

N° d'ordre :

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*

**Quality By Design : Application au dosage de la metformine et ses impuretés par Chromatographie Liquide à Haute Performance**

*Soutenu publiquement, le 13/11/2019*

*Présenté par : M<sup>elle</sup> BEN BAYA Ouiza et M<sup>elle</sup> ALLOUDA Sarah*

*Composition du Jury :*

Mme MAKHLOUFI M.	Professeur	UMMTO	Présidente du jury
Mr MAMOU M.	MCAHU	UMMTO	Promoteur
Mr BOURSOUTI M.	RCA	UMMTO	Co-promoteur
Mr BENCHOUK M.	MAA	UMMTO	Examineur
Mme BELMAHDI L.	MAB	UMMTO	Examinatrice
Mme HASSDANI N.	INGENIEUR	NVND TIZI OUZOU	Invité d'honneur

## **Remerciements**

*Tout d'abord, on tient à remercier le bon Dieu de nous avoir donné la force et la patience afin de mener à bien ce modeste travail*

Nous présentons nos vifs remerciements :

***A notre promoteur Pr M. MAMOU***

*Pour avoir accepté d'encadrer notre travail, pour sa patience, sa disponibilité et ses conseils ainsi que pour l'opportunité qu'il nous a offert en effectuant nos expériences et notre stage pratique au sein de l'industrie pharmaceutique NOVO Nordisk Alpha.*

***A notre Co-promoteur Dr M. BOURSOUTI***

*Pour avoir accepté de co-diriger ce travail, pour le temps précieux qu'il nous a accordé et pour ses directives qui nous ont facilité la tâche. On garderait un excellent souvenir de votre positivité.*

***A notre maître et présidente du jury Madame MAKHLOUFI***

*Vous nous faites l'honneur de présider notre jury et d'accepter d'évaluer ce travail. Veuillez trouver, l'expression de notre très haute considération*

***A nos maîtres et membres de jury Mme L. BELMAHDI et M. BENCHOUAK***

*Vous nous faites l'honneur d'accepter d'examiner et de juger ce travail. Nous tenons à vous remercier et à vous exprimer notre respect.*

***A Mme Nassima HASDANI responsable du laboratoire contrôle qualité au NOVO Nordisk***

*Pour sa modestie, son accueil chaleureux et l'aide qu'elle nous a apporté avec toute son équipe et qui ont fait de sorte à ce qu'on se sente chez soi, veuillez trouver ici l'expression de notre profonde gratitude.*

***A l'équipe du laboratoire de chimie analytique***

*Pour qui on aimerait exprimer notre grande reconnaissance et en particulier pour Dr H. ABDENOURI qui a eu la gentillesse de nous aider et nous donner des conseils fructueux. Merci infiniment.*

## Dédicaces

Je dédie ce mémoire de fin d'études :

### ***À MES PARENTS FARID ET TAOUES***

Aucun mot, ne saurait exprimer l'estime, le respect et l'amour que je vous porte. Vous vous êtes investi à me transmettre le sens de la responsabilité, de la persévérance et de la droiture. Que ce travail soit le gage de ma reconnaissance et de ma gratitude.

### ***À MA SŒUR LETICIA ET À MES FRÈRES SOFLANE ET WALID***

Qui ont égayé ma vie, merci d'avoir été patients durant cette période je vous aime Que dieu vous accorde réussite, bonheur, santé et prospérité !

### ***À MES CHERS AMIS CÉLIA, BRAHIM, NABILA, MASSIKA, KATIA, TAOUES, SOUMER ....***

Vous m'avez encouragé, soutenu et vous étiez présent dans tous mes bons et mauvais moments, Voyez dans ce travail, le témoignage de ma reconnaissance.

### ***À TOUS MES AMIS***

Qui ont contribué de près ou de loin dans l'élaboration de ce travail.

**Ouiza**

# DÉDICACES

## À MES CHERS PARENTS

AUCUNE DÉDICACE NE SAURAIT EXPRIMER MON RESPECT, MON AMOUR ÉTERNEL ET MA  
CONSIDÉRATION POUR TOUS LEURS SACRIFICES ,LEURS AMOURS , LEURS TENDRESSE ,  
LEURS SOUTIEN ET LEUR PRIÈRES QUI M'ONT ACCOMPAGNÉ TOUT AU LONG DE MES  
ÉTUDES .

## À MA CHÈRE SŒUR DAMIA

POUR SON ENCOURAGEMENT ET SOUTIENS DURANT MES ÉTUDES

TU ES MON BRAS DROIT MA CHÈRE SANS DIEUX ET TOI JE NE SERAI JAMAIS ARRIVÉ LÀ

## À MES CHÈRES GRANDS MÈRES

QUI M'ONT ACCOMPAGNÉ PAR LEUR PRIÈRES, LEUR DOUCEUR, PUISSE DIEU LEUR PRÊTER  
LONGUE VIE ET BEAUCOUP DE SANTÉ.

## À MES CHERS ONCLES, TANTES,

LEURS EPOUX ET EPOUSES

## À MES CHERS COUSINS ET COUSINES

VEUILLEZ TROUVER DANS CE TRAVAIL L'EXPRESSION DE MON RESPECT LE PLUS PROFOND  
ET MON AFFECTION LA PLUS SINCÈRE.

## À MA CHÈRE AMIE ET SŒUR LAËTITIA LILIA

POUR SA PRÉSENCE , SON ENCOURAGEMENT ET SOUTIEN MORAL DURANT LES MOMENTS  
LES PLUS DIFFICILES

**À MES CHÈRES COPINES**

LIZA, FADHILA, SAMIA, KAMILA ET NAWAL

POUR LES BONS MOMENTS PASSÉS À L'UNIVERSITÉ

**À MES CHÈRES AMIES D'ENFANCE LYLIA , MELISSA**

**À MA BINÔME**

À TOUS MES ENSEIGNANTS DU PRIMAIRE JUSQU'À L'UNIVERSITÉ JE DÉDIE CE TRAVAIL

À TOUS MES AMIS ET CAMARADES QUI M'ONT SOUTENU DURANT CE TRAVAIL

**SARAH**

# TABLE DE MATIERES

Remerciements	
Dédicaces	
Table des matières	
Liste des abréviations	
Liste des tableaux	
Liste des figures	

## PARTIE THEORIQUE

Introduction générale.....	1
<b>CHAPITRE I : Présentation de la MétformineHCl .....</b>	<b>4</b>
<b>CHAPITRE II : Système qualité.....</b>	<b>6</b>
1. Définition de la qualité.....	6
2. Assurance qualité .....	6
2.1.Définition de l'assurance qualité .....	6
2.2.Principe d'assurance qualité .....	6
2.3.Structures d'un système d'assurance de la qualité .....	6
3. Contrôle qualité .....	7
3.1.Définition de contrôle qualité.....	7
3.2.Bonnes pratiques de fabrication et le contrôle qualité .....	7
3.3.Différence entre contrôle qualité et assurance qualité .....	8
4. Management de la qualité .....	8
4.1.Définition de mangement qualité .....	8
4.2.Etape de mangement qualité .....	8
<b>CHAPITRE III : Quality by Design (Qualité par conception).....</b>	<b>9</b>
1. Présentation des guidelines de L'ICH.....	9
1.1. ICHQ8(R2) : Développement pharmaceutique.....	9
1.2. ICHQ9 : Gestion de risque qualité .....	9
1.3. ICHQ10 : Système qualité pharmaceutique .....	10
2. Nouveau paradigme – Quality by Design (QbD) .....	11
2.1. Relation entre les GMPs et les ICH .....	11
2.2. Définition de qualité par la conception(QbD).....	11
2.3. Intérêt du QbD.....	12
2.4. Avantage et inconvénient de QbD .....	12
2.5. Démarche générale de mise en œuvre du QbD.....	13
3. Plans d'expériences.....	14
3.1. Définition des plans d'expériences .....	14
3.2. Plans de surface de réponse .....	14

# TABLE DE MATIERES

## **PARTIE EXPERIMENTALE**

1. Matériels et méthodes .....	16
2. Résultats et Discussion.....	24
3. Conclusion .....	39
Conclusion générale .....	40
Références bibliographiques	
Annexes I	
Annexes II	
Résumé	

## Liste des abréviations

°C : Degré Celsius

**AMM** : Autorisation de Mise sur le Marché

**AQC** : Attributs Qualité Critique

**BPF** : Bonne Pratique de Fabrication

**CPP** : Paramètres Critiques du Procédé

**CTD** : Common Technical Document

**DCD** : Dicyandiamid

**DS** : Design Space

**FDA** : Food and Drug Administration

**GMP** : Good Manufacturing Practices

**HPLC** : High Performance Liquide Chromatography (Chromatographie Liquide à Haute Performance)

**ICH** : International Conference of Harmonization

**ISO** : International Standard organization.

**JMP** : John's Macintosh Project (logiciel portant le nom de son inventeur)

**OMS** : Organisation mondiale de la santé

**PA** : Principe Actif

**PAT** : Process Analytical Technology

**QDB** : Quality By Design

$R_{\text{metformine}}$  : Recouvrement Metformine

**R<sub>DCD</sub>** : Recouvrement de la Dicyandiamid

**STD** : Standard

## Liste des tableaux

<b>Numéro du tableau</b>	<b>Titre</b>	<b>Pages</b>
Tableau I	Propriétés physico-chimiques et organoleptiques de chlorhydrate de Metformine	04
Tableau II	Composants et réactifs d'un comprimé Metformine HCl	16
Tableau III	Equipements du laboratoire de contrôle qualité	17
Tableau IV	Verreries et autres matériels utilisés	17
Tableau V	Les valeurs codées des cinq facteurs	19
Tableau VI	Matrice d'Hadamard du plan d'expérience exploité par le logiciel JMP trial	19
Tableau VII	Les niveaux des quatre facteurs	22
Tableau VIII	Matrice du plan d'expérience du second degré	22
Tableau IX	Les recouvrements obtenus par l'analyse HPLC	24
Tableau X	Histogramme des facteurs influents sur le recouvrement et leur constante	24
Tableau XI	Calcul de pourcentage de déviation pour $R_{\text{metformine}}$	27
Tableau XII	Histogramme des facteurs influents sur le recouvrement de la DCD	27
Tableau XIII	Calcul de pourcentage de déviation de la DCD (modèle 1 <sup>er</sup> degré)	30
Tableau XIV	Les résultats des recouvrements obtenus après une série d'expérience	31
Tableau XV	Valeurs des coefficients du modèle du second degré (recouvrement Metformine HCl)	32
Tableau XVI	Analyse des variances pour le $R_{\text{metformien HCL}}$	34
Tableau XVII	Calcul de pourcentage de déviation pour le recouvrement de la Metformine HCl (modèle du 2 <sup>ème</sup> degré)	35
Tableau XVIII	Valeurs des coefficients du modèle du second degré (recouvrement de la DCD)	35
Tableau XIX	Analyse des variances pour le recouvrement de la DCD	37
Tableau XX	Calcul de pourcentage de déviation pour le recouvrement de la DCD de modèle de 2 <sup>ème</sup> degré	38

## Liste des figures

Numéro de la figure	Titre de la figure	Page
Figure 01 :	Structure du chlorhydrate de Metformine	4
Figure 2:	La réaction de la diméthylamine chlorhydrate et 2-cyanoguanidine (dicyandiamide)	5
Figure 3:	Différence entre le contrôle qualité et l'assurance qualité	8
Figure 4:	Modèle de diagramme pour la gestion du risque qualité proposé par L'ICH [dem10]	10
Figure 5:	Procédé de fabrication figé	11
Figure 6:	Procédé de fabrication ajustable [8ich]	11
Figure 7 :	Les avantages et les inconvénients du QbD	12
Figure 8 :	Le diagramme de Daniel pour le $R_{\text{metformineHCl}}$	25
Figure 9:	Graphe des valeurs observées en fonction des valeurs prévues pour le $R_{\text{metformine}}$	26
Figure 10:	Graphique des résidus en fonction des valeurs prévus pour $R_{\text{metformine}}$ .	27
Figure 11:	Le diagramme de Daniel pour le recouvrement de la DCD	28
Figure 12 :	Graphe des valeurs observées en fonction des valeurs prévue pour le recouvrement de la DCD	29
Figure 13 :	Graphique des résidus en fonction des valeurs prévus pour $R_{\text{DCD}}$	29
Figure 14 :	Profils de prévisions des réponses des facteurs	30
Figure 15 :	Graphe des valeurs observées en fonction des valeurs prévue pour le $R_{\text{metformineHCl}}$ pour le plan de 2 <sup>eme</sup> degré	33
Figure 16 :	Graphique des résidus en fonction des valeurs prévus pour le $R_{\text{metformine}}$ avec le modèle de second degré	34
Figure 17 :	Graphe des valeurs observées en fonction des valeurs prévue pour le $R_{\text{DCD}}$ de second degré	36
Figure 18 :	Graphique des résidus en fonction des valeurs prévus pour le $R_{\text{DCD}}$ de second degré	37
Figure 19 :	Profile de prévision pour le plan de second degré (BOX-BEHNEKEN)	38

# Glossaire

## **AMM** (Autorisation de Mise sur le Marché)

C'est une autorisation nationale ou européenne délivrée à un titulaire responsable de la commercialisation d'une spécialité pharmaceutique après son évaluation. Ce document officiel est constitué d'une décision et d'annexes dont le résumé des caractéristiques du produit.

## **BPF** (Bonne Pratique de Fabrication)

Ensemble des principes et des lignes directrices à respecter pour la fabrication des médicaments à usage humain et vétérinaire.

## **Norme ISO 9001**

Cette **Norme** définit les exigences en matière de système de management de la qualité au niveau de la conception, de la fabrication, de la fourniture, de la surveillance et de la mesure du produit. Elle prend aussi en compte les Bonnes pratiques de fabrication (BPF).

## **FDA**

Agence américaine des produits alimentaires et médicamenteux. Créé en 1906, sous la présidence de Théodore Roosevelt, ce service du gouvernement américain, est responsable de la pharmacovigilance, c'est-à-dire des études, du contrôle et de la réglementation des médicaments avant leur commercialisation.

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

L'ICH est un comité créé à l'initiative de la communauté économique européenne et Fonctionnant sous formes de conférences en vue d'harmoniser les exigences en matière d'AMM entre les Etats-Unis, le Japon et l'Union Européenne. Le rôle de l'ICH est de travailler à l'harmonisation des principes de qualité, sécurité et l'efficacité des médicaments.

## **Section 3.2.P.2 de CTD**

Il s'agit de développement pharmaceutique de produit fini ( PA , excipient, procédé de fabrication propriété physico-chimique....) d'où ; le **numéro 3** il revient sur le **module 3** qui définit la qualité, **numéro2** s'agit de contenu des principe et des exigences fondamentaux, **Le P** signification de **Produit fini**, et le numéro 2 s'agit de développement pharmaceutique.

### **Section 3.2.P.8 de CTD**

Cette section s'agit de la stabilité de produit fini (résumée et conclusion en matière de stabilité, protocole de stabilité et, données concernant la stabilité), la même signification que la section 3.2.P, appart que **le numéro 8** revient au mot stabilité.

### **Placébo**

C'est les excipients qui sont ajouté au principe actif qui ont peu ou aucun effet thérapeutique, dans le cas de metformine, le placebo joue sur l'apparence du comprimé

### **Logiciel JMP**

C'est un programme informatique de statistiques mis au point par la division JMP de l'Institut SAS. Créé dans les années 1980 en exploitant les avancées graphiques du Macintosh, il a ensuite été amélioré, c'est un logiciel de statistiques dans lequel une partie est consacrée aux plans d'expériences. Dans notre travail on a utilisé la 14<sup>ème</sup> EDITION **JMP trial 14**.

# **INTRODUCTION**

## Introduction générale

---

L'industrie pharmaceutique est de nos jours une industrie florissante, un secteur d'activité très important dans le monde, elle comprend de nombreux services et entreprises, publiques et privées,

Elle gère l'élaboration, la production et la surveillance de tous les médicaments commercialisés dans le but de découvrir, développer, et mettre à la disposition des médecins et de leurs patients des traitements innovants, efficaces et bien tolérés.

Elle veille jours et nuits pour assurer des médicaments de qualités et garantir leur conformité et cela en respectant les BPF et les exigences d'AMM. En prenant en considération les aspects renseignés dans les cinq modules (AMM ) où on doit présenter une carte d'identité du produit en se basant sur l'efficacité et la sureté du médicament via les essais cliniques et précliniques et en assurant la qualité via les contrôle qualités réalisés au laboratoire physicochimique et microbiologique au cours de la production, ces contrôles sont réalisés en effectuant des tests et des analyses sur des échantillons comme le dosage des PA par plusieurs méthodes analytiques ( spectroscopiques, chromatographiques....).

Aujourd'hui la qualité n'est plus assurée uniquement par des tests comme c'était le cas autre fois, avec seulement un médicament commercialisé sur dix produits, les entreprises pharmaceutiques sont de plus en plus désireuses d'adopter de nouvelles mesures pour assurer la qualité et gérer le risque. Pour cela, les laboratoires doivent d'un point de vue éthique, de produire et mettre sur le marché des médicaments d'un haut degré de qualité afin de faire face aux obligations réglementaires et commerciales qui exigent de mettre un système d'assurance qualité plus efficace.

La démarche qualité est l'ensemble des actions menées par une entreprise pour améliorer la qualité et sa gestion, obtenir des produits meilleurs en appliquant une nouvelle approche la qualité par conception (en anglais Quality by design abrégé par l'acronyme QbD) qui est un sujet fortement d'actualité.

Les dosages par HPLC fournissent des résultats expérimentaux présentés sous forme de pics chromatographiques caractérisés par les temps de rétention et les surfaces de ces pics, appelés communément grandeurs chromatographiques. Ces grandeurs sont influencées par plusieurs facteurs liés au système d'analyse (débits et pH de la phase mobile, température ....) et peuvent affecter la conformité de la qualité du produit objet de contrôle. Que sont donc les outils permettant d'identifier et d'évaluer les facteurs influençant les résultats d'une analyse chromatographique et par suite la qualité du médicament manufacturé ? La nouvelle approche QbD répond-elle entre autres cette problématique ?

## Introduction générale

---

Le présent travail est subdivisé en deux parties :

En premier lieu nous nous sommes intéressées à l'étude bibliographique, elle comporte trois chapitres ;

- Le premier chapitre est consacré à la présentation de la molécule Metformine HCl et ses propriétés physicochimiques.
- Le deuxième chapitre traite les notions de qualité, d'assurance qualité et de contrôle qualité.
- Le troisième chapitre est dédié à l'étude du nouveau concept de la qualité QbD et présentant les guidelines de l'ICH et la mise en œuvre de cette démarche, et la présentation des plans d'expérience utilisés dans la partie pratique.

La seconde partie de ce manuscrit est la partie pratique, elle comporte tous les modes opératoires et la définition du matériel utilisé, les résultats obtenus suivis des discussions.

En fin, une conclusion générale résumant l'ensemble de notre travail et les résultats obtenus.

## **Introduction générale**

---

L'objectif de notre travail est d'appliquer le nouveaux concept de la qualité (QbB) au dosage de la metformine et de son impureté DCD dans le produit fini Novoformine comprimé par la chromatographie liquide à haute performance (HPLC) pour déterminer les facteurs qui impactent la réponse expérimentale (aire du pic chromatographique) en utilisant les plans d'expérience de 1er et de 2ème degrés.

# **PARTIE THEORIQUE**

# CHAPITRE I

### 1. Définition et structure chimique de la metformine HCl

La Metformine est un agent appartenant à la classe des antidiabétiques à activité anti hyperglycémique biguanide. Elle aide aussi à réduire les niveaux de cholestérol LDL et de triglycérides. Actuellement c'est le médicament de premier choix pour la gestion du diabète de type II et il est prescrit à au moins 120 millions de personnes dans le monde. [1]

La Metformine est pourvue d'une propriété basique, le motif guanidine qui la compose lui confère une forte basicité (pKa de 11.5) et par suite une forte capacité de protonation dans les milieux biologiques.

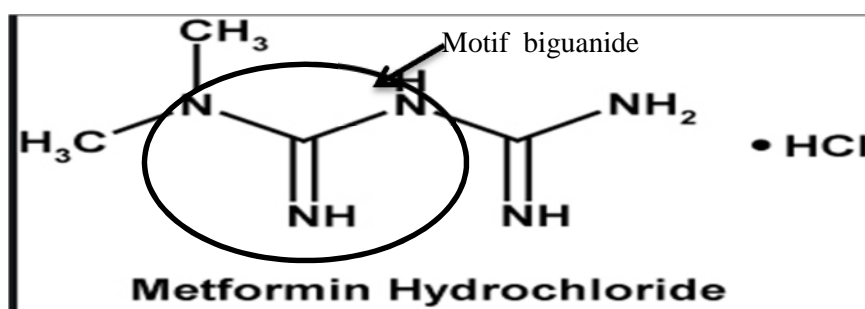


Figure 1 : Structure du chlorhydrate de Metformine

### 2. Propriétés physicochimiques de la Metformine HCl

Le tableau ci-après regroupe quelques propriétés physico-chimiques du chlorhydrate de Metformine

Tableau I : Propriétés physico-chimiques et organoleptiques de chlorhydrate de Metformine [1]

Metformine HCl	Propriétés physico-chimiques/organoleptiques
Nomenclature	Chlorhydrate de de N,N-diméthyle-biguanide
Aspect	Cristaux blancs ou sensiblement blancs.
Formule brute	$C_4H_{12}ClN_5$
Masse molaire (g/mol)	129.16 g/mol
Point de fusion (C°)	224.1°C
Solubilité	Facilement soluble dans l'eau à 95%, Peu soluble dans l'alcool, Pratiquement insoluble dans l'acétone et dans le chlorure de méthylène.
Etat physique	Solide
Classe thérapeutique	Anti diabétique oral
Solubilité dans l'eau	2g de Metformine HCl est soluble dans 10mL d'eau
pKa	12.4



# CHAPITRE II

### 1. Définition de la qualité

En 1984, la qualité est définie comme étant « L'aptitude d'un produit ou d'un service à satisfaire les besoins de l'utilisateur » [2]. Cette définition était remplacée par d'autres ; mais elle a gardé le même sens. En 2005, et selon ISO 9000 la définition de la qualité : « la qualité est l'aptitude d'un ensemble de caractéristiques intrinsèques à satisfaire des exigences spécifiées » [3].

La qualité des médicaments est évidemment de la plus haute importance du point de vue de la santé publique. Lorsqu'on fabrique un médicament nouveau, il faut commencer par établir la qualité [2].

### 2. L'assurance qualité

#### 2.1. Définitions d'assurance qualité :

L'assurance de la qualité est un vaste concept englobant toutes les questions qui, individuellement ou de façon collective, influent sur la qualité d'un produit. Pour ce qui concerne les produits pharmaceutiques, l'assurance de la qualité peut être déclinée en plusieurs thèmes principaux : l'élaboration, le contrôle de la qualité, la production, la distribution et l'inspection [2].

L'assurance qualité est définie comme la probabilité d'obtenir des produits correspondant au niveau de qualité requis.

Selon la norme ISO 9000 « l'assurance qualité est considéré comme une partie du management de la qualité visant à donner confiance en ce que les exigences pour la qualité seront satisfaites » [3].

Notons également, que dans le terme assurance, il y a la notion d'investissement préventif, destiné à garantir le succès de l'opération [4].

#### 2.1.1. Principes d'assurance qualité

- Respect des BPF et autres codes de réglementation.
- Procédure d'auto-inspection (audit de la qualité).
- Les responsabilités précisées ; testes, étalonnages ou validation effectués.
- Médicaments non vendus avant l'obtention d'AMM.
- Médicaments correctement manipulés tout au long de leur durée d'utilisation [6].

#### 2.1.2. Structures d'un système d'assurance de la qualité

L'assurance qualité comporte deux éléments distincts mais complémentaires qui peuvent être également utilisés par les organes de réglementation ; l'inspection et le contrôle de la qualité en laboratoire.

- Le but de l'inspection est de s'assurer que toutes les activités professionnelles à toutes les étapes de la fabrication et de l'approvisionnement sont conformes aux exigences de l'homologation et aux réglementations professionnelles.
- Le rôle des laboratoires de contrôle qualité est de vérifier par des essais appropriés que les médicaments satisfont aux normes de qualité requises et de la surveillance des produits commercialisés.

Selon différents domaines les structures et les éléments de l'assurance qualité peuvent revêtir une importance différente [2].

### **3. Contrôle qualité**

#### **3.1. Définitions du contrôle**

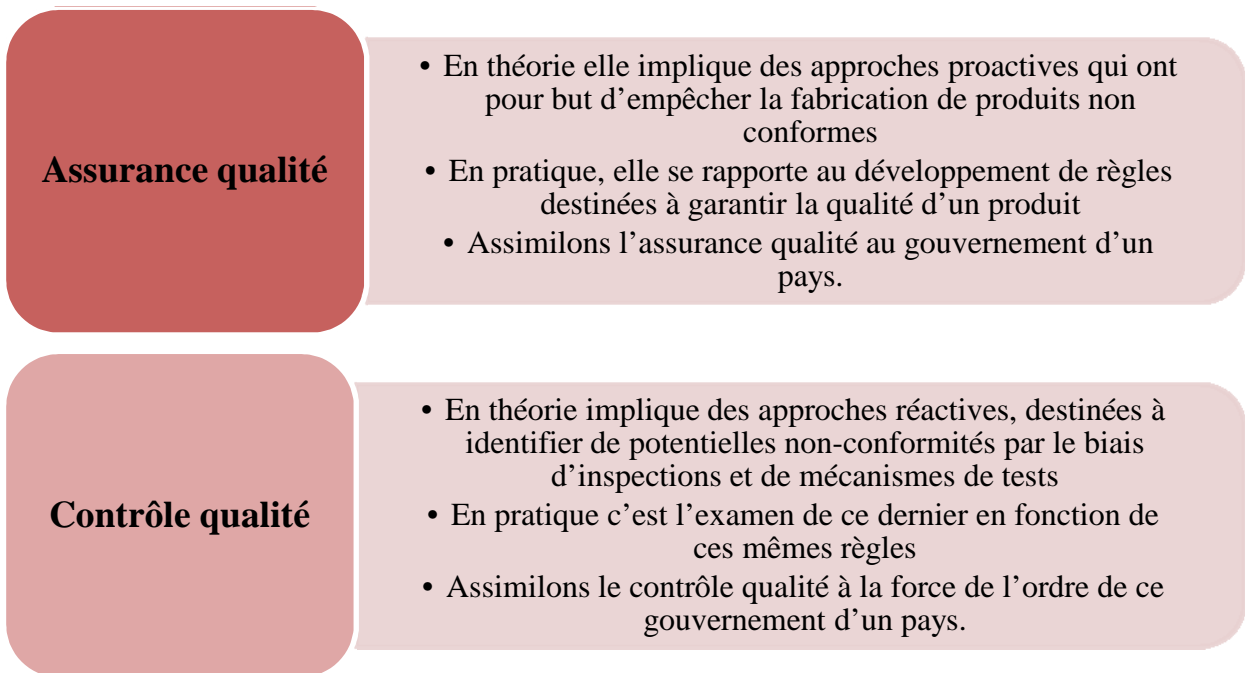
Le contrôle de la qualité est une opération essentielle de l'industrie pharmaceutique. Les médicaments doivent être commercialisés en tant que formulations sûres et thérapeutiquement actives, dont les performances sont cohérentes et prévisibles. De nouveaux et meilleurs agents médicinaux sont produits à un rythme accéléré. En même temps, des méthodes analytiques plus exigeantes et sophistiquées sont mises au point pour leur évaluation. Les exigences régissant le contrôle de la qualité des produits pharmaceutiques qui doivent être conforme selon les normes [6].

#### **3.2. Bonnes pratiques de fabrication et le contrôle qualité**

C'est à la Vingt-huitième Assemblée mondiale de la Santé, en 1975, qu'a été adopté le texte original des « bonnes pratiques de fabrication et de contrôle de la qualité des médicaments ». Un texte révisé a été approuvé par le Comité OMS d'experts des Spécifications relatives aux Préparations pharmaceutiques sous le titre « Bonnes pratiques de fabrication des produits pharmaceutiques ». Il se compose de trois parties :

- Gestion de la qualité dans l'industrie pharmaceutique : principes et éléments essentiels ;
- Bonnes pratiques de production et de contrôle de la qualité ;
- Directives complémentaires (comportant des sections sur les produits pharmaceutiques stériles et les bonnes pratiques de fabrication des principes actifs).

### 3.3. Différence entre contrôle qualité et assurance qualité



**Figure 3:** Différence entre le contrôle qualité et l'assurance qualité [7].

### 3.4. Principe du management de la qualité

#### 3.4.1. Définition ISO 9000 du management de la qualité :

« Activité coordonnées permettant d'orienter et de contrôler un organisme en matière de qualité »[3].

Il doit mettre en place un système qualité (organisation, procédures, moyen et processus) pour rendre opérationnel et efficace le management de la qualité [3].

#### 3.4.2. Etape du management de la qualité :

Pour une entreprise partant d'un niveau moyen en management de la qualité, l'objectif de certification « ISO 9000 » représente déjà un challenge important. Cela ne peut marcher que si l'on encourage et que l'on utilise la volonté de changement du personnel.

La certification obtenue, cette dynamique de progression risque de s'éteindre. Si l'on veut que cette démarche de progrès persiste, ISO 9004 peut revenir renforcer l'ISO 9001 et servir de modèle pour continuer à s'améliorer de façon significative [3].

# CHAPITRE III

## 1. Présentation des guidelines de L'ICH

L'ICH est un processus d'harmonisation des exigences réglementaires en matière de médicaments à usage humain. Depuis sa création, l'ICH s'est focalisée sur les réglementations techniques relatives aux médicaments contenant de nouveaux principes actifs dont la majorité sont développés en Europe, au Japon et aux Etats-Unis (zones majeures de développement de nouveaux produits). Le but était donc d'utiliser les ressources de manière plus économique et de réduire les délais de développement et de disponibilité des nouveaux produits, tout en maintenant la qualité, la sécurité, l'efficacité et en respectant les obligations réglementaires.[ich8]. Afin de standardiser la qualité et de promouvoir l'harmonisation de ses règlements, l'autorité règlementaire de l'ICH crée, en 2003, des groupes de travail pour développer un système de qualité pharmaceutique. Ce système est basé sur une approche scientifique et un management du risque qualité. Ainsi sont publiées, à partir de 2004, les recommandations Q8, Q9 et Q10 centrées sur le développement pharmaceutique, la mise en œuvre de la gestion des risques qualité et l'amélioration continue. [9]

### 1.1.ICH Q8(R2) : Développement pharmaceutique

Cette ligne directrice a permis de préciser le type d'informations nécessaires dans les dossiers d'enregistrements pour démontrer la connaissance des facteurs ayant un impact sur la qualité du produit. [8ich] et cette dernière se décompose en deux parties complémentaires ;

La première partie décrit le contenu suggéré de la section 3.2.P 8 d'une soumission réglementaire au format CTD. Cette section fournit l'occasion d'exposer les connaissances acquises, par l'application d'approches scientifiques, au cours du développement d'un produit et de son procédé de fabrication.

La seconde partie apporte de nouvelles précisions sur la façon de mettre en pratique les principaux concepts de l'ICH Q8, notamment par l'application du Quality by Design. Enfin, elle apporte des indications sur la manière d'utiliser les éléments du QbD dans la section 3.2.P.2, relative au développement pharmaceutique du CTD.[9]

### 1.2.ICH Q9 : Gestion du Risque de la Qualité

Cette guideline transmet les principes et outils suffisants à la gestion du risque de la qualité dans l'industrie pharmaceutique. Elle s'applique à tous les stades du cycle de vie d'un médicament (développement, production, distribution...). [Démarche] et cette recommandation facilite le respect des BPF et autres exigences en matière de qualité.

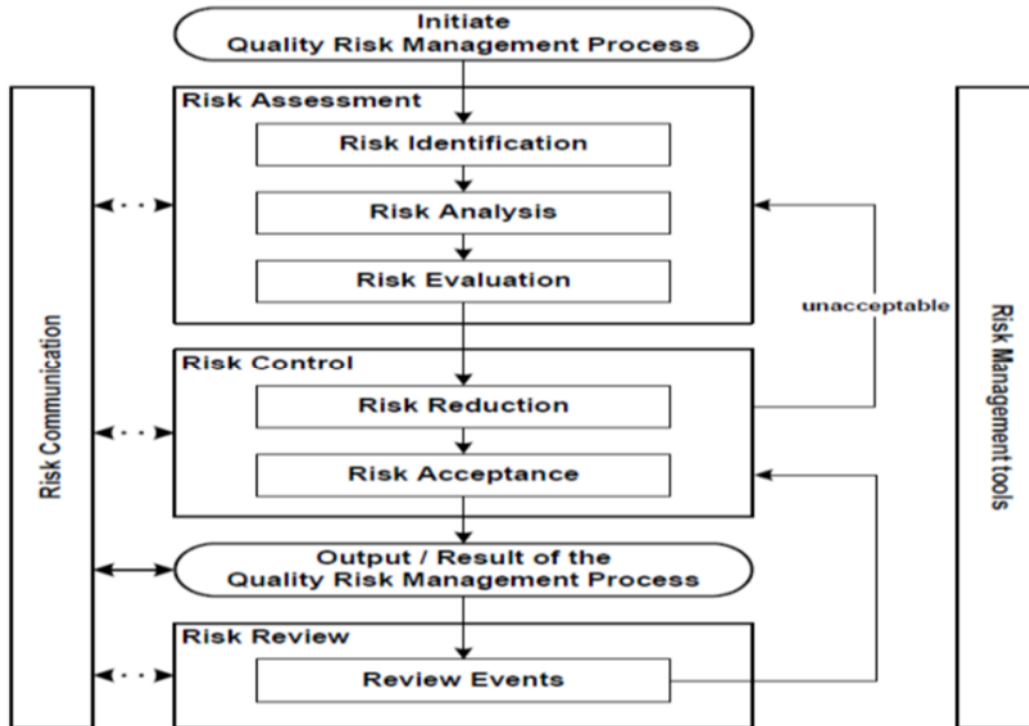
Les deux grands principes de base de cette gestion du risque qualité sont les suivants :

- ✓ L'évaluation du risque qualité doit être basée sur des connaissances scientifiques,

- ✓ Le niveau d'effort, de formalité et de documentation doit être proportionnel au niveau de risque.

Cette dernière propose trois principales étapes à la gestion du risque qualité : l'estimation du risque, son contrôle et sa révision. [8]

La figure 01 ci-dessous représente un modèle de gestion des risques liés à la qualité, présenté dans le diagramme ci-après



**Figure 4** : Modèle de diagramme pour la gestion du risque qualité proposé par l'ICH [dem10]

### 1.3.ICH Q10 système de qualité pharmaceutique

La recommandation ICH Q10 décrit un modèle de système de gestion de la qualité efficace, destiné à l'industrie pharmaceutique et connu sous le nom de système de qualité pharmaceutique. Ce système basé sur les concepts qualité des normes ISO inclut les réglementations GMP et complète les recommandations ICH Q8 et Q9. Ainsi, l'ICH Q10, définit la conception d'un processus de qualité prenant en compte les différentes étapes du cycle de vie d'un produit. La compréhension et l'application de ce document permet de lier étroitement les activités de développement et de production pharmaceutique et d'augmenter l'innovation et l'amélioration continue de la qualité d'un produit.

Les trois principaux objectifs de l'ICH Q10 qui visent tous à compléter ou renforcer les exigences BPF.

- ✓ Assurer la réalisation du produit.
- ✓ Etablir et maintenir une phase de maîtrise.
- ✓ Faciliter l'amélioration continue [11].

### 1.2.Nouveau paradigme – Quality by Design

L'association de la recommandation ICH Q8, Q9, Q10 forme un nouveau « paradigme » de la qualité basé sur la science pharmaceutique et la gestion du risque, en prenant en compte l'intégralité du cycle de vie de produit.

La figure 3 ci- dessous démontre que la maîtrise de la qualité du produit est fondée sur la mesure des paramètres indépendants, sans lier les paramètres du procédé et les caractéristiques de produit fini.



**Figure 5** : Procédé de fabrication figé

La figure 4 ci-dessous démontre que la maîtrise de la qualité du produit est fondée sur la mesure des caractéristiques du produit obtenu, les paramètres de contrôle de procédé sont liés entre eux et au pilotage de fabrication.



**Figure 6** : Procédé de fabrication ajustable [8]

#### 2.1. Relation entre les GMPs et les ICH Q8, Q9, Q10

La complémentarité des données contenues dans les guides GMP et ICH permet, par une compréhension globale et une application ciblée et adaptée, à chaque entreprise de :

- ✓ Réduire les risques et les coûts opérationnels,
- ✓ Stimuler l'innovation et l'amélioration permanente,
- ✓ Optimiser le processus de gestion des changements,
- ✓ Introduire des approches réglementaires flexibles. [8]

#### 2.2.Définition de Quality by Design

Définir le concept de la qualité dans l'industrie pharmaceutique est essentiel à son incorporation dans la conception, contrôle, développement et production des médicaments. Toutefois, cette approche est initiée au début du siècle par la FDA et le comité de l'ICH, cette philosophie bouleverse la manière de travailler des équipes de recherche et développement du processus et du service règlementaire [2].

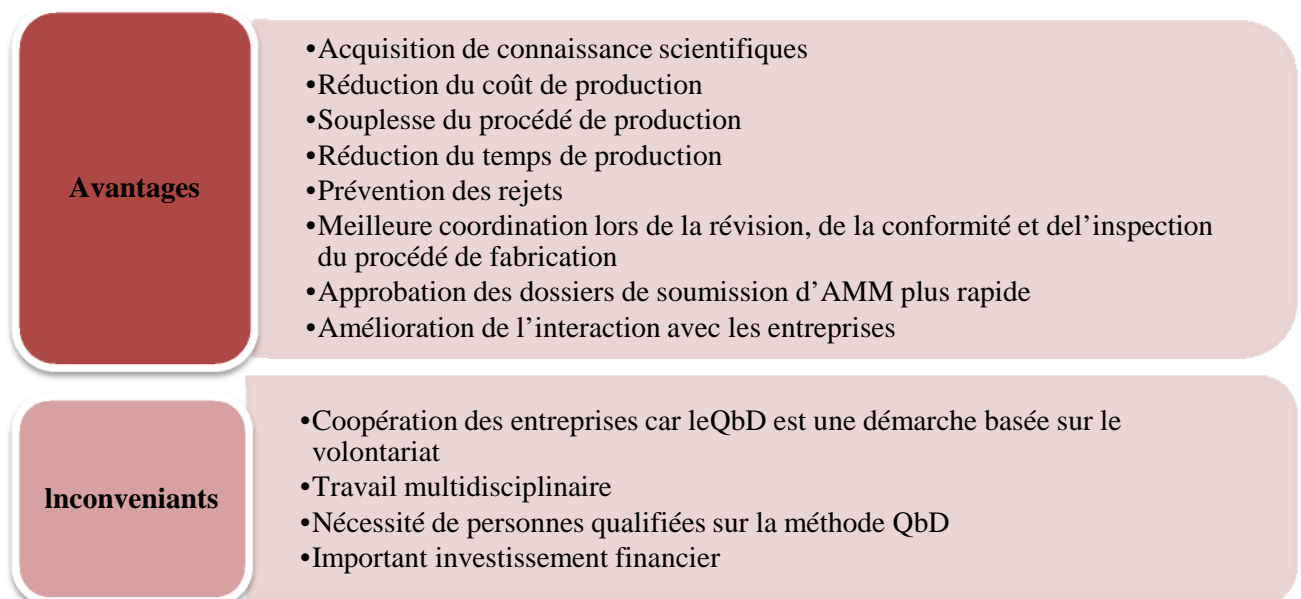
Contrairement aux méthodes empiriques traditionnellement utilisées dans le développement et la fabrication d'un produit, le Quality by Design est une approche scientifique fondée sur les risques. Elle vise à intégrer la qualité dès les premières étapes de conception d'un produit pour éviter toutes défaillances d'apparaître et mieux y remédier le cas échéant. Beaucoup d'entreprises interprètent différemment la notion de Quality by Design mais la plupart s'accordent sur le fait qu'il s'agit de comprendre et de contrôler tous les aspects du processus de fabrication, qui font partie des propriétés essentielles de qualité d'un médicament (appelé Design Space (espace de conception) [10].

Le Quality by Design permet de créer des produits plus sûrs et plus efficaces mais aussi d'être plus flexibles par rapport aux normes appliquées dans le Design Space. Tout cela se traduit par une réduction des coûts pour les fabricants [10].

### 2.3. Intérêt de la démarche Quality by design

Cette approche est utilisée dans le but d'améliorer la qualité en diminuant le nombre d'expériences à effectuer en assurant un large intervalle de sécurité et minimisant les coûts pour l'industrie car avant l'année 2000, il était commun d'effectuer un nombre incalculable d'essais de formulation afin de ne faire varier qu'un seul paramètre à chaque test. Il était aussi normal de réaliser la majorité des contrôles en fin de production, avant la distribution. Le temps de travail n'était pas optimisé et une certaine quantité de lots pouvait être réfutée. De ce fait, les autorités réglementaires ont élaboré une nouvelle manière de travailler en impliquant la qualité tout au long du cycle de vie d'un produit [10].

### 2.4. Avantages et inconvénients



**Figure 7** : les avantages et les inconvénients du QbD [10]

## 2.5. Démarche générale de mise en œuvre du QbD

### 2.5.1. Profil Qualité cible du produit

Le profil du produit et l'objectif de qualité constituent la base de la conception pour le développement d'un nouveau médicament. Les considérations relatives au profil du produit cible en matière de qualité pourraient inclure :

- ✓ Utilisation prévue en milieu clinique, voie d'administration, forme posologique, mode d'administration ;
- ✓ Système de fermeture du récipient ; Développement pharmaceutique.
- ✓ La libération ou l'administration d'un fragment thérapeutique et ses attributs affectant les caractéristiques pharmacocinétiques (p. ex. dissolution, performance aérodynamique) appropriée à la forme posologique du produit médicamenteux en cours d'élaboration ;
- ✓ Critères de qualité du produit médicamenteux (p. ex. stérilité, pureté, stabilité et libération du médicament) approprié pour le produit commercialisé prévu. [11]

### 2.5.2. Attributs qualité critique du produit (AQC)

Une AQC est une propriété ou caractéristique physique, chimique, biologique ou microbiologique qui doit se situer à l'intérieur d'une limite, d'une distribution appropriée pour assurer la qualité souhaitée du produit. Les AQC sont généralement associés à la substance médicamenteuse (excipients, produits intermédiaires et produit pharmaceutique).

Les AQC peuvent en outre inclure des aspects plus spécifiques au produit, tels que les propriétés aérodynamiques de l'air inhalé. La stérilité pour les produits parentéraux et les propriétés d'adhésion pour les timbres transdermiques [11] et la AQC prennent en considération la sécurité et l'efficacité du médicament [12].

### 2.5.3. Paramètres critiques du procédé(CPP)

Un paramètre du procédé dont la variabilité a un impact direct sur un attribut qualité et qui de ce fait nécessite d'être contrôlé pour s'assurer que le procédé conduit bien au niveau de qualité attendu. Un paramètre critique du procédé reste critique même s'il est contrôlé [12].

### 2.5.4. Espace de conception(DS)

DS est définie Selon la guideline ICH Q8(R2), cet espace représente la relation entre les données d'entrée de processus (les « caractéristiques critiques » des matières premières (CMA) et les « paramètres » du procédé (CPP)), avec la qualité du produit fini (les « attributs qualité critiques » (CQA)) [10]. L'industriel peut évoluer dans cette espace de conception sans en informer les autorités compétentes, car toutes variations des paramètres critiques n'impactent pas sur la qualité du produit fini, cela signifie que les paramètres en question (CMA ou CPP) n'influent pas de manière significative sur les CQA [10].

### **2.5.5. Process Analytical Technology (PAT)**

Système basé sur l'analyse de mesures en cours de fabrication dans l'atelier, des paramètres critiques et des indicateurs de performance, qui permet d'atteindre la maîtrise du procédé de fabrication. Le terme « Analytical » doit être pris au sens large pour inclure tout moyen, méthode, technique ou technologie à intégrer en un système bouclé, multidisciplinaire d'amélioration continue [12].

### **2.5.6. Real Time Release Testing**

Capacité d'évaluer et assurer la qualité d'un produit en cours ou fini, fondée sur les données du Processus (sur la base d'une combinaison des attributs composants mesurés et des contrôles de processus. [12].

### **2.5.7. Robustesse du procédé (ProcessRobustness)**

Capacité d'un processus de tolérer une variabilité des composants et des modifications de procédé et d'équipement sans impact négatif sur la qualité du produit [12].

### **2.5.8. Vérification continue du procédé (Continuous Process Verification)**

Autre approche de la validation des procédés dans laquelle la performance du procédé de fabrication est contrôlée et évaluée en continu [12].

## **3. Plans d'expérience**

### **3.2. Définition des plans d'expériences**

Les plans d'expériences sont une suite d'expériences qui permettent d'organiser au mieux les essais qui accompagnent une recherche scientifique ou bien des études industrielles afin d'identifier, à moindres coûts, les effets des paramètres sur la réponse du produit. [13]. L'utilisation de ces plans permet d'obtenir un maximum de renseignements avec un minimum d'expériences

### **3.3. Plans de surface de réponse**

Un plan de surface de réponse est un ensemble de techniques qui permettent de mieux comprendre et d'optimiser une réponse, afin de décrire la méthode permettant d'obtenir la réponse optimale, une série d'essais consistant à manipuler les facteurs est organisée, La méthodologie du plan de surface de réponse est souvent utilisée pour mettre au point des modèles suite à la détermination de facteurs importants, ces plans peuvent être de premier degré ou de second degré.

### 3.4. Plan de criblage (plans de plackett et burman)

Les plans de criblage ont pour but de cribler un nombre conséquent de facteur afin d'en extraire le maximum d'information d'un processus, [14]. C'est une étape permettant de repérer rapidement, dans un grand nombre de facteurs, ceux qui sont effectivement influents sur un processus dans un domaine expérimental fixé [15]. Les plus connus des plans de criblage pour des facteurs à 2 niveaux sont les matrices d'Hadamard ou de Plackett et Burman

- *Définition de plans de plecket et Burman*

Les plans Plackett et Burman ou matrices d'Hadamard attribuent deux niveaux à chaque facteur et supposent que toutes les interactions entre facteurs sont négligeables devant les effets principaux. Ces plans sont une fraction d'un plan factoriel complet qui permet d'estimer un modèle de premier ordre pour des facteurs quantitatifs ou qualitatifs dont le nombre d'essais  $n$  n'est pas multiple de 4.

Ces plans sont limités et nécessitent généralement une seconde étude afin de lever les confusions et d'aborder les effets de second ordre.

### 3.5.Plans de BOX-BEHNKEN

Un plan de Box-Behnken est un type de plan de surface de réponse qui permet d'estimer un modèle du second ordre. Ces plans comptent toujours 3 niveaux (haut (+1), bas (-1) et au centre (0) par facteur. Ce dernier possède la propriété de séquentialité par apport au facteur. Il permet une estimation efficace des coefficients

# **PARTIE PRATIQUE**

## PARTIE PRATIQUE

La partie pratique de ce travail a été réalisée au laboratoire de contrôle qualité de l'entreprise pharmaceutique ALDAPH - NOVO NORDISK Algérie sise au niveau de la zone industrielle Oued Aissi - Tizi-Ouzou.

L'objectif principal était d'appliquer une nouvelle approche QbD en vue de contrôler les variations majeures de la réponse de profil d'impureté et d'intégrer la qualité d'un produit fini Novoformine dès le début de sa conception et de l'améliorer avec un minimum de nombres de tests par chromatographie liquide à haute performance HPLC en se basant sur les plans d'expériences.

L'expérimentation de notre étude s'est déroulée en deux étapes, la première consiste à **identifier les facteurs** les plus influents sur les réponses mesurées (surfaces des pics chromatographiques) à l'aide des plans de Plackett-Burman – model de premier degré. La seconde partie consiste à utiliser les plans de 2eme degrés « BOX-BEHNKEN » qui permettent d'**expliquer les réponses mesurées**.

### 1. Matériel et méthodes

#### 1.2. Matériel

##### 1.2.1. Matières premières et réactifs

Etant donné que notre travail s'effectue sur les comprimés de Metformine, nous listons dans le tableau III suivant les composants de ce produit et les réactifs utilisés dans notre étude.

**Tableau III : Composants et réactifs d'un comprimé Metformine HCl**

PA	Excipients	Les impuretés	Réactifs
Chlorhydrate de metformine	Paraffine et Opadry.	Dicyandiamid (DCD)	Phosphate d'ammonium (NH <sub>4</sub> H <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> ) Acide phosphorique (H <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> ) Eau (H <sub>2</sub> O)

## PARTIE PRATIQUE

### 1.2.2. Equipements

**Tableau IV : Equipement du laboratoire de contrôle qualité de novo Nordisk alpha utilisé dans notre étude**

Equipements		Utilisation	Référence
<b>HPLC</b>	Colonne	C25 (cationique) Nucleosil 10 SA	WATERS
	Pompe	LC20AT	
	Injecteur	SIL 20A	
	Détecteur	Spectrophotomètre Waters 2487	
	Logiciel d'exploitation	Empower2 Software	
<b>Balance analytique</b>		Pesée des échantillons et du STD du PA et des impuretés	Excellence Plus XP 205 DR/M.
<b>Balance micro-analytique</b>			
<b>Bain à ultrason</b>		Agitation et solubilisation des solutions	Ficher Bioblock
<b>Etuve</b>		Séchage et stérilisation de verreries	UNB200 Mettler
<b>Agitateur magnétique</b>		Chauffage et agitation de la phase mobile	LabTech (Multi- Position)
<b>pH-mètre</b>		Ajustements des PH de la phase mobile	Mettler Toledo

### 1.2.3. Verreries et autre

**Tableau V : Verreries et autres matériels utilisé**

Verrerie	Autres
<ul style="list-style-type: none"> <li>• Fioles jaugées (100ml)</li> <li>• Bécher (200ml)</li> <li>• Sabot</li> <li>• Vial</li> <li>• Pipette (2ml, 5ml)</li> <li>• Micropipette ajusté (500µL)</li> <li>• Flacons (1L ,2L)</li> <li>• Erlenmeyer (2L ,5L)</li> <li>• Epruvettes (2L)</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Filtres seringue 0,45 µm</li> <li>• Pro pipette</li> <li>• Compte goutte</li> <li>• Seringue</li> <li>• Embouts</li> <li>• Gants</li> <li>• Lunette</li> <li>• Carreau sel</li> <li>• Spatule</li> <li>• Barreau magnétique</li> <li>• Bouchon</li> <li>• Papier film</li> </ul>

### 1.1. Méthodes : Plans d'expérience

Les plans d'expériences sont issus des méthodes mathématiques et statistiques appliquées à l'expérimentation, le principe consiste à faire varier simultanément les niveaux d'un ou plusieurs facteurs à chaque essai, et de déterminer le nombre d'expériences à réaliser en utilisant un nombre de facteurs définit. [15]

La génération de la matrice d'expériences ainsi que l'analyse statistique des résultats ont été effectués grâce au logiciel JMP Trial 14.

### 1.1.1. Première étape : Plan de Plackett-Burman

Le plan de Plackett-Burman est un plan factoriel fractionnaire, de 1<sup>er</sup> degré, à deux niveaux haut (+1) ou bas (-1), dans ce plan tout type d'interactions sont négligeables ou supposée négligeables. Son intérêt est de déterminer l'effet de chaque facteur sur les réponses [16]. Cela permet de minimiser le nombre de facteurs qui pourraient influencer l'expérience et de construire un autre plan de 2<sup>ème</sup> degrés.

#### 1.1.1.1. Description de l'étude

HPLC est la technique la plus employée dans les laboratoires de contrôle qualité des médicaments. Elle permet l'identification et le dosage des composés chimiques dans un mélange. Sa grande précision permet la recherche de traces.

[17]

Notre travail consiste à suivre les variations du profil d'impureté d'un produit fini (Novoformine HCl) avec l'analyse HPLC en utilisant la matrice d'Hadamard de 12 lignes (12 essais), et l'impureté étudiée est la Dicyandiamid (DCD).

#### 1.1.1.2. Choix des facteurs

Il y a cinq facteurs externes que nous voulons étudier leur influence sur le produit fini Novoformine HCl et déduire quel est le facteur le plus influent sur la variation des réponses fournies par l'appareil HPLC.

**Facteur 1 :** Température de la colonne, cette température dans les conditions normales est de 30°C, on le fait varier de ( $\pm 10\%$ ), la température est un facteur capable d'influencer la viscosité de la phase mobile d'une part et aussi les constantes thermodynamiques contrôlant la solubilité des molécules dans la phase mobile modifiant ainsi la force ionique.

**Facteur 2 :** Le Débit dans les conditions normales est égale à 1mL/min, ( $\pm 10\%$ ), ce paramètre est capable d'influencer plusieurs phénomènes modifiant la réponse dont les plus importants sont le nombre de plateau théorique et la sensibilité de la détection.

**Facteur 3 :** pH du tampon (phase mobile), on change la valeur de pH qui était 3 de  $\pm 10\%$  mais on reste toujours dans un pH acide plus et moins acide que 3.

**Facteur 4 :** Quantité du sel ( $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$ ) dans le tampon, ce facteur influence la force ionique de la phase mobile.

## PARTIE PRATIQUE

**Facteur 5** : Gamme de concentration de PA (Metformine HCl) c'est la quantité de PA dans un comprimé de Novoformine, les variations admises sont  $\pm 10\%$  de la valeur cible, (dans la matrice il est considéré comme un facteur catégoriel). Ça a permis de vérifier la capacité de détection de l'appareil avec la variation de ce facteur.

### 1.1.1.3. Domaine d'étude

Le tableau suivant regroupe les valeurs codées de niveau bas (-1) et de niveau haut (+1) des facteurs retenus et leurs valeurs cibles.

**Tableau VI** : Les valeurs codées des cinq facteurs

Signes	Facteurs	Niveau bas (-1)	Niveau haut (+1)	Conditions normales
X1	Température	25°C	35°C	30°C
X2	Débit	0.8 ml/min	1.2 ml/min	1ml/min
X3	pH	2.5	3.5	3
X4	Quantité de sel	15g	19g	17g
X5	Gamme de concentration	Elevé	Bas	500mg

### 1.1.1.4. Choix de la réponse

Plusieurs réponses ont été calculées par le programme Empower 2 software qui est associé à l'appareil HPLC et parmi ces réponses deux sont choisies, à savoir ;

- 1- Recouvrement de Metformine HCl
- 2- Recouvrement de la DCD

### 1.1.1.5. Construction du plan avec le logiciel

**Tableau VII** : Matrice d'Hadamard du plan d'expérience exploité par le logiciel JMP trial

Nombre d'essai	Configuration	Température	Débit	pH	Quantité de sel	Niveau de concentration
E1	----+-	25	0,8	2,5	19	Elevé
E2	--+---	25	0,8	3,5	15	Elevé
E3	---++	25	0,8	3,5	15	Bas
E4	-+---+	25	1,2	2,5	15	Bas
E5	-+-++	25	1,2	2,5	19	Bas
E6	-++++	25	1,2	3,5	19	Elevé
E7	+----+	35	0,8	2,5	15	Bas
E8	+---+-	35	0,8	2,5	19	Elevé
E9	+--+++	35	0,8	3,5	19	Bas
E10	++----	35	1,2	2,5	15	Elevé
E11	+++---	35	1,2	3,5	15	Elevé
E12	+++++	35	1,2	3,5	19	Bas
E13	0000-	30	1	3	17	Elevé

### 1.1.1.6. Mode opératoire

#### A. Préparation de Tampon à déférente pH

- Peser 34g de  $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$  dans un bécher de 200 ml, ajouter de l'eau purifiée, puis placer un barreau magnétique et le mettre sous agitation magnétique sans chauffage jusqu'à la dissolution complète.  
Mélanger la solution préparée précédemment dans une fiole de 2 litres et compléter avec l'eau purifiée, ajuster le pH de la solution préparée à une valeur de pH 3.00 à l'aide d'une solution d'acide phosphorique de 0.1N.
- Peser deux quantités de  $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$  correspondant chacune à 30 g dans deux béchers de 200 ml ajouter de l'eau purifiée, puis placer un barreau magnétique et le mettre sous agitation magnétique sans chauffage jusqu'à la dissolution complète.  
Diluer chaque solution dans une fiole de 2 litres et compléter avec l'eau, ajuster la première à pH= 2.50 et la seconde à un pH = 3.50 avec de l'acide phosphorique de 0.1 N sous agitation.
- Peser deux quantité de  $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$  correspondant chacune à 38 g dans deux bécher de 200 ml ajouter de l'eau purifiée, puis placer un barreau magnétique et le mettre sous agitation magnétique sans chauffage jusqu'à la dissolution complète.  
Diluer chaque solution dans une fiole de 2 litres et compléter avec l'eau, ajuster la première à pH= 2.50 et la seconde à un pH = 3.50 avec de l'acide phosphorique de 0.1N sous agitation.

#### B. Préparation des solutions STD Metformine HCl

Peser trois quantités du STD Metformine HCl correspondant à 450 mg, 500 mg, 550 mg, chacune dans une fiole jaugée de 100 mL, ajouter à chaque fiole environs 70 mL d'eau purifiée puis les mettre dans un ultrason pendant 20 min, après agitation compléter au volume avec l'eau purifié.

#### C. Préparation du Placebo

C'est un mélange de deux excipients la paraffine et l'opadry à des proportions égales à celles du produit fini. La préparation est faite suivant les mêmes étapes que la solution standard de metformine.

#### D. Préparation de STD Dicyandiamid

Peser trois quantités de la DCD correspondant à 18 mg, 20 mg et 22 mg, chacune dans une fiole jaugée de 100mL , ajouter à chaque fiole environs 70 ml de l'eau purifiée puis les mettre dans un ultrason pendant 20 min. Après agitation compléter au volume avec l'eau purifiée.

### E. Préparation de solution 1

Introduire 5 mL de STD (Metformine HCl) et 5 mL de placebo dans cinq fioles de 100 mL. Ensuite ajouter aux différentes fioles un volume de 70 mL des solutions tampons à différents pH. Et compléter l'ensemble des fioles jusqu'au trait de jauge après les avoir agitées dans un bain ultrason.

### F. Préparation des solutions finales

Mettre 2 mL de la solution (1) et 0.5 mL du STD(DCD) dans différentes fioles de 100 mL, rajouter un volume suffisant du tampon puis les agiter aux ultrasons durant 5 min, compléter au trait de jauge avec le même tampon.

Nous obtiendrons **13 solutions finales** selon la matrice dans différentes conditions.

Une fois que toutes les solutions sont préparées, elles sont dégazées à l'ultrason puis on remplit les viales pour analyse par HPLC.

#### 1.1.2. Seconde étape : Plan de BOX-BEHNKEN

##### 1.1.2.1. Principe

Parmi les plans factoriels complets on trouve le plan de BOX-BEHNKEN qui permet d'estimer un modèle du second degré.

##### 1.1.2.2. Description d'étude :

La deuxième partie est basée sur l'utilisation d'un autre plan de deuxième degré BOX-BEHNKEN qui consiste à valider le 1<sup>er</sup> plan et connaître la surface des réponses des facteurs influent.

##### 1.1.2.3. Choix du facteur

D'après les résultats précédents nous constatons qu'il existe quatre facteurs qui influencent la réponse de l'analyse par HPLC.

**Remarque :** par la suite on va parler juste sur deux facteurs qui influence les réponses que on a étudié, on a gardé les quatre facteurs car ils sont lié à d' autres réponses qui ont été étudié tel que : **Temps de rétention de metformine, Temps de rétention de la DCD et la Résolution de la metformine.**

**Facteur 1 :** Température de la colonne, cette température dans les conditions normales est de 30°C, on la fait varier de ( $\pm 10\%$ ), la température est un facteur capable d'influencer sur la viscosité de la phase mobile d'une part et aussi les constantes thermodynamiques contrôlant la solubilité des molécules dans la phase mobile modifiant ainsi la force ionique.

## PARTIE PRATIQUE

**Facteur 2 :** Débit de la phase mobile, dans les conditions normales est égale à 1mL/mn, ( $\pm 10\%$ ). Ce paramètre est capable d'influencer plusieurs phénomènes modifiant la réponse dont les plus importants sont le nombre de plateau théorique et l'efficacité de la détection.

**Facteur 3 :** pH du tampon (phase mobile), on change la valeur de pH qui étaient 3 de  $\pm 10\%$  mais on reste toujours dans un pH acide plus et moins acide que 3.

**Facteur 4 :** Quantité de sel ( $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$ ) dans le tampon, ce facteur influence la force ionique de la phase mobile.

### 1.1.2.4. Domaines d'études

Le tableau suivant définit les différents niveaux haut (+1), bas (-1) et le point au centre (0) de chaque facteur ;

**Tableau XIII :** Les niveaux des quatre facteurs

Signe	Facteur	Niveau bas (-1)	Niveau haut (+1)	Niveau (0)
<b>X1</b>	Température	25°C	35°C	30°C
<b>X2</b>	Débit	0.8 ml/min	1.2 ml/min	1ml/min
<b>X3</b>	pH	2.5	3.5	3
<b>X4</b>	Quantité de sel	15 g	19 g	17 g

### 1.1.2.5. Choix des réponses

Les réponses choisies durant notre expérimentation sont :

- Le recouvrement Metformine
- Le recouvrement de la DCD

### 1.1.2.6. Construction des plans

Le tableau ci-dessous représente la matrice d'expérience à suivre dans notre étude.

**Tableau XIV :** Matrice du plan d'expérience du second degré

Essai	Configuration	Bloc	Température	Débit	pH	Quantité de sel
<b>E1</b>	++00	1	35	1,2	3	17
<b>E2</b>	00-+	1	30	1	2,5	19
<b>E3</b>	+--00	1	35	0,8	3	17
<b>E4</b>	00+-	1	30	1	3,5	15
<b>E5</b>	-+00	1	25	1,2	3	17
<b>E6</b>	00++	1	30	1	3,5	19
<b>E7</b>	00--	1	30	1	2,5	15
<b>E8</b>	--00	1	25	0,8	3	17
<b>E9</b>	-00-	2	25	1	3	15
<b>E10</b>	0-0	2	30	0,8	2,5	17
<b>E11</b>	0-+0	2	30	0,8	3,5	17
<b>E12</b>	0+-0	2	30	1,2	2,5	17
<b>E13</b>	0++0	2	30	1,2	3,5	17
<b>E14</b>	+00-	2	35	1	3	15
<b>E15</b>	+00+	2	35	1	3	19
<b>E16</b>	-00+	2	25	1	3	19

## PARTIE PRATIQUE

<b>E17</b>	+0-0	3	35	1	2,5	17
<b>E18</b>	0+0+	3	30	1,2	3	19
<b>E19</b>	0-0-	3	30	0,8	3	15
<b>E20</b>	+0+0	3	35	1	3,5	17
<b>E21</b>	0+0-	3	30	1,2	3	15
<b>E22</b>	0-0+	3	30	0,8	3	19
<b>E23</b>	-0-0	3	25	1	2,5	17
<b>E24</b>	-0+0	3	25	1	3,5	17
<b>E25</b>	0	1	30	1	3	17
<b>E26</b>	0	2	30	1	3	17
<b>E27</b>	0	3	30	1	3	17

### 1.1.2.7. Mode opératoire

#### A. Préparation de Tampon à différentes valeurs de pH

- Peser trois quantités de  $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$  dont les masses sont de 34 g dans trois béchers de 200 mL, ajouter un volume suffisant d'eau purifiée et agiter jusqu'à dissolution totale.

Diluer chaque solution dans 2 litres d'eau. Ajuster respectivement le pH de ces solutions à 2,50 ; 3,00 et 3,50 avec l'acide phosphorique de 0.1N.

- Peser trois quantités de  $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$  dont les masses sont de 30 g dans trois béchers de 200 mL, ajouter un volume suffisant d'eau purifiée et agiter jusqu'à dissolution totale.

Diluer chaque solution dans 2 litres d'eau purifiée. Ajuster respectivement le pH de ces solutions à 2,50 ; 3,00 et 3,50 avec l'acide phosphorique de 0.1N.

- Peser trois quantités de  $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$  dont les masses sont de 38 g dans trois béchers de 200 mL, ajouter un volume suffisant d'eau purifiée et agiter jusqu'à dissolution totale.

Diluer chaque solution dans 2 litres d'eau purifiée. Ajuster respectivement le pH de ces solutions à 2,50 ; 3,00 et 3,50 avec l'acide phosphorique de 0.1N.

#### B. Préparation des solutions STD Metformine HCl

Peser une quantité du STD Metformine HCl, dont la masse est de 500 mg dans une fiole jaugée de 100 mL, rajouté environs 70 mL de l'eau purifiée puis agiter aux ultrasons pendant 20 min, on complète jusqu'au trait de jauge avec le même diluant.

#### C. Préparation du Placebo

Peser une quantité du placebo dont la masse est de 45 mg dans une fiole jaugée de 100 mL, Ajouter environs 70 mL de l'eau purifiée et mettre aux ultrasons pendant 20min, compléter au trait de jauge avec le même diluant.

#### D. Préparation de STD Dicyandiamid

Peser une quantité de la DCD dont la masse est de 20 mg dans une fiole jaugée de 100 mL, ajouter environ 70 mL d'eau purifiée puis la mettre aux ultrasons pendant 20 min, puis compléter au trait de jauge avec le même diluant.

#### E. Préparation de solution 1

## PARTIE PRATIQUE

Introduire 5 mL de STD (Metformine HCl) et 5 mL de placebo dans neuf fioles de 100 mL. Ensuite ajouter aux différentes fioles un volume de 70 mL des solutions tampons à différents pH. Et compléter l'ensemble des fioles jusqu'au trait de jauge après les avoir agitées dans un bain ultrason.

### F. Préparation de solution finale

Introduire 2 mL de la solution (1) et 0.5 mL de la solution STD (DCD) dans des fioles de 100 mL, on rajoute le tampon puis on les met aux ultrasons pendant 5 min, on continue jusqu'au trait de jauge avec le même tampon. Le nombre de solutions est de 27.

Une fois que toutes les solutions sont préparées, elles sont dégazées aux ultrasons puis on remplit les vials pour analyse par HPLC.

### 2. Résultats et discussions

#### 2.1. Résultats de la première étape : Plan de Plackett-Burman

Le tableau VIII ci-après résume les résultats de recouvrements obtenus par le calcul et le logiciel associé à l'appareil HPLC en suivant les conditions données par la matrice d'Hadamard décrite dans le tableau VII

Les résultats obtenus par le logiciel **JMP trial** seront discutés en se référant aux travaux de Jacques Goupy. Publiés dans leur ouvrage [15]

**Tableau VIII** : Les recouvrements obtenus par l'analyse HPLC

Nombre d'essai	Recouvrement metformine	Recouvrement DCD
E1	140,6294224	107,994209
E2	101,6106591	131,993301
E3	104,6376218	126,49666
E4	89,00983816	82,3617915
E5	100,1061508	82,6672075
E6	74,50677728	85,3904517
E7	135,9421379	130,008771
E8	120,822026	128,423715
E9	107,0708364	125,434117
E10	91,21724632	86,7773987
E11	74,7959919	84,1389681
E12	68,20457217	80,2363594
E13	100	101,624178

**2.1.1. Résultats de recouvrement de Metformine HCl :**

**2.1.1.1. Résultats du criblage**

**A. Contraste**

**Tableau IX : Histogramme des facteurs influents sur le recouvrement et leur constante.**

Terme	Contraste		Rapport t de Lenth	P-value des observations	P-value simultanée
Débit	-17,7393		-11,40	0,0002*	0,0023*
pH	-12,2417		-7,87	0,0016*	0,0076*
Quantité de sel	1,1772		0,76	0,4201	0,9999
Température	-1,0373		-0,67	0,5315	1,0000
Gamme de concentration	0,1158		0,07	0,9472	1,0000
Débit*PH	2,1588 *		1,39	0,1627	0,7881
Débit*Quantité de sel	-0,1335 *		-0,09	0,9392	1,0000
PH*Quantité de sel	-0,2048 *		-0,13	0,9056	1,0000
Débit*Température	0,7694 *		0,49	0,6641	1,0000
PH*Température	2,3856 *		1,53	0,1314	0,6854
Quantité de sel*Température	-4,1019 *		-2,64	0,0314*	0,2108

**Discussions des résultats**

Le tableau précédant s'agit d'un histogramme qui donne un aperçu visuel de l'importance de chaque contraste (ou facteur), ici nous remarquons que trois contrastes sont nettement plus grands que les autres et qui dépassent le trait bleu (limites de perturbation aléatoire), cela signifie qu'il y a trois facteurs qui influence notre réponse.

L'examen de ces résultats montre qu'il y a deux facteurs (le débit et le pH) et une interaction entre la quantité de sel et la température) qui influent sur la réponse.

**B. Graphique de demi normal du recouvrement de metformine HCl**

Le graphe de demi-normal est une présentation particulière du diagramme de Daniel, il indique les facteurs significatifs en utilisant les valeurs absolues des contrastes.

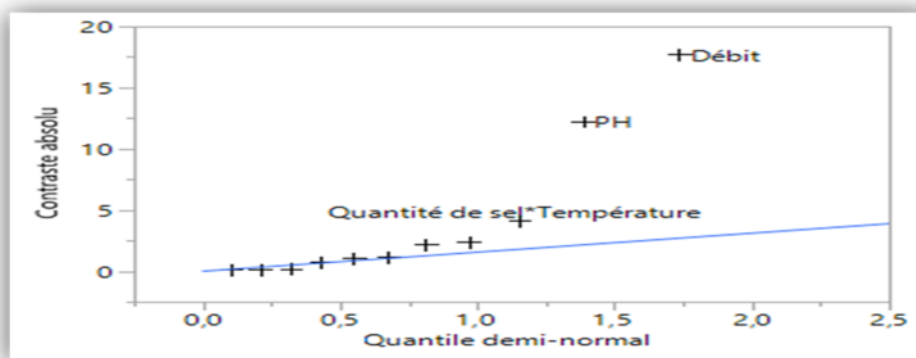


Figure 08 : Le diagramme de Daniel pour le  $R_{\text{metformine HCl}}$ .

### Discussion des résultats

Le diagramme de Daniel est une droite qui passe sur le maximum des points qui sont alignés, les points sur lesquels la droite passe et ceux qui sont plus proches d'elle ne sont pas influents sur la réponse, par contre les points qui s'éloignent de cette droite sont influents, alors on dit que ces facteurs ont un effet sur le recouvrement et le point le plus éloigné qui est le facteur le plus influent, dans notre étude, ce facteur correspond au débit  $l$  de la phase mobile.

### C. Equation mathématique du modèle de 1<sup>er</sup> degré de $R_{\text{metformine HCl}}$

D'après le tableau des contrastes et le diagramme de Daniel on peut représenter la fonction qui lie la réponse aux facteurs par une expression générale de forme :

$$y_1 = a_0 + a_1x_2 + a_2x_3 + a_{14}x_1x_4$$

Avec :

$y_1$  : Est la réponse du modèle de 1<sup>er</sup> degré pour le recouvrement de metformine HCl.

$x_2$  : Est le niveau attribué au facteur « Débit ».

$x_3$  : Est le niveau attribué au facteur « pH ».

$x_1$  : Est le niveau attribué au facteur « température »

$x_4$  : Est le niveau attribué au facteur « Quantité de sel ».

$a_0$  : Est le coefficient constant du modèle.

$a_1$  : Est le coefficient de  $x_2$ .

$a_2$  : Est le coefficient de  $x_3$ .

$a_{12}$  : Est le coefficient du produit des niveaux de deux facteurs (1.2)

Nous avons remplacé les valeurs des contrastes (les coefficients) dans l'équation précédente et on a obtenu l'équation suivante :

Equation du modèle :  $y_1 = 100,71 - 17,73x_2 - 12,24x_3 - 4,1x_1x_4$

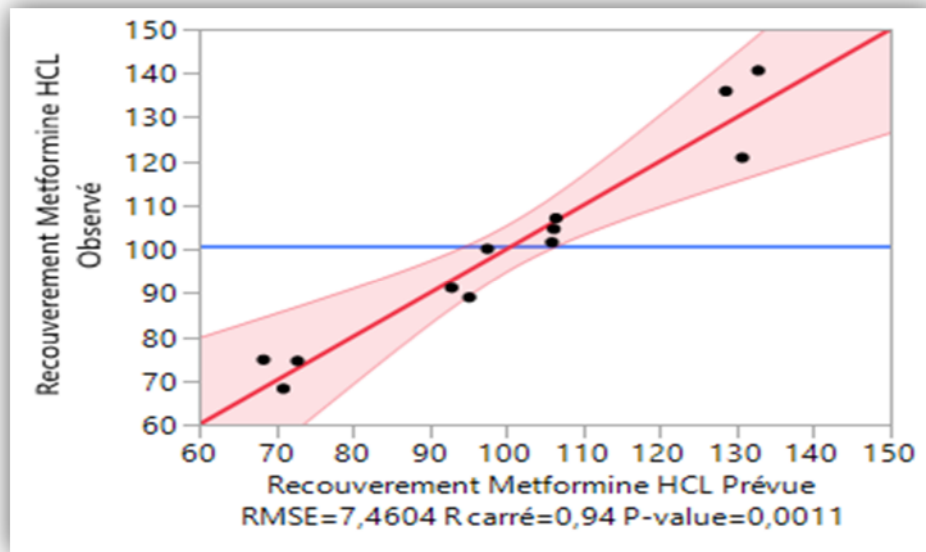
Ce modèle est celui que le logiciel utilise pour établir les résultats des réponses obtenues pour le recouvrement de metformine HCl.

#### 2.1.1.2. Exécution du modèle

##### A. Graphe des valeurs observées en fonction des valeurs prévues pour $R_{\text{metformine HCl}}$

## PARTIE PRATIQUE

C'est le graphe dans lequel sont comparées les réponses des recouvrements mesurées (prévues) et les réponses des recouvrements calculées (observées)

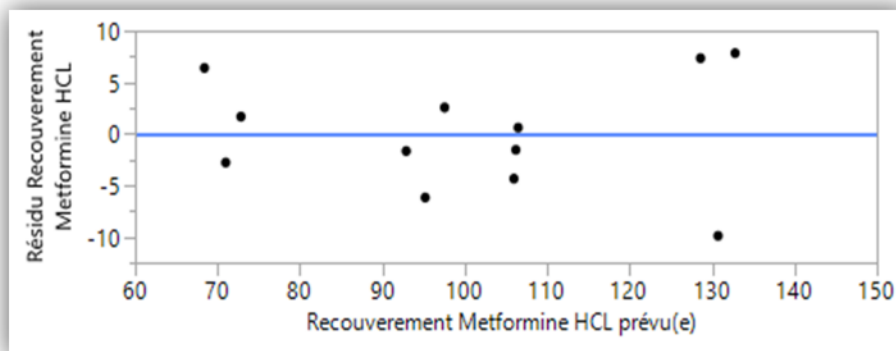


**Figure 09** : Graphe des valeurs observées en fonction des valeurs prévues pour le  $R_{\text{metformine}}$

### Discussions du résultat

Ce modèle est jugé acceptable vu que le coefficient de détermination ou ( $R^2$ ) est de 0,94, il est proche de 1 et les points s'alignent bien autour de la droite de régression et qu'il y aucun point qui sort de l'intervalle de confiance qui est indiqué par les deux courbes en rouge, ceci veut dire que les valeurs prévues par le logiciel JMP et les valeurs observées (introduites) sont proches entre elles

### B. Graphe des résidus pour le recouvrement metformine HCl



**Figure 10** : Graphique des résidus en fonction des valeurs prévus pour  $R_{\text{metformine}}$ .

### Discussions des résultats

## PARTIE PRATIQUE

D'après le graphe précédent nous avons déduit que le modèle est acceptable, ce graphe montre la distribution aléatoire des résidus et qu'ils ne prennent aucune forme d'une fonction mathématique, de ce fait il ne reste plus rien à extraire du modèle.

**Remarque :** nous avons tracé un tableau dans lequel on compare la valeur expérimentale et la valeur prévue par le logiciel pour recouvrement **metformine HCl** dans les conditions normales de Metformine (voir la figure 14 ), le pourcentage de déviation est donné par la relation suivante :

$$\text{Pourcentage de déviation} = ((\text{valeur prévue} / \text{valeur expérimentale}) - 1) * 100$$

**Tableau X :** Calcul de pourcentage de déviation pour  $R_{\text{metformine}}$ .

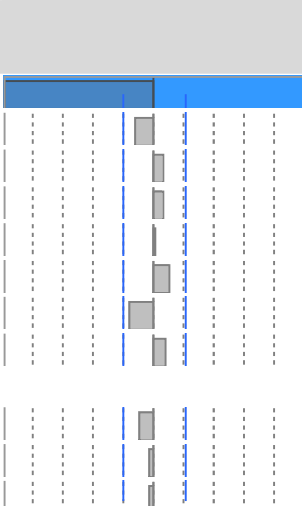
Valeur expérimentale	Valeur calculée par le logiciel	Pourcentage de déviation
100	100.597	0.597

### 2.1.1. Résultats de recouvrement de la DCD

#### 2.1.1.1. Résultats du criblage

##### A. Contrastes

**Tableau XI :** Histogramme des facteurs influents sur le recouvrement de la DCD

Terme	Contraste		Rapport t de Lenth	P-value des observations	P-value simultanée
Débit	-20,7315		-8,44	0,0006*	0,0059*
Quantité de sel	-2,6359		-1,07	0,2572	0,9542
Température	1,5096		0,61	0,5845	1,0000
PH	1,2881		0,52	0,6418	1,0000
Gamme de concentration	0,2072		0,08	0,9426	1,0000
Débit*Quantité de sel	2,2168 *		0,90	0,3297	0,9929
Débit*Température	-3,2166 *		-1,31	0,1816	0,8355
Quantité de sel*Température	1,7647 *		0,72	0,4358	1,0000
Débit*PH	-1,9419 *		-0,79	0,3930	0,9995
Quantité de sel*PH	-0,6443 *		-0,26	0,8211	1,0000
Température*PH	-0,4790 *		-0,20	0,8646	1,0000

#### Discussions des résultats

Le tableau 2 s'agit d'un histogramme qui donne une impression visuelle de l'importance et l'influence de chaque contraste (ou facteur), ici nous remarquons qu'un seul facteur qui sort de l'intervalle de confiance et qui se dirige vers la gauche c.-à-d. qu'il a un effet négatif sur la réponse.

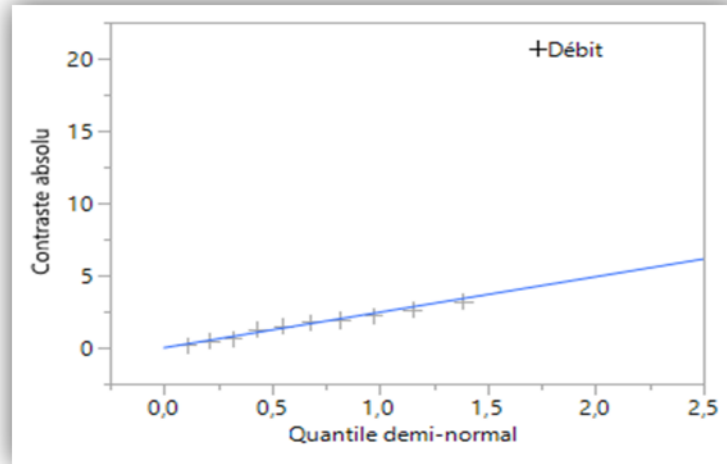
Donc le facteur qui influence le recouvrement de DCD est le débit

#### B. Graphe demi-normal pour le recouvrement de la DCD

Le graphe de demi-normal est une présentation particulière du diagramme de Daniel, il indique les facteurs significatifs en utilisant les valeurs absolues des contrastes.

Les résultats suivants ont été accompagnés avec le graphe de demi normal donné

Erreur pseudo-standard de Lenth = 2.45575. Les termes avec astérisque ont été forcés à devenir orthogonaux. L'analyse est dépendante de l'ordre. P-value dérivée d'une simulation de 10000 t ratio de Lenth.



**Figure 11** : Le diagramme de Daniel pour le recouvrement de la DCD

**Discussions des résultats**

Nous observons que la droite s'aligne sur tous les points à l'exception d'un seul point qui est très éloigné d'elle, en outre, le débit est le paramètre le plus influent sur les recouvrements de la DCD.

**C. Equation mathématique du modèle de 1<sup>er</sup> degré pour R<sub>DCD</sub>**

D'après le tableau des contrastes et le diagramme de Daniel on peut représenter la fonction qui lie la réponse au facteur par une expression générale de forme :

$$y_2 = a_0 + a_1x_2$$

Avec ;

$y_2$  Est la réponse du modèle de 1<sup>er</sup> degré pour temps de recouvrement DCD

$x_2$  Est le niveau attribué au facteur « Débit »

$a_0$  Est le coefficient constant du modèle

$a_1$  Est le coefficient de  $x_2$

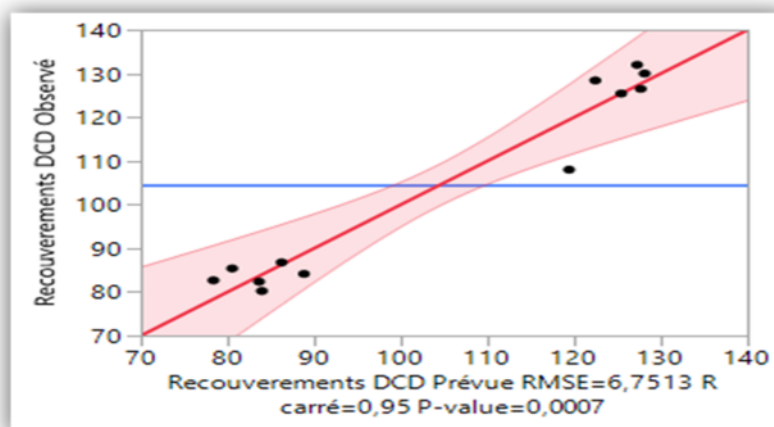
Nous avons remplacé les valeurs des contrastes (les coefficients) dans l'équation précédente et on a obtenu l'équation suivante :

Equation du modèle :  $y_2 = 104.32 - 20.73x_2$

**2.1.1.2. Exécution du modèle**

**A ; Graphique des valeurs observées en fonction des valeurs prévues de  $t_{rDCD}$**

C'est le graphe dans lequel sont comparées les réponses de recouvrement DCD mesurées (prévues) et calculées (observées).

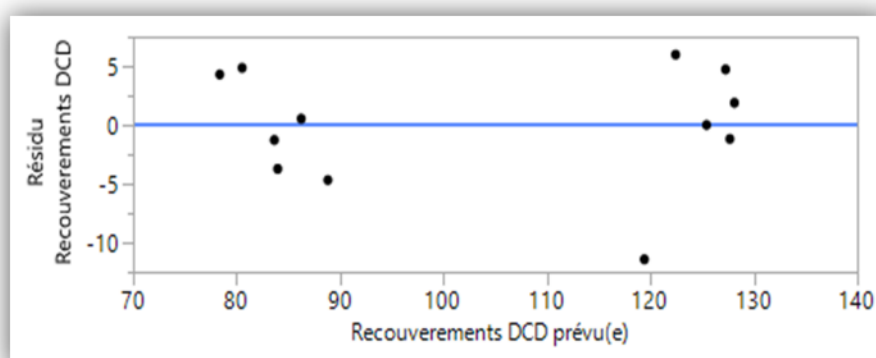


**Figure 12 :** Graphe des valeurs observées en fonction des valeurs prévues pour le recouvrement de la DCD

### Discussions des résultats

Ce modèle est jugé acceptable vu que le coefficient de détermination ou (R carré) est de 0,95, il est proche de 1 et les points s'alignent au voisinage de la droite de régression. Nous constatons que la plus part des points sont répartis d'une manière répétable et compris dans l'intervalle de confiance. Donc les valeurs prévues et observées s'approchent entre elles.

#### 2.1.1.3. Graphique des résidus pour le recouvrement de la DCD



**Figure 13:** Graphique des résidus en fonction des valeurs prévus pour  $R_{DCD}$

### Discussions du résultat

Ce graphe montre que la distribution des résidus est aléatoire, cela confirme que les résultats précédents sont acceptables et que le model est validé pour cette réponse

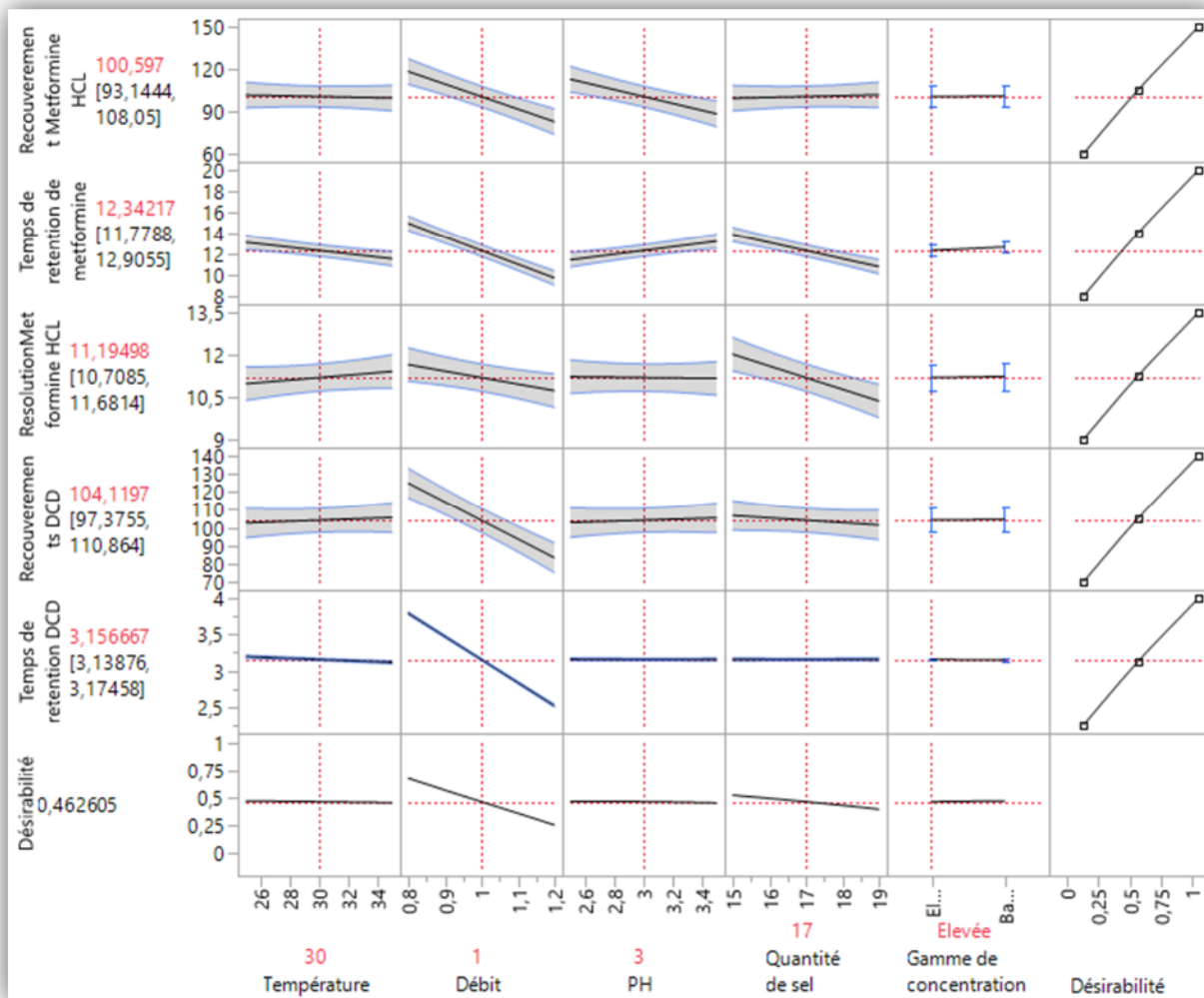
**Remarque :** le tableau XII ci-après compare la valeur expérimentale et la valeur prévue de recouvrement de DCD calculée par le logiciel GMP.

**Tableau XII :** Calcul de pourcentage de déviation de la DCD (modèle 1<sup>er</sup> degré)

Valeur expérimentale	Valeur calculée par le logiciel	Pourcentage de déviation
104.1197	100	4.1197

## PARTIE PRATIQUE

**2.2. Profil des prévisions :** La figure 12 ci-dessous résume les profils des prévisions des cinq réponses étudiées.



**Figure 14 : Profils de prévisions des réponses des facteurs.**

### 2.2. Résultats de la seconde étape : Plan de BOX BEHENKER

Le tableau XV ci-dessous représente la série des résultats calculés par le logiciel associé à l'appareille HPLC qui était introduit dans le logiciel JMP afin d'obtenir les résultats recherchés. Les résultats obtenus par le logiciel **JMP trial** seront discutés en se référant au livre de Jacques Goupy.

**Tableau XV:** Les résultats des recouvrements obtenus après une série d'expérience

Nom d'essai	Recouvrement Metformine HCl	Recouvrement DCD
<b>E1</b>	79,97233357	81,79359501
<b>E2</b>	108,6603847	100,3218695
<b>E3</b>	121,1335798	125,4442433
<b>E4</b>	88,62528106	103,3070861
<b>E5</b>	85,56338115	83,55648211
<b>E6</b>	89,14266307	98,80760373
<b>E7</b>	96,34684179	98,16104745
<b>E8</b>	127,6369253	126,2742723
<b>E9</b>	97,05678287	100,2698179
<b>E10</b>	134,041569	127,2681022
<b>E11</b>	108,0297439	121,8492879
<b>E12</b>	88,55443494	83,00147014
<b>E13</b>	74,39541876	79,72646286
<b>E14</b>	97,81646874	97,610585
<b>E15</b>	102,863528	99,74351507
<b>E16</b>	103,7702742	99,52001179
<b>E17</b>	104,2873846	97,35458389
<b>E18</b>	88,57203274	90,26255807
<b>E19</b>	118,9835062	124,4062429
<b>E20</b>	89,54523969	97,29159779
<b>E21</b>	79,45120283	80,97228264
<b>E22</b>	125,9469612	122,3203939
<b>E23</b>	105,5708137	98,74132201
<b>E24</b>	89,90745578	102,8364623
<b>E25</b>	100	100
<b>E26</b>	100	100
<b>E27</b>	100	100

**2.2.1. Résultats de recouvrement de Metformine HCl pour le plans de 2<sup>ème</sup> degré**

**2.2.1.1. Exécution du model**

**A. Estimation des coefficients codés pour le  $R_{\text{metformine}}$**

Le tableau XVI ci-après donne les valeurs des coefficients du modèle du second degré, ces dernières permettant d'établir une équation mathématique du second degré

## PARTIE PRATIQUE

**Tableau XVI : Valeurs des coefficients du modèle du second degré (recouvrement Metformine HCl)**

Terme	Estimation des coefficients codés	Erreur standard	t ratio	Prob. >  t
Constante	11,409333	0,044026	259,15	<,0001*
Température(25,35)	-0,864083	0,022013	-39,25	<,0001*
Débit (0, 8, 1,2)	-2,42375	0,022013	-110,11	<,0001*
pH (2,5,3,5)	0,28275	0,022013	12,84	<,0001*
Quantité de sel(15,19)	-1,28025	0,022013	-58,16	<,0001*
Température*Débit	0,2195	0,038128	5,76	0,0002*
Température*pH	-0,19075	0,038128	-5,00	0,0005*
Débit*pH	-0,0625	0,038128	-1,64	0,1322
Température*Quantité de sel	0,1805	0,038128	4,73	0,0008*
Débit*Quantité de sel	0,25125	0,038128	6,59	<,0001*
Ph*Quantité de sel	0,2065	0,038128	5,42	0,0003*
Température*Température	0,049125	0,033019	1,49	0,1677
Débit*Débit	0,452125	0,033019	13,69	<,0001*
pH*pH	-0,128625	0,033019	-3,90	0,0030*
Quantité de sel*Quantité de sel	0,181875	0,033019	5,51	0,0003*
Bloc[1]	0,0327778	0,020754	1,58	0,1453
Bloc[2]	-0,006333	0,020754	-0,31	0,7665
Bloc[3]	-0,026444	0,020754	-1,27	0,2314

### Discussions des résultats

Le tableau précédant s'agit d'un histogramme qui donne une appréciation visuelle de l'importance de chaque contraste (ou facteur), nous remarquons qu'il existe plusieurs facteurs influant de fait que la forme des histogrammes diffère d'un facteur à un autre,

Nous remarquons que la valeur de la probabilité des quatre facteurs (température, débit, pH et quantité de sel) est de <0,001 qui est négligeable devant la limite d'acceptation de 0.05. Nous constatons de même que la probabilité de quelques interactions de ces derniers est inférieure à 0.05, ce qui fait que ces facteurs et ces interactions sont significatifs.

**Remarque :** quand la probabilité est supérieure de 0.05 on dit que les facteurs ne sont pas significatifs

### B. Equation mathématique du modèle de second degré pour $R_{\text{metformine}}$

D'après le tableau d'estimation des coefficients, on peut représenter la fonction qui lie la réponse au facteur par une expression générale de forme :

$$y'_1 = a_0 + a_1x_1 + a_2x_2 + a_3x_3 + a_4x_4 + a_{12}x_1x_2 + a_{13}x_1x_3 + a_{14}x_1x_4 + a_{24}x_2x_4 + a_{34}x_3x_4 + a_{22}x_2^2 + a_{33}x_3^2 + a_{44}x_4^2$$

Avec :

- $y'_1$  Est la réponse du modèle de 2<sup>ème</sup> degré pour recouvrements de la metformine HCl
- $x_2$  Est le niveau attribué au facteur « Débit »

## PARTIE PRATIQUE

- $x_3$  Est le niveau attribue au facteur « pH »
- $x_1$  Est le niveau attribue au facteur « température »
- $x_4$  Est le niveau attribue au facteur « Quantité de sel »
- $a_0$  Est le coefficient constant du modèle
- $a_1$  Est le coefficient de  $x_1$
- $a_2$  Est le coefficient de  $x_2$
- $a_3$  Est le coefficient de  $x_3$
- $a_4$  Est le coefficient de  $x_4$
- $a_{12}$  Est le coefficient du produit des niveaux de deux facteurs (1 et 2)
- $a_{13}$  Est le coefficient du produit des niveaux de deux facteurs (1 et 3)
- $a_{23}$  Est le coefficient du produit des niveaux de deux facteurs (2 et 3)
- $a_{24}$  Est le coefficient du produit des niveaux de deux facteurs (2 et 4)
- $a_{34}$  Est le coefficient du produit des niveaux de deux facteurs (3 et 4)
- $a_{22}$  Est le coefficient du produit des niveaux de même facteur 2
- $a_{33}$  Est le coefficient du produit des niveaux de même facteur 3
- $a_{44}$  Est le coefficient du produit des niveaux de même facteur 4

Nous avons remplacé les valeurs des contrastes (les coefficients) dans l'équation précédente et on a obtenu l'équation suivante :

Equation du modèle

$$y = 11.40 - 0.86x_1 - 2.42x_2 + 0.28x_3 - 1.28x_4 + 0.21x_1x_2 - 0.19x_1x_3 + 0.18x_1x_4 + 0.25x_2x_4 + 0.20x_3x_4 + 0.45x_2^2 - 0.12x_3^2 + 0.18x_4^2$$

ce modèle est celui que le logiciel utilise pour établir les résultats des réponses prévues

### C. Graphe des valeurs observées en fonction des valeurs prévues pour le $R_{\text{metformine}}$ de model de 2<sup>ème</sup> degré.

C'est le graphe dans lequel sont comparées les réponses des recouvrements mesurées (prévues) et les réponses de recouvrement calculées (observées) pour le plan de second degré

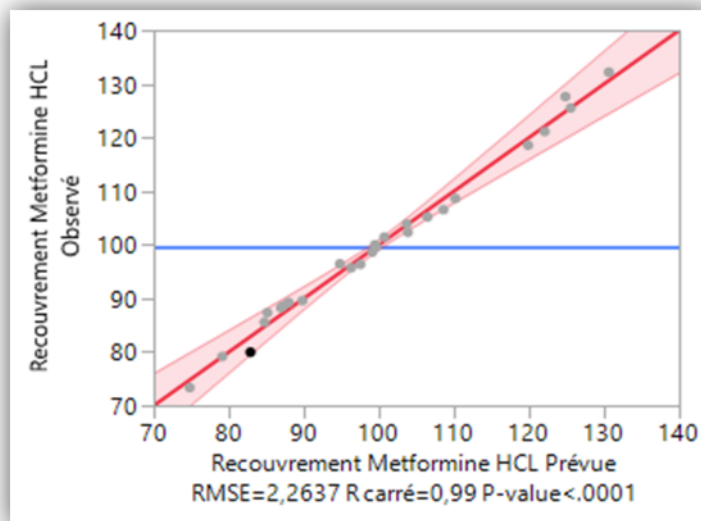
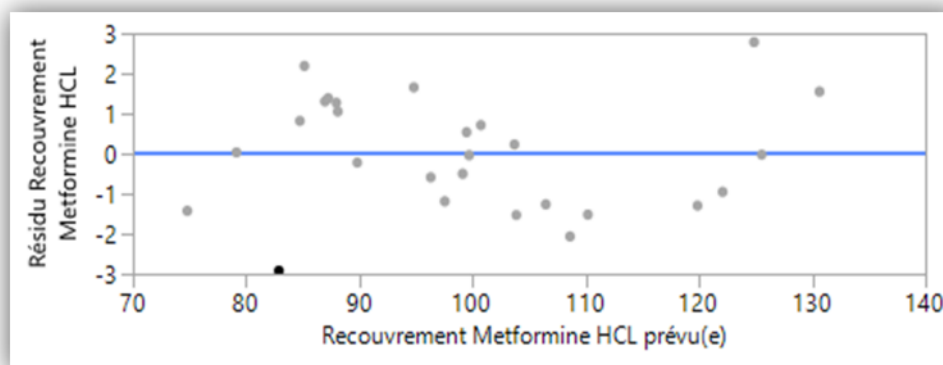


Figure 15 : Graphe des valeurs observées en fonction des valeurs prévues pour le  $R_{\text{metformineHCl}}$  pour le plan de 2<sup>ème</sup> degré.

**Discussions du résultat**

Ce modèle est jugé de bonne qualité vu que le coefficient de détermination ou (R carré) est de 0,99 il est proche de 1 et les point s'alignent bien autour de la droite de régression et qu'il n'Ya aucun point qui sort de l'intervalle de confiance (indiqué par les deux courbes en rouge) ce qui veut dire que les valeurs prévues par le logiciel JMP et les valeurs observées (introduites) sont superposables.

**D. Graphe des résidus pour le  $R_{\text{metformine}}$  de modèle de second degré**



**Figure 16 :** Graphique des résidus en fonction des valeurs prévues pour le  $R_{\text{metformine}}$  avec le modèle de second degré

**Discussions du résultat**

Nous remarquons que ;

D'après le graphique précédent, nous avons déduit que le modèle est acceptable, ce graphe montre la distribution aléatoire des résidus et qu'ils ne prennent aucune forme d'une fonction mathématique, de ce fait il ne reste plus rien à extraire du modèle.

**C. Analyse de variance**

**Tableau XVII:** Analyse des variances pour le  $R_{\text{metformien HCL}}$

Source	Degrés de liberté	Somme des carrés	Carré moyen	Rapport F
Modèle	16	5924,0796	370,255	72,2524
Erreur	10	51,2447	5,124	<b>Prob. &gt; F</b>
Total corrigé	26	5975,3243		<b>&lt;0,0001*</b>

**Discussions des résultats :**

Selon le tableau ci-dessus, l'erreur de la somme des carrées est de 51.24 qui est négligeable devant les deux sommes ce qui fait que le modèle est d'une bonne qualité.

Le rapport des carrés moyens est acceptable et que la probabilité est **< 0,0001**, on déduit que le modèle est fiable.

## PARTIE PRATIQUE

**Remarque :** Plus le rapport F est élevé, plus la probabilité est fiable.

**Remarque :** nous avons tracé un tableau dans lequel nous avons comparé la valeur expérimentale et la valeur prévue de recouvrement de metformine HCl dans les conditions normales de Metformine. Le résultat peut être calculé à l'aide du pourcentage de déviation. Pour rappel ;

$$\text{Pourcentage de déviation} = ((\text{valeur prévue} / \text{valeur expérimentale}) - 1) * 100$$

**Tableau XVIII :** Calcul du pourcentage de déviation pour le recouvrement de la Metformine HCl (modèle du 2<sup>ème</sup> degré)

Valeur expérimentale	Valeur calculée par le logiciel	Pourcentage de déviation
100	99.42	-0.58

### 2.2.2. Résultats de recouvrements de la DCD :

#### 2.2.2.1. Exécution du modèle

##### A. Estimation des coefficients codés

**Tableau XIX :** Valeurs des coefficients du modèle du second degré (recouvrement de la DCD)

Terme	Estimation des coefficients codés	Erreur standard	t ratio	Prob. >  t
Constante	100,52333	1,404742	71,56	<,0001*
Temperature(25,35)	-1,004167	0,702371	-1,43	0,1833
Débit(0,8,1,2)	-20,78833	0,702371	-29,60	<,0001*
Ph(2,5,3,5)	-0,0825	0,702371	-0,12	0,9088
Quantité de sel(15,19)	0,5266667	0,702371	0,75	0,4706
Temperature*Débit	-0,235	1,216542	-0,19	0,8507
Temperature*Ph	-1,0525	1,216542	-0,87	0,4072
Débit*Ph	0,535	1,216542	0,44	0,6695
Temperature*Quantité de sel	0,725	1,216542	0,60	0,5645
Débit*Quantité de sel	2,88	1,216542	2,37	0,0395*
Ph*Quantité de sel	-1,665	1,216542	-1,37	0,2011
Temperature*Temperature	-0,414167	1,053556	-0,39	0,7025
Débit*Débit	4,1795833	1,053556	3,97	0,0027*
Ph*Ph	-0,626667	1,053556	-0,59	0,5652
Quantité de sel*Quantité de sel	0,2770833	1,053556	0,26	0,7979
Bloc[1]	-0,079259	0,662202	-0,12	0,9071
Bloc[2]	-0,671481	0,662202	-1,01	0,3345
Bloc[3]	0,7507407	0,662202	1,13	0,2834

**Discussions des résultats :** Le tableau précédent s'agit d'un histogramme qui donne une appréciation visuelle de l'importance de chaque contraste (ou facteur), (plus la forme des histogrammes est grande plus les facteurs influent).

## PARTIE PRATIQUE

La valeur de la probabilité des quatre facteurs et de quelques interactions est inférieure à la limite d'acceptation 0.05, ce qui veut dire que ces derniers influent sur le recouvrement de la DCD.

### B. Equation mathématique du modèle de second degré pour le R<sub>DCD</sub>

D'après le tableau d'estimation des coefficients nous pouvons représenter la fonction qui lie la réponse au facteur par une expression générale de forme :

$$y'_2 = a_0 + a_1x_2 + a_{14}x_1x_4 + a_{22}x_2^2$$

Avec :

- $y'_2$  Est la réponse du modèle de second degré pour le recouvrement metformine HCl
- $x_1$  Est le niveau attribué au facteur « température »
- $x_2$  Est le niveau attribué au facteur « Débit »
- $x_4$  Est le niveau attribué au facteur « Quantité de sel »
- $a_0$  Est le coefficient constant du modèle
- $a_1$  Est le coefficient de  $x_2$
- $a_{14}$  Est le coefficient du produit des niveaux de deux facteurs
- $a_{22}$  Est le coefficient du produit des niveaux de même niveau

Nous avons remplacé les valeurs des contrastes (les coefficients) dans l'équation précédente et nous avons obtenu l'équation suivante :

Equation du modèle

$$y'_2 = 100.52 - 20.78x_2 + 2.88x_1x_4 - 4.17x_2^2$$

Ce modèle est celui fourni par le logiciel utilisé pour prédire les résultats.

### C. Graphe des valeurs observées en fonction des valeurs prévues pour le R<sub>DCD</sub> de second degré

C'est le graphe dans lequel sont comparées les réponses des recouvrements mesurées (prévues) et calculées (observées)

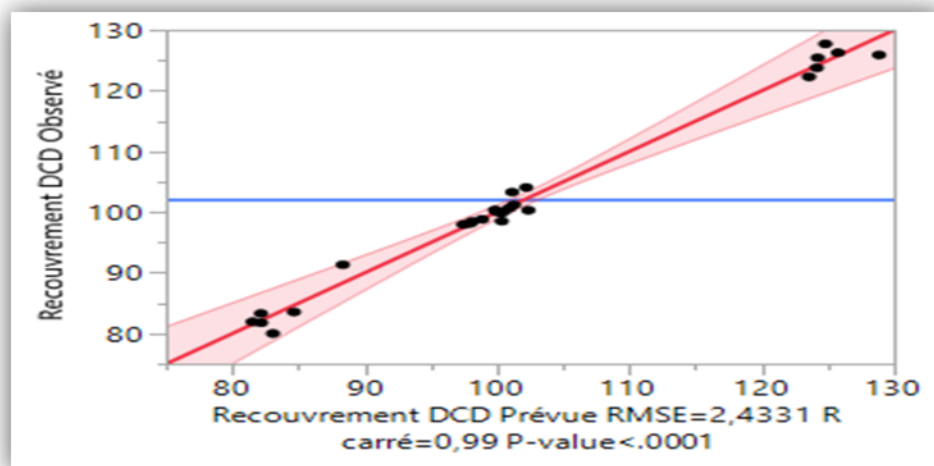


Figure 17 : Graphe des valeurs observées en fonction des valeurs prévues pour le R<sub>DCD</sub> de second degré

## PARTIE PRATIQUE

### Discussions des résultats

Ce modèle est de très bonne qualité puisque le coefficient de détermination ou (R carré) égale à 1 les points s'alignent bien sur la droite de régression et qu'il y a aucun point qui sort de l'intervalle de confiance (indiqué par les deux courbes en rouge) ce qui veut dire que les valeurs prévues par le logiciel JMP et les valeurs observées (introduites) sont superposables.

#### D. Graphique des résidus pour le R<sub>DCD</sub> de second degré

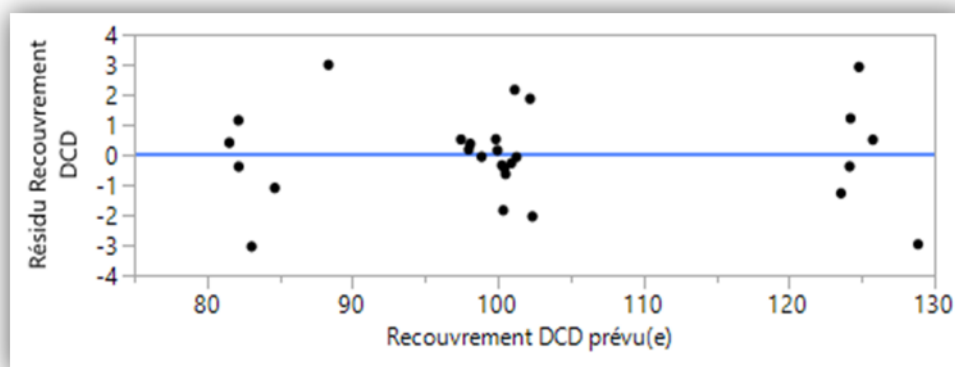


Figure 18 : Graphique des résidus en fonction des valeurs prévues pour le R<sub>DCD</sub> de second degré

### Discussions du résultat

Ce graphe montre que les points sont répartis au hasard et il n'apparaît pas de structures nettes, et cela confirme que les résultats précédents sont fiables et que le modèle est de bonne qualité.

#### D. Analyse des variances

Tableau XX : analyse des variances pour le recouvrement de la DCD

Source	Degrés de liberté	Somme des carrés	Carré moyen	Rapport F
Modèle	16	5392,0432	337,003	56,9271
Erreur	10	59,1990	5,920	<b>Prob. &gt; F</b>
Total corrigé	26	5451,2421		<b>&lt;,0001*</b>

### Discussions des résultats :

Selon le tableau ci-dessus, on remarque que l'erreur de la somme des carrés est de 59.19 qui est totalement négligeable devant les deux sommes des carrés ce qui fait que le modèle est de très bonne qualité.

On remarque aussi que le rapport des carrés moyen est élevé et que la probabilité est inférieure à 0,0001, on déduit que le modèle est fiable.

## PARTIE PRATIQUE

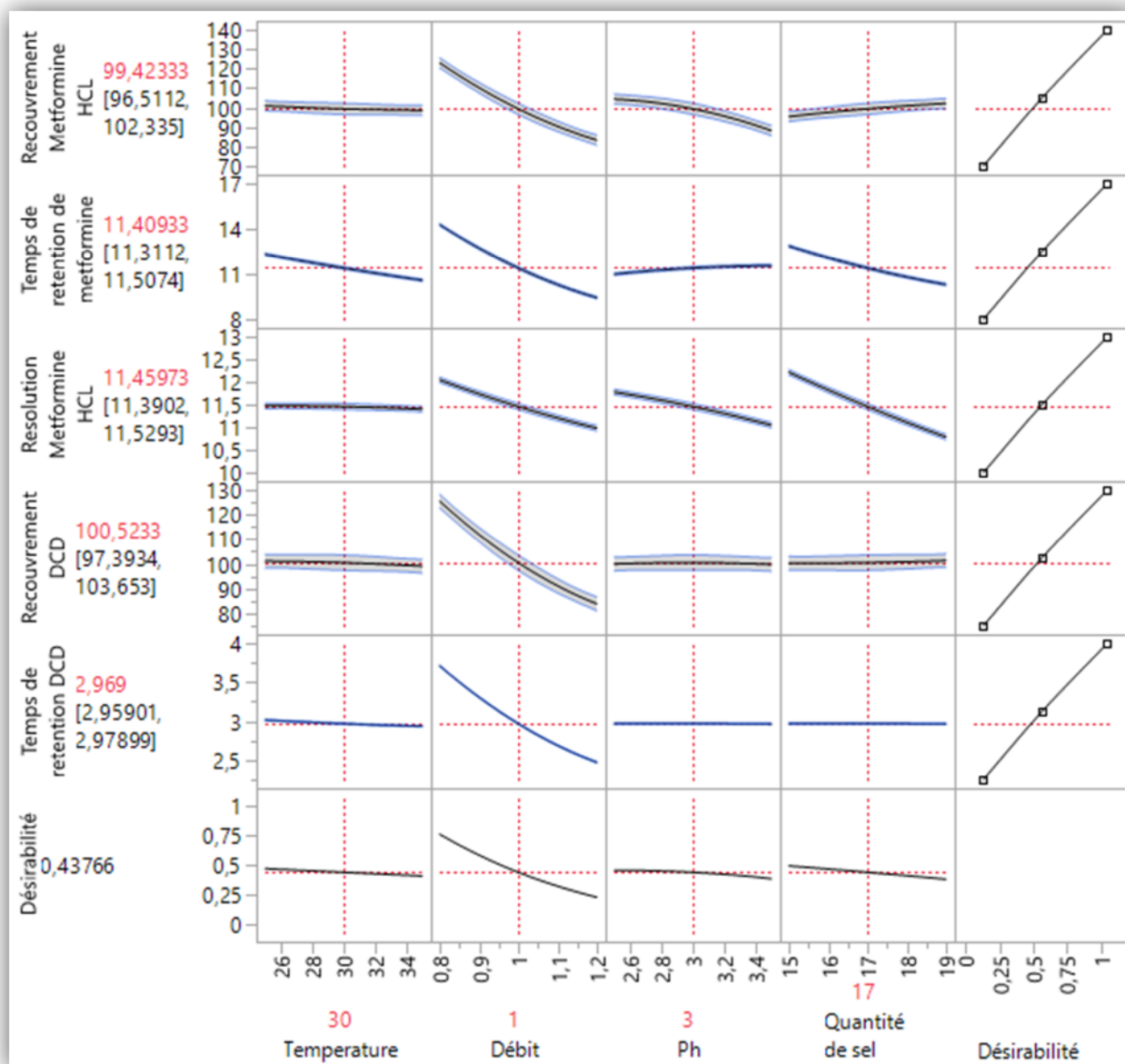
**Remarque :** nous allons tracer un tableau dans lequel nous comparons la valeur expérimentale et la valeur prévue de recouvrement DCD et dans les conditions normales de Metformine (voir la figure19 ).le Pourcentage de déviation est donné par la relation précédente.

**Tableau XXI : Calcul du pourcentage de déviation pour le recouvrement de la DCD de modèle de 2<sup>ème</sup> degré**

Valeur expérimentale	Valeur calculée par le logiciel	Pourcentage de déviation
100	104.471	4.11

### 6. Profil de prévision

## PARTIE PRATIQUE



**Figure 19** : Profil de prévision pour le plan de second degré (BOX-BEHNEKEN)

### 3. Conclusion

L'analyse par chromatographie liquide à haute performance nous a permis d'obtenir des résultats qui ont été interprétés par le logiciel JMP, d'après les résultats donnés par ce logiciel tel que les contrastes et le graphe de Daniel, nous avons constaté qu'un facteur parmi les cinq facteurs qu'on a étudié a un impact sur les réponses de recouvrement metformine et recouvrement de la DCD qui est le Débit.

Et d'après les deux graphes des profils de prévision (figure 12, 17) des petites variations de débit aboutissent à un grand changement de réponses de recouvrements.

# CONCLUSION

Il n'est pas facile d'améliorer la qualité d'un médicament à la fin de sa fabrication. Nous ne pouvons qu'effectuer des contrôles afin de garantir sa qualité répondant aux exigences spécifiées. Il est donc indispensable d'impliquer la notion de qualité dès le début de la conception afin de garantir un niveau de sécurité et d'efficacité plus élevé.

Dans notre travail, nous avons appliqué l'approche QbD au dosage par HPLC d'un antidiabétique oral « Novoformine comprimé » dont l'objectif était d'identifier et de mesurer les facteurs influençant la réponse expérimentale (aire du pic chromatographique) du principe actif et de l'impureté Dicyandiamid.

La mise en application de cette nouvelle approche a été concrétisée par la réalisation de deux plans d'expérience (Plackett-Burman et BOX-BEHENKEN), l'interprétation des résultats a été facilitée par le logiciel JMP.

Afin de réaliser ces plans d'expérience, le choix est porté initialement sur cinq facteurs de la méthode chromatographique (pH du tampon, température, gamme de concentration, quantité de sel et le débit de la phase mobile) avec une variation de 10 %. Cette étape nous a permis de déterminer les facteurs influant sur les recouvrements de la metformine et l'impureté DCD.

Les résultats obtenus pour le plan de 1er degré de Plackett-Burman et d'après le tableau des contrastes et le graphe de Daniel que ; le débit et le pH du tampon sont les facteurs qui influencent significativement le recouvrement de la metformine et le débit influence sur le recouvrement de la DCD.

En ce qui concerne le plan de deuxième degré BOX-BEHENKEN, nous avons constaté que le modèle est de bonne qualité grâce au tableau d'analyse de variance et l'ensemble des graphes associés (valeurs observées, résidus ...).

Au terme de ce travail, nous avons déterminé le facteur qui avait un grand impact sur la réponse de la metformine et l'impureté Dicyandiamid, il s'agit du débit de la phase mobile, ceci a été confirmé par le profil de prévision ; une petite variation de débit a causé une grande variation de résultats.

Nous concluons que notre objectif est atteint et que l'approche QbD est appliqué avec succès au dosage de la metformine et son impureté par HPLC.

**REFERENCES**  
**BIBLIOGRAPHIQUES**

## *Références bibliographiques*

---

- [1] REZGUI,F « Optimisation des paramètres d'encapsulation de chlorhydrate de metformine dans la matrice PLA »
- [2] Portail d'information - Médicaments essentiels et produits de santé, Genève, 19-23 juin 1995 (1995; 96 pages) [English]
- [3] DURETTE D. PILLET M .Qualité en production de l'iso 9000 à six sigma. Publication 2005, Edition n°3 / ISBN : 978-2-7081-3388-4.
- [4] ORGANISATION MONDIALE DE LA SANTE : Médicaments essentiels et produits sanitaires.  
[https://www.who.int/medicines/areas/quality\\_safety/quality\\_assurance/fr/?fbclid=IwAR2krj3qQpZDopl5GzTR\\_XVbx9sEJfSv1qcyYOpOvLMxMA9YP3tEX1kpSE](https://www.who.int/medicines/areas/quality_safety/quality_assurance/fr/?fbclid=IwAR2krj3qQpZDopl5GzTR_XVbx9sEJfSv1qcyYOpOvLMxMA9YP3tEX1kpSE)
- [6] INSTITUT NATIONAL DE LA SANTE, bibliothèque nationale de médecine des états unis, contrôle qualité des produits pharmaceutiques .
- [7] BETH PEDERSEN, employé rédactrice chez la revue Master contrôle : Qu'est – ce que la qualité pharmaceutique par conception, 9 novembre 2017. GXP LIFE LINE
- [8] SENNOUN R. Relations de l'ICH Q10 "Système qualité pharmaceutique" avec les standards ISO, les GMP et son application chez SGS Life Science Services. Sciences pharmaceutiques. 2012.
- [9] CAIRE M. thèse pour le diplôme d'état de docteur en pharmacie, Application du « Quality by Design » dans un centre de développement industriel, université de Limoges, Faculté de pharmacie Année 2011
- [10] MURARO M. thèse en vue de l'obtention du diplôme d'état de docteur en pharmacie, « la démarche Quality by design » faculté des sciences pharmaceutiques, Université Paul Sabatier Toulouse III, Année 2017 .

[11] Nishendu P. Nadpara, Rakshit V. Thumar, Vidhi N. Kalola, Parula B. Patel , revue “Quality by Design”

[12] YVES R. Membre titulaire de l’Académie nationale de Pharmacie  
Aspects théoriques des nouveaux concepts de gestion de la qualité ICH Q8 Q9  
et Q10 vers un référentiel universel

[13] ENS Lionel Gendre, Les plans d'expériences Edité le 21/12/2009.

[14] ASSISTANCE MINITAB 18 , « que sont les plans de surface de réponse ,  
les plans composites centrés et les plans de Box Benhenken »

[15] JMP DISCOVERY FROM SAS,Livre Blanc. « Le plan de criblage  
définitif une approche définitive »

[16] JACQUES GOUPY, pratique les plans d’expériences , livre de JG Edition.

[17] INTERNATIONAL JOURNAL OF INNOVATION AND APPLIED  
STUDIES ISSN 2028-9324 Vol. 6 No. 3 July 2014, pp. 530-540 © 2014  
Innovative Space of Scientific Research Journals

[18] LA CHIMIE.FR ,la chimie pour tous.

# **LISTE DES ANNEXES**

# **ANNEXE 01**

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

## 1. Origine de HPLC

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

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

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

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

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

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

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

Cette nouvelle technique est appelée :

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

## 2. Définition

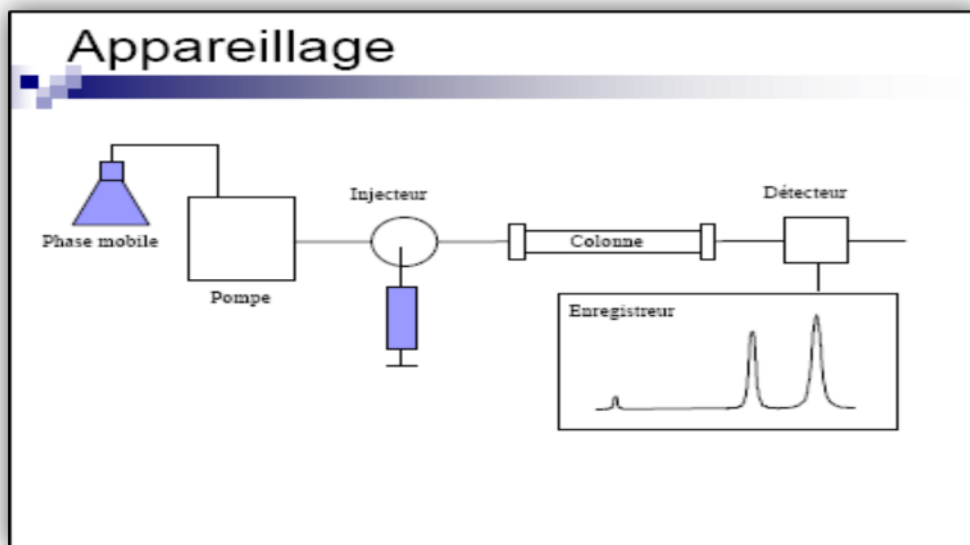
La chromatographie liquide à haute performance est une technique séparative utilisée en analyse quantitative, qualitative et principalement employée dans le domaine de la chimie analytique, elle permet l'identification, la séparation et le dosage des formes pharmaceutiques

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

### 3. Appareillage

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

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



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



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

### 1.1. Réservoir de la phase mobile

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

Les solvants de la phase mobile doivent être de « grade HPLC », ce qui permet de garantir leur degré de pureté ainsi que leur filtration (filtre de  $0.2\mu\text{m}$ ).

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

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

#### ⇒ **Dégazage du solvant**

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

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

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

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

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

Les caractéristiques de ces solvants sont :

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

## 1.2. Pompe

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

Les pompes doivent répondre aux quelques exigences suivantes :

- Fournir des pressions allant jusqu'à 400 bars
- Absence de pulsations
- Débit compris entre 0,1 à 10 ml/min
- Résistance à la corrosion quel que soit le solvant utilisé.

## 1.3. Injecteur

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

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

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

#### 1.4. Colonne

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

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

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

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

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

#### 1.5. Détecteur

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

Deux types de détecteurs sont classiquement utilisés :

##### ⇒ **Détecteur UV-visible**

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

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

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

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

Il existe plusieurs autres détecteurs :

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

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

### **1.6. Intégrateur informatique**

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

- La largeur attendue des pics.
- Le seuil d'intégration (sensibilité).

## **2. Principe de fonctionnement**

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

substance. L'amplitude de ces pics, ou encore l'aire limitée par ces pics et la prolongation de la ligne de base permet de mesurer la concentration de chaque soluté dans le mélange injecté.

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

### 3. Analyse des chromatogrammes

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

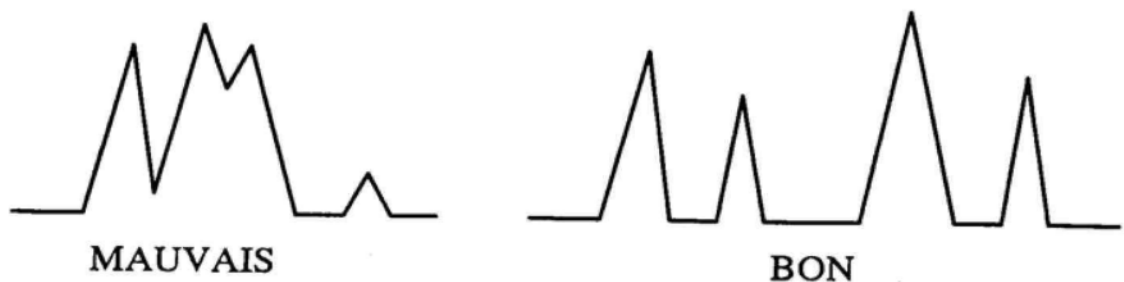


Figure C.1. : L'analyse qualitative d'un chromatogramme

#### 3.1. Analyse qualitative

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

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

✓ **Temps réduit**

Est défini par la différence entre les deux temps précédents ;

$$t_R' = t_R - t_0$$

✓ **Volume de rétention**

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

$$V_R = t_R \times D$$

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

$$V_R' = V_R - V_M$$

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

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

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

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

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

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

Il ne peut, par définition être, inférieur à 1

✓ **Efficacité de la colonne**

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

⇒ Nombre de plateaux théoriques N :

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

$t_R$  : temps de rétention

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

⇒ La hauteur équivalente à un plateau théorique (HEPT)

$$HEPT = L / N$$

**L** : Longueur de la colonne

**N** : Nombre de plateaux théoriques

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

✓ **La résolution (R)**

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

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

✓  $R < 1$  : mauvaise résolution

✓  $1 < R < 1,4$  : résolution acceptable

✓  $1,4 < R < 1,6$  : résolution optimale

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

### 3.2. Analyse quantitative

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

$$m_i = K_i \cdot A_i$$

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

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

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

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

### 4.1. Avantages de l'HPLC

La chromatographie en phase liquide présente les avantages suivants :

- ✓ Elle est utilisée pour des solutés de masse moléculaire élevée, peu volatils, sensibles aux hautes températures, ces solutés peuvent être non polaires, polaires ou ioniques ;
- ✓ Séparation rapide ;
- ✓ Mesure quantitative précise ;
- ✓ Elle analyse de très petites quantités d'échantillons, présente une extrême sensibilité, possède un grand pouvoir de séparation et une excellente reproductibilité et répétabilité.

### 4.2. Inconvénients de l'HPLC

#### ✓ Technologie chère

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

#### ✓ Complexité

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

#### ✓ Faible sensibilité

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

## **Conclusion**

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

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

- ✓ De pouvoir réaliser des analyses rapides/ultrarapides, en particulier dans le domaine pharmaceutique ;
- ✓ D'obtenir des très hautes résolutions pour l'analyse de mélanges les plus complexes (extraits de plantes, protéomique, métabolomique humaine...) ;
- ✓ Des conditions analytiques permettant l'analyse de macromolécules biologiques (protéines).



## ***Résumé***

Jusqu'au 20<sup>ème</sup> siècle, le développement de nouveaux produits pharmaceutiques était long et peu efficace . A partir des années 2000, une nouvelle conception de la Qualité voit le jour : le *Quality by Design*. Il s'agit d'impliquer la Qualité dès le début de la conception du médicament. Cette nouvelle approche est basée sur une connaissance scientifique accrue du produit.

L'objectif de notre travail est d'appliquer le nouveau concept de la qualité (QbB) au dosage de la metformine et de son impureté DCD dans le produit fini Novoformine comprimé par la chromatographie liquide à haute performance (HPLC) afin de déterminer les facteurs qui influencent la réponse expérimentale en ayant recours aux plans d'expérience de 1<sup>er</sup> et de 2<sup>ème</sup> degré. Le logiciel utilisé dans la pratique de notre travail est le JMP.

Les résultats obtenus montrent que les fluctuations du débit de la phase mobile impactent considérablement les réponses de la metformine et de la Dicyandiamid d'où l'intérêt de suivre et de maintenir constant le débit de la phase mobile tout au long de l'analyse par HPLC.

## ***Abstrat***

Until the 20th century, the development of new pharmaceutical products was long and inefficient. Since the 2000s, a new concept of Quality has emerged: Quality by Design. It is a question of involving Quality from the very beginning of the design of the drug. This new approach is based on an increased scientific knowledge of the product. The aim of our work is to apply the new concept of quality (QbB) to the determination of metformin and its impurity DCD in the finished product Novoformin compressed by high performance liquid chromatography (HPLC) in order to determine the factors that influence the experimental response using 1st and 2nd degree experimental designs. The software used in the practice of our work is JMP. The results obtained show that fluctuations in the flow rate of the mobile phase have a considerable impact on the metformin and Dicyandiamid responses, hence the interest of monitoring and keeping constant the flow rate of the mobile phase throughout the HPLC analysis.

