nous avoir donné le courage, la force et la volonté pour mener à ce travail. Nous adressons nos remerciements les plus chaleureux au professeur **MAMOU MARZOUK** maître de conférence classe A et chef de service du laboratoire central de Balwa.*

Nous vous remercions vivement d'avoir accepté d'encadrer notre travail, et d'assurer l'accessibilité et la disponibilité à l'ensemble de matériel utilisés dans notre travail. C'est avec un immense honneur et un grand privilège de travailler sous votre direction.

Nous rendons hommage à votre sérieux, humanisme, dynamisme et à votre haute compétence.

*Nous remercions aussi chaleureusement nos Co-promoteurs Résidents en chimie analytique. **Dr AKLI KARIMA** et **Dr BRAHIMI RABAH**.*

Nous tenons de vous exprimer notre profonde gratitude pour votre soutien physique, moral, votre sérieux, votre disponibilité et précieuse aide, large contribution qui nous a permis d'accomplir notre travail. Nous sommes aussi très heureux de l'honneur que vous nous avez fait en nous guidant, nous conciliant et en nous consacrant une grande partie de votre temps précieux.

*Nous tenons à exprimer notre grand respect et notre gratitude à **Dr TAMAZIRT BOUSSAD** pour ses conseils précieux et son soutien moral à tout moment depuis le début jusqu'à la fin de notre travail on vous remercies infiniment.*

*Nous adressons nos remerciements les plus sincères à **Pr HOCINE SMAIL** qui nous a fait l'honneur de prendre connaissance de ce travail et de présider ce jury. Trouvez ici Monsieur, l'expression de notre profonde reconnaissance. Toute notre gratitude à **Mme BELMAHDI LILA** et **Mme HIKEM DJAMILA** de nous avoir fait l'honneur de participer à ce jury.*

*Nous tenons aussi à remercier toutes les personnes qui ont participé à notre encadrement notamment **Dr BOURSOUTI MOURAD**, et toute l'équipe du laboratoire de chimie analytique.*



Dédicaces

*Merci mon Dieu de m'avoir donné la capacité d'écrire et de réfléchir, la force d'y croire,
la patience d'aller jusqu'au bout de ce mémoire et la chance d'avoir des bons conditionnements de travail.*

*A ma chère mère **LOUIZA** et mon cher père **MEZIANE** symbole de sacrifice, de tendresse et d'amour, Vous avez comblés ma vie de tendresse d'affection et de compréhension.*

Rien au monde ne pourrait compenser les efforts et les sacrifices que vous avez consentis pour mon bien être, et la poursuite de mes études dans de bonnes conditions.

C'est à travers vos encouragements que j'en suis arrivée là, et c'est à travers vos critiques que je me suis réalisée. J'espère avoir répondu aux espoirs que vous avez fondés en moi et réalisés aujourd'hui l'un de vos rêves

Aucune dédicace, ne saurait exprimer à sa juste valeur le profond amour que je vous porte. Puisse Dieu, vous procure santé, bonheur et longue vie.

*A ma chère sœur ; **GHANIA**, je vous remercie pour la bonne ambiance qui a joué un grand rôle dans l'aboutissement de ce mémoire. Merci beaucoup pour votre gentillesse, bonne humeur et la chaleur familiale avec la quelle vous m'avez entouré, que Dieu vous garde et vous protège.*

*A mes très chers frères : **HAKIM, KARIM, YUCEF, RABAH**
Avec tous mes vœux de bonheur, de santé et de réussite.*

*A mes belles sœurs : **GHNIMA, DJAMILA***

*A mes petites nièces : **LILIA, MELENA, DANIA,***

Qui ont égayé ma vie, je vous aime

*A mon beau-frère **RACHID***

*A ma copine et sœur **LYDIA**, je vous remercie infiniment pour les cinq ans universitaires passés, je me rappellerai toujours de tous les bons moments que nous avons partagé ensemble et qui resteront gravé dans ma mémoire.*

*A **SONIA**, je ne sais comment vous remercieriez, je vous souhaite que le meilleur des meilleurs, vous seriez toujours graver dans ma mémoire.*

*A mon binôme **SARA**, toute la famille **LAKHDARI** et à tous ceux qui ont contribué de près ou de loin pour que ce projet soit possible, je vous dis un **GRAND MERCI.***

Fazia





Dédicaces

C'est avec la plus grande émotion et la plus grande joie que je dédie ce modeste travail à :

*Mon cher père **Ali** et ma très chère maman **Zineb**, à qui je dois tout dans la vie ceux qui m'ont élevé ; ceux que tout les mots ne suffisent pour exprimer mon amour et ma gratitude ; je leur souhaite une longue vie plein de santé, joie et de bonheur inchallah.*

Tous les mots du monde ne sauraient exprimer l'immense amour que je vous porte, ni la profonde gratitude que je vous témoigne pour tous les efforts et les sacrifices que vous n'avez jamais cessé de consentir pour mon instruction et mon bien-être.

C'est à travers vos encouragements que j'en suis arrivée là, et c'est à travers vos critiques que je me suis réalisée. J'espère avoir répondu aux espoirs que vous avez fondés en moi et réalisé aujourd'hui l'un de vos rêves ;

*Mes chers frères : **Massi** , **Anis**, **Samy** , **Smail** et chères sœurs **Céline**, **Siham**, **Manel** et **Amina** ;*

*Ma futur belle famille **Ouladbrahim** précisément : **Aissa**, **Fatima** ; Les mots ne suffisent guère pour exprimer l'attachement ; l'Amour et l'affection que je porte pour vous mes fidèles compagnons dans les moments les plus délicats de cette vie mystérieuse, je vous dédie ce travail avec tous mes vœux de bonheur de santé et de réussite.*

*Ma binôme **Fazia** et toute sa famille.*

*Mes copines à la cité universitaire : **Imane**, **Sonia**, **Radia**, **Yamina**, **Massiva** et **Fadma**.*

Sara



Glossaire

Assurance qualité

Selon la norme **ISO 8402** « C'est l'ensemble des actions préétablies et systématiques mises en œuvre dans le cadre du système qualité, et démontrées en tant que de besoin pour donner la confiance appropriée en ce qu'un produit ou service satisfera aux exigences données relatives à la qualité ».

FOOD and Drugs Administration (FDA)

C'est un service du gouvernement américain responsable de la pharmacovigilance, c'est-à-dire des études, du contrôle et de la réglementation des médicaments avant leur commercialisation.

ISO/CEI 17025

C'est une norme internationale qui spécifie les exigences générales concernant la compétence des laboratoires d'étalonnages et d'essais

Pharmacopée

C'est un recueil à caractère officiel et réglementaire des matières premières autorisées pour la fabrication des médicaments. Elle contient les monographies des substances thérapeutiques, elle regroupe tous les médicaments qui peuvent être délivrés par un pharmacien et indique leurs dénominations communes, leurs caractères, les méthodes d'essai et d'analyse, les méthodes de conservation etc.

Placebo

C'est substance sans efficacité pharmacologique mais dont l'effet psychologique peut, chez certains malades, jouer un rôle.

Qualité

La norme **ISO 8402-94** définit la qualité comme suit : « L'ensemble des caractéristiques
BCS : Le système de classification biopharmaceutique est créé par la FDA, il permet de classer les composés pharmaceutiques selon leur solubilité aqueuse et leur perméabilité intestinale. C'est l'un des outils de pronostic les plus efficaces facilitant le développement (le BCS a été proposé par G. Amidon en 1995). En combinant le BCS avec la dissolution du composé on prend en compte les deux facteurs majeurs gouvernant le taux et l'ampleur de l'absorption d'une molécule candidate : la dissolution et la perméabilité intestinale. En 2005, Wu et Benet ont ajouté le troisième facteur clé (l'effet de premier passage hépato-gastrointestinal), le système de classification est alors appelé biopharmaceutical Drug Disposition Classification System (BDDCS) En effet, connaissant ceux ci, on augmente les

capacités de prédictions des effets de certaines variables, telles que la formulation, la nourriture et les maladies, qui altèrent l'absorption par voie orale des molécules [Chen, Antman, Gesenberget *al*, 2006] .

Liste des abréviations

AMM : Autorisation de Mise sur le Marché

BCS : Biopharmaceutical Classification System

BPF : Bonnes Pratiques de Fabrication

Cp : comprimé

CV : Coefficient de variation

DCI : Dénomination Commune Internationale

FDA : Food and Drug Administration

HPLC : High Performance Liquid Chromatography

ICH : Internationale Conference of Harmonization

ISO : International Standard Organisation

IUPAC : International Union of Pure and Applied Chemistry

MSE: Mean Squared Error

MSM: Mean Square Model

LD : Limite de Détection

LP : Libération prolongée

LQ : Limite de Quantification

LQ_{inf} : Limite de Quantification inférieure

LQ_{sup} : Limite de Quantification supérieure

PA : Principe Actif

QSP : Quantité Suffisante Pour

SCE : Somme des Carrés des Ecart

SE : Standard d'Etalonnage

SFSTP : Société Française des Sciences et Techniques Pharmaceutiques

SV : Standard de Validation

UV : Ultra-Violet

USP : united states pharmacopeia

Liste des figures

Figure 1: Structure chimique du chlorhydrate de Metformin	3
Figure 2: La réaction de la diméthylamine chlorhydrate et 2-cyanoguanidine (dicyandiamide)	5
Figure 3: Résumé des principaux effets de la metformine	6
Figure 4: Logigramme permettant de sélectionner un protocole de validation.....	12
Figure 5: Chromatogramme du diluant non chargé	20
Figure 6: Chromatogramme du diluant avec placebo non chargé de PA.....	20
Figure 7:Chromatogramme du standard d'étalonnage niveau 120%.....	21
Figure 8: Chromatogramme du standard de validation, niveau 120%	21
Figure 9 : Superposition des courbes d'étalonnage et de validation de metformine.....	24
Figure10: Courbes d'étalonnage obtenues avec la fonction $y= ax+b$	25
Figure 11 : Courbes d'étalonnage obtenues avec la fonction $Y=Ax$	25
Figure12 : Courbes d'étalonnage obtenues avec la fonction $\sqrt{y}=f(\sqrt{x})$	26
Figure 13 : Courbes d'étalonnage obtenues avec la fonction $\text{Ln } y= f(\text{Ln } x)$	27
Figure 14 : Profil d'exactitude de la méthode de dosage de metformine HCL.....	33
Figure 15 : droite de régression linéaire entre les quantités prédites et les quantités introduite	35

Liste des tableaux

Tableau I: Composition qualitative de la Metformine comprimé en principe actif et en excipients...	4
Tableau II : Propriétés physicochimiques du chlorhydrate de Metformine.....	4
Tableau III: Choix du nombre de standards d'étalonnage et de validation en fonction du protocole.....	13
Tableau IV : Appareillage utilisé.....	14
Tableau V: Verreries et autres matériels utilisés	15
Tableau VI : Matières premières utilisées dans le présent travail	15
Tableau VII : Préparation des solutions SE.....	17
Tableau VIII : Préparation des solutions SV.....	17
Tableau IX : Changement des paramètres pour l'étude de la robustesse.....	18
Tableau X : Plan d'expérience pour l'étude de la robustesse du dosage de métronidazole par HPLC ..	18
Tableau XI : Conditions chromatographiques	19
Tableau XII : Résultats de la superposition des quatre chromatogrammes.....	21
Tableau XIII : Données brutes obtenues sur le SE.....	22
Tableau XIV : Comparaison de la pente et l'ordonnée à l'origine avec 0 sur la gamme d'étalonnage	22
Tableau XV : Données brutes obtenues sur le SV	23
Tableau XVI: Comparaison de la pente et l'ordonnée à l'origine avec 0 sur la gamme de validation.....	23
Tableau XVII: Comparaison des deux pentes par le test du Student	23
Tableau XVIII: Résultats obtenus pour la fonction $y=ax+b$	24
Tableau XIX: Résultats obtenus pour la fonction $\sqrt{y}=f(\sqrt{x})$	26
Tableau XX: Résultats obtenus pour la fonction $\ln y=f(\ln x)$	27
Tableau XXI: Profil d'exactitude de différents Modèles de fonction de réponse	28
Tableau XXII: Alignement des observations sur SV	30
Tableau XXIII: Prédications inverses obtenus à partir des SV.....	30

Tableau XXIV: Calcul de la justesse pour chaque niveau des SV	31
Tableau XXV : Calcul de fidélité pour chaque niveau des SV.....	31
Tableau XXVI: Résultats du calcul de l'exactitude relative	32
Tableau XXVII: Calcul de l'erreur totale pour chaque niveau de concentration des SV	32
Tableau XXVIII : Intervalle de tolérance.....	32
Tableau XXIX: Paramètres de la linéarité de la méthode de dosage du metformine.....	34
Tableau XXX: Etude statistique de la linéarité : masse prédites en fonctions des masses introduites.....	35
Tableau XXXI : Donnés brutes de l'étude de la robustesse	37
Tableau XXXII: Calcul des effets des paramètres et leurs intervalles de confiance pour l'étude la robustesse metformine.....	37
Tableau XXXIII : Signification des résultats de la comparaison des pentes et des ordonnées à l'origine avec 0.....	38
Tableau XXXIV: signification des résultats de la comparaison des deux pentes et des deux ordonnées à l'origine entre elles.....	38

Objectif

L'objectif de notre travail est de mettre au point et valider une méthode analytique de dosage d'un antidiabétique oral : la metformine par Chromatographie Liquide à Haute performance afin d'être appliquée en routine en utilisant le profil d'exactitude comme outil de décision. Ce dernier est décrit dans le guide de validation élaboré par une commission de la Société Française des Sciences Techniques et Pharmaceutiques (SFSTP), publié dans la revue STP Pharma Pratique en Janvier 2006.

Sommaire

Introduction	1
Objectif.....	2

Partie bibliographique

Chapitre I : metformine

1. Diabète.....	4
2. Généralités sur la Metformine	4
2.1 Définition Metformine HCl.....	4
3. Propriétés physicochimiques de la Metformine HCl.....	5
4. Synthèse de la metformine	6
5. Mécanisme d'action de la metformine	6

Chapitre II : validation analytique

1. Contexte réglementaire.....	9
2. Définitions	10
3. Procédures analytiques à valider	10
4. Objectifs de la validation analytique	10
5. Critères de validation	11
5.1. Spécificité (sélectivité)	11
5.2. Fonction de réponse (courbe d'étalonnage.....	11
5.3. Linéarité	11
5.4. Fidélité	11
5.5. Justesse.....	12
5.6. Exactitude.....	12
5.7. Limite de quantification (LQ)	12
5.8. Intervalle de dosage.....	12
5.9. Robustesse.....	12
6. Choix des critères de la validation	13
7 .Protocole de validation	13

Partie pratique

1. Matériel et méthodes	18
1.1. Matériels.....	18
1.1.1 Appareillage	18
1.1.2. Verrerie et autres	19
1.1.3. Matières premières	19
1. 2. Méthodes	19
1.2.1. Méthodologie de la validation analytique	19
1.2.2. Choix du Protocole de validation	19
1.2.3. Choix des paramètres de validation.....	20
1.2.4. Préparation des solutions.....	20
1.2.4.1. Diluant.....	20
1.2.4.2. Préparation de la solution placebo.....	20
1.2.4.3. Préparation de la phase mobile	20
1.2.4.4. Préparation des solutions des SE.....	20
1.2.4.5. Solution des standards de validation	21
1.2.5. Robustesse	21
2. Conditions chromatographiques	23
3. Préparation de la feuille de calcul	23
3.1. Spécificité et effet matrice	23
3.1.1. Comparaison des chromatogrammes.....	23
3.1.2. Vérification de l'absence d'effet matrice et d'erreur systématique.....	28
3.1.3. Confirmation de la spécificité sur les deux gammes d'étalonnage et de validation.....	28
3.2. Fonctions de réponse.....	29
3.2.1..Modèle : $Y=ax+b$	29
3.2.2. Modèle : $\sqrt{y}=f(\sqrt{x})$	30
3.2.3. Modèle : $\text{Ln } y= f (\text{Ln } x)$	31
3.2.4.Modèle : $Y=Ax$	33
3.2.5. Critères de choix de la fonction de réponse.....	33
3.3. Alignement des observations	36

3.4. Prédications inverses.....	37
3.5. Justesse.....	38
3.6. Fidélité.....	38
3.7. Exactitude.....	39
3.8. Erreur totale.....	39
3.9. Intervalle de tolérance.....	40
3.10. Profil d'exactitude.....	40
3.11. Linéarité.....	41
3.12. Limites de quantification et intervalle de dosage.....	42

Discussion

1. Spécificité.....	43
1.1. Comparaison des chromatogrammes.....	43
1.2. Confirmation de la spécificité sur les deux gammes d'étalonnage et de validation.....	43
1.3. Comparaison des deux pentes des deux droites de régression.....	43
2. Le choix de la fonction de réponse.....	44
3. Conditions de choix de la fonction de réponse.....	44
4. Critères de performance de la fonction de réponse choisie.....	44
4.1. Justesse.....	44
4.2. Fidélité.....	44
5. Critère de décision sur la validité de la méthode.....	45
5.1. Erreur totale.....	45
5.2. Profil d'exactitude.....	45
5.3. Intervalle de dosage, limites de quantification, intervalle de validité.....	45
5.4. Linéarité.....	45
6. Robustesse.....	46

Conclusion.....	47
------------------------	-----------

Références bibliographique

Annexes

Résumé

INTRODUCTION GENERALE

Introduction générale

La metformine est utilisée avec succès depuis plus d'un demi-siècle dans le traitement du diabète de type 2 grâce à son efficacité et ses effets secondaires limités, la metformine est recommandée, en l'absence de contre-indications, comme l'antidiabétique oral de première intention.

La metformine réduit l'hyperglycémie sans risque d'hypoglycémie contrairement à d'autres antidiabétiques comme les sulfonylurées et l'insuline.

Le dosage du metformine dans les produits pharmaceutiques s'effectue habituellement par protométrie en milieu anhydre selon british pharmacopea et par spectrophotométrie UV-Visible selon l'USP. Ces méthodes connues pour leur simplicité et leur rapidité d'exécution ne sont pas dépourvues d'inconvénients, leur limite principale consiste en manque de sélectivité. Afin de palier à cette insuffisance les méthodes chromatographiques occupent une place primordiale

La chromatographie liquide à haute performance (HPLC) connue pour ses nombreux avantages tant sur le plan qualitatif que sur le plan quantitatif, offre entre autres une meilleure sélectivité et précision.

Cependant, Toute mise au point d'une nouvelle méthode d'analyse doit faire l'objet d'une validation analytique avant sa mise en routine,

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

Notre étude porte sur la mise au point et validation d'une méthode qui va nous permettre de doser la metformine par HPLC en appliquant le protocole de la SFSTP 2006.

Et pour cela nous avons scindé notre travail en deux parties : la première est consacrée à la synthèse bibliographique et est répartie en deux chapitres :

Chapitre I : Anti diabétique orale : metformine

Chapitre II : validation analytique

La seconde partie est dédiée à la pratique de notre travail où nous définissons les équipements, les méthodes utilisées, ainsi, nous décrivons les protocoles expérimentaux suivis lors de la mise au point de la méthode de dosage de la metformine par HPLC.

Nous présenterons et nous discuterons les résultats obtenus et conclurons à la fin la validité de la méthode analytique objet de l'étude.

Objectif

L'objectif de notre travail est de mettre au point et de valider une méthode de dosage du metformine dans les comprimés de 850 mg par Chromatographie Liquide à Haute performance (HPLC) en vue de son utilisation future dans le contrôle de qualité par les industries pharmaceutiques. Cette validation est basée sur l'utilisation du profil d'exactitude comme outil de décision.

PARTIE THOEORIQUE

CHAPITRE I
METFORMINE

1. Diabète

Définition

Le diabète est une maladie chronique caractérisée par la présence d'un excès de sucre dans le sang appelé hyperglycémie. Il est avéré si le taux de glycémie à jeun est égal ou supérieur à 1,26 g/l ou 7 mmol/l de sang lors de deux dosages successifs [1].

On distingue 2 types de diabètes : diabète insipide qui se traduit par une émission d'urine très importante et le diabète sucré désigne un groupe de maladies métaboliques caractérisées par une hyperglycémie chronique résultante d'un défaut de la sécrétion de l'insuline et/ou de l'action de cette hormone [2].

Il existe deux types de diabète sucré :

- Le diabète dit « de type 1 » : dû à une absence de sécrétion d'insuline par le pancréas ;
- Le diabète dit « de type 2 », dû à une mauvaise utilisation de l'insuline par les cellules de l'organisme. Son développement se fait très progressivement, de façon insidieuse sur de nombreuses années [1].

2. Généralités sur la Metformine

2.1. Définition MetformineHCl

La 1,1 diméthylbiguanide chlorhydrate est le seul dérivé de biguanide sur le marché, administrée par voie orale, d'une dose initiale de 500 ou 850 et 1000 mg, 2 à 3 fois par jour [2].

La Metformine est une molécule dotée d'un comportement basique, le motif guanidine qui la compose présente des caractéristiques particulières dues en grande partie à son pKa de 11.5 donc à sa grande aptitude à la protonation dans les milieux biologiques au pH physiologique (milieu gastro-intestinal) [3].

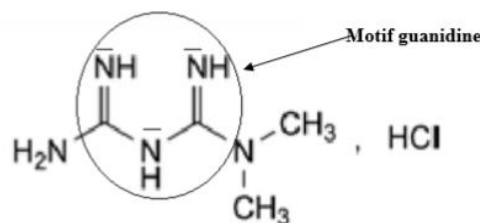


Figure 1: Structure chimique du chlorhydrate de Metformine [4].

La metformine présente des effets anti hyperglycémiant, elle améliore l'hyperglycémie en particulier la glycémie basale et postprandiale en diminuant la production

Chapitre I : Metformine

de glucose dans le foie. Ne stimule pas la sécrétion d'insuline et ne provoque pas d'hypoglycémie [2].

Tableau I: Composition qualitative de la Metformine comprimé en principe actif et en excipients [2]

Composition	Dénomination
Principe actif	Chlorhydrate de Metformine
Excipients	Providone
	Polyéthylène glycol 6000
	Sorbitol 100%
	Stéarate de magnésium

3. Propriétés physicochimiques de la Metformine HCl

Les propriétés physicochimiques de la Metformine HCl sont regroupées dans le tableau III ci-dessous :

Tableau II : Propriétés physicochimiques du chlorhydrate de Metformine [4].

Metformine HCl	Propriétés physicochimiques / organoleptiques
Nomenclature	Chlorhydrate de 1,1-diméthylbiguanide
Formule brute	$C_4H_{11}N_5HCl$
Aspect	Cristaux blancs ou sensiblement blancs
Masse molaire (g/mole)	165,62
Point de fusion (°C)	222-226
Teneur(%)	98,5-101(substance desséchée)
Solubilité	Facilement soluble dans l'eau, peu soluble dans l'alcool, pratiquement insoluble dans l'acétone et dans le chlorure de méthylène

4. Synthèse de la metformine

La synthèse de la Metformine, initialement décrite en 1922 et reproduite dans plusieurs brevets et publications ultérieures, implique la réaction de la diméthylamine chlorhydrate et 2-cyanoguanidine (dicyandiamide) avec chauffage [5].

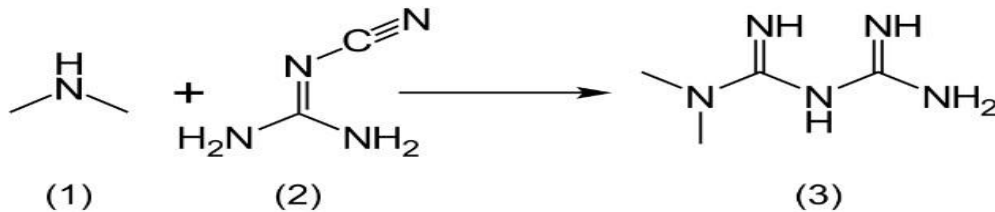


Figure 2 : La réaction de la diméthylamine chlorhydrate et 2-cyanoguanidine (dicyandiamide) [6]

La metformine était synthétisée à l'aide d'une procédure décrite dans le brevet 1975 Aron, et l'Encyclopédie Fabrication de Produits pharmaceutiques, en une étape impliquant la réaction du chlorhydrate de diméthylamine de la 2-cyanoguanidine (dicyandiamide) lors d'un chauffage à des températures plus élevées. Des quantités équimolaires de diméthylamine et de 2-cyanoguanidine sont transformées en une solution utilisant du toluène en tant que solvant ; avec une addition graduelle d'équimolaire de chlorure d'hydrogène, la solution commence à bouillir et lors du refroidissement, une précipitation se produit. Le précipité formé est le chlorhydrate de diamide de N,N-diméthylimidodicarbonimidique avec un rendement de 96% qui est le chlorhydrate de metformine[6] .

La synthèse de la metformine peut avoir un équilibre entre le chlorhydrate de méthylamine et la diméthylamine libre cette dernière attaquant le diméthylformamide[7]

5. Mécanisme d'action de la metformine

La metformine exerce ses effets antidiabétiques principalement au niveau du foie par l'inhibition de la gluconéogenèse et, dans une moindre mesure, au niveau de l'intestin et du muscle, pour aboutir à une diminution de l'hyperglycémie et des lipides circulants, ainsi qu'à une augmentation de la sensibilité à l'insuline.

Ces améliorations procurent de manière indirecte une protection cardiovasculaire et un effet antitumoral. De plus, la metformine réduit de manière directe le risque de maladies cardiovasculaires par des actions affectant à la fois les systèmes macro- et micro-vasculaires, et produit une action antitumorale directement sur les cellules cancéreuses. Par ailleurs, la metformine aurait un effet neuroprotecteur dans les pathologies neurodégénératives.

Les effets bénéfiques de la metformine s'apparentent à ceux observés au cours de la restriction calorique, lesquels concourent à prolonger l'espérance de vie. Ainsi, la metformine

Chapitre I : Metformine

peut être considérée comme un mimétique de la restriction calorique qui pourrait avoir des propriétés anti-âge.

Formation de protéines glyquées, qui sont à l'origine d'un stress oxydant cellulaire et d'une inflammation. En raison des effets vasculaires et des propriétés anti-athérogènes de la metformine, son utilisation pourrait être étendue aux patients non diabétiques présentant un risque de développer des pathologies vasculaires (figure 3) [8].

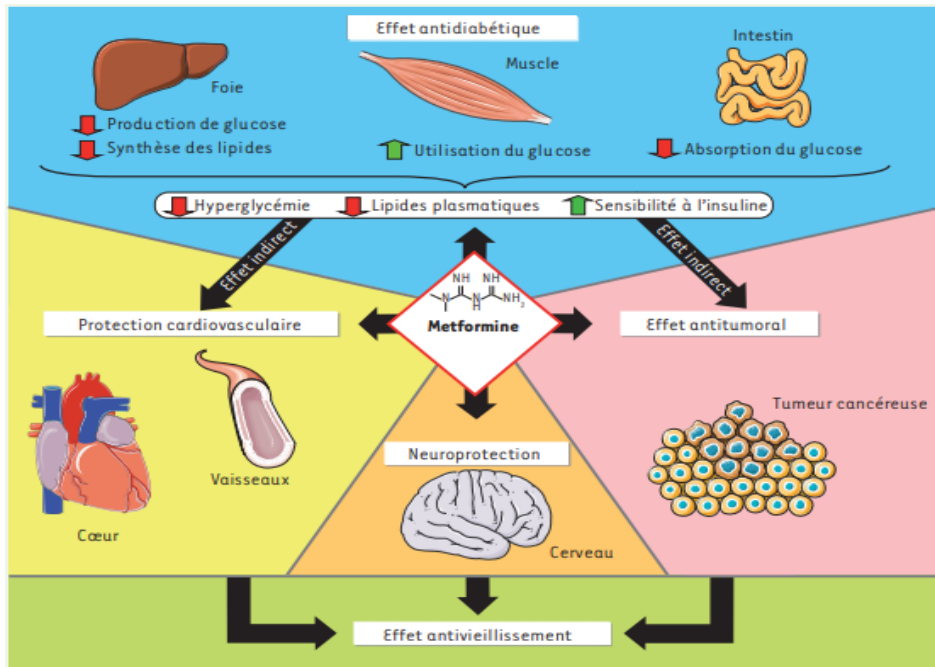


Figure 3: Résumé des principaux effets de la metformine [8]

CHAPITRE II
VALIDATION DES METHODES
ANALYTIQUES

1. Contexte réglementaire

Des directives sur la validation des méthodes analytiques sont fournies dans des publications comme les guidelines ICH, notamment la guideline ICH Q2 (R1) parue en 2005 : « Validation of Analytical Procedures : Text and Methodology ». Son but est de fournir des recommandations sur la manière d'appréhender les différentes caractéristiques de la validation pour chaque méthode analytique.

En outre, le document fournit une indication sur les données qui devraient être représentées dans un dossier d'enregistrement. Cette guideline est une exigence réglementaire. Toute validation de méthode analytique présentée dans un dossier d'AMM (Autorisation de Mise sur le Marché) doit répondre à ses exigences.

Il existe également des publications ne constituant pas des exigences réglementaires, comme les guides de validation analytique élaborés par des commissions techniques de la Société Française des Sciences et Techniques Pharmaceutique (SFSTP), parmi ces guides on site ;

- Guide de validation analytique – Rapport d'une commission de la SFSTP :
Partie I : Méthodologie, paru dans STP Pharma Pratique. En juin 1992 ;
Partie II : Exemples d'application, paru dans STP Pharma Pratique en juin 1992.
- Guide de validation analytique – Rapport d'une commission de la SFSTP : « Méthodes chromatographiques de dosage dans les milieux biologiques : stratégie de validation. Rapport d'une commission SFSTP » paru dans STP Pharma Pratique en 1997.
- SFSTP « Validation des procédures analytiques quantitatives : Harmonisation des démarches ».
Partie I. Généralités, paru dans STP Pharma Pratique en 2003
Partie II. Statistiques, paru dans STP Pharma Prat. en 2006
Partie III. Exemples d'application, paru dans STP Pharma Prat. En 2006

Ces guides ont été élaborés dans le but d'aider les industriels à valider leurs procédures analytiques en appliquant les recommandations réglementaires, dans le but d'obtenir une AMM[9].

2. Définitions

La clause 5.4.5.1.de la norme ISO 17025 (2005) définit ainsi la **validation**: « La validation est la confirmation par examen et apport de preuves objectives du fait que les exigences particulières en vue d'une utilisation prévue déterminée sont remplies » [9].

En fait, selon la norme U47-600-1, cette confirmation « consiste à comparer les valeurs des critères de performance déterminées au cours de l'étude de caractérisation de la méthode à celles attendues ou assignées au préalable (limites d'acceptabilité, objectifs à atteindre), puis à déclarer la méthode d'analyse valide ou non valide »[10].

3. Procédures analytiques à valider

- La validation analytique concerne ;
- Les méthodes conçues/développées par le laboratoire ;
- Les méthodes normalisées employées en dehors de leur domaine d'application prévu ;
- Les amplifications ou modifications de méthodes normalisées [11].

4. Objectifs de la validation analytique

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

Les objectifs de la validation ne sont pas seulement d'obtenir une estimation de lajustesse, du biais ou de la fidélité de la méthode, mais également d'évaluer lerisque statistique lié à son utilisation, qui peut être exprimé par l'incertitude demesure associée au résultat.

L'objectif d'une validation est de pouvoir donner au laboratoire et aux autoritéréglementaires la garantie que chaque résultat X qui sera obtenu dans le futur parla méthode d'analyse sera suffisamment proche de la vraie valeur V del'échantillon à doser.

Dans cette définition le terme « suffisamment proche » impose en premier lieu dechoisir la limite d'acceptabilité qui correspond à l'écart maximum λ accepté entre le résultat X obtenu par la méthode d'analyse et la valeur de référence V acceptéecomme valeur vraie.

$$|X - V| < \lambda$$

Chapitre II : Validation des méthodes analytiques

La limite d'acceptabilité λ doit être fixée en fonction des exigences réglementaires, et en fonction des performances de la méthode, en particulier de son incertitude.

Cette limite d'acceptabilité λ est de 1% à 2% pour le dosage d'une substance active dans une matière première et de 5% pour le dosage d'une substance active dans un produit fini.

Il est généralement admis qu'elle est de 15% pour le dosage de substance active dans des produits biologiques.

Pour apporter les garanties que l'équation soit vérifiée, il faut que la probabilité que $|X - V| < \lambda$ soit supérieure ou égale à une valeur minimale β (au moins 80%)

Probabilité $(|X - V| < \lambda) \geq \beta$ [10]

5. Critères de validation

La validation analytique porte généralement sur les critères suivants

5.1. Spécificité (sélectivité)

La spécificité d'une méthode analytique est sa capacité à établir de manière univoque l'existence, l'identification de la substance à analyser en présence d'autres composants susceptibles de l'accompagner (impuretés, interférences...).

5.2. Fonction de réponse (courbe d'étalonnage)

La fonction de réponse d'une méthode analytique exprime la relation existante entre la réponse (signal) et la concentration (quantité) en substance à examiner à l'intérieur de l'intervalle de dosage. La courbe d'étalonnage traduit une fonction de réponse monotone la plus simple. Cette relation est exprimée par une fonction f qui doit être monotone (strictement croissante ou décroissante).

5.3. Linéarité

La linéarité d'une méthode analytique est sa capacité à l'intérieur d'un certain intervalle de dosage à fournir des résultats directement proportionnels à la quantité ou à la concentration d'analyte dans l'échantillon. [Concentration calculé = fonction (concentration introduite)]

5.4. Fidélité

C'est l'étroitesse de l'accord entre une série de mesures répétées et effectuées sur un même échantillon homogène et dans des conditions constantes et déterminées, il faut tenir compte qu'elle n'est pas en rapport avec la valeur vraie ou spécifiée, elle traduit seulement la distribution des erreurs aléatoires, elle s'évalue à trois niveaux : la répétabilité, fidélité intermédiaire (intra laboratoire), et la reproductibilité (inter laboratoire); la définition de ces dernières est donnée ci-dessous :

- **Répétabilité** : c'est-à-dire que les résultats d'essais indépendants sont obtenus dans des conditions de répétabilité : qui veut dire : la même méthode, sur des échantillons d'essais

identiques, dans le même laboratoire, par le même opérateur, utilisant le même équipement et ceci pendant un court intervalle de temps.

- **Fidélité intermédiaire** : les résultats d'essais indépendants sont obtenus dans des conditions bien particulières, c'est-à-dire : la même méthode, sur des échantillons d'essais identiques, dans le même laboratoire, avec différents opérateurs et utilisant des équipements différents et ceci pendant un intervalle de temps donné.
- **Reproductibilité** : veut dire que les résultats d'essais sont obtenus dans des conditions de reproductibilité : la même méthode, des échantillons d'essais identiques mais dans différents laboratoires avec différents opérateurs et utilisant des équipements différents.

5.5. Justesse

Autrefois appelée exactitude ou exactitude de la moyenne, selon la norme ISO 5725, elle correspond à « l'étroitesse de l'accord entre la valeur moyenne obtenue à partir de larges séries de résultats d'essais et une valeur de référence acceptée », sa mesure est exprimée en termes de biais (relatifs, absolus) et recouvrements.

5.6. Exactitude

Exprime la somme de la justesse et fidélité, sa définition selon la norme ISO 5725, elle correspond à « l'étroitesse de l'accord entre le résultat d'essai et la valeur de référence acceptée communément appelée valeur conventionnellement vraie », cette étroitesse d'accord signifie la somme d'erreurs systématiques et aléatoires combinée qui est la résultante de l'erreur totale.

5.7. Limite de quantification (LQ)

C'est la plus petite quantité d'analyte pouvant être dosée dans un échantillon au cours d'une procédure d'analyse avec une exactitude définie dans les conditions expérimentales décrites dans la procédure.

5.8. Intervalle de dosage

Il définit les valeurs incluses entre les niveaux supérieurs et inférieurs pour lesquelles a été démontré que l'exactitude et la linéarité sont respectées dans la procédure selon la méthode utilisée.

5.9. Robustesse

C'est la capacité d'une méthode d'analyse à rendre des résultats exacts en présence de faibles changements de conditions expérimentales capable de se produire dans l'utilisation de cette procédure c'est-à-dire que cette méthode supporte ces changements, elle a pour but de définir les variations de chacun des paramètres opératoires qui peuvent modifier le résultat de l'analyse et de donner une idée sur la fiabilité de la méthode d'analyse[12].

6. Choix des critères de la validation

Il existe divers critères de validation dont le choix dépend de la méthode d'analyse, qu'elle soit qualitative ou quantitative ; ces derniers ne sont obligatoirement pas décrits en totalité pour chaque méthode mais également l'absence de l'un d'eux doit être justifiée et témoignée dans le rapport de caractérisation et de validation d'une méthode d'analyse [13].

Selon l'étape du processus de validation, ces critères sont classés en deux caractérisations :

- Caractérisation intra laboratoire : on a la spécificité, la sensibilité, la fidélité, la limite de détection et domaines de validité qui font partie des critères de performances qualitatives et quantitatives, tandis que la fonction d'étalonnage, la justesse, l'exactitude, linéarité et limite de quantification qui font partie des critères de performance quantitatives seulement.
- Caractérisation inter laboratoire : on a la reproductibilité, répétabilité ainsi que d'autres critères tels que le délai, la rapidité, le cout ... qui sont considérés comme étant critères de performance qualitatives et quantitatives, comme on a aussi la limite de détection, la spécificité, la sensibilité qui sont qualitatives uniquement et la limite de détection qui est quantitative.

Il faut noter qu'on peut avoir d'autres critères selon les exigences des référentiels.

7. Protocole de validation

La méthode de validation utilisant le profil d'exactitude comme outil de décision a été développée par une commission de la SFSTP (SFSTP 2003 et 2006), pour pallier aux faiblesses des guides de validation précédents.

Cette commission est repartie des objectifs fondamentaux de la validation analytique pour proposer un outil de décision permettant de prévoir avec quelle garantie une proportion donnée des résultats futurs seront compris dans les limites d'acceptabilité. Ceci permet de mieux intégrer les besoins de l'utilisateur final de la méthode analytique aux objectifs de la validation [9].

En accord avec les guides référentiels, les principaux objectifs de la phase de validation sont :

- Démontrer la spécificité ou la sélectivité
- Valider la fonction réponse ou modèle d'étalonnage utilisé en routine
- Estimer la fidélité
- Estimer la justesse
- Estimer l'exactitude
- Valider les seuils de quantification
- Valider l'intervalle de dosage
- Vérifier la linéarité de la procédure analytique

Chapitre II : Validation des méthodes analytiques

L'exactitude s'applique aux méthodes développées et mises au point ainsi la sélectivité ou spécificité, une fois cette dernière est étudiée on opère deux ensembles d'échantillons :

- Standard d'étalonnage (SE) : peuvent être réalisés sans la matrice (si on a démontré l'absence d'effet matrice) ou avec la matrice, utilisée pour évaluer les différentes fonctions de réponses $y=f(x)$ afin d'effectuer les prédictions inverses.
- Standard de validation (SV) : doivent toujours être réalisés avec la matrice, utilisé dans le but de déterminer l'erreur totale à chaque niveau de concentration, calculer l'intervalle de tolérance et tracer le profil d'exactitude et déterminer les limites inférieure et supérieure de quantification (intervalle de dosage).

En ce qui concerne la préparation des SE et SV, celle-ci dépend du protocole de validation choisi. Le logigramme de la figure 8 ci-dessous présente la démarche proposée dans le guide SFSTP 2003 pour sélectionner un protocole expérimental de la validation en fonction des contraintes ou des spécificités liées à la procédure de dosage sous épreuve [12].

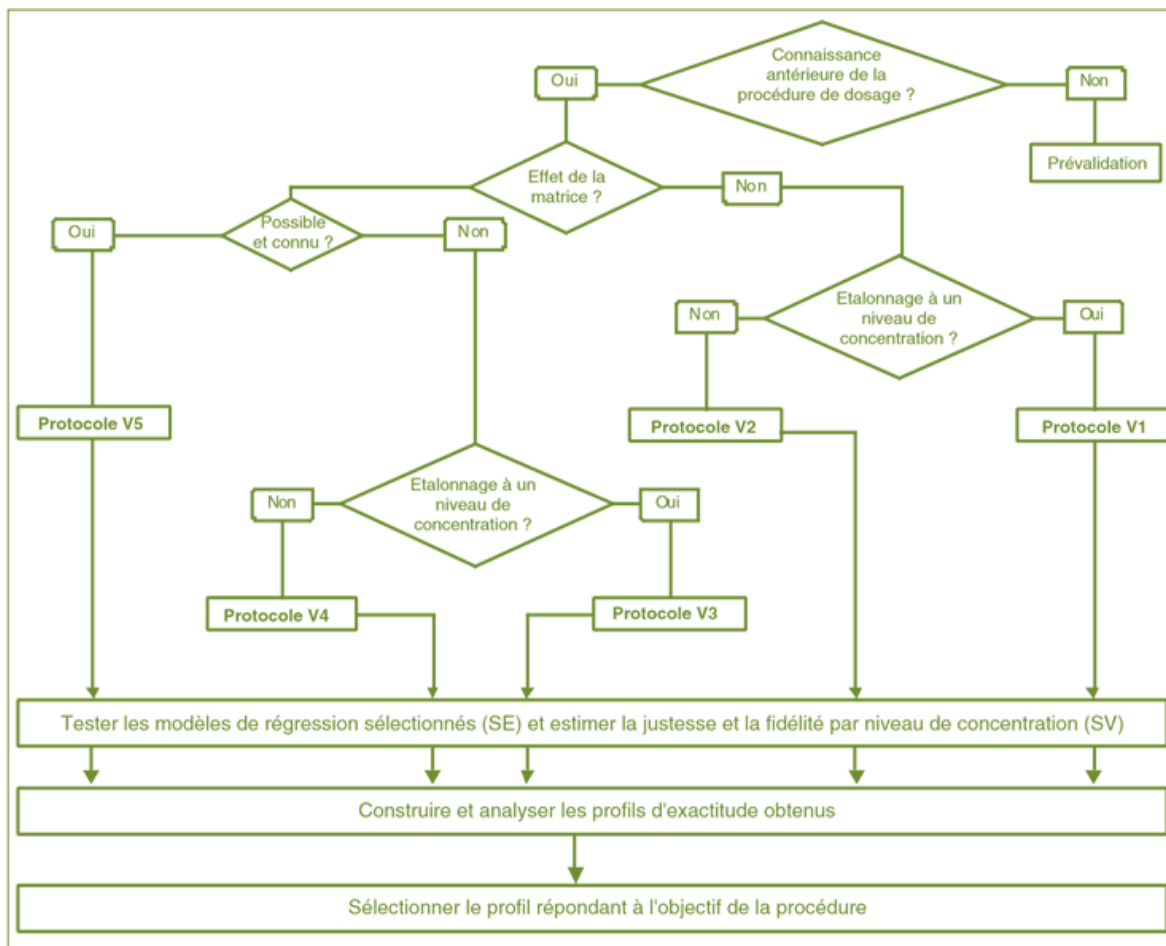


Figure 4: Logigramme permettant de sélectionner un protocole de validation [12]

Chapitre II : Validation des méthodes analytiques

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

Tableau III: Choix du nombre de standards d'étalonnage et de validation en fonction du protocole [14].

Standard	Niveau de concentration	Protocole				
		V1	V2	V3	V4	V5
SE. Etalonnage sans la matrice	Bas		2		2	
	Médian	2	2 ¹	2	2 ¹	
	Haut	2 ²	2	2 ²	2	
SE. Etalonnage avec la matrice	Bas				2	2
	Médian			2	2 ²	2 ²
	Haut			2 ¹	2	2
	Additif					2 ³
SV. Validation avec la matrice	Bas	3	3	3	3	3
	Médian	3	3	3	3	3
	Haut	3	3	3	3	3
SV. Validation avec la matrice		3	3	3	3	3
Nombre total essais (min)		33	45	39	63	45

- **1 :**Suppression possible du niveau de concentration médian pour l'étalonnage sur la base dumodèle de régression retenu pour exprimer la fonction de réponse (exemple : modèle plussimple comme le modèle mathématique des moindres carrés). Dans ce cas, le nombre total estde 39 essais pour les protocoles V2 (sans matrice) et V5 (avec la matrice). Le nombre d'essais est de 51 pour le protocole V4.
- **2 :** Sélection d'un niveau de concentration supérieure à la concentration cible pour l'étalonnage (exemple : 120% de la concentration cible).
- **3 :** Addition d'un niveau de concentration supplémentaire pour une fonction de réponse nécessitant un modèle plus complexe (exemple : fonction logistique à quatre paramètres) [14].

PARTIE PRATIQUE

MATERIEL
ET
METHODES

Ce travail étant focalisé sur la validation analytique de la méthode de dosage de la metformine dans les comprimés par HPLC, détection UV.

L'objectif principal étant de mettre au point et de valider une nouvelle méthode de dosage de metformine dans un antidiabétique oral sous forme de comprimé.

Le travail a été réalisé au niveau du laboratoire de chimie analytique du département de pharmacie de Tizi Ouzou. La validation a été faite selon le protocole proposé par une commission de la SFSTP parue dans la revue pharmaceutique SFSTP pharmaceutique en 2006 portant «validation des procédures analytiques: harmonisation des démarches»

1. Matériel et méthodes

1.1. Matériels

1.1.1 Appareillage

Tableau IV : Appareillage utilisé

Désignation		Spécification	Usage
HPLC (SHIMADZU LC20) Pompe	Pompe	Lc20 at	Dosage (obtention des chromatogrammes)
	Injecteur automatique	SIL 20 A	
	Contrôleur	CBM-20	
	Compartiment de la colonne	CTO-20 A	
	Colonne	C18 (25 cm)	
	Détecteur	Spectrophotomètre UV visible	
	Logiciel d'exploitation	LC-solution	
Distillateur		Lab. Tech	Eau distillée
Pompe à vide		Fisher BioblockScientificPmax = 4 bar	Filtration de la phase mobile
Sonicateur		Avantage-LAB	Solubilisation
Agitateurs magnétique		NAHITA ModeL690-1	Homogénéisation des solutions
Balances analytiques		KERN	Pesé
		METLER TOLEDO	
pH-mètre		METLER TOLEDO	Préparation du tampon
Etuve		MEMMERT	Séchage

1.1.2. Verrerie et autres

Tableau V: Verreries et autres matériels utilisés

Verrerie	Autres
<ul style="list-style-type: none"> - Fioles jaugées : 50 ml, 100 ml, 250 ml, 1000 ml, 2000 ml ; - Bêchers ; - Eprouvette : 1000 ml ; - Pipettes graduées : 20 ml ; - Pipettes jaugées : 5 ml ; - Entonnoirs ; - Vials ; 	<ul style="list-style-type: none"> - Micropipette : 1 ml ; - Poires ; - Pissettes ; - Spatules ; - Papier aluminium ; - Des flacons pour phase mobile ; - Les filtres millipores ; - Barreau magnétique ;

1.1.3. Matières premières

Tableau VI : Matières premières utilisées dans le présent travail

Matière première		Provenance
Principe actif	Metformine	ALDPH-NOVONORDISK ALGERIE
Excipients	Povidone, Polyéthylène glycole 6000, Stéarate de magnésium, sorbitol	Laboratoire de Chimie Analytique

1. 2. Méthodes

1.2.1. Méthodologie de la validation analytique

Inspiré des travaux d'une commission de la SFSTP (SFSTP 2006), ce nouveau protocole de validation se veut plus réaliste que les protocoles de validation avec critères, en essayant de garantir la qualité des résultats ultérieurs avec un risque connu prédéfini en fonction de la finalité de la méthode d'analyse à valider. **L'ensemble des critères de validation (spécificité, linéarité, justesse, fidélité, exactitude et limites de dosage) sont étudié simultanément sur les deux types de solutions standards, les standards d'étalonnage (SE) et les standards de validation (SV).**

1.2.2. Choix du Protocole de validation

Selon le logigramme de la figure 8 ainsi que le tableau VI qui nous permettent de sélectionner un protocole de validation sachant qu'il n'y a pas d'effet matrice et l'étalonnage ne se fait pas à un niveau de concentration, le protocole adopté dans notre étude est le **V2** ; en ajoutant deux points supplémentaires pour les SE, c'est-à-dire 5 niveaux de concentrations au lieu de trois car selon l'exigence ICH : les SV comportent 5 niveaux de concentrations afin d'aligner le nombre de points en SE et SV on a ajouté deux points supplémentaires pour avoir le même nombre de concentrations .

Cette modification apportée nous a amenés à appliquer le protocole nommée le **V2** modifié. Cela consiste selon SFSTP de préparer :

- Trois séries de standard d'étalonnage (SE) : Chaque série comporte 5 niveaux de concentrations avec 2 répétitions par niveau.
- Trois séries de standard de validation (SV) : Chaque série comporte 5 niveaux de concentrations avec 3 répétitions par niveau.

1.2.3. Choix des paramètres de validation

- Limite d'acceptabilité : $\lambda = 5\%$
- Probabilité de confiance (β) : $\beta = 95\%$ on choisit $\geq 95\%$ dans le domaine pharmaceutique.

1.2.4. Préparation des solutions

1.2.4.1. Diluant : Eau distillé

1.2.4.2. Préparation de la solution placebo : le placebo des comprimés de metformine est préparé au niveau du laboratoire de chimie analytique en se référant à la notice du médicament et en utilisant les recommandation décrites dans le référentiel HAND-BOOK of excipients en vue de reconstituer une composition quantitative adéquate du médicament.

A base du placebo reconstitué, une solution placebo est préparée en dissolvant 100 mg dans 50 ml d'eau. La solution ainsi obtenue est filtrée à travers un papier filtre.

1.2.4.3. Préparation de la phase mobile : la phase mobile utilisée est celle décrite dans la monographie de la matière première pour le test des substances apparentées. Elle correspond à une solution tampon aqueux à $\text{pH} = 3,0$.

Dans une fiole de 1 L, Peser 17g de phosphate d'ammonium monobasique ($\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$), dissoudre avec 950 ml d'eau, ajuster le pH à 3,0 avec une solution d'acide phosphorique et compléter à 1 L avec l'eau.

1.2.4.4. Préparation des solutions des SE :

Chaque jour, pendant 03 jours, 05 niveaux de concentration sont préparés à raison de 2 répétitions par niveau selon le tableau suivant :

Tableau VII : Préparation des solutions SE

Niveaux	80%		90%		100%		110%		120%	
Masse du metformineHCl	40 mg		45 mg		50 mg		55 mg		60 mg	
Répétitions	1	2	1	2	1	2	1	2	1	2
Protocole	<p>Pour chaque solution ;</p> <ul style="list-style-type: none"> – Peser la masse correspondant dans une fiole de 50 ml, dissoudre et compléter au trait de jauge avec l'eau (solution mère). – effectuer une dilution 10/50 dans l'eau. <p>Agiter par retournement et remplir les vials.</p>									
Nombre de solutions de SE	SE : 5x3x2=30 solutions (5 niveaux, 3 séries, 2 répétitions)									

1.2.4.5. Solution des standards de validation

Chaque jour, pendant les 03 jours, 05 niveaux de concentration sont préparés à raison de 3 répétitions par niveau selon le tableau suivant :

Tableau VIII : Préparation des solutions SV

Niveaux	80%		90%		100%		110%		120%	
Masse du metformine	40 mg		45 mg		50 mg		55 mg		60 mg	
Répétitions	1	2	1	2	1	2	1	2	1	2
Protocole	<p>Pour chaque solution ;</p> <ul style="list-style-type: none"> – Peser la masse correspondant dans une fiole de 50 ml, dissoudre et compléter au trait de jauge avec l'eau (solution mère). – Dans une fiole de 50 ml, ajouter 10 ml de la solution mère et 5 ml de la solution placebo, compléter au trait de jauge avec l'eau. <p>Agiter par retournement et remplir les vials.</p>									
Nombre de solutions de SV	SE : 5 x 3 x 3 = 45 solutions (5 niveaux, 3 séries, 3 répétitions)									

1.2.5. Robustesse

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

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

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

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

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

	Paramètre A Concentration en kétoprofène en %	Paramètre B Débit de la phase mobile	Paramètre C Longueur d'onde de détection
Valeur nominale	100 %	2 ml/min	218 nm
Variation	± 5%	± 0,4 ml/mn	± 2 nm
Niveau bas (-)	95%	1,6 ml/min	216 nm
Niveau haut (+)	105%	2,4 ml/min	220 nm

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

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

Les échantillons 01 et 02 sont analysés pour chacune des débits de la phase mobile à deux longueurs d'onde différentes ; 216 nm et 220 nm.

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

Tableau X : Plan d'expérience pour l'étude de la robustesse du dosage de métronidazole par HPLC

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

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

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

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

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

$$\text{Intervalle de confiance} = \text{Effet} \pm 0.836 \sigma_{\text{exp}}$$

RESULTATS
ET
DISCUSSIONS

2. Résultat et discussions

2.1. Résultats

2.1.1. Résultat de l'étape de mise au point

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

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

Résultats de mise au point de la méthode du dosage de metformine :
Tableau XI : Conditions chromatographiques

Colonne	Longueur	250mm
	Diamètre	4.6mm
	Taille des particules	10µm
	Phase stationnaire	Gel de silice de forme irrégulière sur lequel ont été greffés des groupements acide benzène sulfonique
Phase mobile	Tampon pH 3,0	
Volume d'injection	20 µl	
Temps d'analyse	08 min	
Débit	2 ml/min	
Détection	Spectrophotomètre UV-Visible : longueur d'onde $\lambda_v=218\text{nm}$	
Température	Ambiante	

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

Diluant : Eau

Solution standard (SE 100%) : dans une fiole de 50 ml, peser 50 mg de metformine HCl standard, dissoudre dans un volume suffisant d'eau et compléter au trait de jauge avec le même solvant. Effectuer une dilution 1/5^{ième} dans l'eau.

Solution échantillon (SV 100%) : dans une fiole de 50 ml, peser une quantité du médicament (forme pharmaceutique reconstituée) contenant 50 mg de metformine HCl standard, dissoudre dans un volume suffisant d'eau et compléter au trait de jauge avec le même solvant, filtrer à travers un filtre seringue ou sur papier filtre. Effectuer une dilution 1/5^{ième} dans l'eau.

2.1.2. Résultats de l'étape de validation

2.1.2.1. Spécificité

La spécificité de la méthode analytique est démontrée à l'aide d'une approche empirique qui consiste à comparer les chromatogrammes obtenus à partir du diluant, des solutions placebo, SE 120% et SV 120% et d'une approche statistique qui consiste à comparer les pentes obtenues à partir des gammes SE et SV.

A. Approche empirique

Les résultats obtenus sont illustrés dans les figures ci-dessous ;

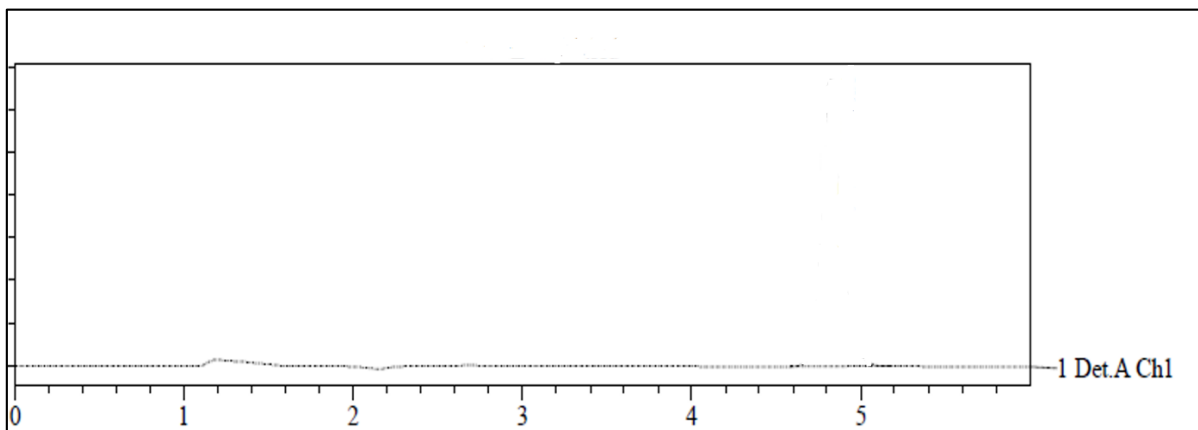


Figure 5:Chromatogramme obtenu à partir du diluant

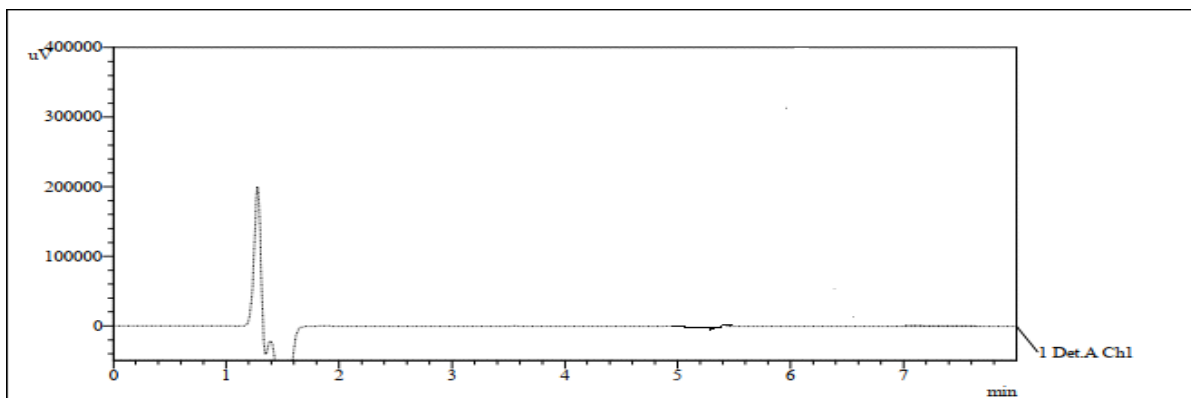


Figure 6:Chromatogramme obtenu à partir du placebo

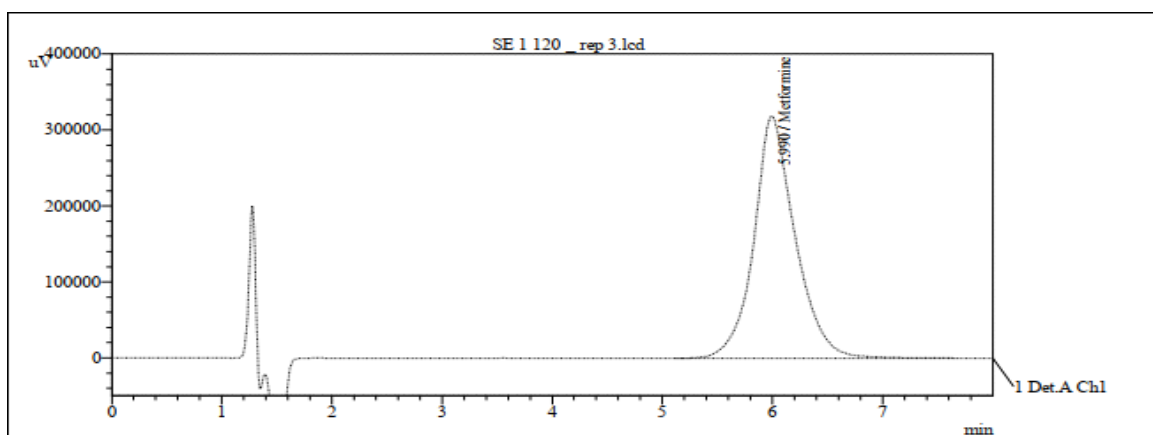


Figure 7 :Chromatogramme du standard d'étalonnage niveau 120%

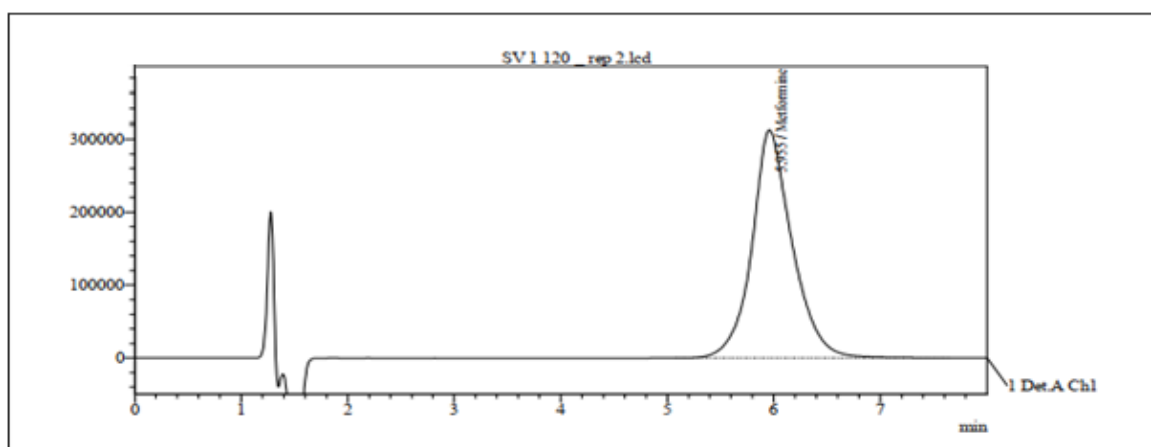


Figure 8:Chromatogramme du standard de validation, niveau 120%

Le tableau suivant présente les résultats de la superposition des quatre chromatogrammes :

Tableau XII:Résultats de la superposition des quatre chromatogrammes

Solutions	Temps de rétention (min)	Superposition
Diluant	Absence de pic de metformine	Concluante
Placebo		
SE 120 %	5.990	Concluante
SV 120 %	5.955	Concluante

B. Approche statistique

Le test statistique utilisé dans cette approche est le test t de student qui consiste à calculer une valeur d'une variable centrée réduite $t_{calculé}$ et la comparer à une valeur seuil lue sur la table de student au risque de 5 et un degré de liberté ddl approprié.

Les données brutes obtenues pour les premières répétitions des des SE et SV sont présentées dans les tableaux XIII et XV.

La comparaison des pentes de chaque droite d'étalonnage (SE et SV) sont présentés dans les tableaux XIV et XVI.

La comparaison des pentes des SE et SV est présentée dans le tableau XVII.

Tableau XIII : Données brutes obtenues sur le SE

Niveaux	1ère répétitions de chaque série	Masses introduites (Xi)	Réponses instrumentales (Yi)
80%	1	40,18	5595853
	2	40,46	5762730
	3	40,43	5566308
90%	1	45,15	6357611
	2	45,15	6439268
	3	45,06	6364697
100%	1	50,29	7053151
	2	50,04	7162799
	3	50,53	7229308
110%	1	55,53	7713531
	2	55,24	7981106
	3	55,04	7945688
120%	1	60,29	8427079
	2	60,53	8577499
	3	60,18	8567572
Pente		144725,70	
ordonnée à l'origine		-159563,53	
Erreur pente		3675,71	
Erreur ordonnée à l'origine		186617,49	

Tableau XIV : Comparaison de la pente et l'ordonnée à l'origine avec 0 sur la gamme d'étalonnage

Comparaison de la pente avec 0	t calculé	39,37	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	0,86	Différence non significative
	$t^{\circ}(\alpha ; 13)$	2,16	
	Condition	$t \text{ calculé} < t^{\circ}(\alpha ; 13)$	

Tableau XV : Données brutes obtenues sur le SV

Niveaux	1ère répétitions de chaque serie	Masses introduites (Xi)	Réponses instrumentales (Yi)
80%	1	40,18	5686736
	2	40,46	5758236
	3	40,43	5727832
90%	1	45,15	6324590
	2	45,43	6424275
	3	45,06	6399808
100%	1	50,29	7002566
	2	50,04	7154793
	3	50,53	7350833
110%	1	55,53	7836488
	2	55,24	7970934
	3	55,04	7952486
120%	1	60,29	8253758
	2	60,53	8665558
	3	60,18	8535182
Pente		141145,01	
Ordonnée à l'origine		37806,96	
Erreur pente		4494,74	
Erreur ordonnée à l'origine		228274,90	

Tableau XVI: Comparaison de la pente et l'ordonnée à l'origine avec 0 sur la gamme de validation

Comparaison de la pente avec 0	t calculé	31,402	Différence significative
	$t^\circ(\alpha ; 13)$	2,160	
	Condition	$t \text{ calculé} < t^\circ(\alpha ; 13)$	
Comparaison de l'ordonnée à l'origine avec 0	t calculé	0,166	Différence non significative
	$t^\circ(\alpha ; 13)$	2,160	
	Condition	$t \text{ calculé} < t^\circ(\alpha ; 13)$	

– Vérification de l'absence d'effet matrice et d'erreur systématique

Tableau XVII: Comparaison des deux pentes par le test du Student

Comparaison des deux pentes des deux droites de régression	t calculé	0,617	Différence non significative
	$t^\circ(\alpha ; 26)$	2,056	
	Condition	$t \text{ calculé} < t^\circ(\alpha ; 26)$	
Comparaison des ordonnées à l'origine des deux droites de régression	t calculé	0,669	Différence non significative
	$t^\circ(\alpha ; 26)$	2,056	
	Condition	$t \text{ calculé} < t^\circ(\alpha ; 26)$	

– **Confirmation de la spécificité sur les deux gammes d'étalonnage et de validation**

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

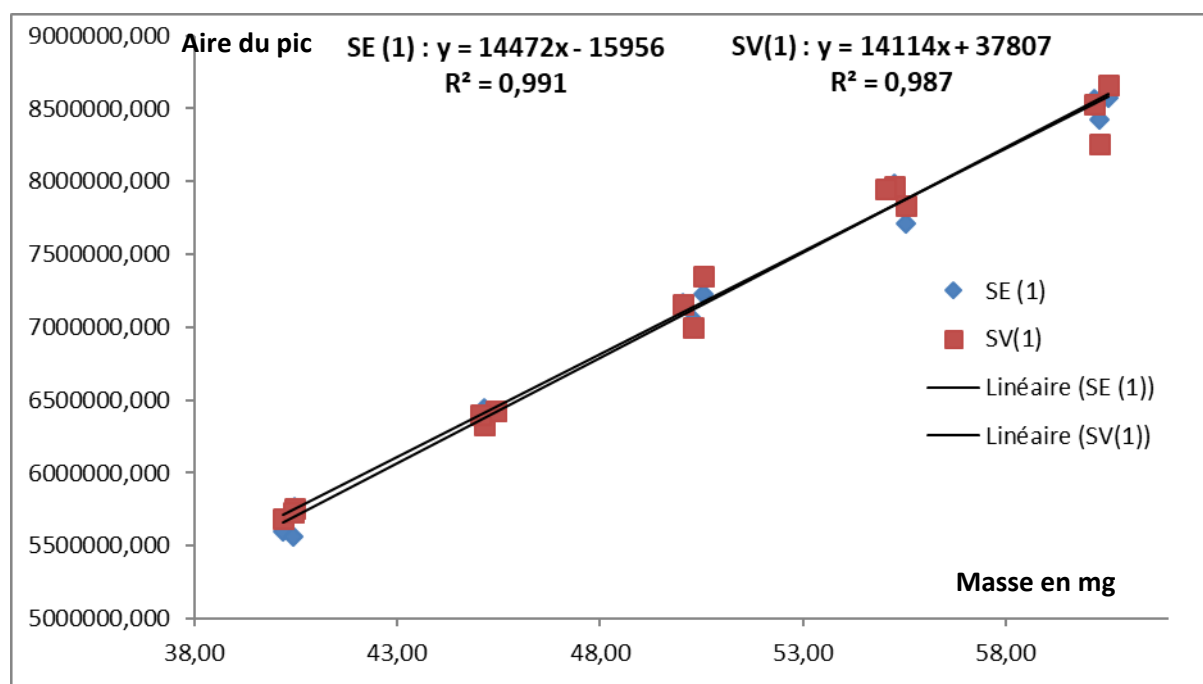


Figure 9 : Superposition des courbes d'étalonnage et de validation de metformine

2.1.2.2. Fonction de réponse

La relation existante entre l'aire du pic (réponse instrumentale) et la masse introduite dans les standards d'étalonnage (concentration), obtenue sur chacune des trois séries, est représentée pour quatre (04) modèles mathématiques comme suit :

A. Modèle : $y=ax+b$

Tableau XVIII: Résultats obtenus pour la fonction $y=ax+b$

Niveaux	Rep	Série 1		Série 2		Série 3	
		Masse en mg	Aire du pic	Masse en mg	Aire du pic	Masse en mg	Aire du pic
80%	1	40,18	5595853	40,46	5762730	40,43	5566308
	2	40,08	5543058	40,05	5720315	40,26	5673875
90%	1	45,15	6357611	45,43	6439268	45,06	6364697
	2	45,44	6200819	45	6498154	45,26	6488754
100%	1	50,29	7053151	50,04	7162799	50,53	7229308
	2	50,53	6862299	50,2	7318913	50,14	7137493
110%	1	55,53	7713531	55,24	7981106	55,04	7945688
	2	55,12	7697636	55,09	7982000	55,06	7735095
120%	1	60,29	8427079	60,53	8577499	60,18	8567572
	2	60,05	8340481	60,08	8545278	60,1	8570906
Pente		140645		Pente		142784	
Ordonnée		-90532		Ordonnée		29342	
		Origine				-291062	

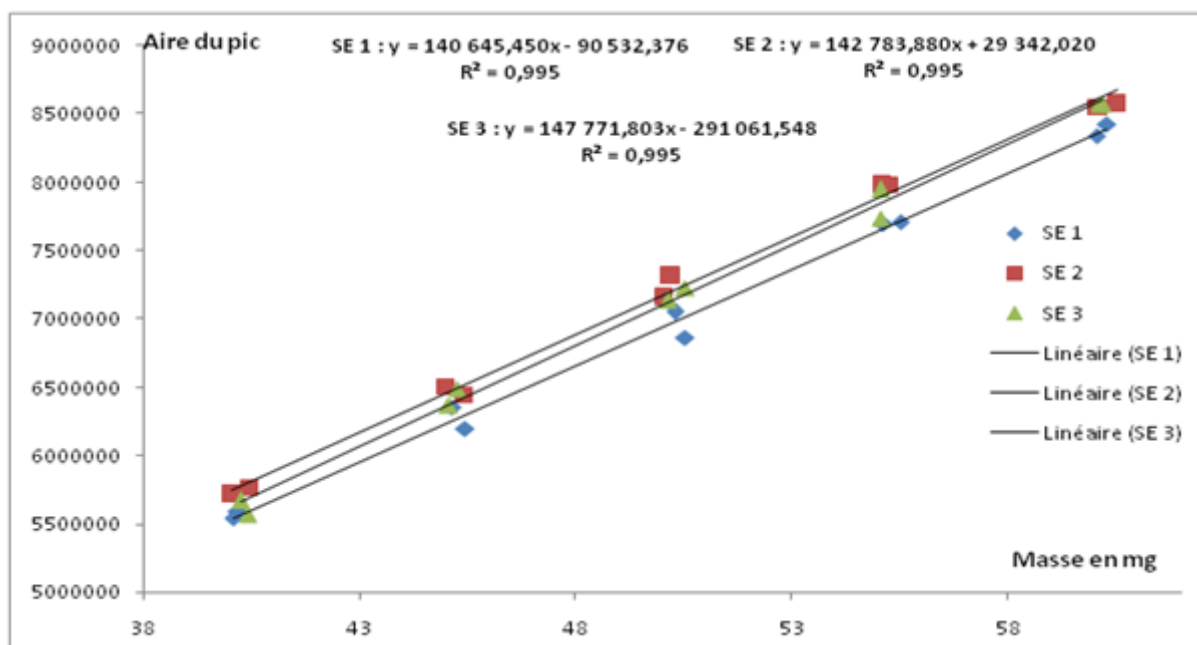
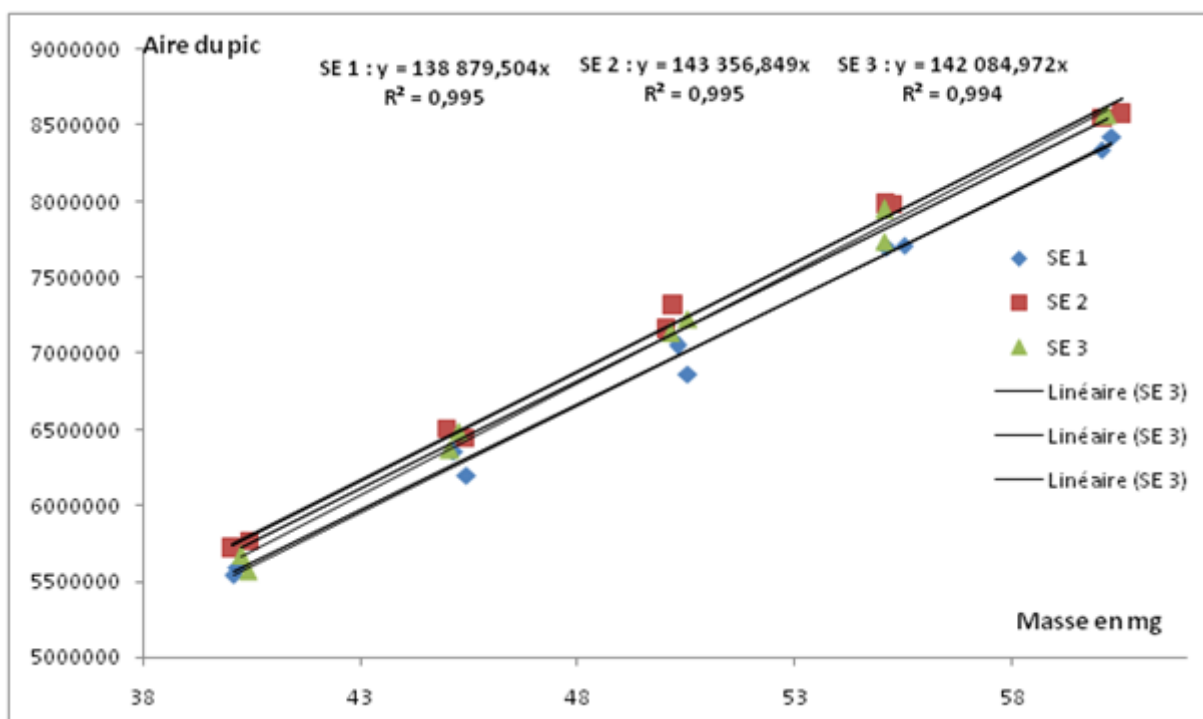


Figure10: Courbes d'étalonnage obtenues avec la fonction $y = ax + b$

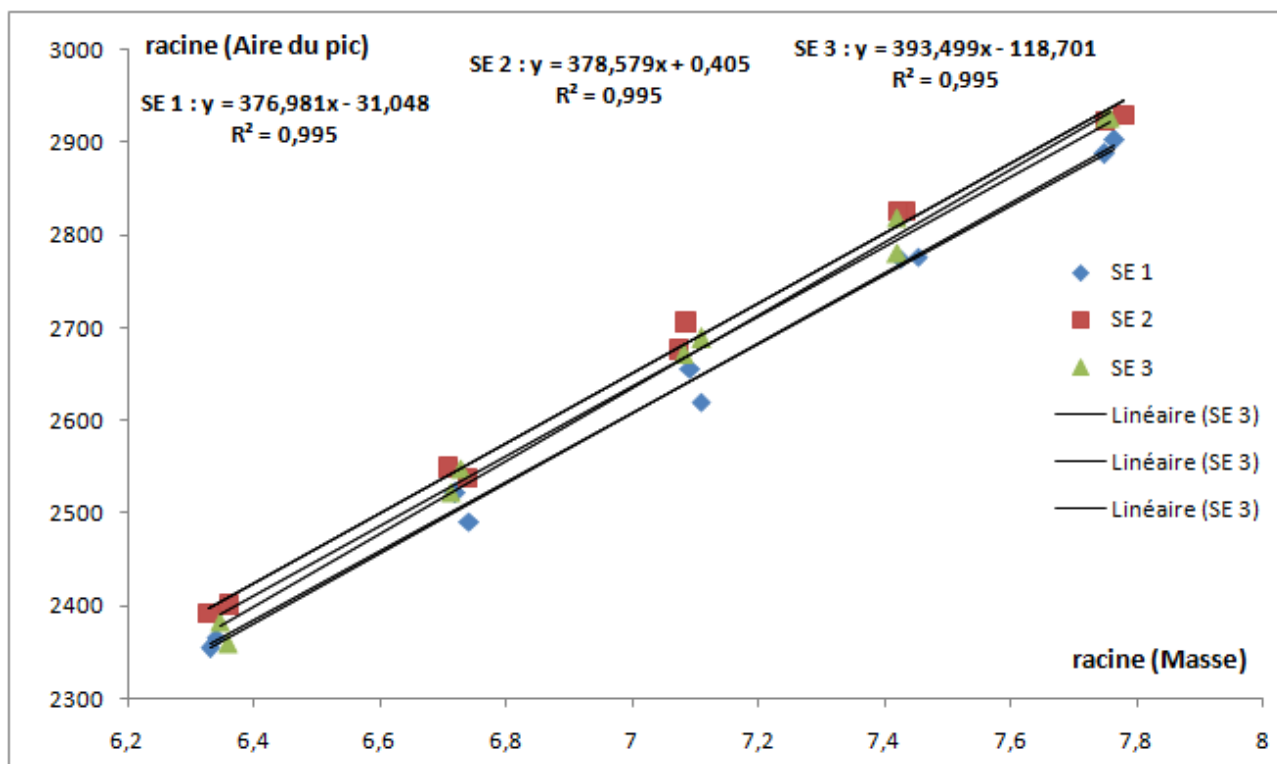
B. Modèle : $y = ax$

Tableau XIV: Résultats obtenus pour la fonction $Y = Ax$

Niveau	Repetition	Serie 1			Serie 2			Serie 3		
		Variable	moyenne	Réponse	Variable	Moyenne	Réponse	Variable	Moyenne	Reponse
80%	1	40,18	40,13	5595853	40,46	40,255	5762730	40,43	40,345	5566308
	2	40,08		5543058	40,05		5720315	40,26		5673875
90%	1	45,15	45,295	6357611	45,43	45,215	6439268	45,06	45,16	6364697
	2	45,44		6200819	45		6498154	45,26		6488754
100%	1	50,29	50,41	7053151	50,04	50,12	7162799	50,53	50,335	7229308
	2	50,53		6862299	50,2		7318913	50,14		7137493
110%	1	55,53	55,325	7713531	55,24	55,165	7981106	55,04	55,05	7945688
	2	55,12		7697636	55,09		7982000	55,06		7735095
120%	1	60,29	60,17	8427079	60,53	60,305	8577499	60,18	60,14	8567572
	2	60,05		8340481	60,08		8545278	60,1		8570906
		Pente	138880		Pente	143357		Pente	142085	
		Ordonee	0		Ordonee	0		Origine	0	

Figure11 : Courbes d'étalonnage obtenues avec la fonction $y = ax$ C. Modèle : $\sqrt{y}=f(\sqrt{x})$ Tableau XIX: Résultats obtenus pour la fonction $\sqrt{y}=f(\sqrt{x})$

Niveaux	Rep	Série 1		Série 2		Série 3	
		Racine (Masse)	Racine (Aire du pic)	Racine (Masse)	Racine (Aire du pic)	Racine (Masse)	Racine (Aire du pic)
80%	1	6,339	2365,556	6,361	2400,569	6,358	2359,302
	2	6,331	2354,370	6,329	2391,718	6,345	2381,990
90%	1	6,719	2521,430	6,740	2537,571	6,713	2522,835
	2	6,741	2490,144	6,708	2549,148	6,728	2547,303
100%	1	7,092	2655,777	7,074	2676,341	7,108	2688,737
	2	7,108	2619,599	7,085	2705,349	7,081	2671,609
110%	1	7,452	2777,324	7,432	2825,085	7,419	2818,810
	2	7,424	2774,461	7,422	2825,243	7,420	2781,204
120%	1	7,765	2902,943	7,780	2928,737	7,758	2927,042
	2	7,749	2887,989	7,751	2923,231	7,752	2927,611
Pente		376,981		Pente 378,579		Pente 393,499	
Ordonnée		31,048		Ordonnée 0,405		Origine -118,701	

Figure12: Courbes d'étalonnage obtenues avec la fonction $\sqrt{y}=f(\sqrt{x})$ D. Modèle : $\ln y = f(\ln x)$ Tableau XX: Résultats obtenus pour la fonction $\ln y = f(\ln x)$

Niveaux	Rep	Série 1		Série 2		Série 3	
		ln (Masse)	ln (Aire du pic)	ln (Masse)	ln (Aire du pic)	ln (Masse)	ln (Aire du pic)
80%	1	3,693	15,538	3,700	15,567	3,700	15,532
	2	3,691	15,528	3,690	15,560	3,695	15,551
90%	1	3,810	15,665	3,816	15,678	3,808	15,666
	2	3,816	15,640	3,807	15,687	3,812	15,686
100%	1	3,918	15,769	3,913	15,784	3,923	15,794
	2	3,923	15,742	3,916	15,806	3,915	15,781
110%	1	4,017	15,858	4,012	15,893	4,008	15,888
	2	4,010	15,856	4,009	15,893	4,008	15,861
120%	1	4,099	15,947	4,103	15,965	4,097	15,963
	2	4,095	15,937	4,096	15,961	4,096	15,964
Pente		1,009		Pente		1,003	
Ordonnée		11,80		Ordonnée		11,861	
				Origine		11,672	

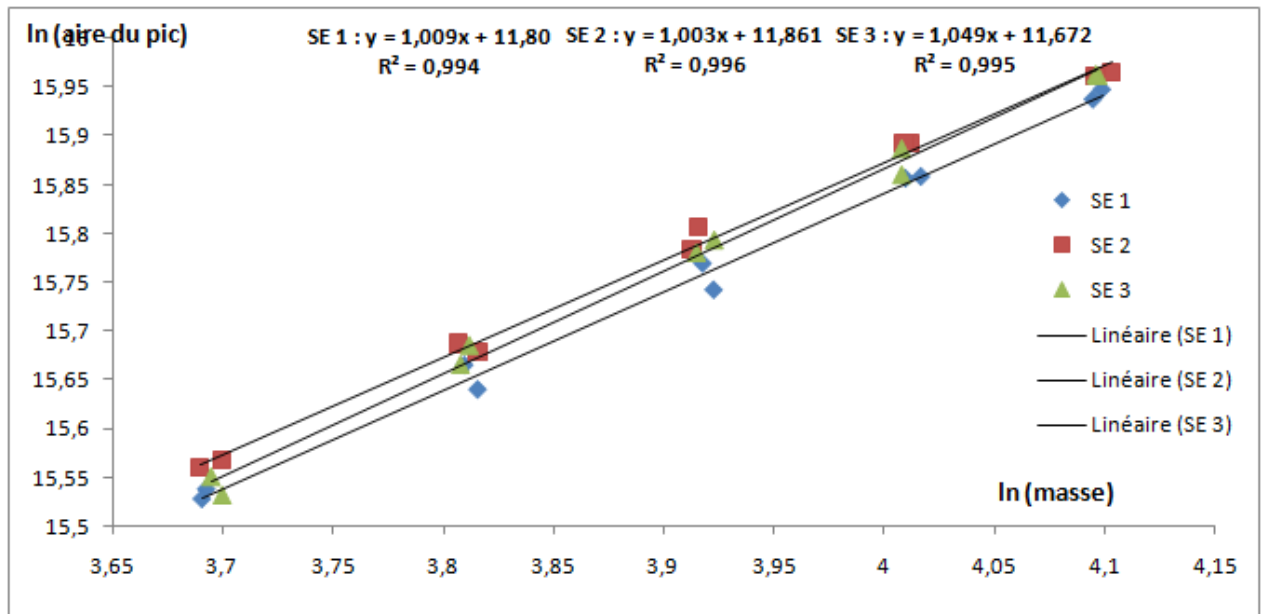


Figure 13 : Courbes d'étalonnage obtenues avec la fonction $\ln y=f(\ln x)$

Choix de la fonction de réponse

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

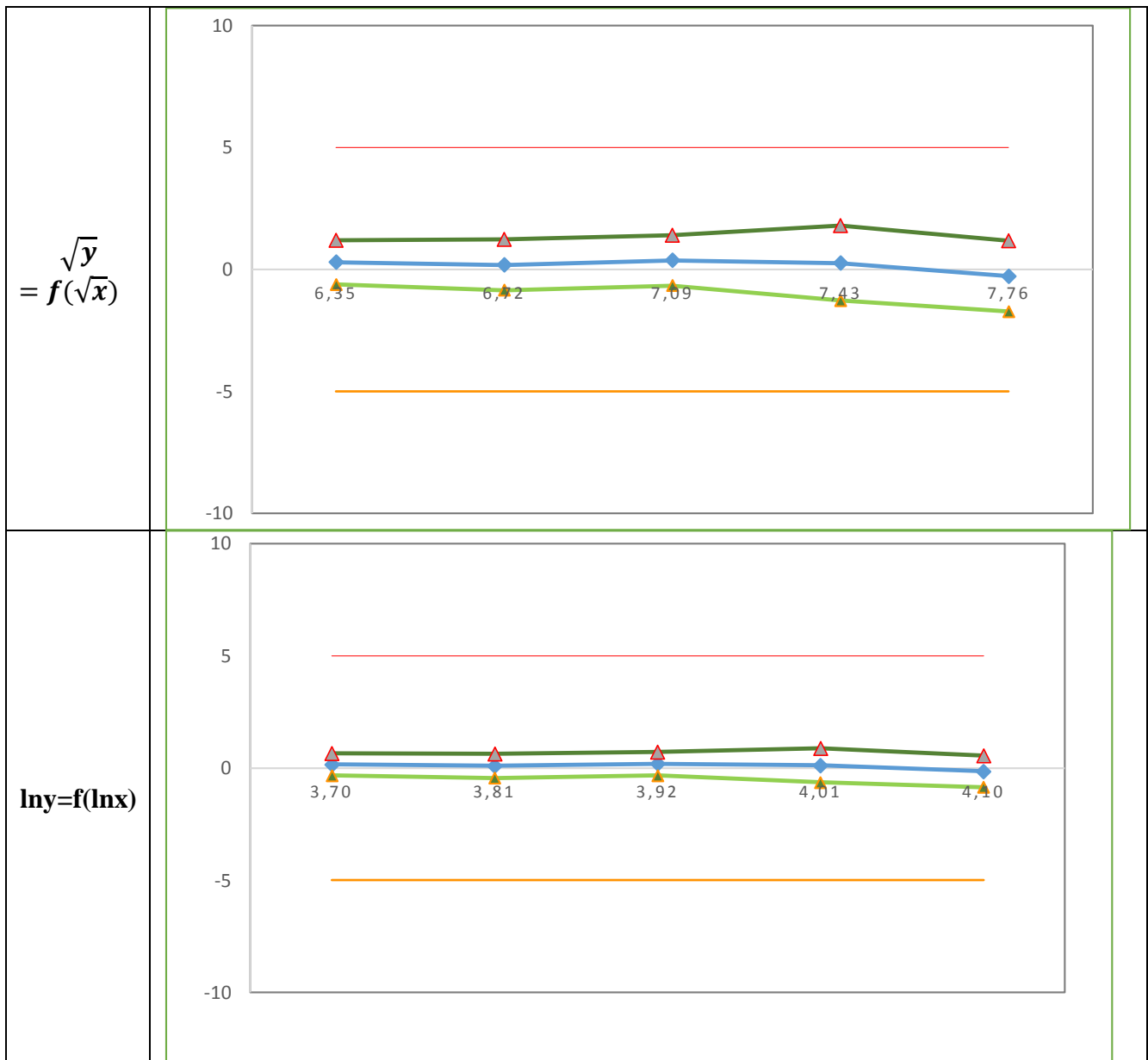
-Par le calcul des indices : d'intervalle de dosage, indice de justesse, indice de fidélité et indice d'exactitude

- Par comparaison des profils d'exactitude

Dans notre travail la démarche utilisée pour le choix de la fonction de réponse est celle basée sur le profil d'exactitude. Les différents modèles de régression testés aboutissant aux profils d'exactitude élucidés dans les tableaux ci-dessous :

Tableau XXI: Profil d'exactitude de différents Modèles de fonction de réponse

Modèle de fonction de réponse	Profil d'exactitude
$y = ax + b$	<p>Graphique du profil d'exactitude pour le modèle $y = ax + b$. L'axe des ordonnées va de -10 à 10. Trois lignes sont tracées : une bleue avec des losanges pour le biais (%), une verte avec des triangles pour la limite inférieure de l'intervalle de tolérance, et une rouge avec des triangles pour la limite supérieure. Les données sont : (40, 2,8), (45, 1,8), (50, 2,1), (55, 1,6), (60, 2,2).</p>
$y = ax$	<p>Graphique du profil d'exactitude pour le modèle $y = ax$. L'axe des ordonnées va de -10 à 10. Trois lignes sont tracées : une bleue avec des losanges pour le biais (%), une verte avec des triangles pour la limite inférieure de l'intervalle de tolérance, et une rouge avec des triangles pour la limite supérieure. Les données sont : (40, 2,8), (45, 1,8), (50, 2,1), (55, 1,6), (60, 2,2).</p>



2.1.2.3. Justesse – Fidélité – Exactitude – limites de dosage

A. 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 appliqué aux réponses obtenues avec les trois séries des standards de validation, sur la moyenne des masses introduites pour chaque niveau de concentration théorique est résumé dans les tableaux suivants :

Tableau XXII: Alignement des observations sur SV

Niveaux	Répétitions	Séries								
		1			2			3		
		Masse (mg)	Aire du pic	Alignement	Masse (mg)	Aire du pic	Alignement	Masse (mg)	Aire du pic	Alignement
80 %	1	40,18	5686736	5701113,09	40,46	5758236	5732852,20	40,43	5727832	5705994,61
	2	40,08	5574144	5602585,64	40,05	5638378	5671535,60	40,26	5746484	5749767,82
	3	40,30	5649797	5647296,64	40,75	5805309	5738517,87	40,03	5751642	5788913,33
90 %	1	45,15	6324590	6328653,09	45,43	6424275	6388420,38	45,06	6399808	6417376,43
	2	45,44	6453606	6416881,91	45,00	6400804	6426346,45	45,26	6356587	6344601,06
	3	45,00	6303369	6328528,91	45,16	6425319	6428016,03	45,11	6494013	6504192,83
100 %	1	50,29	7002566	6991001,82	50,04	7154793	7178748,96	50,53	7350833	7303217,64
	2	50,53	7052436	7007116,91	50,20	7219698	7220808,54	50,14	7325988	7336003,64
	3	50,00	7012841	7042063,99	50,04	7121996	7145951,96	50,10	7134669	7150595,52
110 %	1	55,53	7836488	7784605,46	55,24	7970934	7959669,94	55,04	7952486	7970382,81
	2	55,12	7719293	7725075,09	55,09	7706971	7717124,52	55,06	7934920	7949861,37
	3	55,30	7625426	7605891,91	55,02	7863985	7884133,39	55,05	8074080	8090499,09
120 %	1	60,29	8253758	8243600,27	60,53	8665558	8620977,70	60,18	8535182	8540764,49
	2	60,05	8235254	8258851,18	60,08	8388531	8408203,45	60,10	8634988	8652392,23
	3	60,00	8291716	8322345,45	60,21	8702761	8703871,54	60,52	8741823	8697163,08

B. Prédiction inverses

C'est les concentrations que peut nous fournir la méthode pour un échantillon inconnu.

Les concentrations inverses prédites des standards de validation sont calculées en utilisant la fonction inverse du modèle d'étalonnage. Ces concentrations retrouvées permettent de calculer le biais de chaque mesurage, et également de vérifier la linéarité de la méthode, les prédictions inverses obtenues à partir des SV sont représentées dans les tableaux ci-dessous :

Tableau XXIII: Prédiction inverses obtenus à partir des SV

Niveaux %	répétitions	Séries					
		1		2		3	
		Réponses alignées	prédictions inverses	Réponses alignées	prédictions inverses	Réponses alignées	prédictions inverses
80%	1	5701113,09	41,18	5732852,20	39,945	5705994,61	40,583
	2	5602585,64	40,479	5671535,59	39,516	5749767,82	40,879
	3	5647296,64	40,796	5738517,87	39,985	5788913,33	41,144
90%	1	6328653,09	45,641	6388420,38	44,536	6417376,43	45,397
	2	6416881,91	46,268	6426346,45	44,802	6344601,06	44,905
	3	6328528,91	45,640	6428016,03	44,814	6504192,84	45,985
100 %	1	6991001,82	50,350	7178748,96	50,072	7303217,64	51,392
	2	7007116,91	50,465	7220808,54	50,366	7336003,64	51,614
	3	7042064,00	50,713	7145951,96	49,842	7150595,52	50,359
110 %	1	7784605,46	55,993	7959669,94	55,541	7970382,81	55,907
	2	7725075,09	55,570	7717124,52	53,842	7949861,37	55,768
	3	7605891,91	54,722	7884133,39	55,012	8090499,09	56,720
120 %	1	8243600,27	59,256	8620977,70	60,172	8540764,49	59,767
	2	8258851,18	59,365	8408203,45	58,682	8652392,23	60,522
	3	8322345,45	59,816	8703871,54	60,753	8697163,08	60,825

C. Justesse

La justesse fournit une indication sur les erreurs systématiques de la procédure analytique. Elle est exprimée en termes de biais (en mg/ml), de biais relatif (%) ou de taux de concentration des SV comme indiqué dans le tableau suivant :

Tableau XXIV: Calcul de la justesse pour chaque niveau des SV

Niveau	Masse introduite (mg)	Masse prédite (mg)	Biais absolu	Recouvrement	Exactitude	Biais relatif
80%	40,28	40,50	0,22	100,54	-0,22	0,542
90%	45,18	45,33	0,15	100,33	-0,15	0,34
100%	50,21	50,57	0,37	100,73	-0,37	0,73
110%	55,16	55,45	0,29	100,53	-0,29	0,5
120%	60,22	59,91	-0,31	99,48	0,31	-0,52

D. 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 termes de coefficient de variation est résumée dans le tableau suivant :

Tableau XXV : Calcul de fidélité pour chaque niveau des SV

Niveau	MSM	MSE	Fidélité inter-série	Fidélité intra-série	Fidélité intermédiaire	CV de répétabilité	CV de fidélité intermédiaire
80%	0,0448	0,0552	0	0,2350	0,2350	0,58	0,58
90%	0,0028	0,0277	0	0,1665	0,1665	0,37	0,37
100%	0,0296	0,0412	0	0,2031	0,2031	0,40	0,40
110%	0,0577	0,0281	0,0573	0,1678	0,2252	0,30	0,30
120%	0,0245	0,0379	0	0,1949	0,19492	0,32	0,32

E. Exactitude

Le tableau suivant élucide pour chaque concentration des standards de validation son exactitude relative, et met en avant l'erreur relative maximale observée (en rouge) pour chaque niveau de concentration théorique :

Tableau XXVI: Résultats du calcul de l'exactitude relative

Niveaux %	répétitions	Séries SV								
		1			2			3		
		Masse introduite (mg)	Masse prédite (mg)	Exactitude relative	Masse introduite (mg)	Masse prédite (mg)	Exactitude relative	Masse introduite (mg)	Masse prédite (mg)	Exactitude relative (%)
80 %	1	40,18	41,179	-2,486	40,46	39,945	1,273	40,43	40,583	-0,379
	2	40,08	40,479	-0,994	40,05	39,516	1,334	40,26	40,879	-1,539
	3	40,30	40,796	-1,232	40,75	39,985	1,878	40,03	41,144	-2,784
90 %	1	45,15	45,641	-1,087	45,43	44,536	1,967	45,06	45,397	-0,749
	2	45,44	46,268	-1,823	45,00	44,802	0,440	45,26	44,905	0,785
	3	45,00	45,640	-1,422	45,16	44,814	0,767	45,11	45,985	-1,939
100 %	1	50,29	50,350	-0,120	50,04	50,072	-0,063	50,53	51,392	-1,706
	2	50,53	50,465	0,129	50,20	50,366	-0,331	50,14	51,614	-2,939
	3	50,00	50,713	-1,427	50,04	49,842	0,396	50,10	50,359	-0,517
110 %	1	55,53	55,993	-0,833	55,24	55,541	-0,544	55,04	55,907	-1,575
	2	55,12	55,570	-0,816	55,09	53,842	2,265	55,06	55,768	-1,286
	3	55,30	54,722	1,045	55,02	55,012	0,015	55,05	56,720	-3,033
120 %	1	60,29	59,256	1,715	60,53	60,172	0,591	60,18	59,767	0,687
	2	60,05	59,365	1,141	60,08	58,682	2,327	60,10	60,522	-0,702
	3	60,00	59,816	0,306	60,21	60,753	-0,902	60,52	60,825	-0,504

F. Erreur totale

Le tableau ci-dessous présente le calcul de l'erreur totale relative pour chaque niveau de concentration théorique :

Tableau XXVII: Calcul de l'erreur totale pour chaque niveau de concentration des SV

Niveau	Erreur totale	Erreur totale relative
80%	0,45	1,13
90%	0,32	0,71
100%	0,57	1,14
110%	0,51	0,84

G. Intervalle de tolérance

Le calcul des limites de l'intervalle de tolérance pour chaque niveau de concentration théorique est résumé dans le tableau suivant :

Tableau XXVIII : Intervalle de tolérance

Masse introduite (mg)	40,28	45,18	50,21	55,16	60,22
Biais (%)	0,54	0,34	0,73	0,53	-0,52
Limite intervalle tolérance basse	-1,28	-1,76	-1,36	-2,55	-3,42
Limite intervalle tolérance haute	2,36	2,43	2,82	3,60	2,38
Limite d'acceptation basse	-5,00	-5,00	-5,00	-5,00	-5,00

Limite d'acceptation haute	5,00	5,00	5,00	5,00	5,00
----------------------------	------	------	------	------	------

H. Profil d'exactitude

La figure ci-dessous dans laquelle l'axe horizontal représente les masses introduites en mg allant de 40.3 à 60.2 mg et l'axe vertical le biais relatif représente le profil d'exactitude :

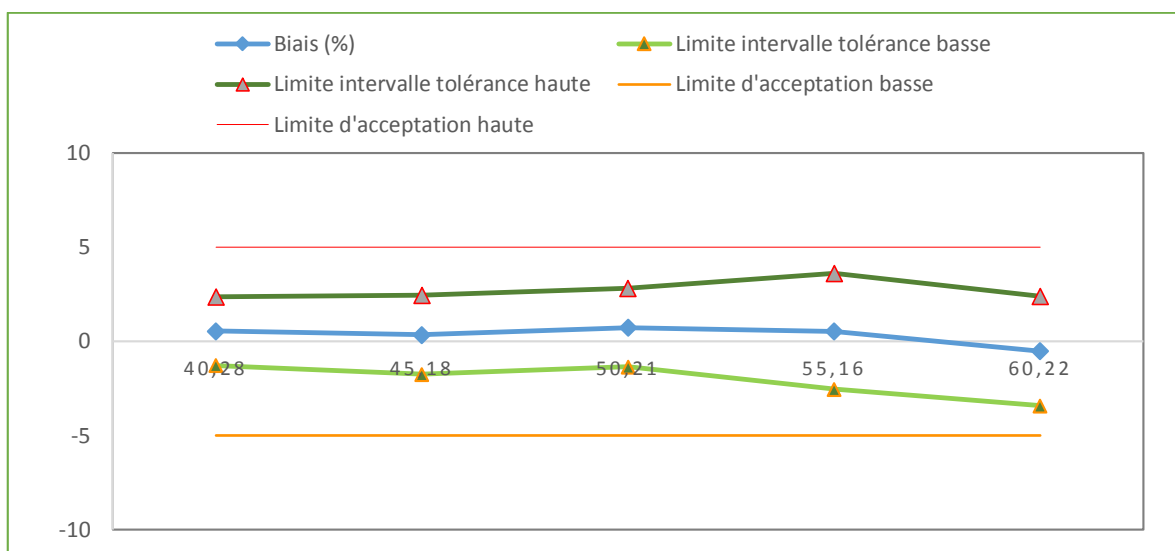


Figure 14: Profil d'exactitude de la méthode de dosage du métfomineHCl

2.1.2.4. Linéarité de la méthode

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

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

Tableau XXIX: Paramètres de la linéarité de la méthode de dosage du métformine

Niveaux	Séries	Répétitions	Masses introduites (mg)	Masse estimées (mg)
1	1	1	40,18	41,08
		2	40,08	40,38
		3	40,30	40,70
	2	1	40,46	40,08
		2	40,05	39,65
		3	40,75	40,12
	3	1	40,43	40,54
		2	40,26	40,84
		3	40,03	41,10
2	1	1	45,15	45,66
		2	45,44	46,29
		3	45,00	45,66
	2	1	45,43	44,55
		2	45,00	44,82
		3	45,16	44,83
	3	1	45,06	45,36
		2	45,26	44,87
		3	45,11	45,95
3	1	1	50,29	50,42
		2	50,53	50,53
		3	50,00	50,78
	2	1	50,04	49,96
		2	50,20	50,25
		3	50,04	49,73
	3	1	50,53	51,44
		2	50,14	51,66
		3	50,10	50,41
4	1	1	55,53	56,15
		2	55,12	55,73
		3	55,30	54,88
	2	1	55,24	55,50
		2	55,09	53,80
		3	55,02	54,97
	3	1	55,04	55,80
		2	55,06	55,66
		3	55,05	56,61
5	1	1	60,29	59,15
		2	60,05	59,26
		3	60,00	59,71
	2	1	60,53	60,23
		2	60,08	58,74
		3	60,21	60,81
	3	1	60,18	59,82
		2	60,10	60,57
		3	60,52	60,87

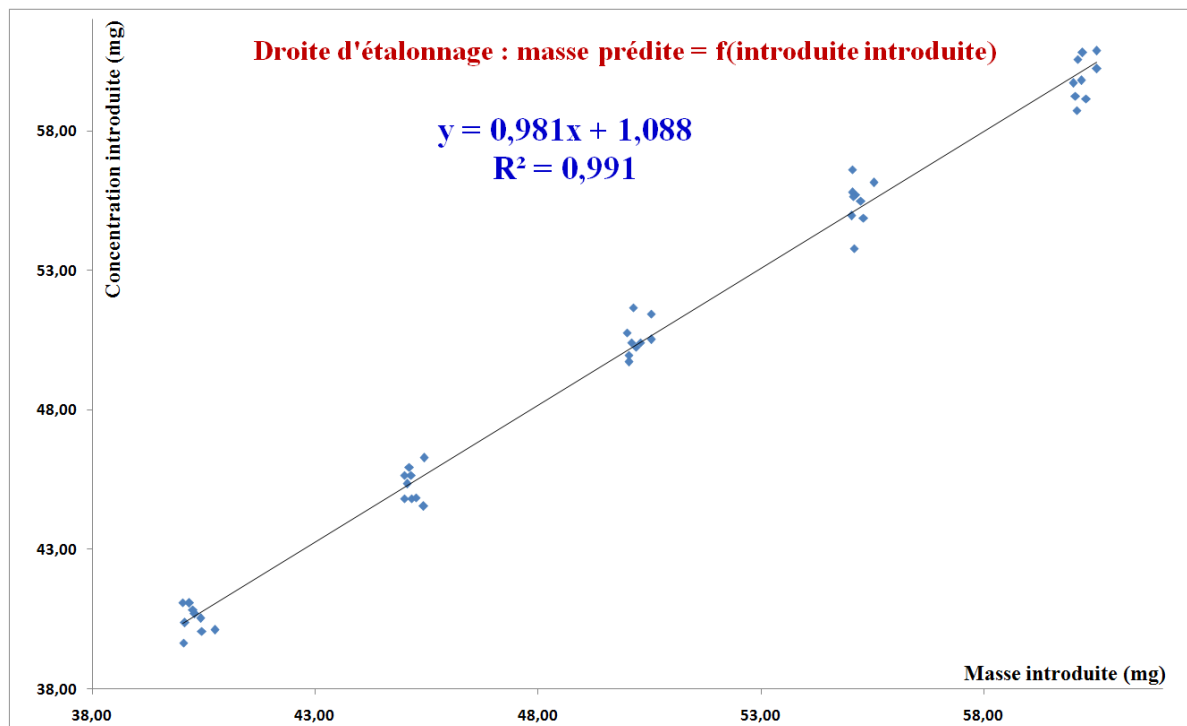


Figure 15: Droite de régression linéaire entre les quantités prédites et les quantités introduites.

La régression donne une équation de la droite ; $y = 0,981 x + 1,088$ avec ;

- Erreur de la pente $\sigma_a = 0,01425$
- Erreur de l'ordonnée à l'origine $\sigma_b = 1,088$
- Coefficient de corrélation $R = 0,9955$

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

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

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

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

TableauXXX: Etude statistique de la linéarité : masse prédites en fonctions des masses introduites

	Pente	Ordonnée à l'origine
Valeur	0,981	1,088
Erreur	0,01425	0,7225
t calculé	1,33	1,50
$t^\circ(0,05 ; 13)$	2,16	2,16
Condition	t calculé < $t^\circ(0,05 ; 13)$	
Résultats	La pente a est comparable avec 1	L'ordonnée à l'origine b est comparable avec 0

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

2.1.2.5.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 β 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) =0.8016 mg/ml.**
- **Limite supérieure de quantification (LQ_{sup}) = 1.2104 mg/ml.**

2.1.2.6. Robustesse

. Les données brutes de l'étude de la robustesse sont présentées dans le tableau XXV et les résultats du calcul des intervalles de confiance sont présentés dans le tableau XXVI.

Tableau XXXI : Donnés brutes de l'étude de la robustesse

N° de l'essai	A (teneur en %)	B (Débit de la phase mobile (ml/mn))	C longueur d'onde de détection (nm)	Masse introduite (Echantillon)	Masse (Standard) en mg	Teneur introduite (%)	Aire du pic (échantillon)	Aire du pic (standard)	Masse estimée en mg	Reponse (Teneur en %)
1	95%	1,6	216	47,5	50,00	95,00	8505243	9047943	47.00	94.00
2	105%	1,6	216	52,5	50,00	105,00	9556027	9047943	52.81	105.62
3	95%	2,4	216	47,5	50,00	95,00	8304946	8770322	47.35	94.69
4	105%	2,4	216	52,5	50,00	105,00	9294432	8770322	52.99	105.98
5	95%	1,6	220	47,5	50,00	95,00	5754111	6015609	47.83	95.65
6	105%	1,6	220	52,5	50,00	105,00	6448080	6015609	53.59	107.19
7	95%	2,4	220	47,5	50,00	95,00	5492749	5827029	47.13	94.26
8	105%	2,4	220	52,5	50,00	105,00	6168112	5827029	52.93	105.85
Ecart type									6.19	

Tableau XXXII: Calcul des effets des paramètres et leurs intervalles de confiance pour l'étude la robustesse metformine.

Essais	Facteurs			interactions				
	A	B	C	AB	AC	BC	ABC	
1	-94.00	-94.00	-94.00	94.00	94.00	94.00	-94.00	
2	105.62	-105.62	-105.62	-105.62	-105.62	105.62	105.62	
3	-94.69	94.69	-94.69	-94.69	94.69	-94.69	94.69	
4	105.98	105.98	-105.98	105.98	-105.98	-105.98	-105.98	
5	-95.65	-95.65	95.65	95.65	-95.65	-95.65	95.65	
6	107.19	-107.19	107.19	-107.19	107.19	-107.19	-107.19	
7	-94.26	94.26	94.26	-94.26	-94.26	94.26	-94.26	
8	105.85	105.85	105.85	105.85	105.85	105.85	105.85	
Somme	46.02	-1.67	2.67	-0.28	0.23	-3.78	0.39	
Effet	5.75	-0.21	0.33	-0.03	0.03	-0.47	0.05	
Intervalle de confiance	limite inférieur	0.58	-5.38	-4.84	-5.21	-5.14	-5.64	-5.12
	limite supérieur	10.92	4.96	5.51	5.14	5.20	4.70	5.22

2.2. Discussion

2.2.1. Pécificité

2.2.1.1. Comparaison des chromatogrammes

Selon les résultats obtenus, la spécificité de la méthode est confirmée par :

- L'absence de pic au temps de rétention théorique dans le chromatogramme obtenu avec le diluant seul et le diluant avec placebo ; on l'explique par l'absence d'interférences.
- Les temps de rétention du pic du metformine dans le standard d'étalonnage et le standard de validation sont comparables à dire similaire.

2.2.1.2. Confirmation de la spécificité sur les deux gammes d'étalonnage et de validation

La discussion des résultats obtenus est résumée dans le tableau ci-dessous

Tableau XXXIII: Signification des résultats de la comparaison des pentes et des ordonnées à l'origine avec 0

Test	Gamme	Résultat	Signification
Les pentes sont-elles comparables avec 0 ?	Sans matrice	NON	Pentes significatives
	Avec matrice	NON	
Les ordonnées à l'origine sont-elles comparables avec 0 ?	Sans matrice	OUI	La méthode est spécifique
	Avec matrice	OUI	

2.2.1.3. Comparaison des deux pentes des deux droites de régression

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

Tableau XXXIV: signification des résultats de la comparaison des deux pentes et des deux ordonnées à l'origine entre elles.

Test	Résultat	Signification
Les pentes sont-elles comparables ?	OUI	Pas d'effet matrice
Les ordonnées à l'origine sont-elles comparables ?	OUI	Pas d'erreur systématique

On peut dire qu'avec un risque inférieur à 5%, l'absence d'effet matrice et d'erreur Systématique est confirmée pour la metformine donc statistiquement la méthode est Spécifique.

2.2.2. Le choix de la fonction de réponse

D'après les profils d'exactitude élucidés dans le tableau est les intervalles de validité (intervalle de dosage) de la méthode qui en découlent pour chaque modèle simulé et validé, on constate que le modèle de régression est linéaire avec toutes les équations données.

Les points du biais ainsi que les limites de tolérance du profil d'exactitude choisis doivent être rapprochés par rapport aux autres profils d'exactitude afin de minimiser et d'ajuster les erreurs mathématiques pour que la fonction choisie puisse être utilisée en routine avec un intervalle de dosage le plus large.

Dans le cadre de notre étude le modèle mathématique choisi en l'occurrence la fonction de réponse : **$y=ax+b$ en raison de sa simplicité.**

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 considérées comme étant la valeur de référence est assez étroit pour les 5 niveaux, compte tenu du fait que les biais relatifs sont inférieurs à 1 % pour tous les niveaux.

2.2.3.2. Fidélité

La dispersion des prédictions inverses des concentrations des trois séries de validation est assez étroite pour tous les niveaux de concentration, du fait que les coefficients de variance de la répétabilité et de la fidélité intermédiaire de tous les niveaux est inférieur à 1 %. Cependant ces estimations de la fidélité et de la justesse ne sont pas une fin en soi, ils sont une étape intermédiaire obligatoire pour pouvoir évaluer si la procédure analytique va vraisemblablement pouvoir ou non quantifier avec une exactitude suffisante chacune des quantités inconnues, en d'autres termes, elles ne renseignent pas sur la qualité des résultats et ne permettent pas de prendre une décision sur la validité de la méthode.

2.2.4. Critère de décision sur la validité de la méthode

2.2.4.1. Erreur totale

Selon le profil d'erreur totale élucidé dans la figure on juge que tous les niveaux sont inclus dans l'intervalle de validité. Et ceci est confirmé par l'erreur totale observée pour tous les niveaux ; inférieure aux limites d'acceptation

2.2.4.2. Profil d'exactitude

En se référant au profil d'exactitude élucidé dans la figure , on considère que la méthode mise aux point dans ce présent travail est valide où le profil d'exactitude est compris dans les limites d'acceptation de $\pm 5\%$, sachant que cette limite d'acceptabilité λ devrait être de 5% pour le dosage d'une substance active dans un produit fini .Cela signifie que la méthode est capable de produire une proportion de 95% des résultats acceptables et seulement 5% des futures mesures d'échantillons inconnus peuvent avoir des résultats non fiables.

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

2.2.4.3. Intervalle de dosage, limites de quantification, intervalle de validité

L'intervalle de dosage est l'intervalle compris entre les limites de quantifications inférieur et

Supérieur où la procédure analytique atteint l'exactitude souhaitée.

Selon les tableaux, on remarque que ;

-La limite de quantification inférieure est de 0.8016 mg/ml.

-La limite de quantification supérieure est de 1.2104 mg/ml.

La limite de quantification inférieure selon le tableau est de 40,3mg/50ml.

L'intervalle de validité est [LQinf ; LQsup] ; selon les résultats, la méthode est tenue pour valide dans l'intervalle **[0.8016mg/ml ; 1.2104 mg/ml]**

2.2.5. Linéarité

- Le coefficient de détermination linéaire de la relation existante entre la concentration introduite et la concentration prédite est acceptable ($R^2=0,9929$), étant donné que les deux variables ne sont pas toutes les deux indépendantes, il ne peut confirmer à lui seul la validité de la linéarité.

- La pente est statistiquement comparable à 1 au risque de 5 %, en l'occurrence la pente est significativement différente de 0, cela veut dire que la régression est significative entre la variable expliquée (concentration prédite) et la variable explicative (concentration introduite).

- L'ordonnée à l'origine est statistiquement comparable avec 0 au risque de 5 %, Ce qui nous amène à conclure que la linéarité de la méthode de dosage est validée.

2.2.6. Robustesse D'après les résultats du tableau, 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 de la concentration.

3. Conclusion de la validation de la méthode

La spécificité ,la justesse ,la fidélité, la linéarité et l'exactitude de la méthode de dosage de la metformine dans les comprimés a libération immédiate à 850 mg par HPLC mise au point dans le présent travail en vue d'une étude de son profil de dissolution sont démontrés dans l'intervalle de dosage [0.80 mg/ ml ; 1.20 mg/ml] avec une probabilité de confiance de 95 % dans les limites d'acceptation définies ± 5 %. Autrement dit, 95% des futurs résultats fournis par la méthode analytique développée se situeront dans les limites d'acceptabilité et les limites de dosage.

La méthode s'est révélée concluante est valide avec les critères d'acceptation prédéfinis sur l'intervalle décrit. 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 dans un intervalle de dosage déterminé.

CONCLUSION GENERALE

Conclusion générale

La finalité de notre étude a été de valider la méthode de dosage de metformine, 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 SFSTP Pharma Pratique qui consiste à évaluer l'exactitude d'une manière globale au lieu de mesurer les critères statistiques séparément.

En premier lieu, nous avons effectué un plan d'étalonnage pour générer un modèle d'étalonnage pour chaque série (le jour) permet de relier la réponse analytique (la surface du pic) à la concentration introduite.

En deuxième lieu nous avons réalisé un plan de validation pour pouvoir estimer le biais et la fidélité de la méthode. Cependant nous avons constaté que la méthode est juste pour le dosage de principes actifs avec un biais relatif qui ne dépasse pas 1%.

Aussi nous avons constaté que la méthode est valide puisque les coefficients de variations de répétabilité et de fidélité intermédiaire sont généralement inférieurs à 1%.

En troisième lieu, l'établissement des intervalles de tolérance apparié à des limites d'acceptation nous permet de construire les profils d'exactitudes qui sont construit à l'issue de ce travail caractérisant la validité de la méthode dans l'intervalle de concentration étudié [0.8016 ; 1.2104] mg/ml, avec une proportion $\beta=95\%$ de mesures dans les limites d'acceptations ($\pm 5\%$). Dans le même contexte, nous avons démontré que la méthode est robuste en calculant la robustesse. **Ce qui nous permet de déclarer que cette méthode peut être utilisée en routine par les laboratoires de contrôle qualité pharmaceutique en toute confiance.**

REFERENCES
BIBLIOGRAPHIQUES

Références bibliographiques

- [1] <https://www.ameli.fr/assure/sante/themes/diabete-comprendre/definition>
- [2] Classification du diabète sucré : Article
- [3] THESE : Vers la synthèse totale du FR225654 inhibiteur de la gluconéogenèse
Laboratoire Synthèse et Structure de Molécules d'Intérêt Pharmacologique
Université Paris Descartes-CNRS UMR 8638 Mardi 3 Décembre 2013
Par Shabbair Mohammad
- [4] OPTIMISATION DE LA METHODE D'ANALYSE PHYSICOCHIMIQUE D'UN
ANTIDIABETIQUE ORALE METFORMINE COMPRIME
Mémoire de Master en Chimie Spécialité : Chimie Pharmaceutique
Présenté par Melle TERBOUCHE Fetta
Soutenu publiquement le 23/ 10 / 2012 UNIVERSITE MOULOU D MAMMERI TIZI-
OUZOU
- [5] <https://www.researchgate.net/publication/323430278> (metformine–A Panacea
Pharmaceutical Agent through convergence révolution initiative)
- [6] Mémoire de fin d'études : Pour l'Obtention du Diplôme de licence Sciences et Techniques
Validation Analytique de Dosage de la Metformine par la Méthode HPLC
Présenté par: MOHAMED ADIL MAHRAZ Année Universitaire : 2011-2012
- [7] metformine pharmacodynamique vidal
- [8] Les nouvelles promesses de la metformine Vers une meilleure compréhension de ses
mécanismes d'action (article)
- [9] Isabelle Pinguet. Validation analytique : application de la procédure SFSTP 2003-2006 au
domaine
de la phytothérapie. Sciences pharmaceutiques. 2015. dumas-01188779
- [10] Guide de validation des méthodes d'analyses ANSES/PR3/07/01 version a Date : 28
octobre 2015
- [11] Validation des méthodes d'analyse quantitative par le profil d'exactitude Numéro spécial
2010 Collectif Responsables scientifiques : Max Feinberg et Michel Laurentie
Animatrice : Annie Guerin - Coordonnatrice : Marie Huyez-Levrat5
- [12] MEMOIRE DE MASTER
Optimisation par plan d'expérience, mise au point et validation analytique d'une méthode de
dosage simultanée des deux conservateurs antimicrobiens méthyle et propyle parabène après

extraction liquide –liquide, selon le protocole SFSTP 2006Présenté par : Melle TELLAL Sakina et Melle TOULAIT Thinhinanele 11 / 07 / 2018,

[13]MEMOIRE DE FIN D’ETUDES En vue de l’obtention du Diplôme de Docteur en Pharmacie Mise au point et validation d’une méthode de dosage du Diclofénac sodique dans des comprimés gastro-résistants de50 mg par HPLC, en vue d’une étude du profil de dissolution Réalisé par : Mr TAMAZIRT Boussad ANNEE UNIVERSITAIRE : 2016/2017 UMMTO

[14]MEMOIRE DE MASTER

Optimisation par plan d’expérience, mise au point et validation analytique d’une méthode de dosage simultanée des deux conservateurs antimicrobiens méthyle et propyle parabène après extraction liquide –liquide, selon le protocole SFSTP 2006Présenté par : Melle TELLAL Sakina et Melle TOULAIT Thinhinanele 11 / 07 / 2018

[15] : Commission SFSTP, Ph. Hubert, J.J. Nguyen-Huu B. Boulanger, E. Chapuzet, P. Chiap, N. Cohen, P.A. Compagnon, W. Dewe, M. Feinberg, M. Lallier, M. Laurentie, N. Mercier, G. Muzard, C. Nivet, L. « Validation des procédures analytiques quantitatives Harmonisation des démarches partie II statistiques (2006)

[16] : Isabelle Pinguet .Validation analytique : application de la procédure SFSTP 2003-2006 au domaine de la phytothérapie

[17] : Bouabidi A. Thèse Doctorat en Sciences Pharmaceutiques .Etude Critique des Différentes Approche de Validation des méthodes Analytique .Faculté des Sciences Ben M’Sik Casablanca .Faculté de Médecine Département Pharmacie Université de Liège ; 2013.

[18]CHROMATOGRAPHIE EN PHASE LIQUIDE A HAUTE PERFORMANCE (CLHP – HPLC)

[19]<http://biotech.spip.ac-rouen.fr/spip.php?article9> HPLC Principe et appareillage

Publication date: mercredi 20 janvier 2010

[20]CHROMATOGRAPHIE EN PHASE LIQUIDE A HAUTE PERFORMANCE (CLHP – HPLC)

[21]Mémoire du Mastère en chimie analytique ÉTUDE DE LA SÉPARATION DES FLUOROQUINOLONES PARHPLC: APPLICATION À L'ÉTUDE DE LEUR DÉGRADATIONPAR RAYONNEMENT GAMMA

Présenté par LATIFA BEN SAAD Soutenu le 19 /12/2013 Université Tunis El Manar Faculté des Sciences de Tunis

[22]Chapitre 4 cours CHROMATOGRAPHIE LIQUIDE : Article

[23] www.123bio.net/cours/chromato/echange.html

[24] hmf.enseeiht.fr/travaux/CD0910/bei/beiere/groupe3/node/114.html

[25]STP PHARMA PRATIQUES - volume 16 - N° 1 - janvier/février 2006

[26] STP PHARMA PRATIQUES - volume 16 - N° 2 - mars/avril 2006

[27]MISE AU POINT ET VALIDATION D'UNE METHODE DE DOSAGE DE FUROSEMIDE DANS DES COMPRIMES DE 40 mg PAR LA CHROMATOGRAPHIE LIQUIDE A HAUTE PERFORMANCE

Réalisé par :

SLIMANI Silia

ZALOUK Thiziri

ZERBOUT Hocine

Le : 09juillet 2019

ANNEXES

Annexe I : HPLC

La chromatographie en phase liquide

La chromatographie permet la séparation ou la purification d'un ou de plusieurs composés d'un mélange en vue de leur identification et de leur quantification.

La chromatographie en phase liquide a permis de réaliser des analyses qui n'étaient auparavant pas possible avec les techniques sur couche mince ou en phase gazeuse. A l'origine la chromatographie en phase liquide se faisait sur des colonnes en verre. Le liquide traversait la phase stationnaire par gravité ou sous faible pression.

Puis pour augmenter le débit, des manipulations ont été réalisées sous pression plus forte. C'est ce que l'on a appelé la chromatographie liquide sous haute pression (HPLC). Très rapidement le P de pression est devenu le P de performance lorsque l'on a optimisé la technique (diminution de la taille de particules de la phase stationnaire, régularité de cette phase...) [15].

1. Principe :

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 analyser est injecté puis transporté au travers du système chromatographique. Les composés en solution se répartissent alors suivant leur affinité entre la phase mobile et la phase stationnaire.

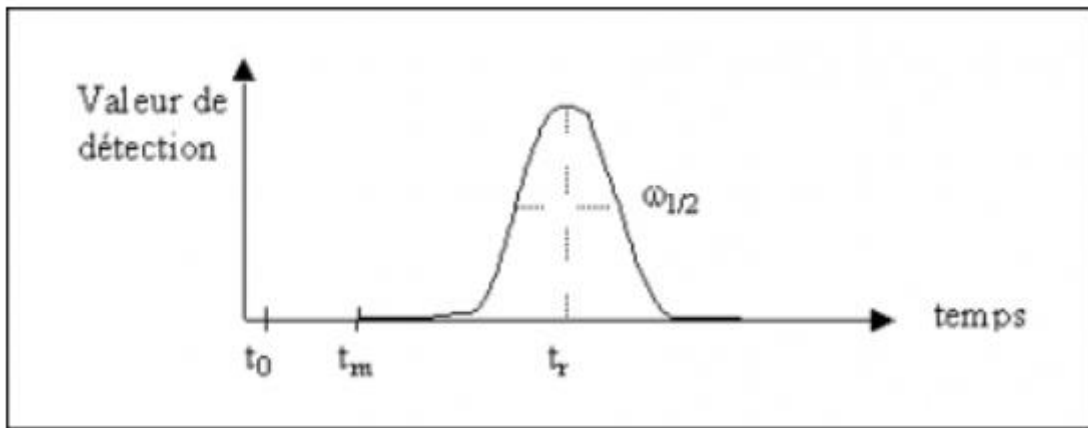
En sortie de colonne grâce à un détecteur approprié les différents solutés sont caractérisés par un pic. L'ensemble des pics enregistrés est appelé chromatogramme [15].

2. Notions fondamentales

La phase stationnaire est un support plus ou moins poreux recouvert d'un gel (liquide greffé) qui a les propriétés désirées pour retenir les molécules de solutés.

La phase mobile ou éluant est un liquide qui entraîne les solutés à travers la colonne.

2.1. Notion de temps



- t_0 est le temps du début de l'injection
- Le temps mort t_m est le temps mis par un composé non retenu par la phase stationnaire pour traverser la colonne (temps passé dans la phase mobile)
- Le temps de rétention t_r est le temps mis par un soluté pour traverser la colonne. C'est le temps passé dans la phase stationnaire et dans le volume mort de la colonne. Ce temps est caractéristique d'un soluté dans des conditions d'analyse donnée. La surface du pic est fonction de la quantité du constituant dont il est la trace.
- Le temps de rétention réduit t'_r est le temps passé par un soluté dans la phase stationnaire, soit

$$t'_r = t_r - t_m$$

2.2. Notion de concentration

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

- 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

Ce coefficient est fonction de 3 types d'affinités :

celle entre le soluté et la phase mobile

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.

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

2.3. Notion d'efficacité

La largeur d'un pic est caractéristique de l'efficacité de la séparation : plus le pic est fin plus la chromatographie est efficace. L'efficacité est mesurée par :

- le nombre de plateaux théoriques N_{th}

$$N_{th} = 5,54 \left(\frac{t_r}{\omega_{1/2}} \right)^2$$

t_r : temps de rétention

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

Remarque :

N_{th} est très utilisé en HPLC. Pourtant il serait plus judicieux d'utiliser N_{eff} (nombre de plateaux effectifs) puisqu'il dépend vraiment du temps passé dans la phase stationnaire.

$$N_{eff} = 5,54 \left(\frac{t_r - t_m}{\omega_{1/2}} \right)^2$$

Expérimentalement t_m est difficile à déterminer d'où l'utilisation de N_{th} .

- La hauteur équivalente à un plateau théorique : HEPT, qui est défini comme :

$$HEPT = \frac{L}{N_{th}}$$

L : Longueur de la colonne
 Nth : Nombre de plateaux théoriques

Quels sont les facteurs d'élargissement des pics ?

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 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.

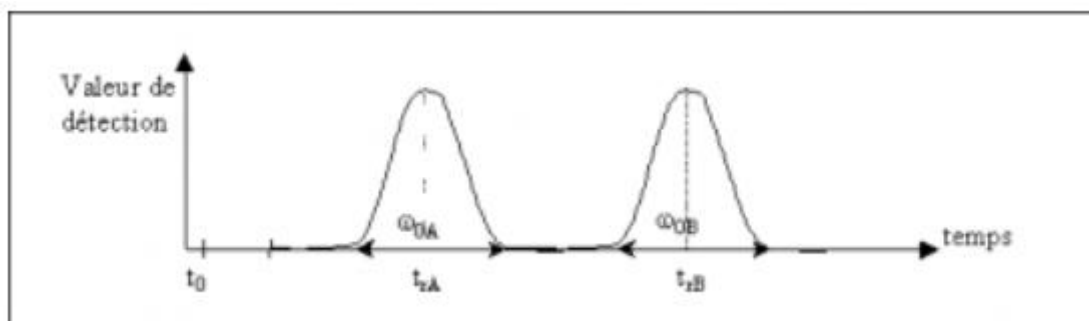
La résistance au transfert de masse : l'élargissement est expliqué par l'accumulation de phase mobile dans les anfractuosités du support. Les molécules qui y diffusent vont moins vite que celle qui n'y diffusent pas.

La diffusion longitudinale. Ce phénomène diminue plus la vitesse de la phase mobile augmente.

Dans la pratique cette diffusion est négligeable en HPLC.

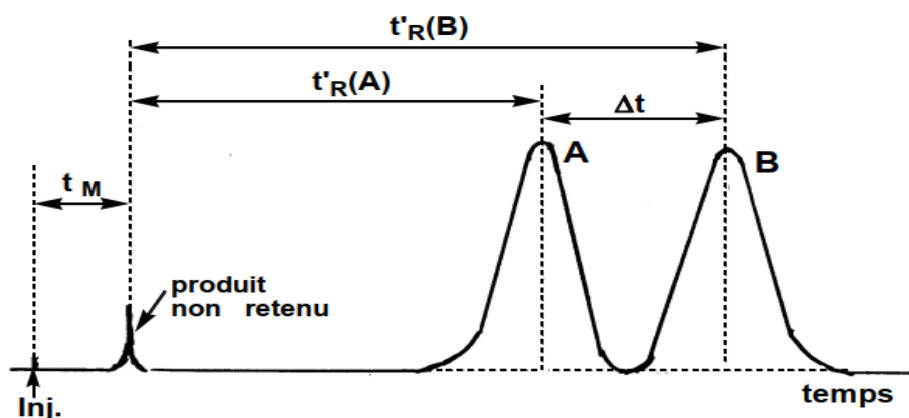
En conclusion l'efficacité calculée d'une chromatographie, représentée par la HEPT, est fonction de la vitesse de la phase mobile donc du débit, et de la qualité (régularité, remplissage) de la phase stationnaire .

2.4. Qualité de la séparation



La sélectivité (α)

Elle est définie comme le rapport des temps de rétention réduits [22].



$$\alpha = \frac{t'_{R(B)}}{t'_{R(A)}} = \frac{k'_B}{k'_A}$$

a est toujours > 1 car on choisit $t'_{rB} > t'_{rA}$

• La résolution (R)

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

$$R = \frac{(t'_{rB} - t'_{rA})}{(\omega_{0B} - \omega_{0A})}$$

$R < 1$: mauvaise résolution

$1 < R < 1,4$: résolution acceptable

$1,4 < R < 1,6$: résolution optimale

$R > 1,6$: résolution trop bonne car le temps d'analyse est rallongé

Remarques :

Si les pics sont gaussiens $w_0 = 1,7 w / 2$

Il est parfois utile d'exprimer cette résolution en fonction de la sélectivité et de l'efficacité du dernier des 2 pics étudiés

$$R = \frac{1}{4} \times \frac{\alpha - 1}{\alpha} \times \frac{K'_B}{1 + K'_B} \times \sqrt{N_{th}} = \frac{1}{4} \times \frac{\alpha - 1}{\alpha} \times \sqrt{N_{eff}}$$

2.5. Notion de pression

A l'intérieur d'une colonne la phase mobile frotte sur les parois de la colonne mais aussi sur les particules de phase stationnaire. Ces frottements définissent la résistance à l'écoulement. Les particules de phase stationnaire sont sphériques. Si l'on divise leur diamètre par 10, on diminue leur surface d'un facteur 100 et leur volume d'un facteur 1000. On peut donc placer dans la colonne 1000 fois plus de particules et donc augmenter de 10 fois la surface en contact avec la phase mobile. La résistance à l'écoulement est donc augmentée.

En conséquence, pour maintenir le débit constant dans la colonne il faut augmenter la pression plus la granulométrie de la phase stationnaire est faible.

En HPLC on travaille, en tête de colonne, à des pressions entre 20 et 150 bars [15].

3. Les différents modes de séparation

Il existe différents modes de séparation en chromatographie en phase liquide :

- l'adsorption
- le partage (80% des séparations)
- l'échange d'ions
- l'exclusion

Les trois premiers types utilisent la polarité des solutés pour les séparer.

4. Polarité et chromatographie

4.1 Polarité d'une molécule

La polarité d'une molécule est une notion intrinsèque. Certaines molécules étant dissymétriques, les électrons ne sont pas uniformément répartis autour d'elles. De ce fait il existe un moment dipolaire permanent qui crée un champ électrique local. Ces molécules sont dites polaires.

4.2. Interactions entre molécules

Dans la nature, les molécules ne sont pas isolées. Entre elles il existe différents types d'interactions :

- les interactions diélectriques ou ioniques
- les liaisons " hydrogène "
- les forces de Van Der Waals

4.3. Notion de polarisabilité

Sur certaines molécules isolées qui ne possèdent pas de moment dipolaire permanent, un champ électrique peut créer un champ dipolaire induit, en déformant les orbitales électroniques ou en modifiant la position relative des atomes. Ces molécules sont dites polarisables.

4.4. Application à la chromatographie

Il existe des échelles de polarité, mais de manière on utilise la notion de polarité comme une donnée comparative entre molécules. On dit que tel composé est plus polaire ou moins polaire qu'un autre. De même on dit que la phase mobile et la phase stationnaire sont polaires, peu polaires ou apolaires.

Pour qu'il y ait séparation chromatographique de composés, il faut que leurs molécules interagissent de manières différentes avec au moins une des phases (stationnaire et mobile). Ces phases doivent avoir des polarités différentes.

On peut appliquer la règle "qui se ressemble s'assemble" à l'ensemble soluté - phase stationnaire.

- Si la phase stationnaire est polaire, les composés polaires seront plus retenus que les composés non polaires.
- Si la phase stationnaire est apolaire, les composés apolaires seront plus retenus que les composés polaires.

Polarité de phase

À l'origine, les colonnes étaient remplies de silice (phase stationnaire polaire). Elle doit sa polarité aux groupements silanols Si-OH qui sont polaires. Pour que la séparation soit efficace, la phase mobile doit alors être peu polaire.

L'ensemble "phase stationnaire polaire et phase mobile peu polaire" forme la chromatographie à polarité de phase normale.

Par la suite, les particules de silice (support) ont été enrobées de paraffine en C 18 pour faire une phase apolaire.

Dans ce cas, pour que la séparation soit efficace, la phase mobile est polaire (généralement à base d'eau).

L'ensemble "phase stationnaire apolaire et phase mobile polaire" forme la chromatographie à polarité de phase inversée.

Aujourd'hui, les phases stationnaires sont greffées chimiquement pour la plupart sur de la silice sphérique et calibrée.

Composition de la phase mobile

Dans la pratique, chaque séparation nécessite une polarité de la phase mobile qui lui est propre. Chaque solvant ayant une polarité donnée, on ajuste la polarité globale de la phase mobile en mélangeant plusieurs solvants miscibles. A cette composition de phase mobile correspond une force éluante qui caractérise le pouvoir d'entraîner les solutés.

Il faut ajuster la force éluante en fonction des solutés à séparer. Pour cela, on peut utiliser un solvant pur ou un mélange de solvants : on dit travailler en mode isocratique.

Dans certains cas il est utile de faire varier la force éluante au cours de l'analyse. Si le mélange de différents solvants varie au cours de la séparation, on réalise alors un gradient d'élution, car la meilleure force éluante pour le début de l'analyse n'est pas forcément adaptée pour une bonne séparation des solutés sortant en fin de chromatogramme.

Ces 2 modes sont utilisés pour des analyses en chromatographie à polarité de phase normale ou inversée [15].

5. Appareillage

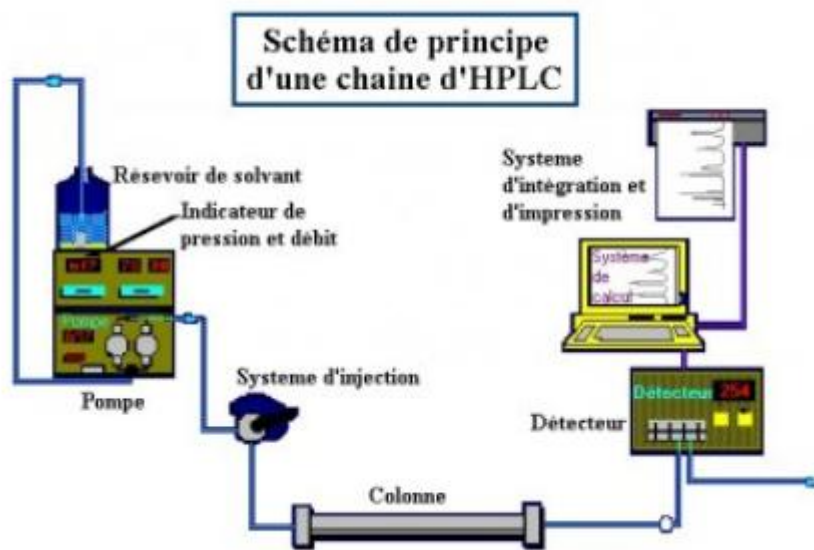


Figure : schéma de principe d'une chaîne d'HPLC [15]

La phase mobile est pompée à partir d'une bouteille et parcourt en permanence le chromatographe : l'injecteur, la colonne dans le four et le détecteur. La température du four est maintenue constante. Le signal du détecteur est amplifié et enregistré.

5.1. Réservoir de la phase mobile (solvant)

Le plus souvent ce réservoir est une bouteille en verre dans lequel plonge un tube avec une extrémité filtrante en téflon. S'il est nécessaire le dégazage peut se faire par agitation puis conservation du solvant sous atmosphère d'hélium.

5.2. Pompe

Elle délivre en continu la phase mobile. Elle est définie par la pression qu'elle permet d'atteindre dans la colonne, son débit, et la stabilité du flux. Actuellement les paramètres d'une pompe sont

* débit : 0,01 à 10 mL/min

* stabilité < 1% (<0,2% pour des chromatographies d'exclusion diffusion)

* pression maximale > 350 bars

Certaines sont pilotées par informatique (bien utile lors de l'utilisation de gradient d'élution).

5.3. Injecteur

Le type d'injecteur le plus couramment utilisé comporte une vanne à boucle d'échantillonnage d'une capacité fixe (10, 20, 50 μ L...). Cette boucle permet d'introduire l'échantillon sans modifier la pression dans la colonne.

Vanne à boucle d'échantillonnage

Elle possède 2 positions. La première permet le remplissage de la boucle d'injection de volume fixe (load), la seconde permet la mise en circulation de l'échantillon dans le système chromatographique (inject).

Le remplissage de la boucle d'injection se fait à l'aide d'une seringue.

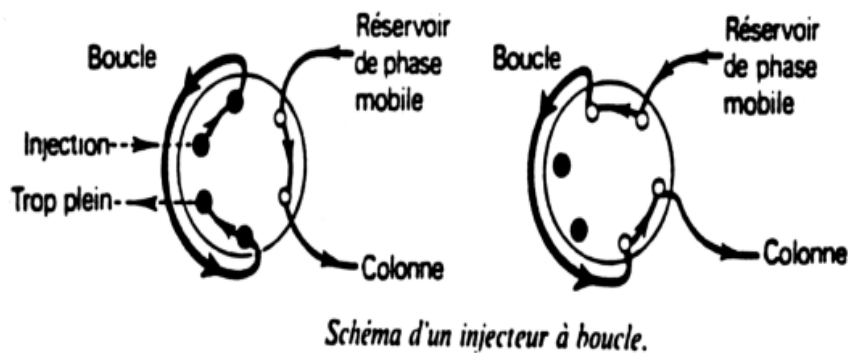


Figure : schéma d'un injecteur à boucle [17]

5.4. Colonne

En mode analytique, les colonnes en inox ont généralement un diamètre interne de 4,6mm. La longueur est de 5, 10, 15, ou 25cm. Le remplissage (en silice, silice greffée ou particules polymériques) a une granulométrie de 3, 5, ou 10 μ m. Le diamètre interne d'une colonne est usuellement de 4 ou 4,6 mm. Si des substances pures doivent être collectées en fin de chromatogramme des colonnes de gros diamètre seront nécessaires. Paramètres de colonne utilisée en HPLC de phase réverse

5.5. Détecteurs

Le détecteur suit en continu l'apparition des solutés. Pour détecter, on utilise différents phénomènes physico-chimiques. Le signal obtenu est enregistré en fonction du temps. Généralement, on compare le signal obtenu pour la phase mobile et le soluté à celui de la phase mobile seule. Le détecteur le plus utilisé en CLHP est un spectrophotomètre d'absorption UV-visible (190-600 nm) relié à la sortie de colonne.

Il existe d'autres détecteurs :

- réfractomètre différentiel
- UV à barrette de diodes
- électrochimique
- fluorimétrie...

ainsi que différents types de couplage :

- Spectrométrie infrarouge
- Spectrométrie de masse
- Résonance Magnétique Nucléaire...

5.6. Intégrateur

La chromatographie est une méthode de séparation utilisée en vue d'un dosage. Il faut donc avant tout chercher à séparer correctement les pics avant de les intégrer. Une intégration consiste à mesurer la surface sous un pic.

La détection d'un pic chromatographique par l'intégrateur, dépend de 2 paramètres :

* la largeur attendue des pics

* le seuil d'intégration (sensibilité)

La largeur de pic est à peu près prévisible en fonctions de la technique d'analyse et des conditions opératoires. Elle détermine la fréquence d'échantillonnage du signal. Le pic est alors découpé en tranches. Le seuil d'intégration est la valeur du signal à partir de laquelle le calculateur repère un début de pic [15].

6. Mise au point d'une séparation par la chaîne HPLC

Après avoir préparé l'échantillon et choisi le type de chromatographie (partage, phase inversée, exclusion, diffusion...), la mise au point d'une méthode de séparation chromatographique se fait par étape:

✓ Obtenir un débit d'écoulement de la phase mobile correspond à une séparation dans un délai de temps acceptable.

✓ Ajuster la sélectivité en agissant sur la composition de la phase mobile et sur son pH.

✓ Optimiser la méthode en influant sur le débit d'écoulement de l'éluant, le pH, la phase stationnaire et des autres paramètres.

La méthode analytique finale optimisée donne ainsi des pics de bonne résolution supérieure à l'unité.

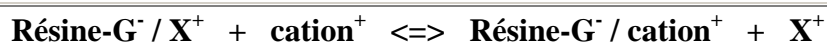
Pour mettre au point une méthode chromatographique pour analyser les produits pharmaceutiques, il est conseillé d'utiliser la chromatographie liquide à haute performance en phase de polarité inversée en utilisant généralement des colonnes C18 ou C8 à température ambiante, avec un débit variant entre 1 et 2 mL /min compatible avec la pression en tête de la colonne. Une large plage de composition de la phase mobile à base de méthanol ou d'acétonitrile peut convenir. Pour atteindre une séparation convenable le plus vite possible, il vaut mieux débiter avec une force éluante importante. Lorsque la phase mobile contient 100% de méthanol ou d'acétonitrile. Si on utilise le modificateur organique entre 80% et 90%, la force éluante est souvent encore trop importante et par conséquent tous les composés sortent proche du front de solvant (temps mort) et tous ne sont pas bien séparés.

Une bonne méthode consiste à diminuer la teneur en solvant organique. Pour cette raison, on doit ainsi balayer rapidement la plage de la force éluant de la phase mobile [18].

7. CHROMATOGRAPHIE SUR ECHANGEURS D'IONS :

Principe : Les échangeurs d'ions sont des macromolécules insolubles portant des groupements ionisables, qui ont la propriété d'échanger de façon réversible certains de leurs ions, au contact d'autres ions provenant d'une solution.

Résine cationique : qui échange réversiblement des cations. Une résine cationique est chargée négativement [20].



Résine échangeuse de cations (cationique) :

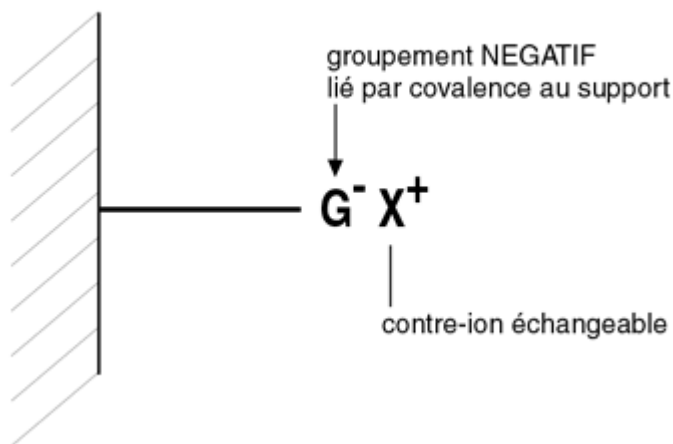
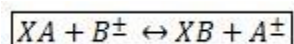


Figure : Résine échangeuse de cation cationique [19]

L'échange d'ions est un procédé permettant de récupérer une famille ionique d'une solution contaminée par échange contre un autre type d'ion [20].

Cette réaction a lieu sur des bases ioniques positionnées sur des particules sphériques qui forment une résine qui confère une structure rigide au procédé de traitement, on parle ainsi de résine échangeuse d'ions. Cette résine est agencée en colonnes à travers lesquelles l'eau percole verticalement, on désigne donc également ces dispositifs comme des colonnes chromatographiques. Cette technique est particulièrement adaptée à la récupération d'ions métalliques présents dans des effluents miniers pollués. Elle est donc recommandée pour le traitement des ions de chrome hexavalent que l'on trouve dans les eaux de ruissellement des bassins versants du massif de Koniambo. Les réactions d'échanges d'ions sont réversibles et sélectives. Si l'on note X la partie active de la résine, on a donc des réactions du type :



C'est donc cette grande interactivité entre la phase fixe et les ions de la phase mobile qui permet d'utiliser cette technique dans le traitement des eaux.

Il existe différents types de résines, certaines sont faites pour récupérer des cations, d'autres fixent les anions. Utilisées principalement en déminéralisation, les résines échangeuses de cations sont divisées en deux catégories, permettant de fixer aussi bien des ions issus de solutions fortement acides (la résine est alors préparée avec des bases sulfonates) ou de solutions au pH plus neutre (bases carboxylates). De même, chez les résines échangeuses d'anions, on retrouve une différenciation similaire avec des groupes fonctionnels ioniques à l'ammonium quaternaire servant pour les solutions faiblement basiques, et préparées à l'ammonium non quaternaire pour les pH les plus élevés.

Une résine échangeuse d'ions fonctionne par cycle décomposé en différentes phases. On distingue :

La phase de saturation de la résine durant laquelle on fait percoler la solution polluée jusqu'au maximum de capacité de la résine.

La phase de soulèvement qui permet d'éliminer les particules qui sont restées bloquées en amont de la résine en procédant à un fort contre-lavage

La phase de régénération où l'on fait percoler dans la colonne une solution chargée en ions spécifiques qui viendront prendre la place des molécules capturées dans les groupes fonctionnels. Cette réaction est induite par l'inversion de l'équilibre chimique provoquée par les importantes concentrations en régénérant utilisées. On utilise généralement une solution à base d'acide chlorhydrique, d'acide sulfurique, de soude ou une solution salée, choisie selon le pH et les caractéristiques de la résine.

Une dernière phase de rinçage qui permet d'éliminer les traces de régénérant restés en excès à l'intérieur de la résine.

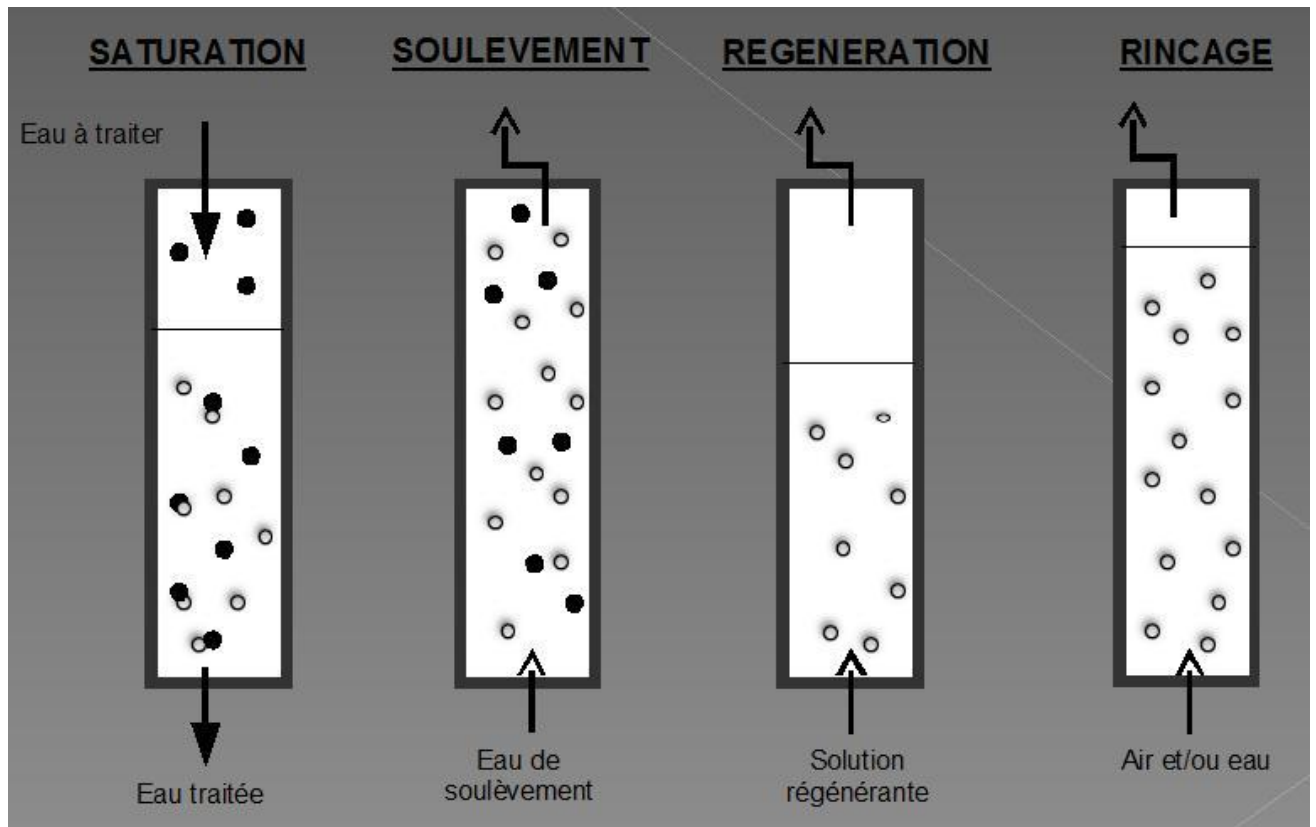


Figure: Description des quatre phases d'un cycle de chromatographie [20]

Annexe II : comprimés

Il existe différentes formes pharmaceutiques généralement classées selon la voie d'administration ou l'état physique. Chaque forme présente des avantages et des inconvénients. Il a été choisi de s'intéresser aux comprimés, forme pharmaceutique solide la plus répandue.

1. Définition

Les comprimés sont des préparations solides contenant une unité de prise d'une ou plusieurs substances actives. Ils sont obtenus en agglomérant par compression un volume constant de particules ou par un autre procédé de fabrication approprié tel que l'extrusion, le moulage ou la cryodessiccation (lyophilisation). Le comprimé est d'une forme sèche dont la conservation est favorisée par l'état condensé et sec. En tant que préparation unidose, le comprimé assure l'administration d'une dose précise de principe(s) actif(s) (PA) et l'adaptation des posologies est conditionnée par les dosages existants. [21]

2– Avantages et inconvénients

L'importance prise par cette forme s'explique par ses avantages qui sont les suivants :

- Emploi facile : les comprimés sont d'un volume réduit et leur solidité est suffisante pour subir les manipulations de conditionnement et de transport.
- Dosage précis par unité de prise.
- Milieu sec et condensé, favorable à une bonne conservation.
- Forme particulièrement intéressante pour les principes actifs peu solubles.
- Fabrication industrielle à grande échelle d'où prix de revient peu élevé.
- La saveur désagréable des principes actifs, déjà moins perceptible qu'en milieu liquide, peut être complètement masquée par enrobage.
- Les comprimés à couches multiples permettent de résoudre des problèmes d'incompatibilités (principes actifs dans des couches différentes) ou de libération prolongée.

Ses inconvénients sont moins nombreux :

- Le comprimé constitue une forme condensée, ce qui, si le délitement n'est pas rapidement assuré, peut être nuisible pour la muqueuse digestive.
- La mise au point est délicate : Si le mode de fabrication n'est pas parfaitement étudié, le comprimé risque de ne pas se déliter dans le tube digestif.

- Les principes actifs liquides, s'ils ne sont pas en quantité très réduite, ne peuvent être mis en comprimés [22].

3. Composition des comprimés :

Un médicament est un mélange de nombreuses espèces chimiques. Il contient un ou plusieurs **principes actifs** et des **excipients**

3.1. Principe actif :

3.1.1. définition

Tout composant d'un médicament, qui est destiné à exercer une action pharmacologique ou un autre effet direct en rapport avec le diagnostic, le traitement, la prévention d'une maladie, ou à agir sur la structure, les fonctions de l'organisme humain ou animal par des moyens pharmacologiques. Un médicament peut contenir plusieurs principes actifs. Terme équivalent : substance active.

- Le principe actif est, la plupart du temps, en très faible proportion dans le médicament par rapport aux excipients. ...
- Le principe actif est désigné par sa dénomination commune internationale (DCI) : c'est le nom utilisé dans tous les pays du monde. C'est souvent son nom scientifique [23].

3.1.2. Classification selon le système de classification biopharmaceutique (BCS)

Actuellement, les composés pharmaceutiques sont regroupés selon les quatre catégories suivantes :

- BCS classe I : solubilité élevée, perméabilité élevée : ces composés sont très bien absorbés.
- BCS classe II : faible solubilité, perméabilité élevée : ces composés présentent en général une absorption dépendant du taux de dissolution.
- BCS classe III : solubilité élevée, faible perméabilité : ces composés présentent en général une absorption dépendant du taux de perméabilité. Pour ces composés on essaie de modifier légèrement la structure chimique.
- BCS classe IV : faible solubilité et faible perméabilité [24]

La metformine est classée dans la classe 3

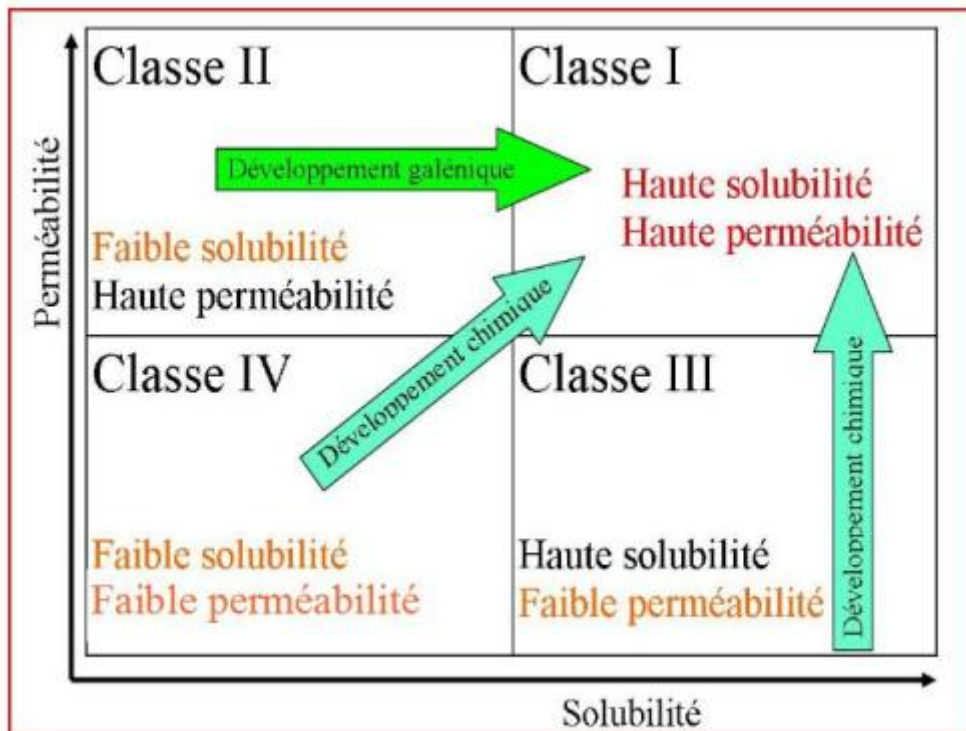


Figure : Représentation du système de classification biopharmaceutique montrant que l'absorption d'un composé de classe II peut être améliorée grâce à la formulation galénique.

Les composés de classe III et IV peuvent voir leur absorption augmentée après modification chimique . [24].

3.2. Excipients :

Tout composant, autre que le principe actif, qui est présent dans un médicament ou utilisé pour sa fabrication. La fonction d'un excipient est de servir de vecteur au principe actif, ou d'entrer dans la composition du vecteur, contribuant ainsi à certaines propriétés du produit, telles que la stabilité, le profil biopharmaceutique, l'aspect et l'acceptabilité pour le patient, la facilité de fabrication, la formulation d'un médicament comprend généralement plusieurs excipients [23].

Ils sont classés en plusieurs catégories apportant chacune au principe actif les qualités qui lui manquent : **les diluants ; agglutinants ou les liants ; les lubrifiants ; les délitant ou les désagrégeant ; adjuvants divers**

Dans le cas de la **granulation sèche**, tout peut être mélangé ensemble sauf le lubrifiant qui peut être ajouté au grain [21].

4. classification des comprimés :

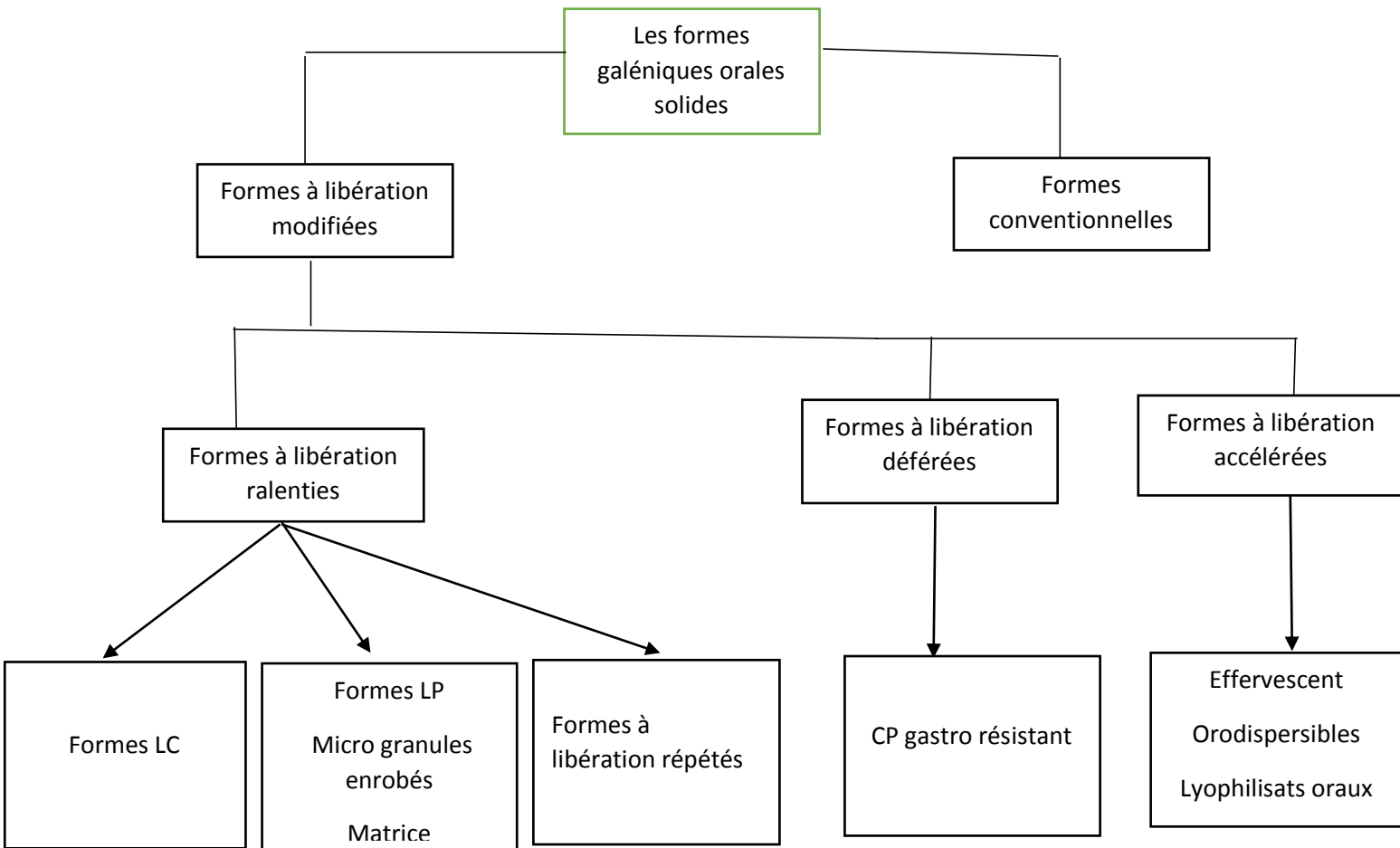


Figure : classification des comprimés [25].

6. Contrôle qualité :

Selon la norme ISO 9001, le mot « qualité » peut être définie comme : « l'ensemble des propriétés et caractéristiques d'un produit ou service qui lui confèrent l'aptitude à satisfaire des besoins exprimés ou implicites ». D'après les BPF européennes, lorsqu'on parle de la « qualité du médicament », il s'agit de la qualité à réaliser pour répondre aux besoins des malades, c'est-à-dire la qualité décrite dans le dossier de demande d'AMM. « le contrôle consiste à mesurer une ou plusieurs caractéristiques d'une entité et à comparer les résultats obtenus à des spécifications préétablies » [26].

Pour cela, il est exigé pour les comprimés les essais suivants regroupés en 4 catégories, selon le tableau I suivant

Tableau : Essais de contrôle qualité des comprimés [27]

Essais pharmacotechniques	Essais liés à la nature du PA
<ul style="list-style-type: none"> - Test de sécabilité - Test de dureté ou de résistance à la rupture - Test de friabilité - Essai d'uniformité de masse - Essai d'uniformité de teneur - Test de désagrégation - Test de dissolution in vitro 	<ul style="list-style-type: none"> - Test d'identification du PA - Dosage du PA - Identification et dosage des substances apparentées et des produits de dégradation du PA
Essais d'identification et de dosage de diverses impuretés	Essais microbiologiques
<ul style="list-style-type: none"> - Solvants résiduels (éthanol par exemple) - Eau - D'autres impuretés suspectées (métaux lourds dans le PA, impuretés provenant des excipients, etc.) 	<ul style="list-style-type: none"> - Le dénombrement des germes aérobies viables totaux (bactéries, moisissures et levures) - La recherche d'Escherichia coli

Annexe III : Etude statistique

1. Spécificité

Pour vérifier la spécificité d'une méthode d'analyse, on doit en premier lieu , préparer une solution placebo dont son signal doit être obligatoirement nul ($S_0=0$) afin d'assurer que la solution en question ne présente pas d'interférence(s). En second lieu , on prépare deux solutions ; une solution standard et solution de la forme reconstitué . On parle d'absence d'effet matrice si le signal obtenu de la première solution (S_1) est comparable à celui de la deuxième solution (S_2), c'est-à-dire que les deux chromatogrammes obtenus renferment des pics en même temps de rétention et avec des surfaces comparables, ou des droites comparables. Cette comparaison est basée sur le test t de Student.

2. Fonction de réponse

Il existe une relation entre la réponse Y après des mesures réalisées sur une série des SE et la concentration X de ces solutions, qui est exprimée par une fonction de type :

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

Avec ε qui est l'erreur résiduelle qui doit être le minimal possible.

Cette fonction doit être strictement monotone sur un intervalle de dosage donné.

Selon la méthode utilisée, on a différentes fonctions de réponses qui peuvent envisagées lors de la validation. Le tableau résume quelques exemples de ces fonctions .

Tableau : Exemples de fonctions de réponses

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

Fonction logistique à 5 paramètres	$Y = \alpha + \frac{\delta - \alpha}{\left[1 + \left(\frac{x}{\gamma}\right)^\psi\right]}$	$\beta, \alpha, \gamma, \sigma, \psi$	Non
---	--	---------------------------------------	-----

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 β 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 fonctions de réponses obtenues avec les standards de étalonnage. Ainsi l'alignement des n_{ij} répétitions du niveau de concentration j de la série i s'effectue comme suit :

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

En résumé les règles d'alignement pour les différentes fonctions de réponses dans le tableau ci dessous

Tableau : Règles d'alignement pour différentes fonctions de réponses

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

4. Prédiction inverses

C'est une forme de fonction inverse du courbe d'étalonnage qui nous permet de déterminer les concentrations calculées, à partir des résultats de la validation, selon cette formule :

$$X_{\text{calc}} = f^{-1}(Y).$$

Avant d'appliquer cette fonction, il faut d'abord assurer l'alignement de toutes les concentrations. Le tableau illustre ces prédictions selon l'alignement des fonctions de réponses utilisées .

Tableau : Calcul des prédictions inverses pour différentes fonctions de réponses.

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	$x_{ijk,calc} = \frac{-\hat{\beta}_i + \sqrt{\beta_i^2 - 4\hat{\gamma}_i(\hat{\alpha}_i - y_{ijk})}}{2\hat{\gamma}_i}$
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	$x_{ijk} = \hat{\gamma}_i \left[\left(\frac{\hat{\delta}_i - \hat{\alpha}_i}{y_{ijk} - \hat{\alpha}_i} \right)^{\frac{1}{\hat{\psi}_i}} - 1 \right]^{\frac{1}{\hat{\beta}_i}}$

5. Linéarité

Pour étudier la linéarité, elle doit être valide dans l'intervalle de conformité et d'inconformité, pour cela on réalise trois séries de gammes d'étalons, pour la forme standard et pour la forme reconstituée, les droites obtenues à partir de ces dernières doivent être superposables selon la formule suivante : $Y=f(X)$

Pour qu'il y ait de proportionnalité il faut que les deux pentes soient statistiquement différentes de zéro .

Le critère de linéarité se réfère à la relation entre la quantité introduite et la quantité calculée (résultat) d'analyte à partir de la courbe d'étalonnage tandis que la fonction de réponse se réfère à la relation entre la réponse instrumentale et la concentration .

6. Justesse et fidélité

6.1. Modèle de calcul

Pour déterminer ces deux paramètres, on doit d'abord calculer l'estimation. L'estimation de ces deux paramètres se réalise avec les concentrations calculées provenant des standards de validation en phase de validation (ou des standards d'étalonnage en phase de pré-validation).

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

Où : X_{ijk} est la K-ième concentration calculée du niveau j de la i^{ème} série.

μ_j est la moyenne des concentrations calculées de niveau j.

α_{ij} est l'écart entre la moyenne de la i^{ème} série et la moyenne μ_j , au niveau j; α_{ij} est considéré comme une variable aléatoire ayant une distribution normale de moyenne 0 et de variance $\sigma_{B,j}^2$

ε_{ijk} est l'erreur expérimentale, considérée comme une variable aléatoire ayant une distribution normale de moyenne 0 et de variance $\sigma_{r,j}^2$

L'erreur expérimentale est supposée indépendante de la série.

Les variances $\sigma_{B,j}^2$ et $\sigma_{r,j}^2$ 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 μ_j , $\sigma_{B,j}^2$ et $\sigma_{r,j}^2$ du modèle. Ceci est résumé dans la Figure 03 où les deux courbes de linéarité et de fonction de réponse sont présentées :

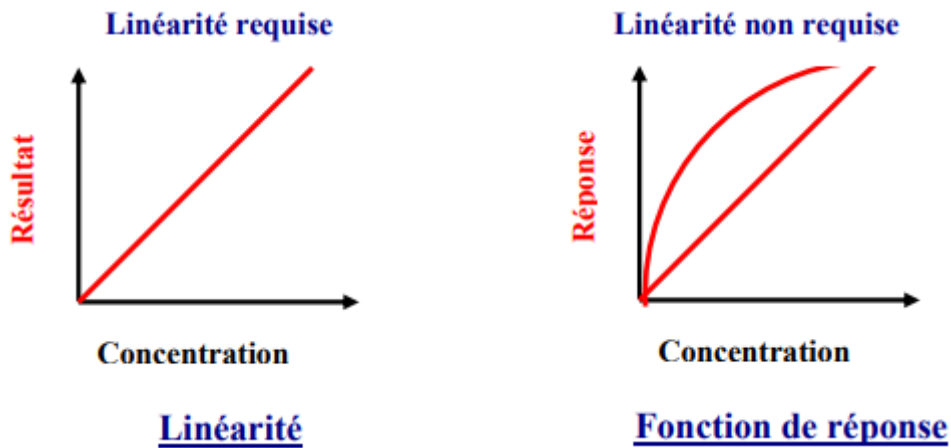


Figure : La différence entre linéarité et fonction de réponse

6.2. Justesse

La justesse (ou le biais) de la méthode se mesure, à un niveau donné 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 [14]:

$$\text{Biais}_j = \bar{X}_j - \hat{X}_j$$

$$\text{Biais}(\%)_j = \frac{\bar{X}_j - \hat{X}_j}{\bar{X}_j} \times 100$$

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

Avec :

\hat{X}_j = moyenne des concentrations introduites.

\bar{X}_j = moyenne des concentrations prédites.

6.3. 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.

Variance de la fidélité intermédiaire :

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

L'écart type de la répétabilité :

$$\hat{\sigma}_{B,i}^2 = \hat{\sigma}_{w,i}^2$$

7. 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

On peut l'exprimer en valeur relative : L'exactitude des résultats, l'erreur maximale observée, nous donne des indications sur les résultats obtenus dans les expériences de validation et un impact sur le choix de la fonction de réponse .

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

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

8. Erreur totale et profil d'erreur totale

Pour mesure d'une méthode analytique reflète, sa vraie valeur, biais, et fidélité, ce qui exprime comme suit :

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

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

$$X - \mu = \text{Erreur totale} = \text{Erreur de mesure}$$

D'après ces relations, l'erreur totale, est la somme de la justesse (biais) et de la fidélité. On plus, l'erreur totale est un bon indicateur de l'exactitude des résultats d'une méthode d'analyse.

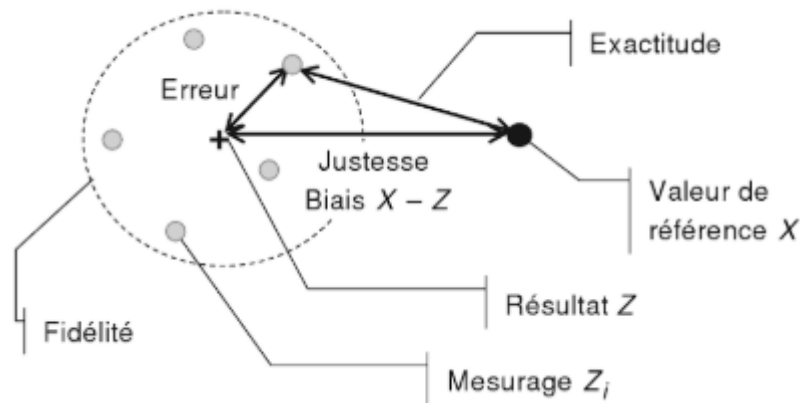


Figure: représentation schématique de l'exactitude.

9. Calcul de l'intervalle de tolérance

Ce qui nous importe cependant en validation, ce n'est pas la validité des résultats obtenus que nous obtenions avec l'erreur totale, mais plutôt la garantie ou une représentation de ce que la même procédure analytique pourra donner comme résultats dans le futur, C'est le rôle de l'intervalle de tolérance.

L'estimation des paramètres μ_j , $\sigma_{B,j}$ et $\sigma_{r,j}$ à chaque niveau de concentration j a pour but de permettre d'estimer la proportion attendue d'observation dans les limites d'acceptation prédéfinies $[-\lambda, \lambda]$, c'est-à-dire :

$$E_{\mu_M, \hat{\sigma}_M} \{ |X - \mu_T| < \lambda \mid \mu_M, \hat{\sigma}_M \} \geq \beta$$

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

$$E_{\mu_M, \hat{\sigma}_M} \{ P_x [\mu_M - Q_t \hat{\sigma}_M < X < \mu_M + Q_t \hat{\sigma}_M \mid \mu_M, \hat{\sigma}_M] \} = \beta$$

$$\begin{aligned} \hat{\sigma}_{FI,j}^2 &= \hat{\sigma}_{r,j}^2 + \hat{\sigma}_{B,j}^2 \\ R_j &= \frac{\hat{\sigma}_{B,j}^2}{\hat{\sigma}_{r,j}^2} \\ B_j &= \sqrt{\frac{R_j + 1}{nR_j + 1}} \\ v &= \frac{(R+1)^2}{\left(\frac{R+1}{K}\right)^2 + \frac{1}{I \times K}} \end{aligned}$$

Où :

$Q_t(v; \frac{1+\beta}{2})$ est le quantile β de la distribution t de Student à v degrés de liberté.

Le même intervalle en échelle relative devient

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

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 β pour le niveau de concentration en question, si l'intervalle de tolérance est incluse dans les limites $[-\lambda, \lambda]$ définies a priori en fonction des objectifs de la méthode.

10. Le profil d'exactitude

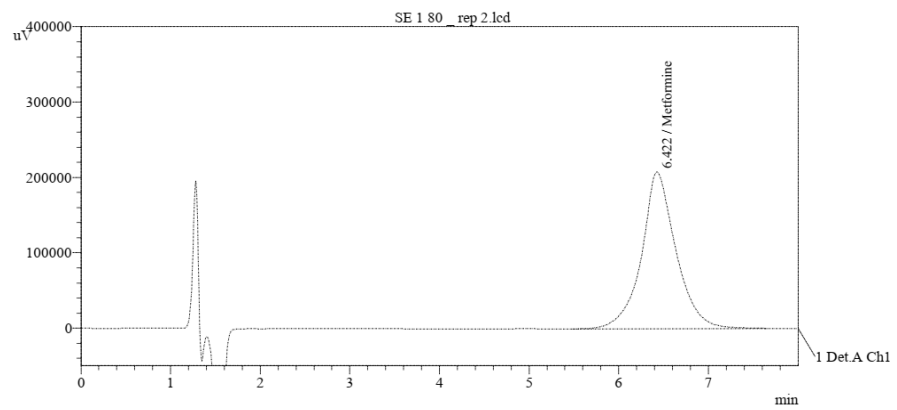
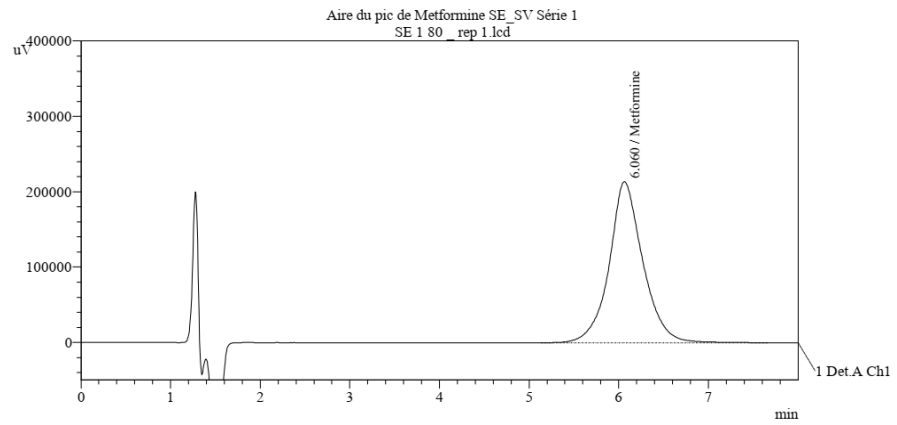
Selon l'équation ci-dessous les bornes de ces intervalles sont :

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

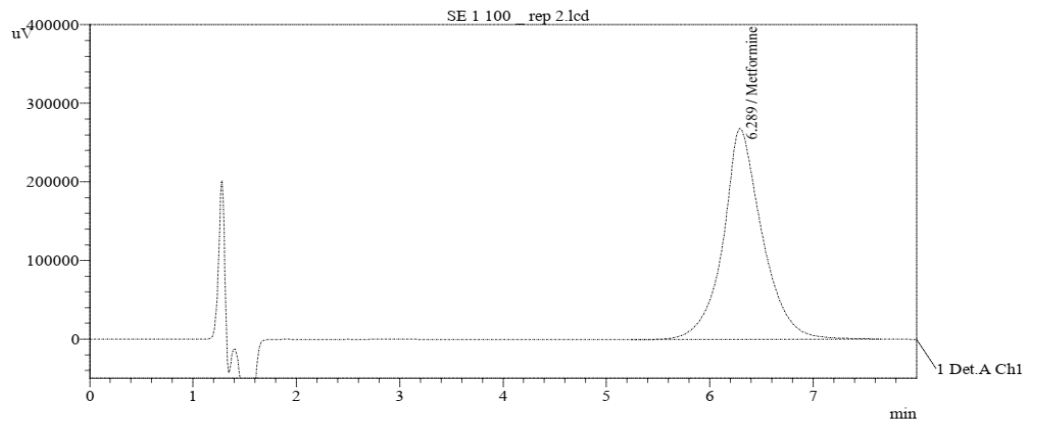
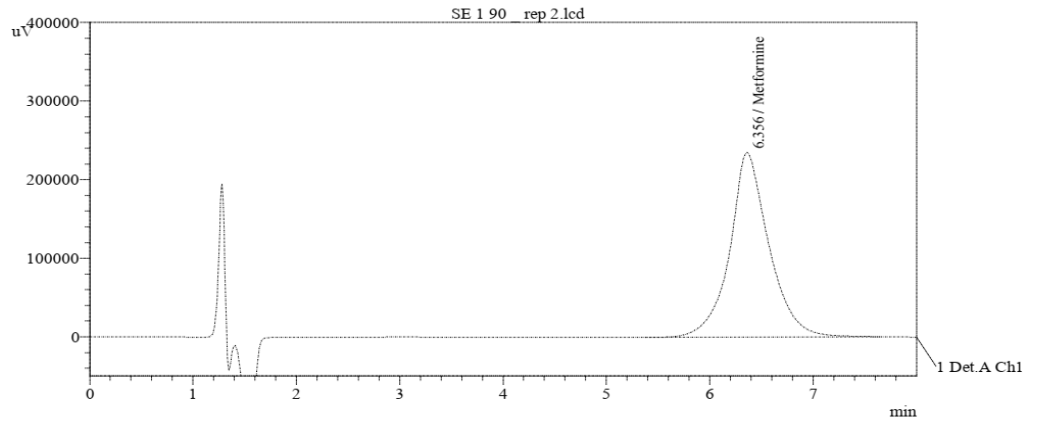
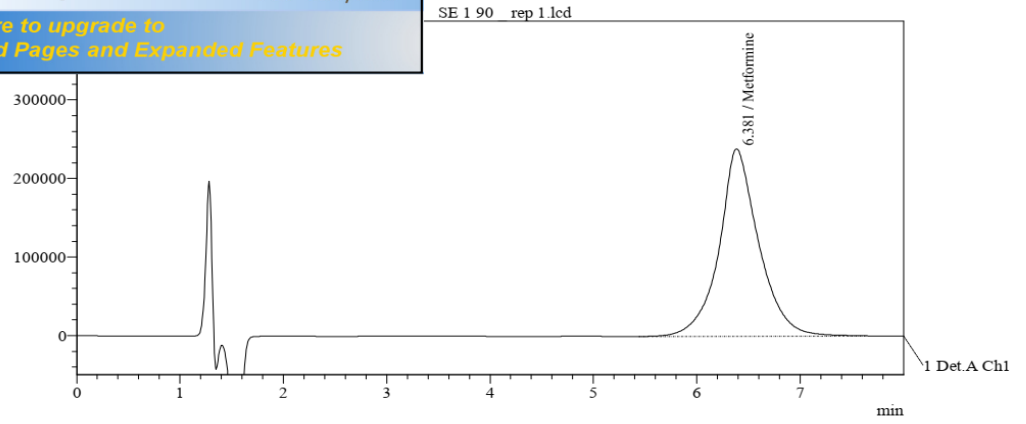
$$U_j(\text{borne inférieure}) = \text{biais}(\%)_j + Q_t \left(v; \frac{1+\beta}{2} \right) \sqrt{1 + \frac{1}{pnB_j^2} CV_{FI,J}}$$

Le profil d'exactitude de la méthode s'obtient en reliant d'une part les bornes L_j entre elles ($L_1 \dots L_m$) et d'autre part les bornes U_j entre elles [27].

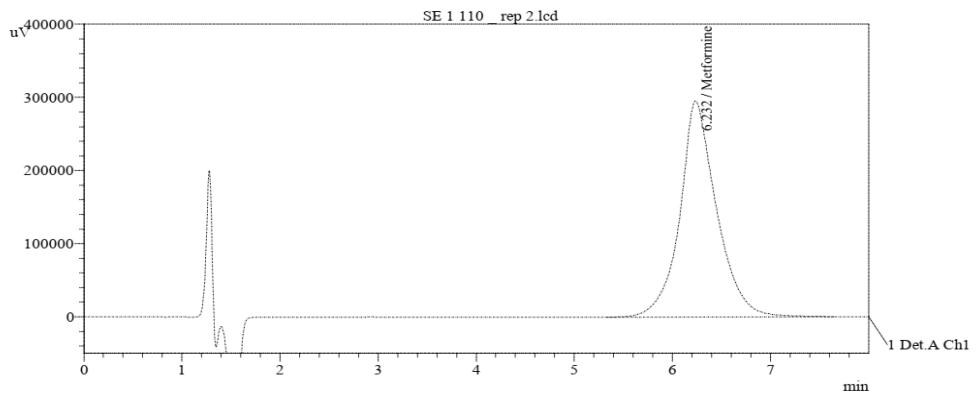
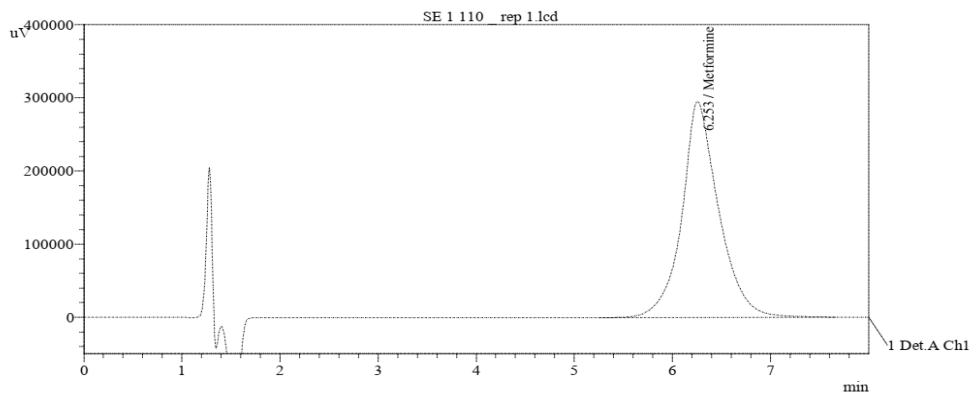
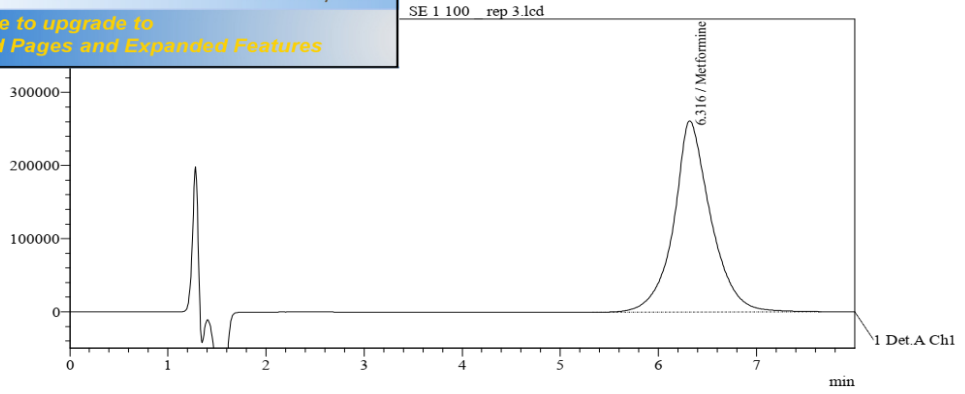
Annexe III: Donnés brutes de la validation



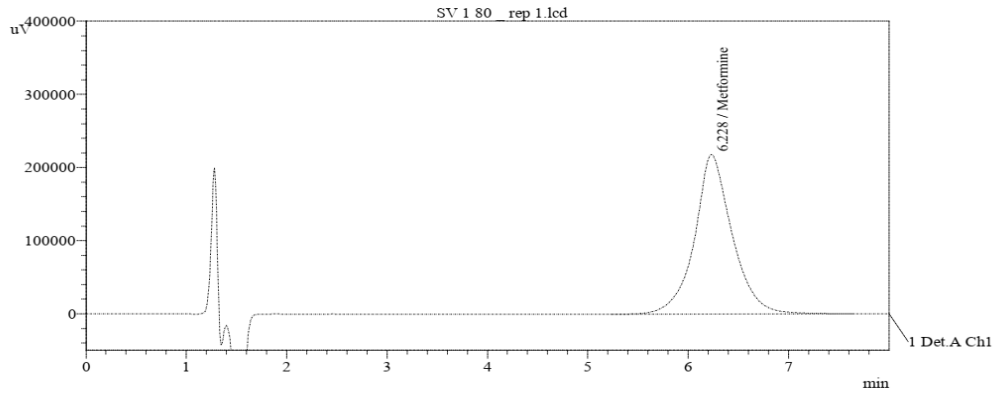
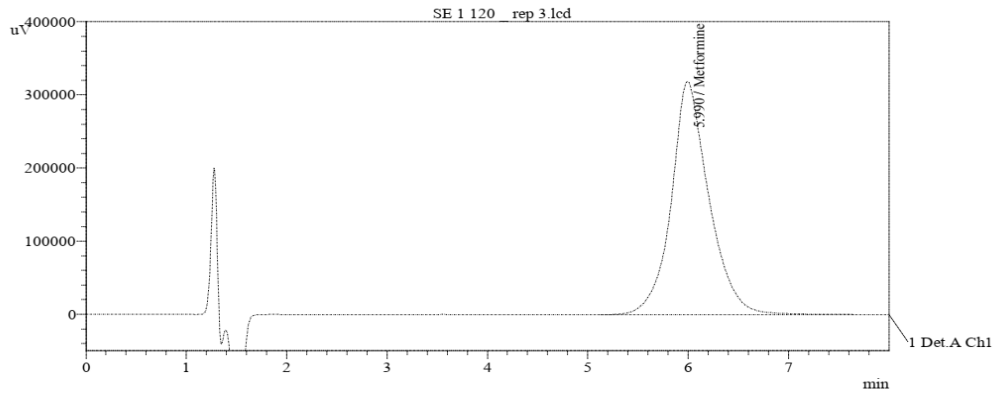
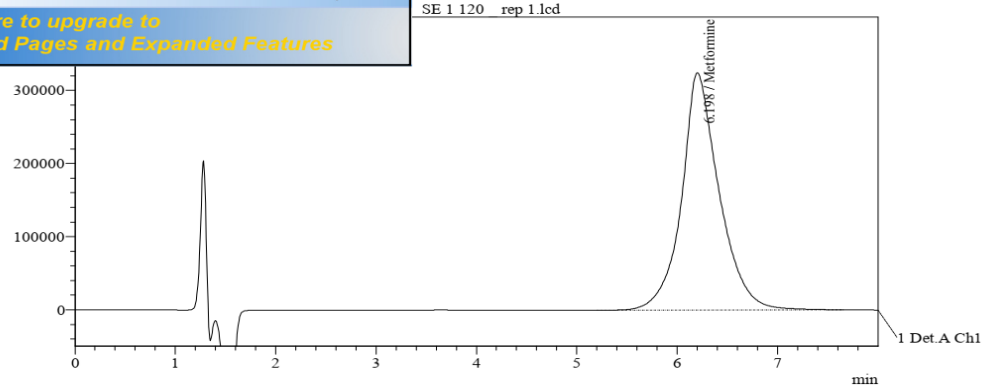
 **PDF Complete**
Your complimentary use period has ended.
Thank you for using PDF Complete.
[Click Here to upgrade to Unlimited Pages and Expanded Features](#)



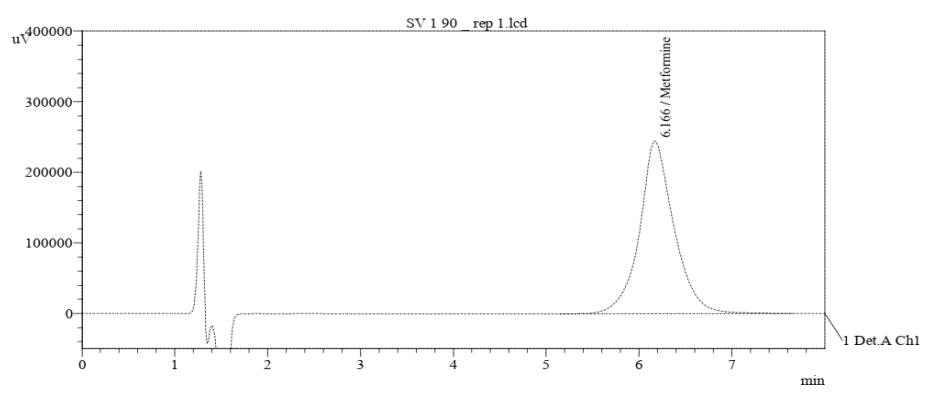
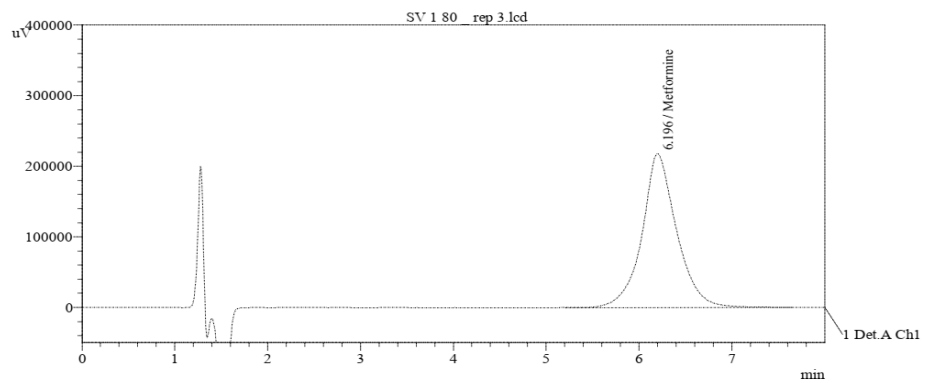
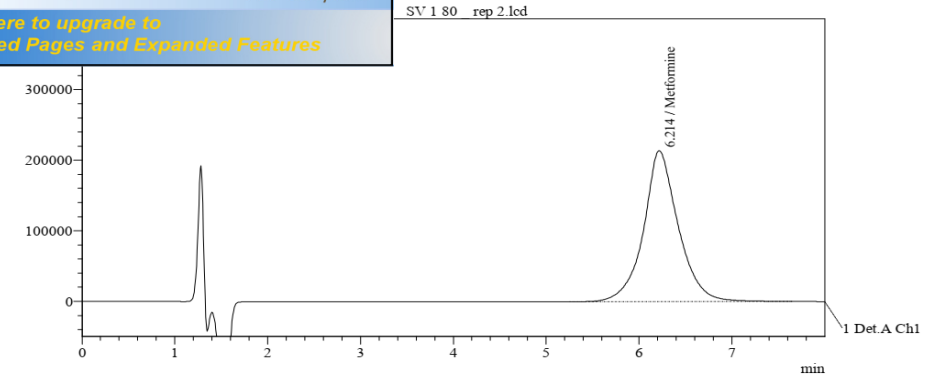
 **PDF Complete**
Your complimentary use period has ended.
Thank you for using PDF Complete.
[Click Here to upgrade to Unlimited Pages and Expanded Features](#)



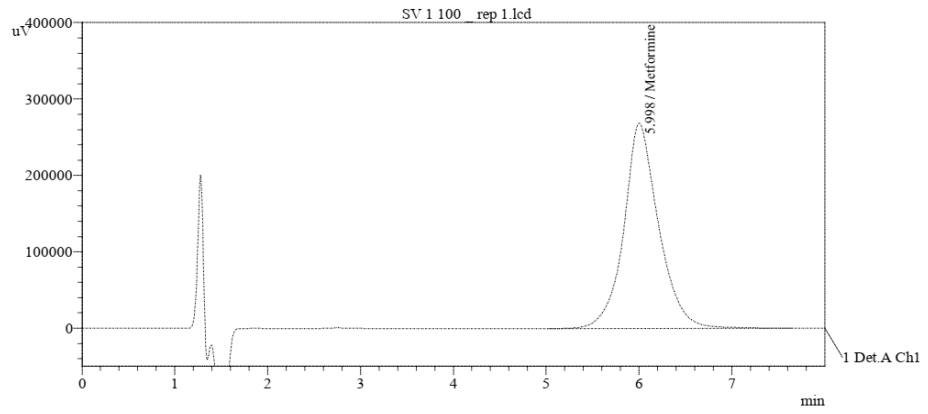
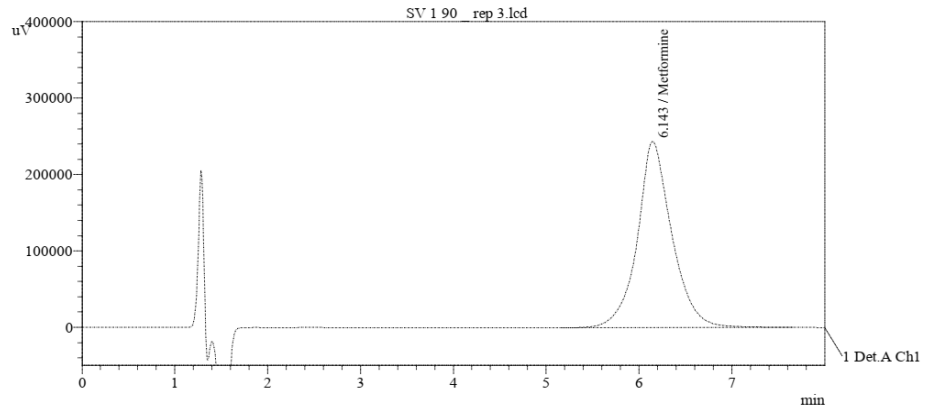
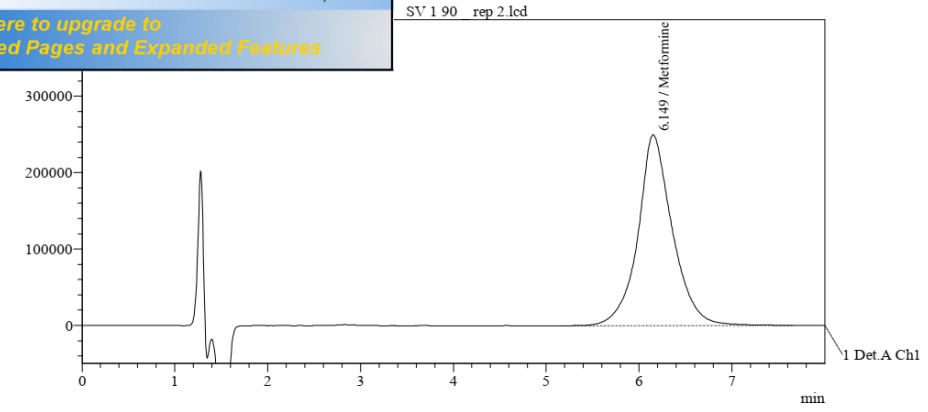
 **PDF Complete**
Your complimentary use period has ended.
Thank you for using PDF Complete.
[Click Here to upgrade to Unlimited Pages and Expanded Features](#)



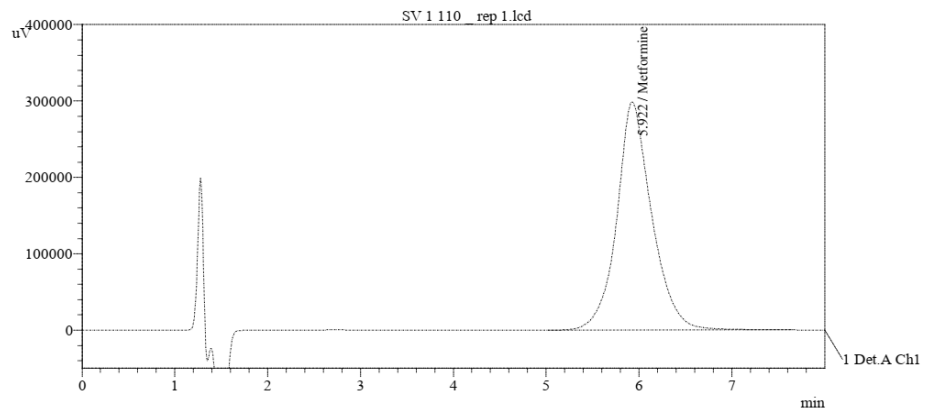
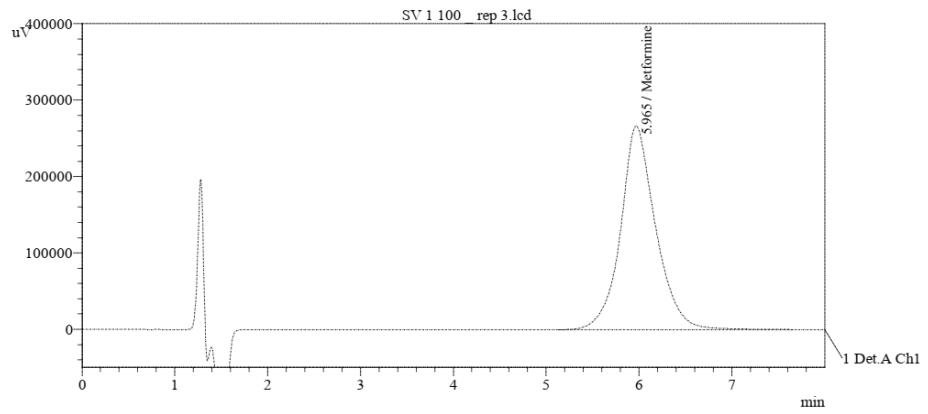
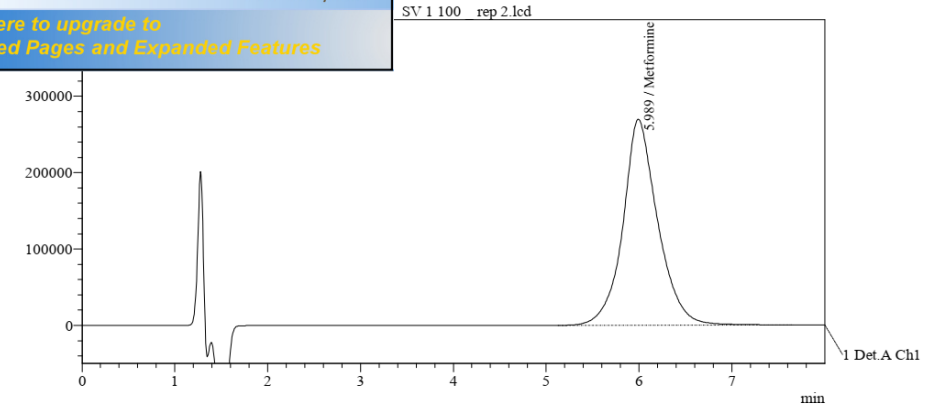
 **PDF Complete**
Your complimentary use period has ended.
Thank you for using PDF Complete.
[Click Here to upgrade to Unlimited Pages and Expanded Features](#)



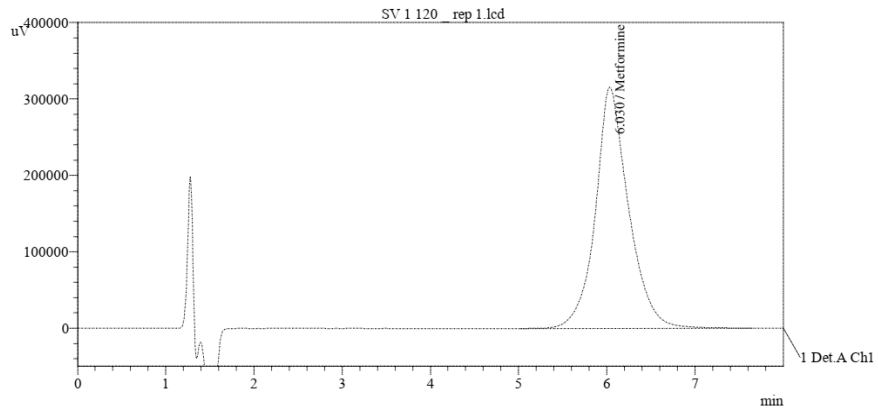
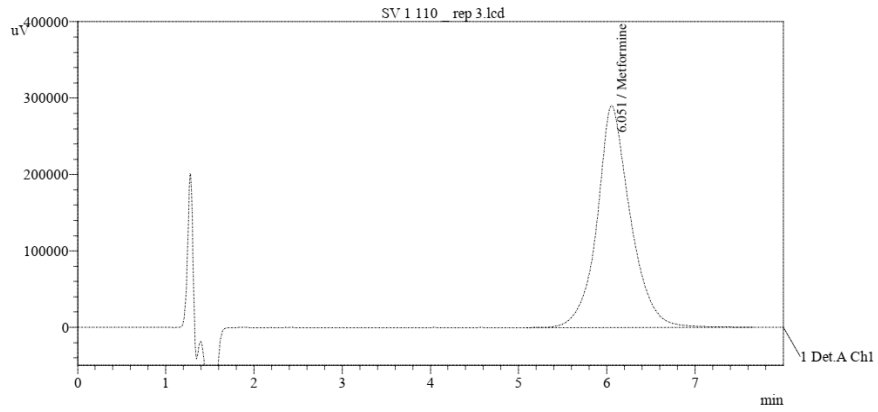
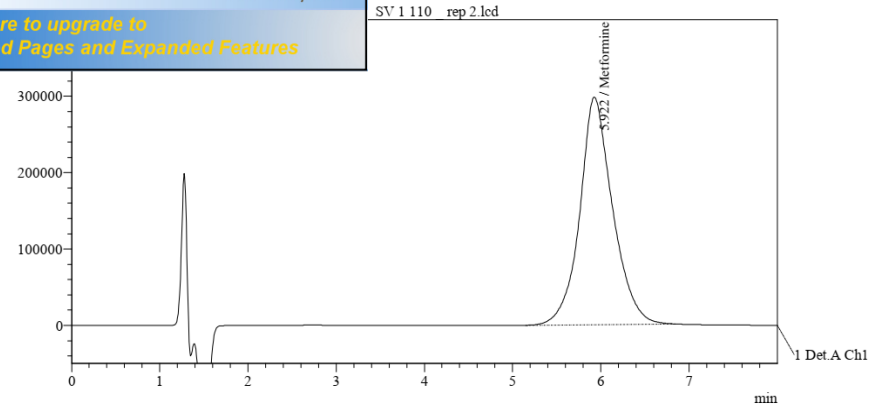
 **PDF Complete**
Your complimentary use period has ended.
Thank you for using PDF Complete.
[Click Here to upgrade to Unlimited Pages and Expanded Features](#)



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

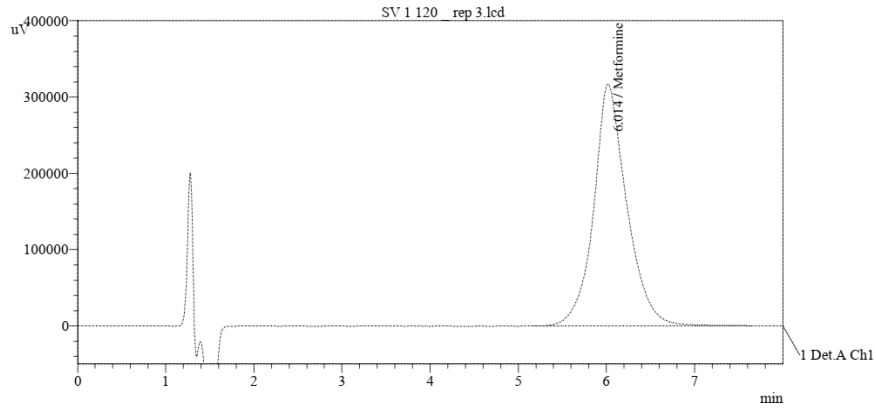
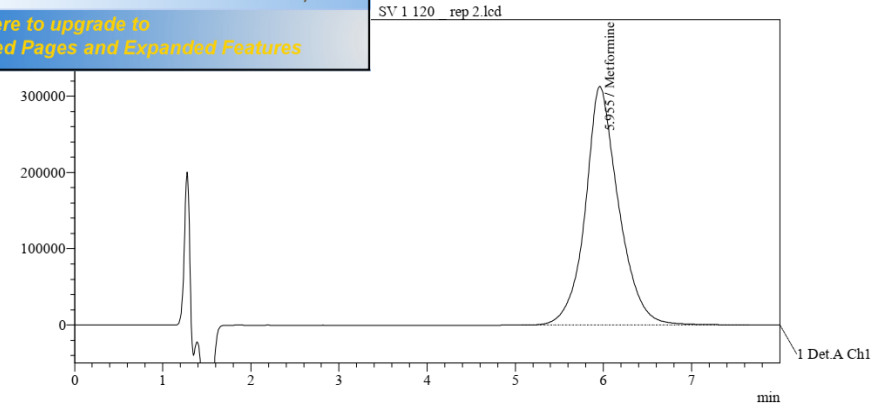


 **PDF Complete**
Your complimentary use period has ended.
Thank you for using PDF Complete.
[Click Here to upgrade to Unlimited Pages and Expanded Features](#)




 Your complimentary use period has ended. Thank you for using PDF Complete.

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

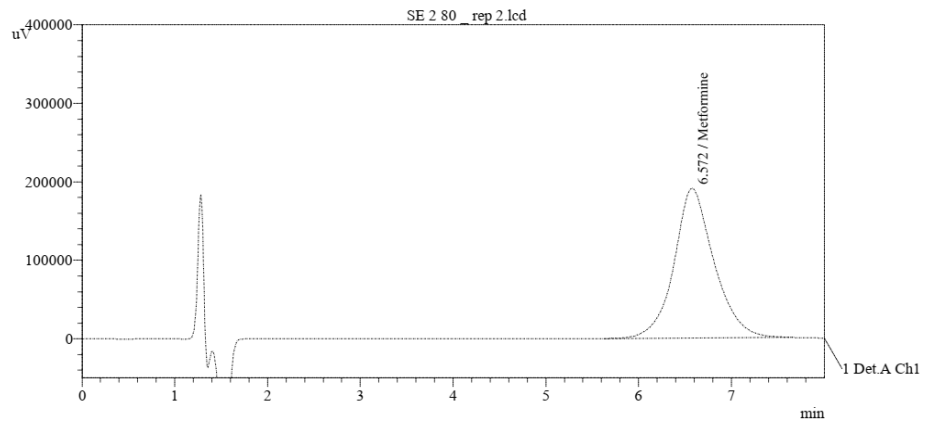
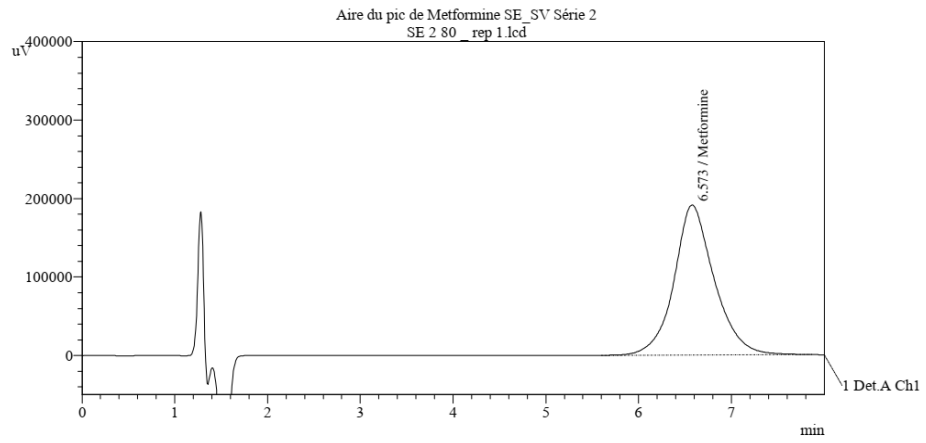


<< Detector A >>

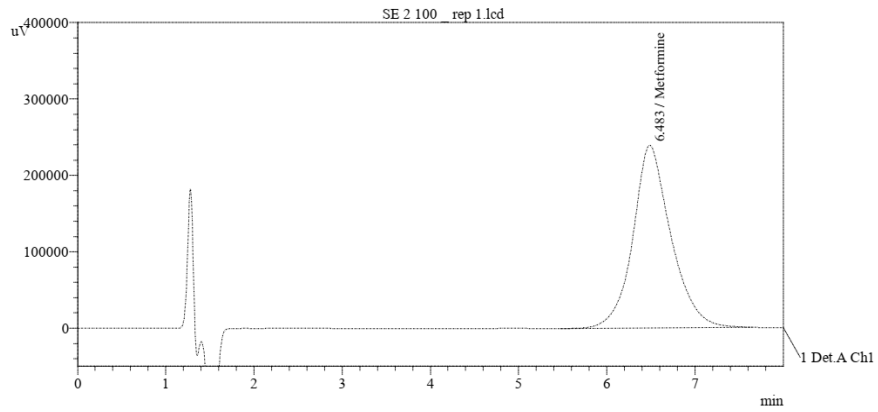
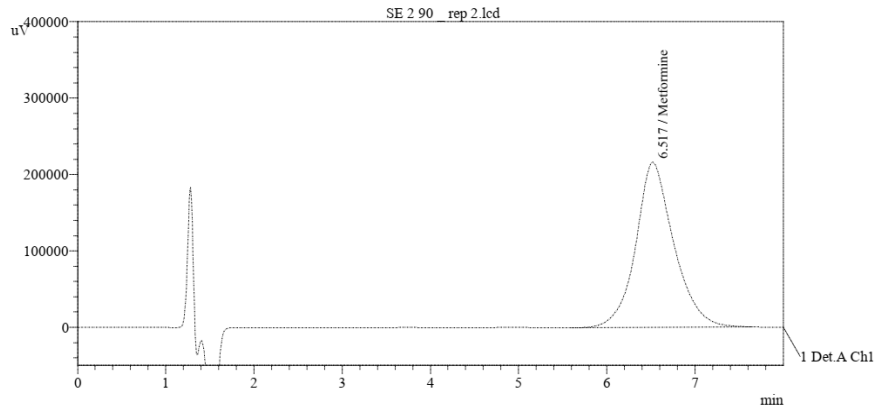
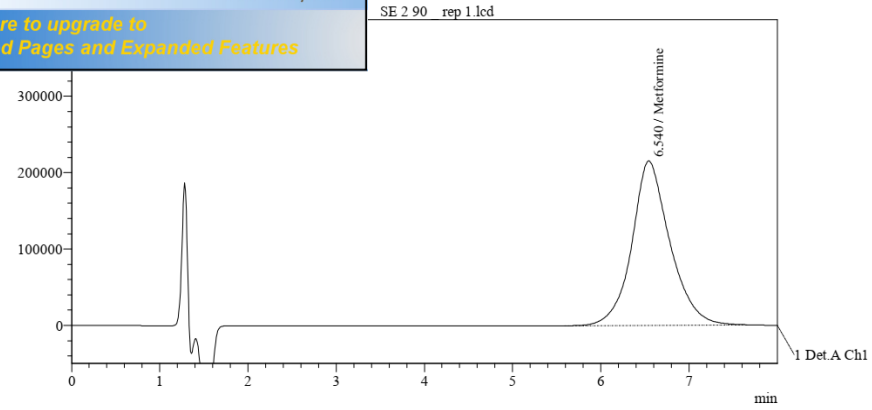
ID#1 Compound Name: Metformine

Title	Ret. Time	Area	Height
SE 1 80 rep 1.lcd	6.060	5595853	213908
SE 1 80 rep 2.lcd	6.422	5543058	208013
SE 1 90 rep 1.lcd	6.381	6357611	238403
SE 1 90 rep 2.lcd	6.356	6200819	234966
SE 1 100 rep 2.lcd	6.289	7053151	268359
SE 1 100 rep 3.lcd	6.316	6862299	261361
SE 1 110 rep 1.lcd	6.253	7713531	295413
SE 1 110 rep 2.lcd	6.232	7697636	295295
SE 1 120 rep 1.lcd	6.198	8427079	324291
SE 1 120 rep 3.lcd	5.990	8340481	319174
SV 1 80 rep 1.lcd	6.228	5686736	218226
SV 1 80 rep 2.lcd	6.214	5574144	214036
SV 1 80 rep 3.lcd	6.196	5649797	217982
SV 1 90 rep 1.lcd	6.166	6324590	244580
SV 1 90 rep 2.lcd	6.149	6453606	249933
SV 1 90 rep 3.lcd	6.143	6303369	243891
SV 1 100 rep 1.lcd	5.998	7002566	268729
SV 1 100 rep 2.lcd	5.989	7052436	269855
SV 1 100 rep 3.lcd	5.965	7012841	266812
SV 1 110 rep 1.lcd	5.922	7836488	298844
SV 1 110 rep 2.lcd	5.922	7719293	298016
SV 1 110 rep 3.lcd	6.051	7625426	290536
SV 1 120 rep 1.lcd	6.030	8253758	315953
SV 1 120 rep 2.lcd	5.955	8235254	313000
SV 1 120 rep 3.lcd	6.014	8291716	317156

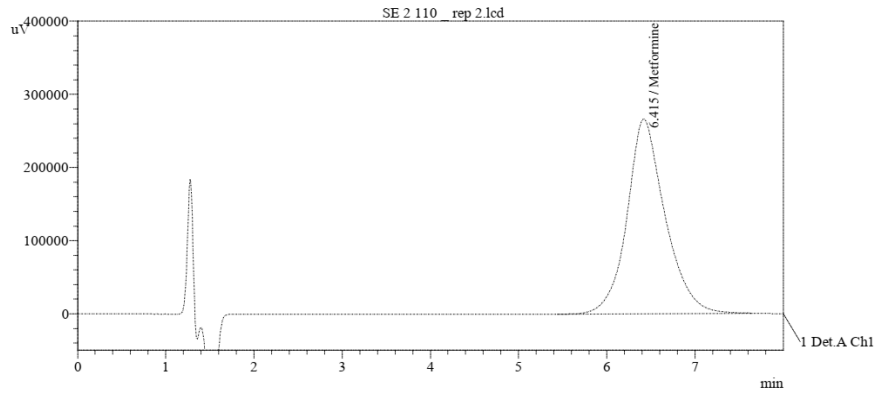
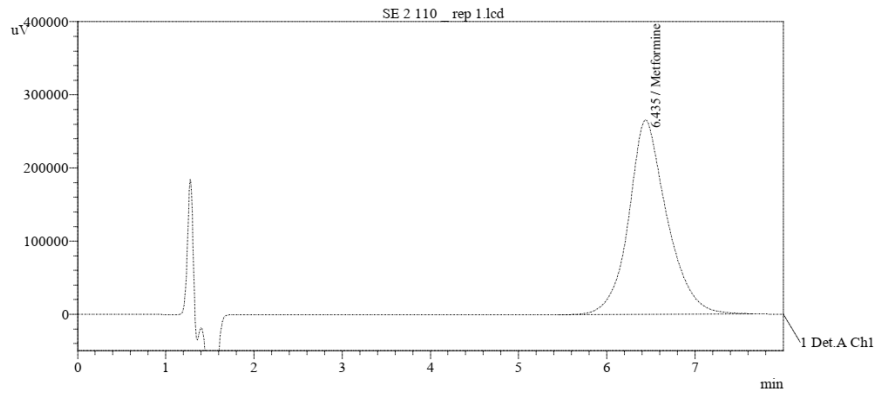
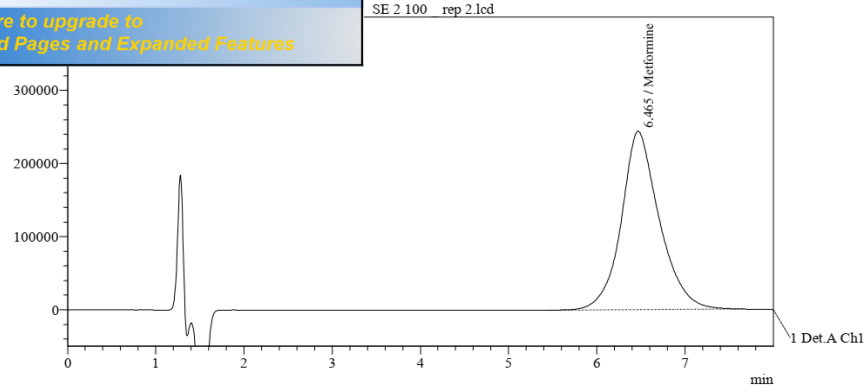
 **PDF Complete**
Your complimentary use period has ended.
Thank you for using PDF Complete.
[Click Here to upgrade to Unlimited Pages and Expanded Features](#)



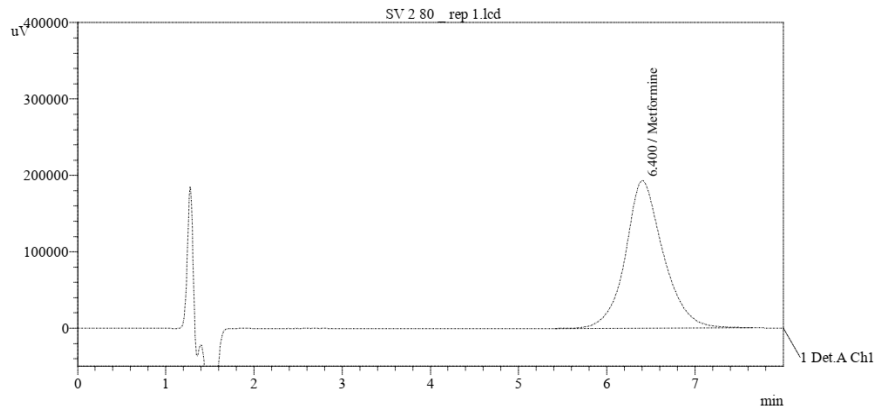
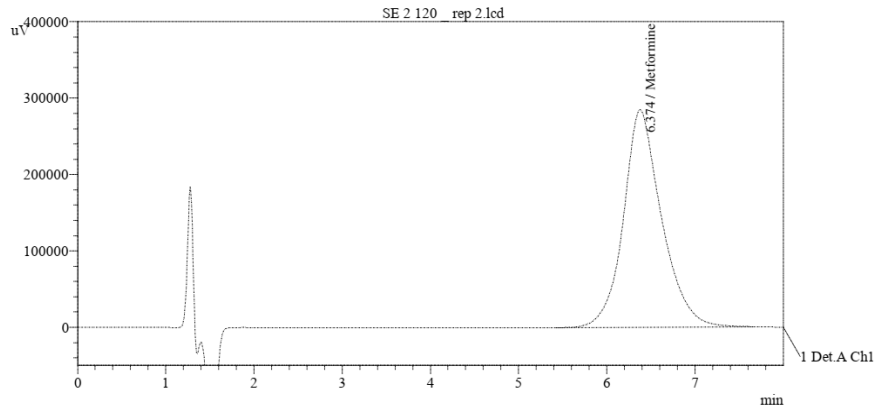
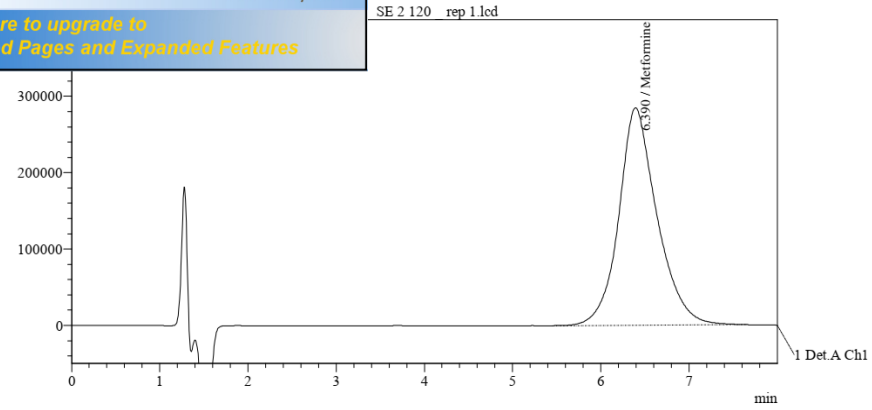
 **PDF Complete**
Your complimentary use period has ended.
Thank you for using PDF Complete.
[Click Here to upgrade to Unlimited Pages and Expanded Features](#)



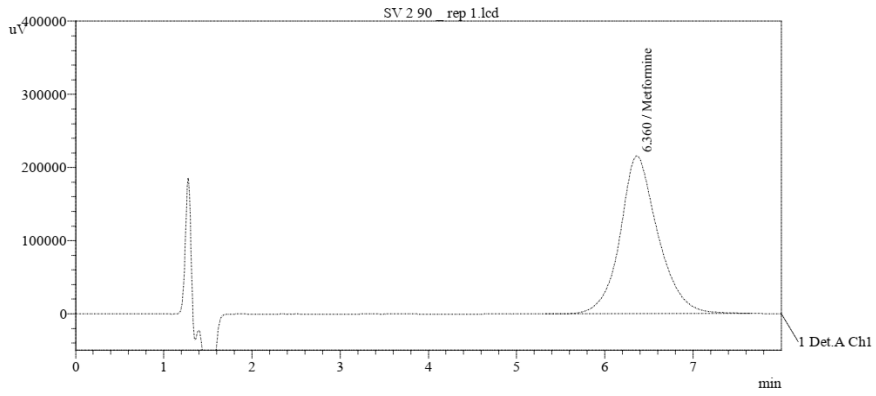
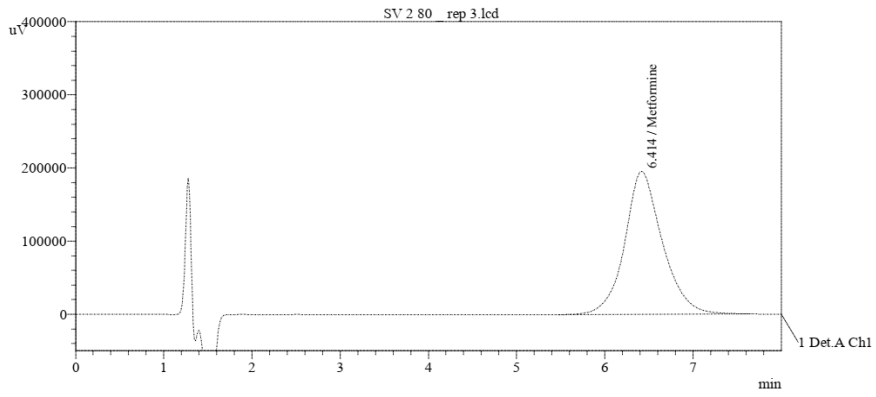
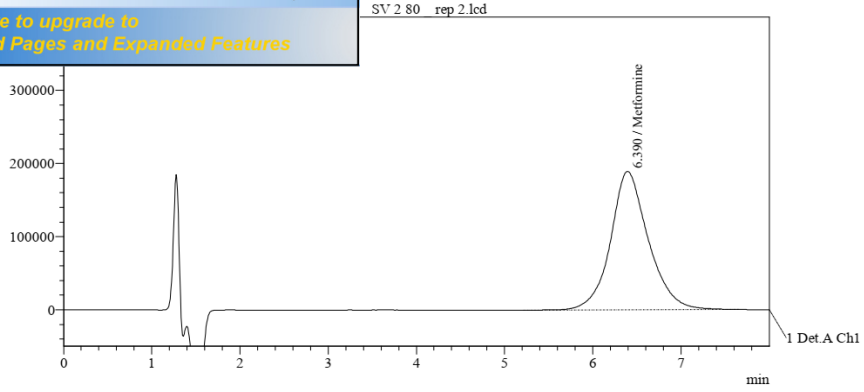
 **PDF Complete**
Your complimentary use period has ended.
Thank you for using PDF Complete.
[Click Here to upgrade to Unlimited Pages and Expanded Features](#)



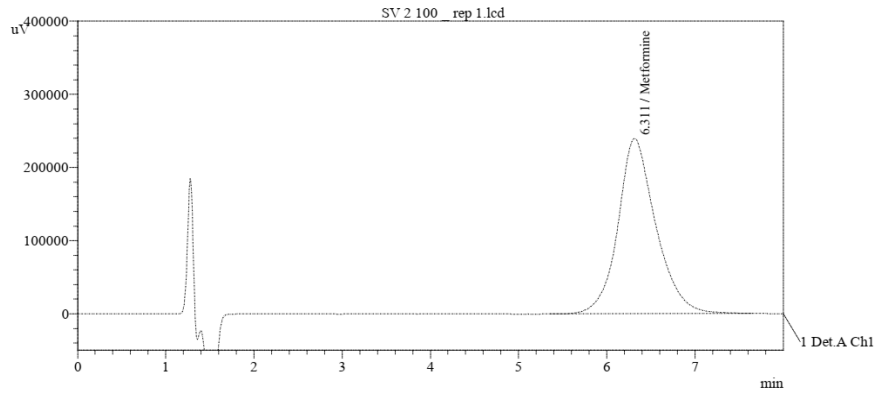
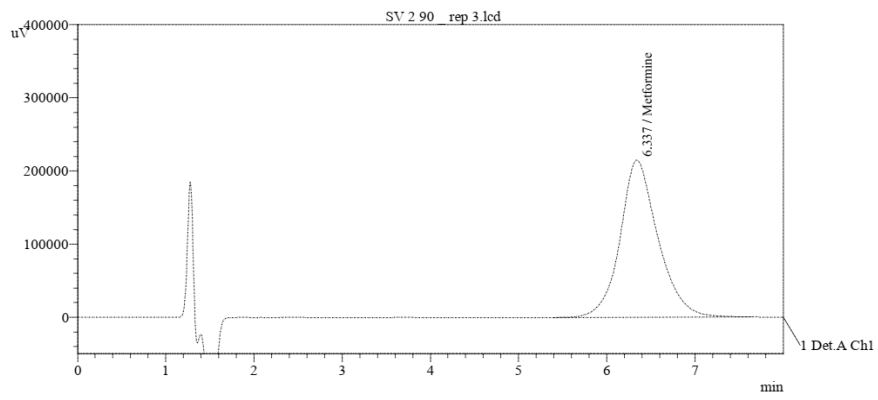
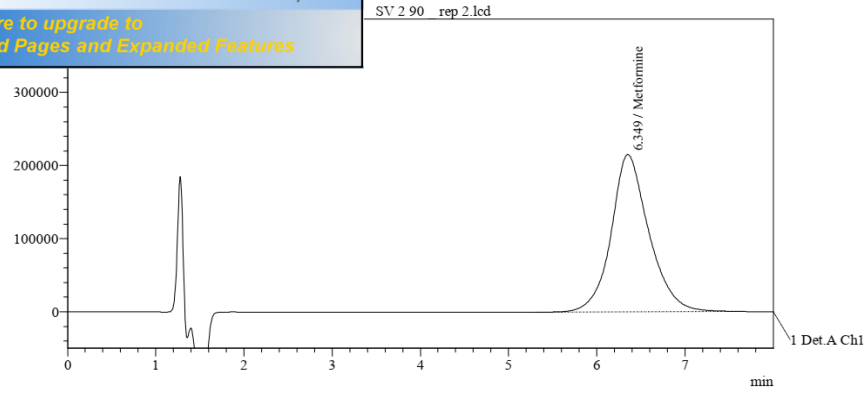
 **PDF Complete**
Your complimentary use period has ended.
Thank you for using PDF Complete.
[Click Here to upgrade to Unlimited Pages and Expanded Features](#)



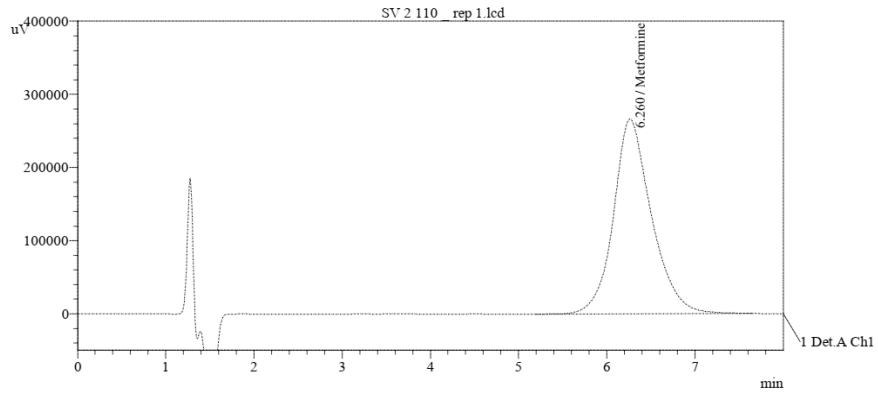
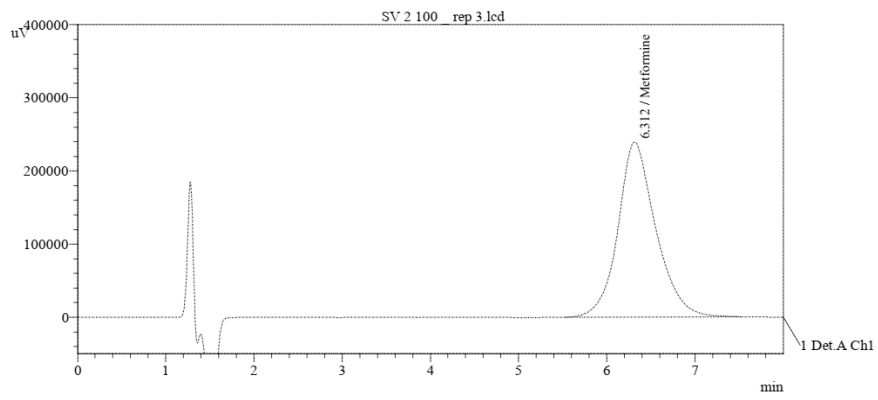
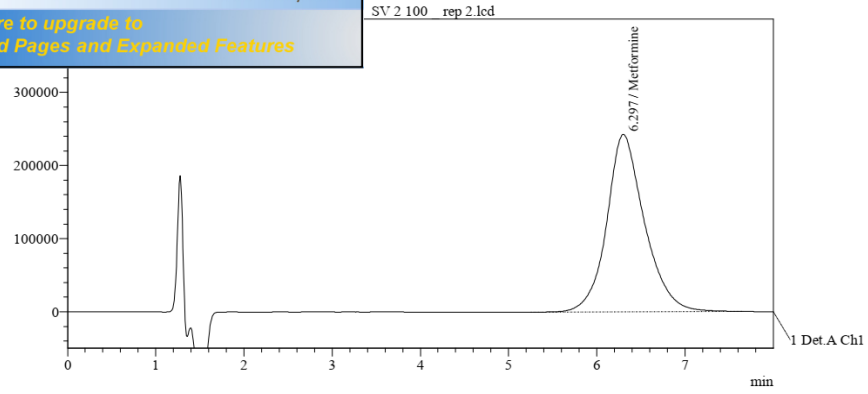
 **PDF Complete**
Your complimentary use period has ended.
Thank you for using PDF Complete.
[Click Here to upgrade to Unlimited Pages and Expanded Features](#)



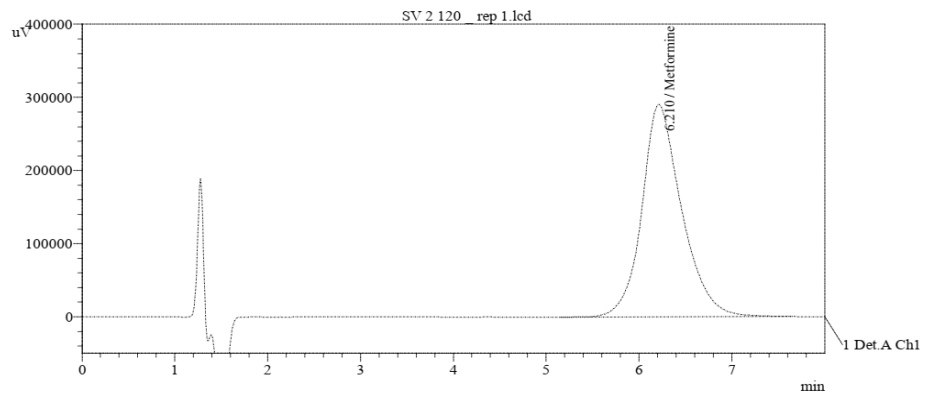
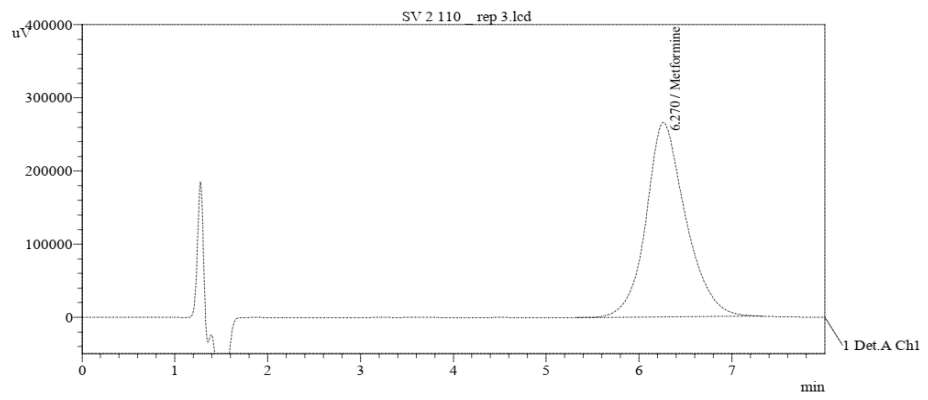
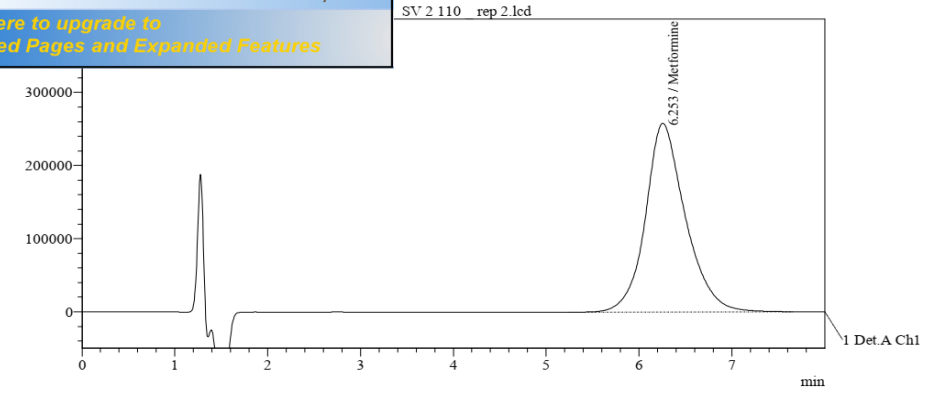
 **PDF Complete**
Your complimentary use period has ended.
Thank you for using PDF Complete.
[Click Here to upgrade to Unlimited Pages and Expanded Features](#)



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

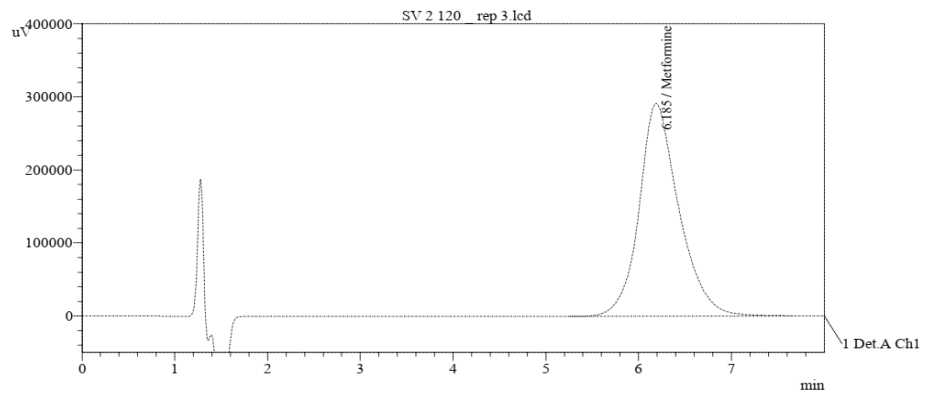
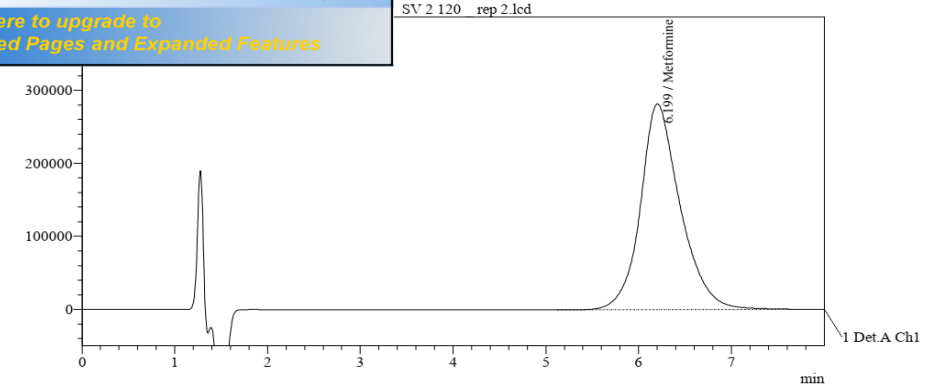


 **PDF Complete**
Your complimentary use period has ended.
Thank you for using PDF Complete.
[Click Here to upgrade to Unlimited Pages and Expanded Features](#)




 Your complimentary use period has ended. Thank you for using PDF Complete.

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

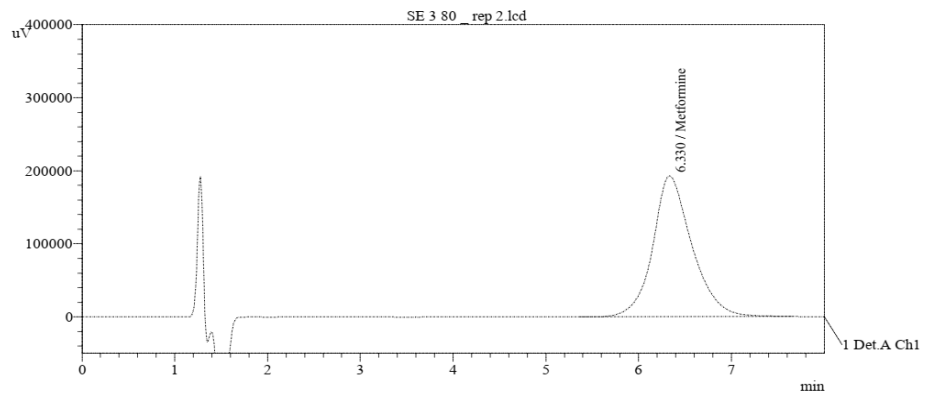
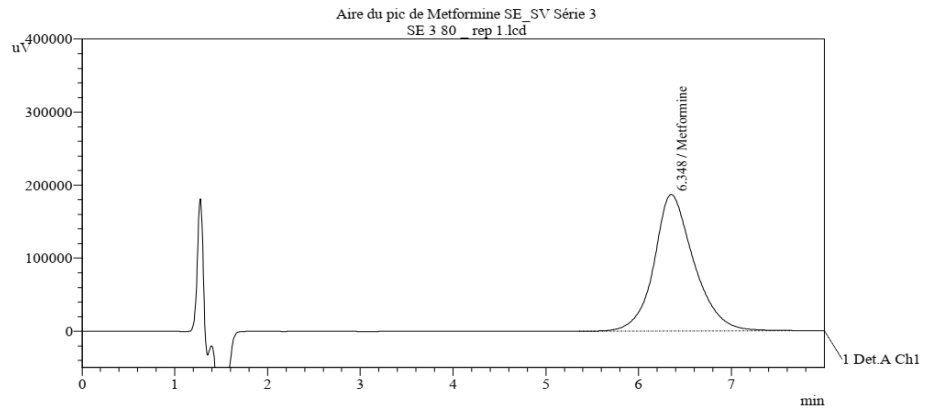


<< Detector A >>

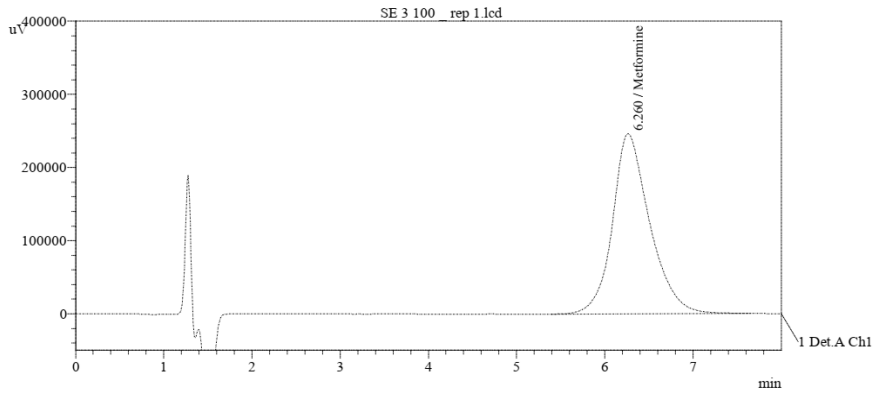
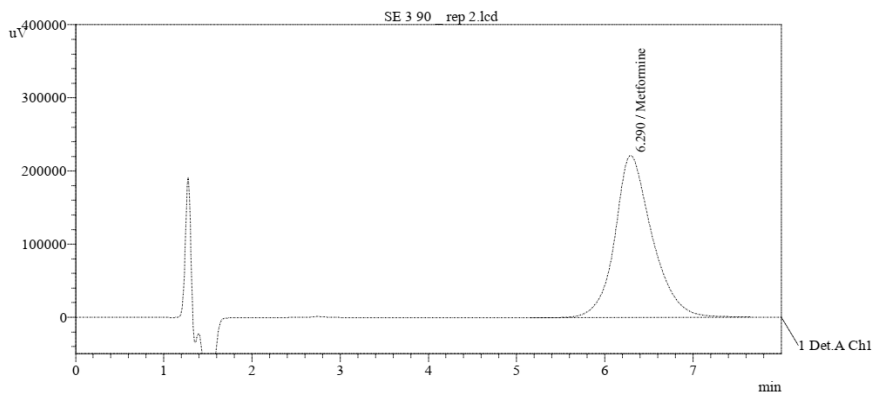
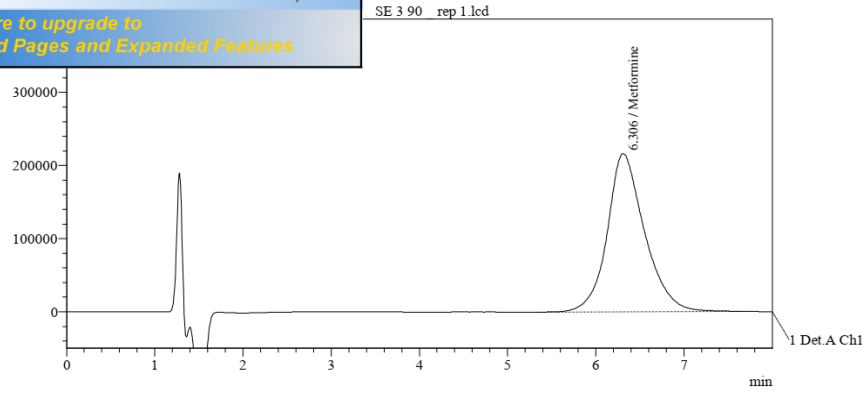
ID#1 Compound Name: Metformine

Title	Ret. Time	Area	Height
SE 2 80 rep 1.lcd	6.573	5762730	190439
SE 2 80 rep 2.lcd	6.572	5720315	190907
SE 2 90 rep 1.lcd	6.540	6439268	215194
SE 2 90 rep 2.lcd	6.517	6498154	216242
SE 2 100 rep 1.lcd	6.483	7162799	239174
SE 2 100 rep 2.lcd	6.465	7318913	243825
SE 2 110 rep 1.lcd	6.435	7981106	265692
SE 2 110 rep 2.lcd	6.415	7982000	266354
SE 2 120 rep 1.lcd	6.390	8577499	284824
SE 2 120 rep 2.lcd	6.374	8545278	284665
SV 2 80 rep 1.lcd	6.400	5758236	193167
SV 2 80 rep 2.lcd	6.390	5638378	189338
SV 2 80 rep 3.lcd	6.414	5805309	195555
SV 2 90 rep 1.lcd	6.360	6424275	215829
SV 2 90 rep 2.lcd	6.349	6400804	215266
SV 2 90 rep 3.lcd	6.337	6425319	215012
SV 2 100 rep 1.lcd	6.311	7154793	239650
SV 2 100 rep 2.lcd	6.297	7219698	242688
SV 2 100 rep 3.lcd	6.312	7121996	238890
SV 2 110 rep 1.lcd	6.260	7970934	266469
SV 2 110 rep 2.lcd	6.253	7706971	258064
SV 2 110 rep 3.lcd	6.270	7863985	254309
SV 2 120 rep 1.lcd	6.210	8665558	290342
SV 2 120 rep 2.lcd	6.199	8388531	281570
SV 2 120 rep 3.lcd	6.185	8702761	291552

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

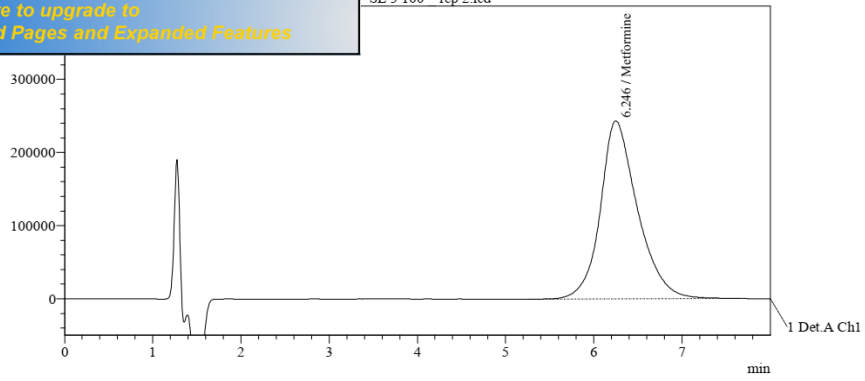


 **PDF Complete**
Your complimentary use period has ended.
Thank you for using PDF Complete.
[Click Here to upgrade to Unlimited Pages and Expanded Features](#)

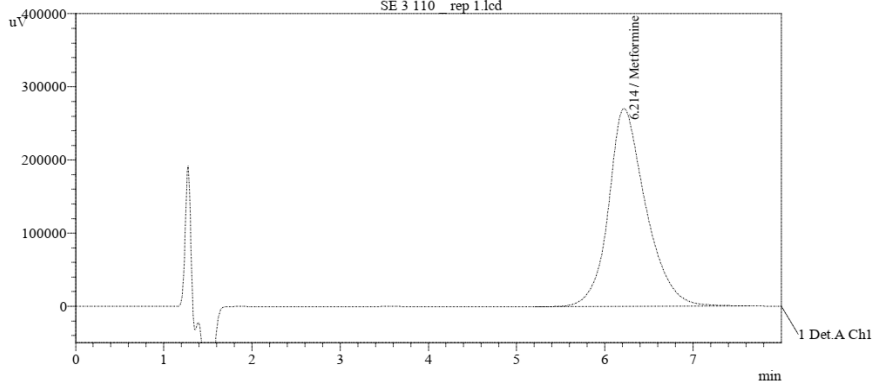


 **PDF Complete**
Your complimentary use period has ended.
Thank you for using PDF Complete.
[Click Here to upgrade to Unlimited Pages and Expanded Features](#)

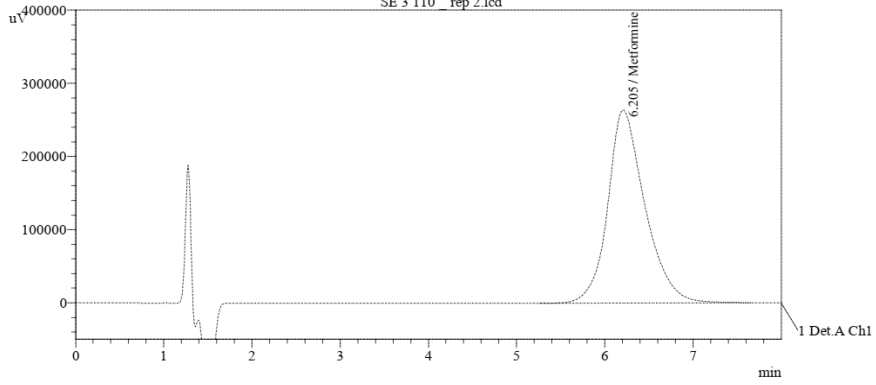
SE 3 100 rep 2.lcd



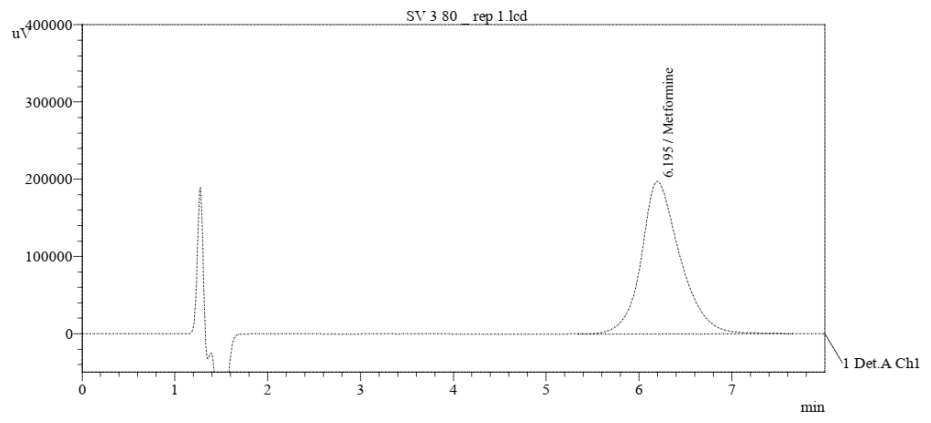
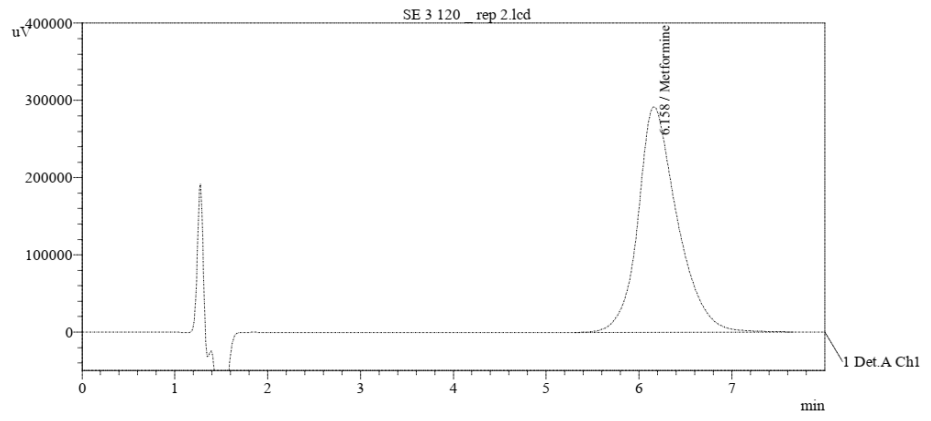
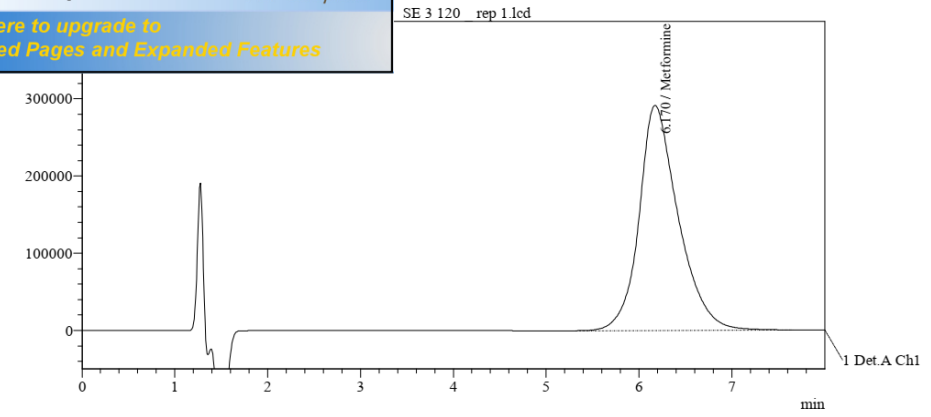
SE 3 110 rep 1.lcd



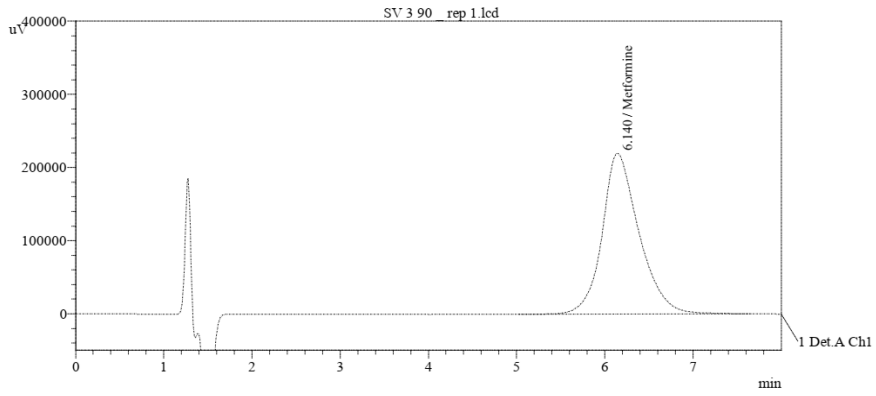
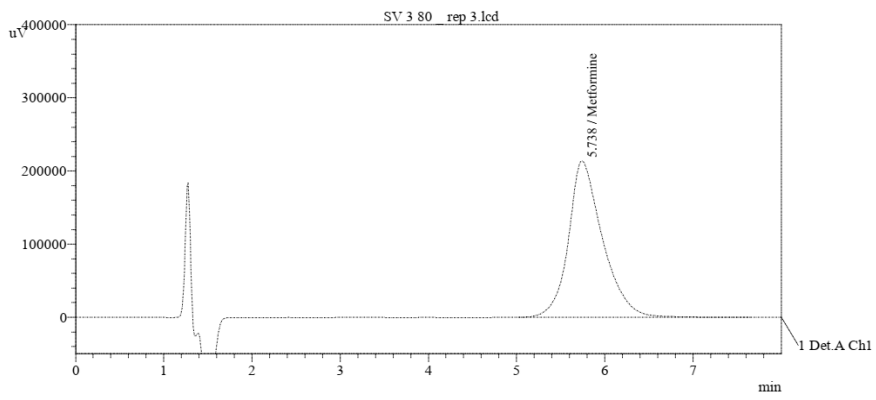
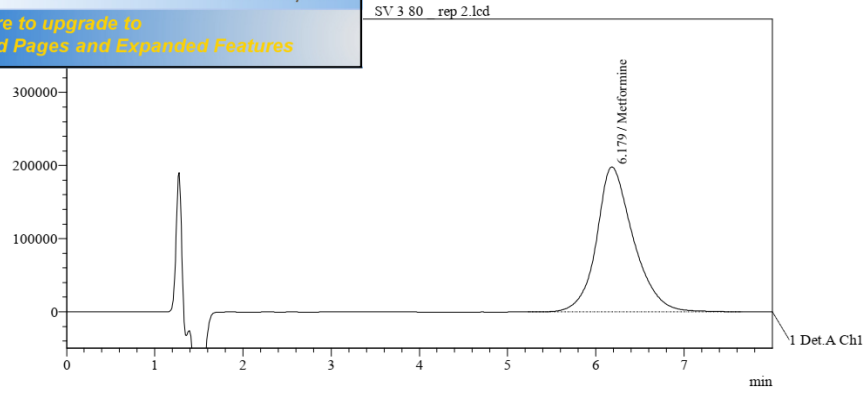
SE 3 110 rep 2.lcd



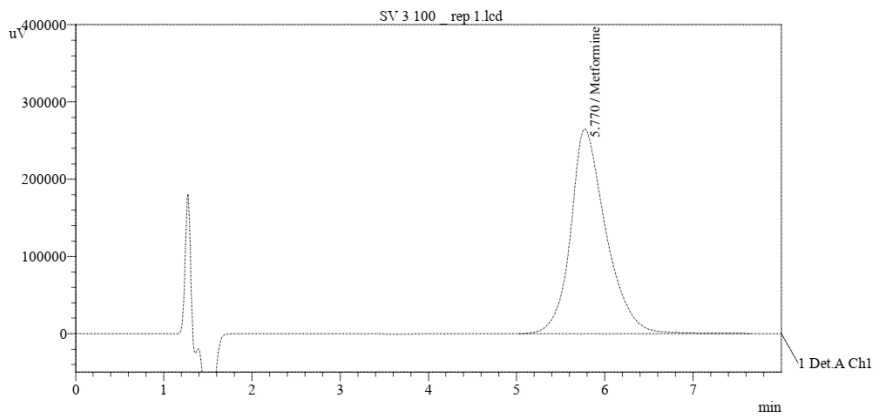
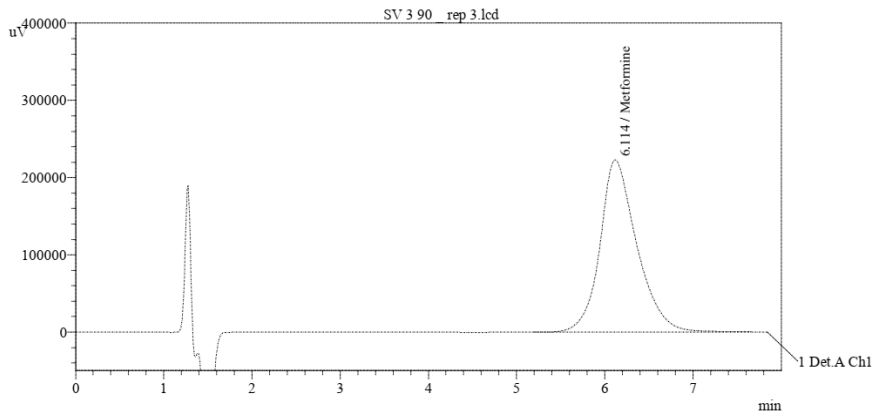
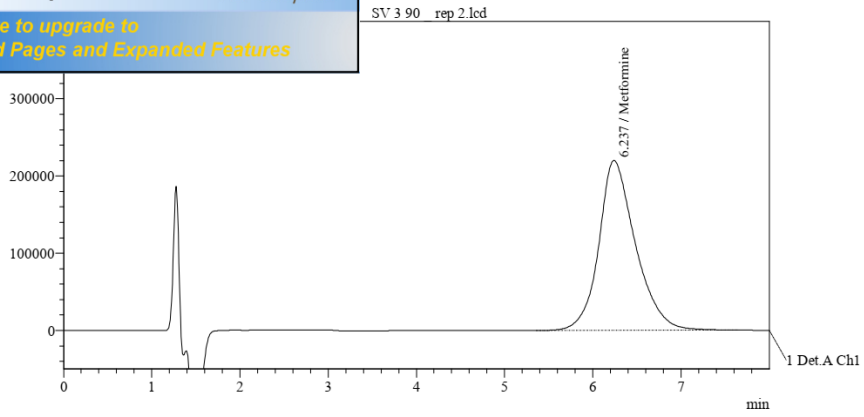
 **PDF Complete**
Your complimentary use period has ended.
Thank you for using PDF Complete.
[Click Here to upgrade to Unlimited Pages and Expanded Features](#)



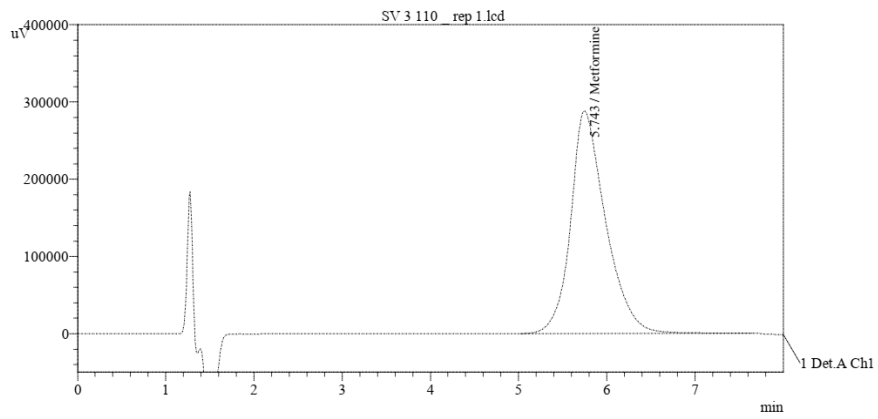
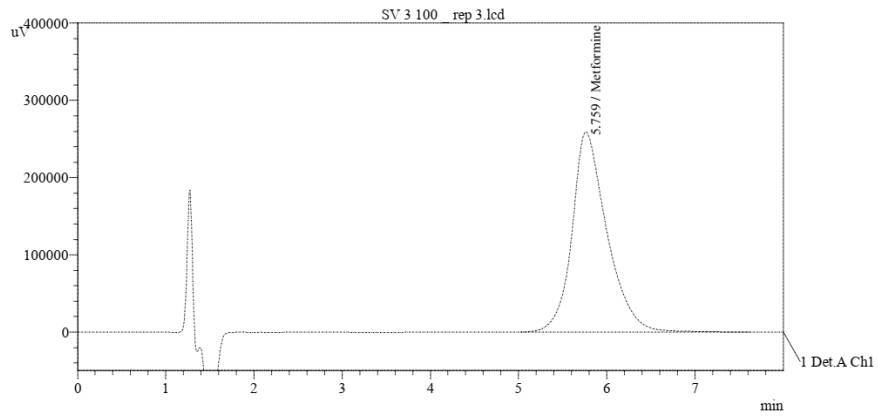
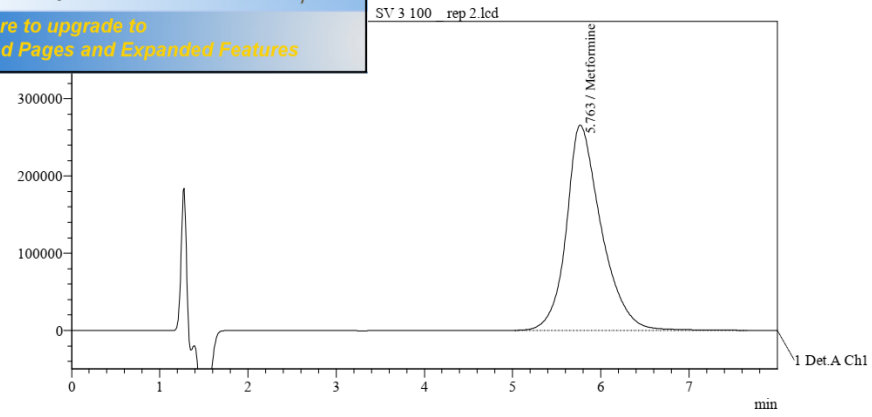
 **PDF Complete**
Your complimentary use period has ended.
Thank you for using PDF Complete.
[Click Here to upgrade to Unlimited Pages and Expanded Features](#)



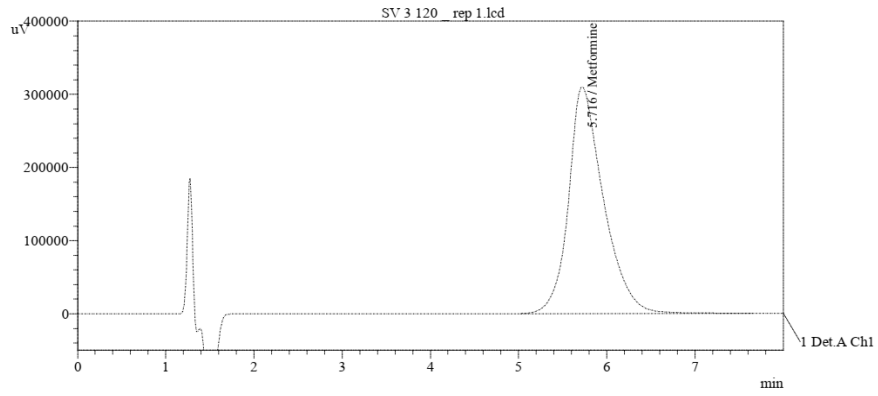
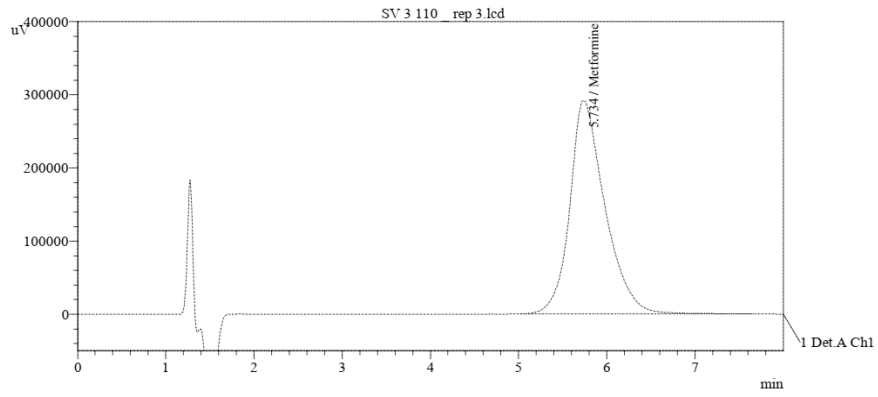
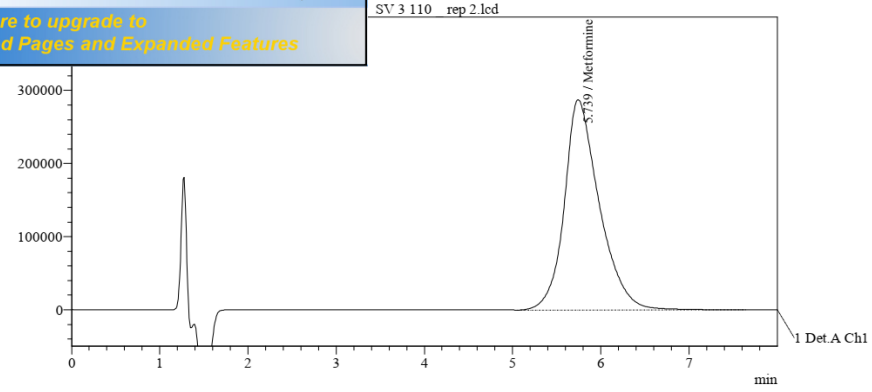
 **PDF Complete**
Your complimentary use period has ended.
Thank you for using PDF Complete.
[Click Here to upgrade to Unlimited Pages and Expanded Features](#)



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

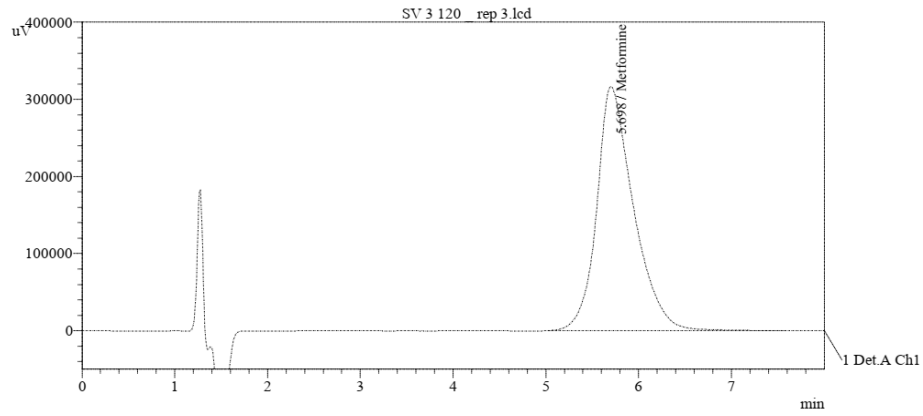
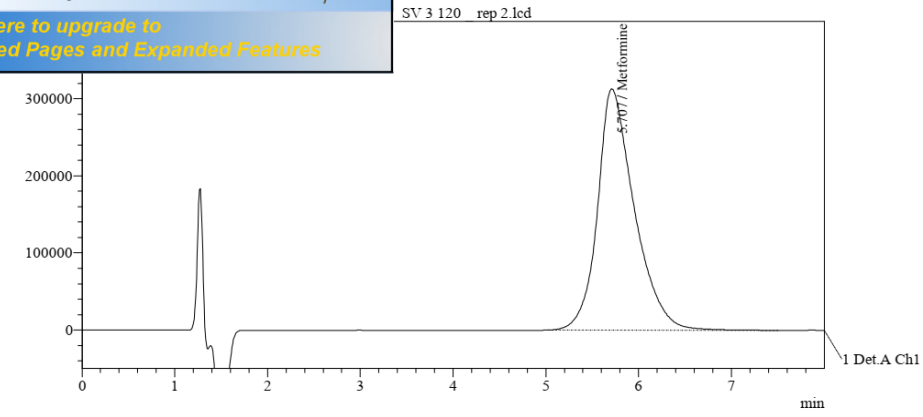


 **PDF Complete**
Your complimentary use period has ended.
Thank you for using PDF Complete.
[Click Here to upgrade to Unlimited Pages and Expanded Features](#)




 Your complimentary use period has ended. Thank you for using PDF Complete.

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



<< Detector A >>

ID#1 Compound Name: Metformine

Title	Ret. Time	Area	Height
SE 3 80 rep 1.lcd	6.348	5566308	186880
SE 3 80 rep 2.lcd	6.330	5673875	192742
SE 3 90 rep 1.lcd	6.306	6364697	216284
SE 3 90 rep 2.lcd	6.290	6488754	221460
SE 3 100 rep 1.lcd	6.260	7229308	246200
SE 3 100 rep 2.lcd	6.246	7137493	243369
SE 3 110 rep 1.lcd	6.214	7945688	270705
SE 3 110 rep 2.lcd	6.205	7735095	263973
SE 3 120 rep 1.lcd	6.170	8567572	291523
SE 3 120 rep 2.lcd	6.158	8570906	291982
SV 3 80 rep 1.lcd	6.195	5727832	197295
SV 3 80 rep 2.lcd	6.179	5746484	198172
SV 3 80 rep 3.lcd	5.738	5751642	213784
SV 3 90 rep 1.lcd	6.140	6399808	219837
SV 3 90 rep 2.lcd	6.237	6356587	220038
SV 3 90 rep 3.lcd	6.114	6494013	223166
SV 3 100 rep 1.lcd	5.770	7350833	265079
SV 3 100 rep 2.lcd	5.763	7325988	265932
SV 3 100 rep 3.lcd	5.759	7134669	259032
SV 3 110 rep 1.lcd	5.743	7952486	288069
SV 3 110 rep 2.lcd	5.739	7934920	287421
SV 3 110 rep 3.lcd	5.734	8074080	291929
SV 3 120 rep 1.lcd	5.716	8535182	309844
SV 3 120 rep 2.lcd	5.707	8634988	312916
SV 3 120 rep 3.lcd	5.698	8741823	316535

Données brutes : Standard d'étalonnage (sans la matrice)

Niv de Conc j	Répétitions i	Série 1		Série 2		Série 3	
		Quantités (Concentrations) introduites	signal (aire du pic, absorbance)	Quantités (Concentrations) introduites	signal (aire du pic, absorbance)	Quantités (Concentrations) introduites	signal (aire du pic, absorbance)
1	1	40,18	5595853	40,46	5762730	40,43	5566308
	2	40,08	5543058	40,05	5720315	40,26	5673875
2	1	45,15	6357611	45,43	6439268	45,06	6364697
	2	45,44	6200819	45,00	6498154	45,26	6488754
3	1	50,29	7053151	50,04	7162799	50,53	7229308
	2	50,53	6862299	50,20	7318913	50,14	7137493
4	1	55,53	7713531	55,24	7981106	55,04	7945688
	2	55,12	7697636	55,09	7982000	55,06	7735095
5	1	60,29	8427079	60,53	8577499	60,18	8567572
	2	60,05	8340481	60,08	8545278	60,10	8570906
Pente		140645,45	140645,45	142783,88	142783,88	147771,803	147771,803
Ordonnée à l'origine		-90532,376	-90532,376	29342,01986	29342,01986	-291061,55	-291061,55

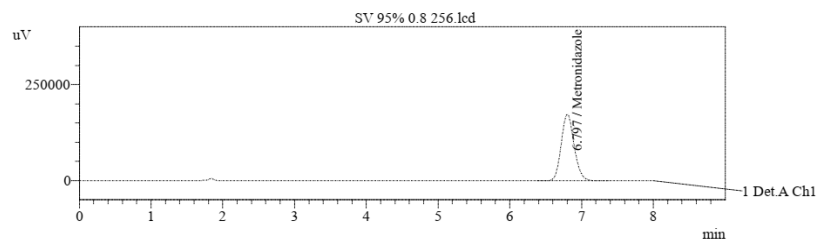
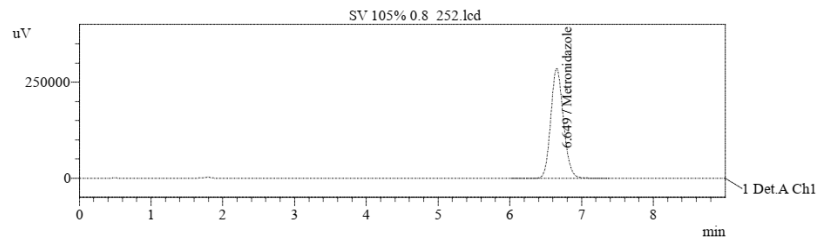
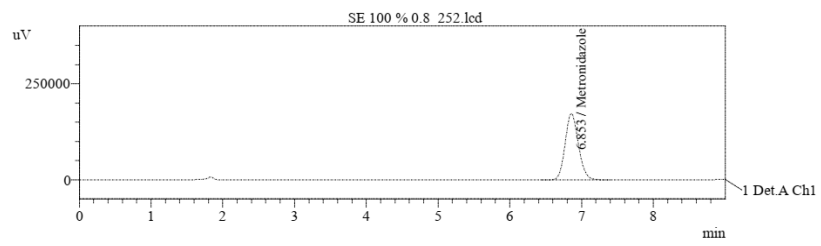
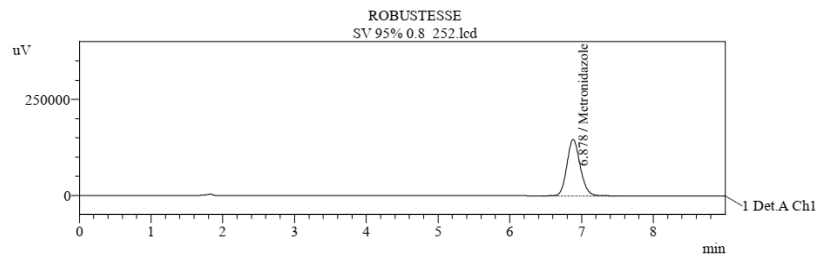
Données brutes : Standard de validation (dans la matrice)

Niv de Conc	i	Série 1		Série 2		Série 3		
		Répétitions	i	Quantités (Concentrations) introduites	signal (aire du pic, absorbance)	Quantités (Concentrations) introduites	signal (aire du pic, absorbance)	Quantités (Concentrations) introduites
1	1	1	40,18	5686736	40,46	5758236	40,43	5727832
	2	2	40,08	5574144	40,05	5638378	40,26	5746484
	3	3	40,30	5649797	40,75	5805309	40,03	5751642
2	1	1	45,15	6324590	45,43	6424275	45,06	6399808
	2	2	45,44	6453606	45,00	6400804	45,26	6356587
	3	3	45,00	6303369	45,16	6425319	45,11	6494013
3	1	1	50,29	7002566	50,04	7154793	50,53	7350833
	2	2	50,53	7052436	50,20	7219698	50,14	7325988
	3	3	50,00	7012841	50,04	7121996	50,10	7134669
4	1	1	55,53	7836488	55,24	7970934	55,04	7952486
	2	2	55,12	7719293	55,09	7706971	55,06	7934920
	3	3	55,30	7625426	55,02	7863985	55,05	8074080
5	1	1	60,29	8253758	60,53	8665558	60,18	8535182
	2	2	60,05	8235254	60,08	8388531	60,10	8634988
	3	3	60,00	8291716	60,21	8702761	60,52	8741823

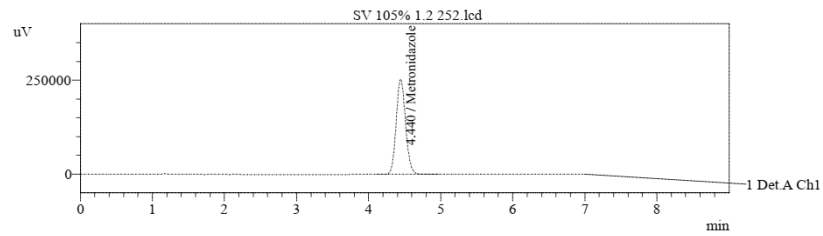
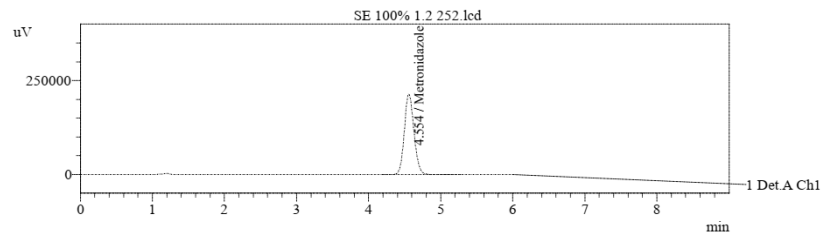
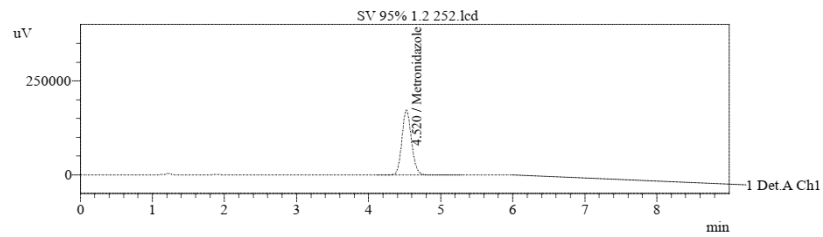
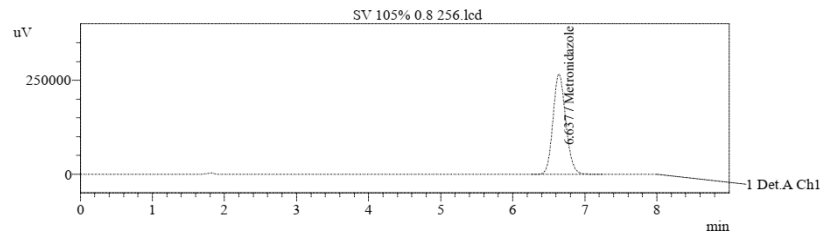
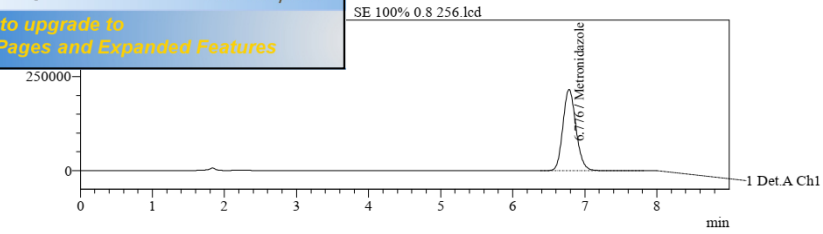
Robustesse

 *Your complimentary use period has ended. Thank you for using PDF Complete.*

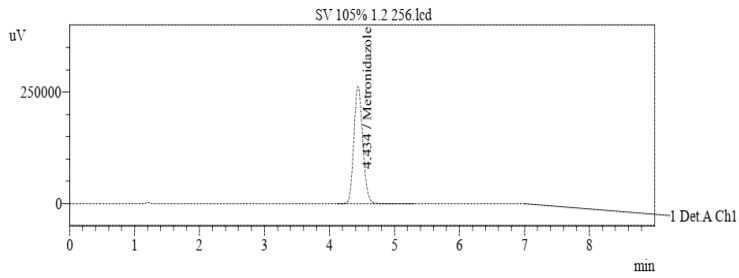
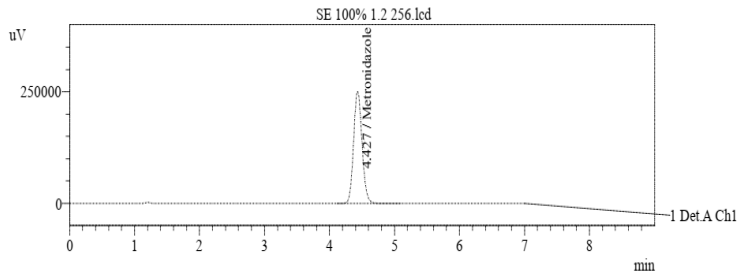
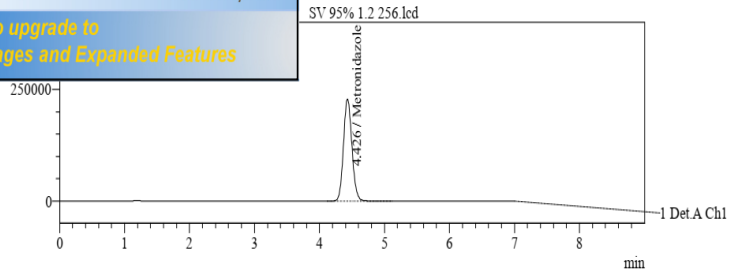
[Click Here to upgrade to Unlimited Pages and Expanded Features](#)



 **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](#)



<< Detector A >>

ID#1 Compound Name: Metronidazole

Title	Ret. Time	Area	Height
SV 95% 0.8 252.lcd	6.878	1880173	146662
SE 100 % 0.8 252.lcd	6.853	2219537	173288
SV 105% 0.8 252.lcd	6.649	3500583	286256
SV 95% 0.8 256.lcd	6.797	2169612	173304
SE 100% 0.8 256.lcd	6.776	2715022	215975
SV 105% 0.8 256.lcd	6.637	3277268	267199
SV 95% 1.2 252.lcd	4.520	1592980	172758
SE 100% 1.2 252.lcd	4.554	1982889	214650
SV 105% 1.2 252.lcd	4.440	2290725	253577
SV 95% 1.2 256.lcd	4.426	2058820	228844
SE 100% 1.2 256.lcd	4.427	2253679	251393
SV 105% 1.2 256.lcd	4.434	2479696	262305

Masse (concentration) pour une teneur théorique de 100%		50	mg							
N° de l'essai	A (teneur en %)	B (longueur d'onde d'excitation)	C (Débit de la phase mobile)	Masse introduite (concentration) - Echantillon	Masse (concentration) - Standard	Teneur introduite (%)	Aire (absorbance) échantillon	Aire (absorbance) standard	Masse (Concentration) estimée	Reponse (Teneur en %)
1	95%	216	0,8	47,5	50,00	95,00	8505243	9047943	47,00	94,00
2	105%	216	0,8	52,5	50,00	105,00	9556027	9047943	52,81	105,62
3	95%	220	0,8	47,5	50,00	95,00	8304946	8770322	47,35	94,69
4	105%	220	0,8	52,5	50,00	105,00	9294432	8770322	52,99	105,98
5	95%	216	1,2	47,5	50,00	95,00	5754111	6015609	47,83	95,65
6	105%	216	1,2	52,5	50,00	105,00	6448080	6015609	53,59	107,19
7	95%	220	1,2	47,5	50,00	95,00	5492749	5827029	47,13	94,26
8	105%	220	1,2	52,5	50,00	105,00	6168112	5827029	52,93	105,85
									Ecartype	6,19
									t°(0,05,7)	2,36

Essai	facteurs			interactions			
	A (teneur)	B (pH de la phase mobile)	C (longueur d'onde d'excitation)	AB	AC	BC	ABC
1	-1	-1	-1	1	1	1	-1
2	1	-1	-1	-1	-1	1	1
3	-1	1	-1	-1	1	-1	1
4	1	1	-1	1	-1	-1	-1
5	-1	-1	1	1	-1	-1	1
6	1	-1	1	-1	1	-1	-1
7	-1	1	1	-1	-1	1	-1
8	1	1	1	1	1	1	1
Niveau bas	95%	2,85	311				
Niveau haut	105%	3,15	315				

Essai	facteurs			interactions				
	A	B	C	AB	AC	BC	ABC	
1	-94,00	-94,00	-94,00	94,00	94,00	94,00	-94,00	
2	105,62	-105,62	-105,62	-105,62	-105,62	105,62	105,62	
3	-94,69	94,69	-94,69	-94,69	94,69	-94,69	94,69	
4	105,98	105,98	-105,98	105,98	-105,98	-105,98	-105,98	
5	-95,65	-95,65	95,65	95,65	-95,65	-95,65	95,65	
6	107,19	-107,19	107,19	-107,19	107,19	-107,19	-107,19	
7	-94,26	94,26	94,26	-94,26	-94,26	94,26	-94,26	
8	105,85	105,85	105,85	105,85	105,85	105,85	105,85	
somme	46,02	-1,67	2,67	-0,28	0,23	-3,78	0,39	
effet	5,75	-0,21	0,33	-0,03	0,03	-0,47	0,05	
Intervalle de confiance	limite inferieur	0,58	-5,38	-4,84	-5,21	-5,14	-5,64	-5,12
	limite superieur	10,92	4,96	5,51	5,14	5,20	4,70	5,22
Facteur signification (S) ou Non significatif (NS)		S	NS	NS	NS	NS	NS	NS

Résumé

Avant l'autorisation de mise sur le marché d'un médicament, le contrôle analytique 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.

L'analyse, quantitative et qualitative, tend toujours, et de plus en plus vers de nouvelles méthodes et techniques dans un souci de gain de temps, de gains d'argent et de gain de précision. L'adoption d'une nouvelle technique ou son adaptation à un nouveau domaine d'application nécessite sa mise à l'épreuve, qu'elle soit validée

L'utilisation de l'HPLC comme technique de dosages de la metformine a été testée pour les critères suivant : Exactitude, Linéarité, Fidélité, Répétabilité dans le cadre d'une validation interne au laboratoire. Cette technique est montrée valide pour les utilisations définies et en conformité parfaite avec les critères de validation définis par l'ICH.

Les résultats obtenus prouvent que toutes les exigences spécifiques élaborées dans cette approche harmonisée sont remplies, c'est-à-dire que la méthode est spécifique, linéaire, fidèle, juste, exacte et robuste, ce qui atteste la validité de la méthode proposée dans notre travail pour l'utilisation en routine.

Mots Clés :metformine, Contrôle de qualité, comprimé, Validation, Exactitude, Linéarité, Fidélité, Répétabilité, Tests statistiques.

ABSTRACT

Before the marketing authorization of a drug, the analytical control is an important and essential step in ensuring the quality of the product that will be delivered to patients. Pharmaceutical companies are easily tested. They are perfectly controlled. They are perfectly checked.

The analysis, quantitative and qualitative, always tends, and more and more new methods and techniques for the sake of time, money gains and gain of precision. The adoption of a new technique or its adaptation to a new field of application must be put to the test, it is validated

The use of HPLC as a metformin assay technique was tested for the following criteria: Accuracy, Linearity, Fidelity, and Répétabilité in the laboratory validation framework. This Techniques is shown valid for the users with default.

The results obtained are exactly what they are, specifically, linear, faithful, fair, authentic and robust. our work for routine use.

Key words: Metformin, Quality control, tablet, Validation, Accuracy, Linearity, Fidelity, Repeatability, Statistiques tests.