

RÉPUBLIQUE ALGÉRIENNE DÉMOCRATIQUE ET POPULAIRE
MINISTÈRE DE L'ENSEIGNEMENT SUPÉRIEUR ET DE LA
RECHERCHE SCIENTIFIQUE
UNIVERSITE MOULOUD MAMMERI
TIZI-OUZOU



FACULTÉ DES SCIENCES
DÉPARTEMENT DE CHIMIE

Mémoire de Master en Chimie
Spécialité : Chimie Pharmaceutique

Présenté par
Melle TERBOUCHEFetta

OPTIMISATION DE LA METHODE D'ANALYSE PHYSICO-CHIMIQUE D'UN ANTIDIABETIQUE ORALE METFORMINE COMPRIME

Proposé et Dirigé par Mr OUAGUENOUNI Mohamed (NNAPP)
Codirigé par Mme FERNANE Farida (MCA – UMMTO)

Soutenu publiquement le 23/ 10 / 2012 devant le jury composé de

Mr MOUSSAOUI Ramdane	MCA (UMMTO)	Président
Mme BELMAHDI Lila	MAA (UMMTO)	Examinatrice
Mr MAMOU Marzouk	MAHU (UMMTO)	Examineur
Mr OUAGUENOUNI Mohamed	Manager (NNAPP)	Encadreur
Mme FERNANE Farida	MCA (UMMTO)	Co-Encadreur

Remerciements

Ce travail a été réalisé au sein du laboratoire de Novo Nordisk Aldaph Production Pharmaceutique (NNAPP) sous la direction de Mr OUAGUENOUNI Mohamed Manager Qualité et co-direction de M^m FERNANE Farida Maître de Conférence au département de chimie de la faculté des sciences de l'UMMTO.

Mes profonds remerciements s'adressent particulièrement à mon promoteur ***Mr OUACUENOUNI Mohamed***, sans ces efforts ce travail en cotutelle n'aurait pas pu exister. Je tiens à le remercier pour son aide et ces précieux conseils qu'il m'a prodigué tout au long de mon travail. Je ne vous remercierai jamais assez de m'avoir donné la chance de découvrir le monde pharmaceutique qui me tient trop à cœur.

Je tiens à remercier vivement Madame ***FERNANE Farida (Co-promotrice)*** pour tous les efforts qu'elle a fourni pour la création et la mise en place de la spécialité chimie pharmaceutique à l'UMMTO, Je l'a remercie d'avoir initié la coopération avec NNAPP, sans vous je n'aurais jamais eu la chance de connaître NNAPP où j'ai complété ma formation de chimie pharmaceutique et même j'ai acquis de nouvelles notions que je ne trouverai que dans de tel organisme.

Mes sincères remerciements et ma reconnaissance sont adressés aux responsables de NNAPP qui ont accepté la réalisation de ce modeste travail au sein de leur usine.

Je vous remercie Madame ***TOUDEFT.Nassima*** (Manager qualité) de vos précieux conseils et de votre sympathie.

Je remercie également Monsieur ***AZEM Idir*** (responsable du laboratoire contrôle qualité) pour la confiance qu'il a témoignée à mon égard, pour les opportunités de formation et tous les moyens qu'il a mis à ma disposition.

Je souhaite associer à ces remerciements, Monsieur ***FREINDI Toufik***, technicien qualité qui m'a suivi pendant toute la durée de ce travail, je vous remercie de m'avoir enrichie d'informations si précieuses sur la technique HPLC que ce soit sur la méthode ou sur l'équipement (je n'oublierai jamais le premier jour où vous m'avez donné l'honneur de toucher à l'équipement HPLC que je croyais être qu'un rêve).

Qu'il trouve ici, l'assurance de toute ma reconnaissance et mes sincères remerciements toute l'équipe du laboratoire contrôle qualité qui avec eux j'ai beaucoup appris sur les deux

plans professionnel et humain. Je remercie tous les techniciens qui ont assuré mes formations de stage : **Takfarinnas** de m'avoir formé sur le test de dissolution, **Nora** sur le test de dosage par UV, **Nassima** sur les balances de précisions, le duromètre, le dessiccateur halogène et la méthode HPLC et **Amel** sur les BPF.

Merci **lilia, Hakima Ouahiba, , brahim, moh omkrane, , Mouloud, , Salim**, et surtout **moh ourmdane** qui a été d'une grande utilité pour finaliser mon travail. Je vous remercie tous de m'avoir aidé, conseillé au début de mon stage et encouragé à la fin de mon travail. et je vous remercie surtout pour votre humour et votre sympathie.

Permettez moi de remercier **Nassima HASDANE** une deuxième fois pour tous ce qu'elle a du faire pour la continuité de mon travail, pour ces orientations, son soutien permanent, ces conseils précieux, pour la qualité d'informations qu'elle m'a transmises et surtout pour sa disponibilité (merci d'avoir sacrifié ta journée de week-end pour venir travailler avec moi au laboratoire).

J'adresse également ma profonde gratitude à tous les techniciens de l'assurance qualité qui ont été gentils, sympathiques et serviables merci **Fatiha, Amel, Kamela, Nawel, Djouhra** et **Mustapha** et un grand merci à **Mme Belhadj** et à **Salima** pour leur gentillesse.

Je remercie toute personne travaillant à NNAP ; employés des autres département production, magasin ou autre qui ont eu une attention ou un mot sympathique à mon égard et qui m'ont particulièrement touché ce jour-là.

Je remercie ma chère karima de m'avoir accompagné tout au long de ce stage, d'avoir partagé avec moi les moments agréables et me soutenir dans les mauvaises circonstances.

Je remercie **Mr MOUSSAOUI. R** de m'avoir fait l'honneur de présider le jury.

Mes remerciements s'adressent à **Mme BELMAHDI.L** et **Mr MAMOUM** d'avoir accepté d'examiner mon travail.

Je remercie tous mes enseignants, qui m'ont donné les bases de la science plus particulièrement mon institutrice **SAÏFI Samia** qui était une deuxième mère pour moi.

Je remercie tous mes camarades de la promotion de chimie pharmaceutique plus particulièrement **Ouiza ,Sihem et Yasmine**.

TERBOUCHE. Fetta

Dédicace

A la mémoire de mon regrettable père !

A être le plus chère à mon cœur, à ma douce et tendre mère : *Maman* je ne te remercierai jamais assez pour tes encouragements et tous l'effort que tu as fourni depuis ma naissance jusqu' à aujourd'hui.

A mes très chères sœurs : *ELDJIA, HASSIBA, FARIDA* et ma très chère sœur, amie et confidente *DJAMILA*.

A mes très chers frères : *SALAH, BELAID, IDIR et ACHOUR*.

A mes petites nièces : *ALICIA, LILIANE et EMILIE*

A mon petit neveu *YANI*

A mes belles sœurs : *SAMIA et BESSMA*

A mon beau frère *AHMED*

A mes cousins : *SALIHA, YAHIA et YOUNES*

A ma cousine et très chère amie *DYHIA*

A mes très chères amies *DYHIA* et *KARIMA* ainsi qu'à leur famille.

A tous ceux qui m'ont aimé et soutenu dans ma vie !

A votre bénédiction la plus sainte

Je dédie mon modeste travail

Fetta TERBOUCHE

Liste des figures:

Figure 1 : Structure chimique du chlorhydrate de Metformine.....	5
Figure 2 : Schéma d'une installation HPLC	13
Figure 3 : Chromatogramme type	16
Figure 4 : Colonne standard et précolonne de CLHP	16
Figure 5 : Courbe de Vaan deempter	19
Figure 6 : Module de séparation 2695 XE de waters (vue frontale)	28
Figure 7 : Circuit fluide du système de gestion des solvants	28
Figure 8 : Circuit fluide du système de gestion des échantillons	30
Figure 9 : Détecteur Waters 2487 à doubles longueurs d'onde	31
Figure 10 : Graphe de la variation de la pression en fonction du débit pour la colonne 2	47
Figure 11 : Graphes de suivi de pression en fonction du débit colonne 1	47
Figure 12 : Temps de rétention de Metformine HCl à un débit de 0.8 ml/min (colonne 1)	49
Figure 13 : Résolution obtenues par les colonnes 1 et 2.....	50
Figure 14 : Temps de rétention de la Metformine HCl (colonne 1 et colonne 2)	50
Figure 15 : Etapes de préparation des solutions du test de la linéarité de DCDA chargée de STD (pour un essai).	55
Figure 16 : Etapes de préparation des solutions du test de la linéarité de DCDA	56
seule (pour un essai)	
Figure 17 : Démarche statistique de l'étude de la linéarité	57
Figure 18 : Chromatogramme de STD (test spécificité).....	64
Figure 19 : Chromatogramme de DCDA (test spécificité)	65
Figure 20 : Chromatogramme de la phase mobile (test spécificité)	65
Figure 21 : Chromatogramme de STD chargé de DCDA (spécificité)	66
Figure 22 : Chromatogramme de l'hydrolyse acide (HCl) de la solution 1.....	67
Figure 23 : Chromatogramme de l'hydrolyse basique (NaOH) de la solution 1	67
Figure 24 : Chromatogramme d'oxydation (H ₂ O ₂) de la solution 1.....	68

Figure 25 : chromatogrammes des solutions de STD (stockée et fraîche).....	69
Figure 26 : chromatogrammes des solutions de DCDA (stockée et fraîche).....	70
Figure 27 : chromatogrammes des solutions 1 (stockée et fraîche)	71
Figure 28 : chromatogrammes des solutions 4 (stocké et fraîche)	72
Figure 29 : Chromatogramme de la solution A (fraîche).....	73
Figure 30 : Droite d'étalonnage de STD chargé de DCDA (<i>logiciel origine 6.0</i>)	75
Figure 31 : Droite d'étalonnage DCDA seule (logiciel origine 6.0)	76
Figure 32 : différents chromatogramme superposés de la linéarité de DCDA	77+

Liste des tableaux

Tableau 1: Propriétés physicochimiques et organoleptiques du chlorhydrate de Metformine	6
Tableau 2: Représentation des structures et nomenclatures des impuretés de la Metformine HCl.....	7
Tableau 3: Composition qualitative du produit fini Metformine 850mg.....	8
Tableau 4: Tests de validation recommandés par les ICH.....	24
Tableau 5 : Caractéristiques des colonnes 1 et 2	32
Tableau 6 : Autre équipements utilisés pour le projet	32
Tableau 7 : Variation des paramètres autorisés en vertu des exigences des pharmacopées (USP, EP)	36
Tableau 8 : Ajustements de l'étude.....	37
Tableau 9 : Plan de l'étude.....	37
Tableau 10 : Critère d'acceptation des performances du système HPLC	38
Tableau 11 : Critère d'acceptation du pourcentage d'impureté de Metformine 850mg	39
Tableau 12: Résultats de la conformité du système colonne 1	40
Tableau 13 : Résultats de la conformité du système colonne 2	41
Tableau 14 : Données brutes utilisées dans le calcul des % d'impuretés (colonne 1)	42
Tableau 15 : Données brutes utilisées dans le calcul des % d'impuretés (colonne 2)	43
Tableau 16 : Résultats de pourcentage d'impureté calculés (colonne 1).....	44
Tableau 17 : Pourcentage d'impureté calculés de la colonne 2	45
Tableau 18 : Suivis de pression des deux colonnes 1 et 2.....	46
Tableau 19 : Temps de rétention de la metformine HCl colonne 1 et colonne 2.....	48
Tableau 20 : Tests de précision (répétabilité et précision intermédiaire).....	61
Tableau 21: Informations sur les pics de la solution 1(hydrolyse acide, basique et oxydation de Metformine).....	68
Tableau 22 : Résultats de la dégradation forcée de Metformine 850mg (échantillon)	73
Tableau 23 : Données brutes de la linéarité sur STD chargé de DCDA	74
Tableau 24 : Données brutes de la linéarité DCDA seule.....	75
Tableau 25 : Résultats de l'estimation d'une droite de régression linéaire (DCDA seule et STD chargé de DCDA.....	77

Tableau 26 : Résultats du test de comparaison des pentes des droites D_1 et D_2	78
Tableau 27 : Résultats du test de comparaison des ordonnées à l'origine des droite D_1 et D_2	78
Tableau 28 : Test de comparaison des ordonnées à l'origine avec le point zéro	79
Tableau 29 : Résultats de changement de variable	80
Tableau 30 : Résultats du test de Cochran	81
Tableau 31 : Résultats de l'estimation du recouvrement moyen.....	82
Tableau 32 : Données brutes des résultats de la précision : répétabilité et précision intermédiaire	83
Tableau 33 : Concentrations estimées : répétabilité et précision intermédiaire	83
Tableau 34 : Pourcentage de recouvrement	84
Tableau 35 : Résultats des moyennes des groupes	84
Tableau 36 : Dispersion à l'intérieur des groupes de mesure	85
Tableau 37 : Test d'homogénéité des variances à l'intérieure des groupes.....	85
Tableau 38 : Variance de répétabilité	85
Tableau 39 : Variance intergroupes	86
Tableau 40 : Coefficient de variation de répétabilité et de précision intermédiaire.....	86
Tableau 41 : Temps de rétention donnée par les deux colonnes	88
Tableau 42 : Etude de minimisation des coûts	90

1. En lettres latines

AMM : Autorisation de Mise Sur le Marché.

ADC: Article De Conditionnement.

AS : facteur de symétrie.

BMC : Bouillon Mac Conkey.

BPF : Bonne Pratique De Fabricatio.

C : Centimètre.

C_{commerciale} : concentration de HCl commerciale

C_{filte} : concentration de HCl voulu.

Cfu: unité formant colonnie

Ci : Combinaison.

cm : centimètre.

°C : degré Celsius.

CPG : Chromatographie en Phase Gazeuse.

D : droite de régression linéaire.

d : diamètre interne.

DCDA : Dicyandiamide.

Dkk : Couronne Danoise.

EP : Europeen Pharmacopae

E. coli: Escherichia coli.

EP : European Pharmacopeia

F: Débit.

FDA : Food and drug administration.

g: gramme.

GMC : gélose mac conkey.

H ou HEPT : Hauteur Equivalent d'un Plateau Théorique.

HPLC : Chromatographie liquide à haute performance.

ICH : International Conference on Harmonization

K' : facteur de rétention.

ISO : International Standard organisation.

Km : Kilomètre.

L : longueur.

LD : Limite de Détection.

LQ : Limite de Quantification.

m² : mètre carré.

ml : millilitre.

mm : millimètre.

Mol : Mole.

NNAPP: Novo Nordisk Aldaph Production Pharmaceutique.

N ou NPTA : Nombre de Plateau Théorique.

NS: Non Significatif.

OHSAS: organization Health Safety And Security.

ph: Eup: pharmacopée Européenne.

PVC: Polychlorure de Vinyl.

R_s : Résolution.

RMN : Résonance Magnétique Nucléaire.

S : Significatif.

SA :

SEC : chromatographie d'exclusion Stérique

SM : Spectroscopie de Masse

SFSTP: Société Française des Sciences Techniques et Pharmaceutique.

STD: Standard

SST : System Suitability Tests

T: température.

t_R : temps de rétention

TSA : Triptaze Soja Agar

TSB : triptaze Soja Bouillon.

μl : Microlitre

μm : Micromètre

USP : United States Pharmacopeia

V : Volume

Vi : vanne

UV : Ultra Violet

UV/Vis : Ultra Violet/ Visible.

V_{prélevé} : volume à prélevé de la solution HCl commerciale.

V_{préparé} : volume de la solution à prélevée.

Wh : longueur à mis hauteur.

2. Les paramètres statistiques

a : pente de la droite de régression.

b : ordonnée à l'origine de la droite de régression.

C : test Cochran.

CV : coefficient de variation.

IRM : intervalle de confiance du recouvrement moyen RM .

K : nombre de groupe.

m_j : moyenne de n_j valeurs du groupe j.

n_j : nombre d'observation du groupe j.

NDL ou DDL : nombre de degrés de liberté.

r : coefficient de corrélation.

S : écart type estimé de n valeurs.

S_b : écart type de l'ordonnée à l'origine.

S^2 : variance.

S_J : écart type à l'intérieure du groupe j.

S_j^2 : la variance des répétitions à l'intérieure du groupe.

S_R^2 : variance de répétabilité.

S_g^2 : variance inter-groupes.

t : test de Student.

X_{ij} : valeur brute indépendante

Y_{ij} : valeur brute dépendante.

α : risque d'erreur

Sommaire

Partie théorique

Introduction	1
---------------------------	----------

CHAPITRE I - PRESENTATION DU SITE ET DU PRODUIT

1. Présentation du site Novo Nordisk (maison mère).....	3
1.1. Aperçu historique.....	3
1.2. Différents département de NNAPP.....	4
1.2.1. Département qualité.....	4
1.2.1.1. Département assurance qualité....	4
1.2.1.2. Laboratoire contrôle qualité.....	4
1.2.2. Département technique.....	4
1.2.3. La logistique	5
2. Présentation du médicament Metformine.....	5
3. Contrôle qualité du produit fini Metformine 850mg	8
3.1. Tests physicochimiques.....	8
3.2 Tests microbiologiques.....	9

CHAPITRE II - CHROMATOGRAPHIE LIQUIDE A HAUTE PERFORMANCE

1. Techniques de séparation chromatographique.....	10
1.1. Classification selon le mécanisme de séparation	10
1.2. Classification selon les procédés utilisés.....	11
2. Chromatographie liquide à haute performance.....	11
2.1. Avantages de la chromatographie liquide à haute performance	11
2.2. Intérêt de la HPLC dans le contrôle qualité en industrie pharmaceutique	12
2.3. Appareillage.....	12
2.3.1. Système de pompage	13

2.3.2. Injecteurs	14
2.3.3. Colonne chromatographique	14
2.3.3.1. Classification des colonnes	14
2.3.3.2. Caractéristiques de la colonne.....	14
2.3.3.2.1. Nombre de plateaux théorique N.....	15
2.3.3.2.2. Hauteur Equivalente d'un Plateau Théorique (HEPT ou H).....	15
2.3.3.2.3. Résolution.....	15
2.3.3.3. La pré colonne.....	16
2.3.4. Détecteurs.....	16
2.3.5. Phase stationnaire	17
2.3.6. Phase mobile.....	17
3. Optimisation d'une méthode HPLC	17
3.1. Choix de la température	17
3.1.1. Diminution de la température.....	18
3.1.2. Augmentation de la température	18
3.2. Choix du débit	18
3.3. Optimisation d'une méthode HPLC et la conformité du système	19
4. Validation d'une méthode HPLC.....	19

CHAPITRE III - VALIDATION ANALYTIQUE

1. Définition de la validation	21
2. But de la validation.....	21
3. La validation analytique	22
4. Types de procédures analytiques à valider	22
4.1 Tests d'identification	22
4.2. Tests d'impuretés	23
5. Critère de la validation	23
5.1. Spécificité	24
5.2. Exactitude	25
5.3. La précision	25
5.3.1. La répétabilité	25
5.3.2. La précision intermédiaire	25
5.3.3. La reproductibilité	25

5.4. Limite de détection.....	25
5.5. Limite de quantification (limite de dosage).....	25
5.6. La linéarité	26
5.7. La gamme.....	26
5.8. La robustesse.....	26

Partie expérimentale

CHAPITRE IV- MATERIELS ET METHODES

1. Matériels.....	27
1.1 Généralités sur le système HPLC Alliance	27
1.1.1. Les différents compartiments de La chaîne HPLC	27
1.1.1.1. Système de gestion de solvant	28
1.1.1.2. Système de gestion des échantillons	29
1.1.2. Détecteur Waters 2487 à doubles longueurs d'onde	31
1.1.3. Contrôle par le logiciel Empower 2.....	31
1.2. Colonne HPLC.....	32
1.3. Autre Equipements	32
1.4. Matières premières et réactifs	32
1.5. Verreries et autres.....	33
2. Méthodes.....	33
2.1. Préparation de la solution tampon pH 3.00	33
2.2. Méthode de contrôle de produit fini Metformine 850 mg.....	33
2.3. Préparation des solutions.....	34

CHAPITRE V- OPTIMISATION DE LA METHODE DE CONTROLE DE METFORMINE 850MG

1. Protocole d'optimisation de la méthode d'identification et dosage des impuretés et substances de dégradation de la Metformine (produit fini)	35
1.1. Prélèvement des échantillons de travail.....	35
1.2. La procédure de travail	35
1.3. Plan d'étude de l'optimisation.....	37

1.4. Critères de sélection des modifications optimales.....	37
2. Résultats et discussions de la partie optimisation.....	39
2.1. Résultats de la conformité du système (system Suitability Test ou SST).....	40
2.2. Calcul de pourcentage d'impuretés dans la solution 1	42
2.3. Résultats du suivi de pression de la colonne 1 et colonne 2	45
2.4. Résultats des temps de rétention.....	47
2.4.1. Temps de rétention à un débit de 0.8ml/ml.....	49
2.4.2. Choix de la colonne et de la combinaison de travail	49
2.4.2.1. Choix de la colonne	49
2.4.2.2. Choix de la combinaison	51

CHAPITRE VI- VALIDATION ANALYTIQUE DE LA METHODE DE CONTROLE DE METFORMINE 850 MG.

1. Protocole de validation de la méthode de contrôle de Metformine 850mg	52
1.1. Validation.....	52
1.2. Définition des tests de validation.....	52
1.2.1. Spécificité.....	52
1.2.2. Stabilité.....	53
1.2.3. Linéarité.....	54
1.2.3.1. Linéarité de Dicyandiamide chargé de Metformine HCl	54
1.2.3.2. Linéarité de DCDA seule.....	55
1.2.3.3 Etude statistique des résultats de la linéarité	56
1.2.4. Exactitude.....	59
1.2.5. La précision.....	60
1.2.5.1. Préparation des solutions	60
1.2.5.2. Etude statistique des tests de la précision.....	61
1.2.6. Limite de détection et limite de quantification.....	62
2. Résultats et discussions.....	64
2.1. Spécificité.....	64
2.2. Stabilité	66
2.3. Résultats de la linéarité.....	74
2.3.1. Linéarité sur STD chargé de DCDA.....	74
2.3.2. Linéarité de DCDA.....	75

2.3.3. Etude statistique.....	77
2.3.3.1. Test de comparaison des pentes des droites D_1 et D_2	78
2.3.3.2 Tests de comparaison des ordonnées à l'origine	78
2.3.3.3. Test de comparaison des ordonnées à l'origine avec le point zéro.....	78
2.4. Résultats des tests de l'exactitude	79
2.4.1. Changement de variable.....	79
2.4.2. Vérification de l'homogénéité des variances (test de Cochran).....	80
2.4.3. Estimation du recouvrement moyen	81
2.5. Résultat des tests de la précision : répétabilité et précision intermédiaire	82
2.5.1. Calcul statistique.....	83
2.5.1.1. Transformation des données brutes en quantité retrouvées	83
2.5.1.2. Détermination des pourcentages de recouvrement	84
2.5.1.3. La moyenne des groupes	84
2.5.1.4. Dispersion à l'intérieur des groupes de mesure	85
2.5.1.5. Test d'homogénéité des variances à l'intérieure des groupes (Test de Cochran).....	85
2.5.1.6. Variance de répétabilité....	85
2.5.1.7. Variance intergroupe.....	85
2.5.1.8. Variance de précision intermédiaire.....	86
2.5.1.9. Coefficients de variation....	86
2.6. Limite de détection (LD) et limite de quantification (LOQ).....	87

CHAPITRE VII : EVALUATION ECONOMIQUE DU PROJET

1. Les gains du projet	88
1.1. Les gains économiques.....	88
1.1.1. Gain du temps.....	88
1.1.1.1. Avantage engendrés par le gain du temps	89
1.1.2. Gain d'argent	89
1.1.3. Minimisation des coûts	90
2. Gains écologiques	90
2.1. Réduction de l'énergie	90
2.2. Réduction de déchets	90
Conclusion Générale	91

Le médicament Metformine est un antidiabétique orale de plus en plus consommé en Algérie vu le taux de malades qui ne cesse de croître d'une année à une autre. L'industrie pharmaceutique est le secteur capital qui répond aux attentes de ces patients par la fabrication de spécialités pharmaceutiques ou de produit générique.

A l'instar de tous les médicaments préparés par les industries pharmaceutiques contemporaines, la Metformine doit obéir à des exigences de qualité et de sécurité. Des laboratoires de contrôle qualité de la matière première, des produits en vrac, finis ou semi finis sont mis en œuvre afin de garantir le niveau qualité exigé par les pharmacopées. Ces laboratoires sont dotés d'équipements consacrés au contrôle de ces médicaments.

La chromatographie liquide à haute performance (HPLC) est l'une des techniques largement utilisée dans le contrôle qualité des formes sèches ce qui est le cas du médicament Metformine. La HPLC occupe une place indétrônable dans le laboratoire de contrôle qualité en raison de sa fiabilité, sa reproductibilité, sa robustesse et sa capacité de séparer des mélanges souvent non réussit par d'autres techniques.

Le temps d'analyse d'un médicament avec la technique HPLC diffère d'un protocole à un autre. Il dépend de nombreux facteurs intervenant dans la séparation des mélanges. Les caractéristiques de la colonne (dimensions, porosité de la phase stationnaire, la température...) sont à considérer au même titre que la force ionique, la température, le pH et le débit de la phase mobile ainsi que la pression appliquée.

Actuellement, la réduction du temps d'analyse par HPLC est un défi que les industriels se lancent pour des fins sociaux-économiques et environnementales. Dans cette perspective, notre travail réalisé au sein du laboratoire contrôle qualité de Novo Nordisk (NNAPP) de Tizi-Ouzou cherche à relever ce défi pour le contrôle qualité de routine des comprimés Metformine. L'objectif du contrôle se focalise sur l'identification et dosage des substances de dégradation du principe actif de la Metformine suivant une méthode décrite dans la pharmacopée britannique (BP) développée par leur fournisseur de matière première.

Pour ce faire le laboratoire de contrôle qualité NNAPP a opté pour changer les caractéristiques suivantes de la colonne : la longueur et le diamètre interne ainsi que la porosité de la phase stationnaire.

En analyse HPLC, la modification des caractéristiques d'une colonne induit automatiquement à l'optimisation de plusieurs paramètres, essentiellement : le débit de la phase mobile et la température de la colonne.

Cependant le compromis entre le temps réduit de l'analyse et la résolution par rapport aux produits de dégradations du principe actif de la Metformine nous oriente sur le choix des optimums. En effet, dans notre cas le produit de référence pour la résolution est la Mélamine.

Il en sort de ceci que notre problématique est de rechercher la meilleure combinaison (débit, température) qui permettrait d'atteindre un temps réduit d'analyse et une meilleure résolution entre le principe actif de la Metformine et la Mélamine selon les recommandations des pharmacopées Européenne (EP) et Américaine (USP).

Par ailleurs toute modification dans le protocole d'analyse en industrie pharmaceutique exige une validation analytique afin de confirmer que la procédure analytique employée est adaptée et fiable pour son utilisation prévue.

Le présent mémoire est divisé en deux parties :

- Ø La première partie est une synthèse bibliographique dans laquelle on retrouve l'essentiel sur les techniques chromatographiques et les procédures de validation.
- Ø La deuxième partie est consacrée à notre travail pratique dans lequel nous avons décrit tous les protocoles expérimentaux et les résultats afférant.

L'ensemble des résultats seront traités systématiquement de telle sorte à mettre en évidence les paramètres importants qui ont occasionné la réduction du temps d'analyse. Un traitement statistique des résultats de la validation analytique sera réalisé afin de vérifier ses critères conformément au protocole préétabli.

1. Présentation du site Novo Nordisk (maison mère)

1.1. Aperçu historique

L'histoire de Novo Nordisk remonte aux années 20 à Copenhague au Danemark. C'est l'association de deux sociétés Novo et Nordisk : Nordisk Insulinlaboratium qui a produit en 1920 la première insuline sous le nom de Leo grâce à la visite aux USA du couple August pris Nobel de physiologie et Marie Krogh chercheuse sur les maladies métaboliques, où ils obtiennent l'autorisation de produire de l'insuline par le directeur de l'institut de Toronto. Terapeutisk a réussi la fabrication de sa première insuline en 1924 sous le nom d'Insuline Novo avec la conception d'une seringue spéciale appelée seringue Novo qui permet aux patients de s'auto-injecter de l'insuline. Novo terapeutisk est née grâce aux frères Pedersen qui ont travaillé à Nordisk Insulinlaboratium, et qui ont décidé d'ouvrir leur propre usine et concurrencer Nordisk Insulinlaboratium.

Se livrant à une compétition farouche, les deux sociétés concurrentes figurèrent bientôt parmi les meilleurs dans leur domaine. En janvier 1989 il est annoncé que Nordisk Gentofte A/S et Novo Industrie A/S unissent leurs forces sous le nom de Novo Nordisk A/S, fusion grâce à laquelle le Danemark a l'honneur d'avoir parmi ses entreprises le premier fournisseur mondial d'insuline [1].

Novo Nordisk Aldaph production Pharmaceutique (NNAPP) est une usine née dans le cadre des relations coopératives Algéro-Danoises que les deux pays tentent de renforcer sur plusieurs plans, en investissant un capital de 50 million DKK (6.7 million d'euro). C'est la première usine que réalise Novo Nordisk en Afrique. L'usine est conçue selon les exigences de bonne pratique de fabrication et les standards propres à Novo Nordisk pour la production des antidiabétiques oraux Metformine comprimés à différents dosages 500mg, 850mg et 1000mg destinés au diabète de type II, appelé «diabète non insulino dépendant». L'usine est officiellement ouverte en mai 2006 avec un effectif initial de 30 employés et une capacité de production d'environ deux millions de boîtes par année. Le premier lot a été commercialisé en 2008. Aujourd'hui, le nombre d'employés est arrivé à 100 employés pour avoir une capacité de production annuelle de 10 millions de boîtes [1].

Située à environ 7 Km au Sud-est de la wilaya de Tizi Ouzou, Novo Nordisk est implantée dans la zone industrielle Aïssat Idir à oued Aïssi. Elle occupe un terrain de 22 000 m² dont on a construit une superficie de 2900 m² [1].

1.2. Différents département de NNAPP

L'usine est composée de trois principaux départements: département qualité, département technique (production et maintenance) et la logistique.

1.2.1. Département qualité

Comme son nom l'indique, le département qualité veille à ce que le médicament Metformine produit soit de bonne qualité, fabriqué selon les exigences des bonnes pratiques de fabrication. Ce département est divisé en deux départements distincts :

1.2.1.1. Département assurance qualité

Le département assurance qualité est d'une importance capitale dans l'industrie pharmaceutique, il gère le travail des différents départements et s'assure qu'il soit fait conformément aux exigences des pharmacopées et aux recommandations internationales et s'occupe de toute sorte de défaillance de la qualité (non-conformité) dans l'usine.

1.2.1.2. Laboratoire contrôle qualité

Les tâches du laboratoire de contrôle qualité sont multiples et indispensables. Il s'occupe du contrôle de la matière première utilisée en production, contrôle des articles de conditionnement (ADC), contrôle de l'eau purifiée et de l'eau brute, contrôle des produits finis. Le laboratoire contrôle qualité est doté de plusieurs salles des quelles on peut citer : Une salle de pesée, une salle de physicochimie, une salle de chimie, une salle de microbiologie, un magasin réactif, une échantillothèque, un bureau de contrôle qualité et une laverie.

1.2.2. Département technique

Ø La production

Ce département est conçu d'une façon à répondre aux exigences de la production de Metformine afin de garantir le maintien d'un niveau de qualité uniforme au moment de la production dans le respect des BPF (bonnes pratiques de fabrication), dossier AMM (Autorisation de Mise sur le Marché) de la Metformine et des procédures générales de NNAPP.

Le département de production est appelé zone blanche qui n'est pas classée mais contrôlée dont l'humidité est suivie et régulée au dessous de 62%, le taux de renouvellement d'air est de 100% ou bien 80 % selon les locaux. La température est suivie et régulée entre 16°C et 29°C avec comme intervalle de performance 18°C - 24°C [2].

Ø La maintenance

Ce département s'occupe de la maintenance de tous les équipements de différent département de l'usine.

La production des comprimés Metformine passe par plusieurs opérations qui sont : La compression du granulat, le pelliculage, le conditionnement primaire (mise sous blisters des comprimés pelliculés, le conditionnement extérieur (mise en étuis des blisters, vignettage et mise en caisses des étuis) [3].

1.2.3. La logistique

C'est le département chargé des approvisionnements en matières premières et ADC ainsi que l'expédition des produits finis.

La logistique est dotée d'un magasin qui est une grande surface qui permet un stockage ordonné des différentes catégories de produit : Matière première (granulat, excipient, article de conditionnement), Produit intermédiaire (vrac ou fini), Produit en quarantaine, Produits libérés, refusés, retournés ou rappelés. Il respecte les normes d'hygiène : propre, sec, maintenu dans des limites acceptables de température et d'humidité (inférieure à 60%) [4]

2. Présentation du médicament Metformine

La Metformine est une molécule qui fait partie de la famille des biguanides dotée d'une activité hypoglycémiant incontestable. Metformine a été citée dans le traitement du diabète sucré non insulino-dépendant grâce aux essais cliniques de Sterne [5].

La Metformine est une molécule dotée d'un comportement basique, le motif guanidine qui la compose présente des caractéristiques particulières dues en grande partie à son pKa de 11.5 donc à sa grande aptitude à la protonation dans les milieux biologiques au pH physiologique (milieu gastro-intestinal) [6]

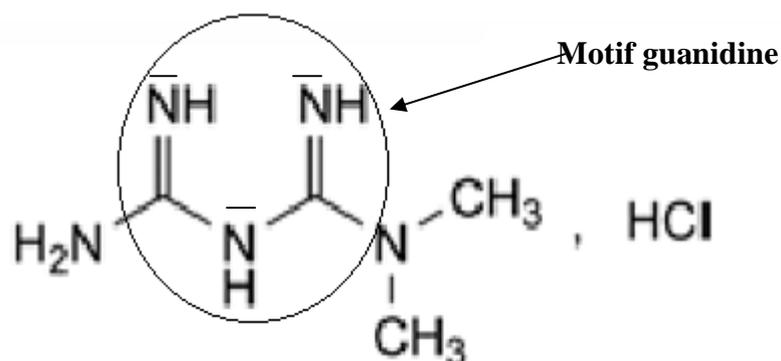


Figure 1 : Structure chimique du chlorhydrate de Metformine [7].

L'ensemble des propriétés physicochimique de la Metformine sont regroupées dans le tableau 1 [7, 8]

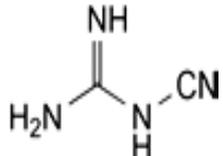
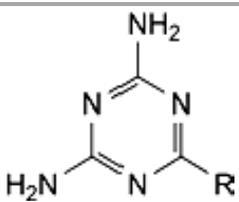
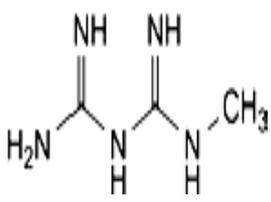
Tableau 1 : Propriétés physicochimiques et organoleptiques du chlorhydrate de Metformine

Metformine HCl	Propriété physicochimique/organoleptique
Nomenclature	Chlorhydrate de N,N-dimethyl-biguanide
Aspect	Cristaux blancs ou sensiblement blancs
Formule brute	C ₄ H ₁₂ ClN ₅
Masse molaire (g /mol)	165.6
Point de fusion (C°)	222-226
Teneur (%)	98.5 -101.0
Solubilité	facilement soluble dans l'eau, peu soluble dans l'alcool, pratiquement insoluble dans l'acétone et dans le chlorure de méthylène.

Les impuretés de chlorhydrate de Metformine sont des produits de sa dégradation qui peuvent être spécifiées ou non. L'impureté spécifiée (Dicyandiamide) doit être obligatoirement identifiée et dosée par l'un des essais décrits dans la pharmacopée. Le test le plus adéquat est l'identification et dosage par la chromatographie liquide. Par contre les autres impuretés sont décelables si elles sont présentes à une teneur suffisante. Elles sont limitées par le critère général d'acceptation applicable aux autres impuretés ou impuretés non spécifiées, ou par les dispositions de la monographie générale des substances pour usage pharmaceutique [7].

Sur le tableau 2 sont listées les structures et nomenclatures des différents produits de dégradation de la Metformine HCl selon la pharmacopée Européenne.

Tableau 2 : Représentation des structures et nomenclatures des impuretés de la Metformine HCl [7].

impureté	Structure chimique	Nomenclature
Spécifiée		Cyanoguanidine.
Non spécifiée		R = NH-C(=NH)-NH ₂ (4,6-diamino-1,3,5-triazin-2-yl)guanidine.
		R = N(CH ₃) ₂ N,N-diméthyl-1,3,5-triazine-2,4,6-triamine.
		R = NH ₂ : 1, 3,5-triazine-2, 4,6-triamine (mélamine).
Non spécifiée		1-méthylbiguanide.
	CH ₃ -NH-CH ₃	N-méthylméthanamine.

3. Contrôle qualité du produit fini Metformine 850mg

Etant donné que notre travail s'effectue sur les comprimés Metformine 850mg, nous listons sur le tableau 3 la composition qualitative de ce produit.

Tableau 3 : Composition qualitative du produit fini Metformine 850mg [9].

Composition		Données qualitatifs
Principe actif		Chlorhydrate de Metformine
Excipients		Providone
		Polyéthylène glycol 6000
		Sorbitol 100%
		Stéarate de magnésium
		Opadry Y-1-700
		Paraffine, hard
Articles de conditionnements (ADC)	Primaire	Aluminium et polychlorure de vinyle (PVC)
	Secondaire	Notices, étuis.
	Tertiaire	Caisses

La libération des lots du produit fini nécessite des contrôles physicochimiques et microbiologiques au sein du laboratoire du contrôle qualité. Ils sont en nombre de sept : six tests physicochimiques et un test microbiologique.

3.1. Tests physicochimiques

- Ø **Aspect :** C'est un test visuel qui consiste en un contrôle de la couleur et de la forme des comprimés. Ce test est valide si les comprimés sont pelliculés blanchâtres à jaunâtre, d'un corps convexe, diamètre de 13mm avec une cassure au milieu d'une face.
- Ø **Uniformité de masse :** Ce test consiste en détermination de la masse moyenne ainsi que les limites inférieures et supérieures de vingt comprimés après leur pesée statistique à l'aide d'une balance analytique. Le test est jugé conforme s'il n'ya pas plus de 2 des 20 comprimés prélevés qui dévient de 5% de la masse moyenne et aucun comprimé ne dévie de 10%.

- Ø **Perte à la dessiccation** : A l'aide d'un dessiccateur halogène, on soumit une poudre de comprimés Metformine 850mg broyés à une température de 105°C et on évalue sa teneur en eau. Le test est conforme si le pourcentage de la teneur en eau est $\leq 2.0\%$.
- Ø **Dosage de la Metformine HCl par spectrométrie UV** : Le test de quantification du principe actif (Metformine HCl) dans la matrice se fait par spectrométrie UV. Le test est conforme si la quantité de Metformine HCl est incluse dans l'intervalle de 807.5 à 892.5 mg par comprimé.
- Ø **Dissolution** : Le test de dissolution de formes comprimées est indispensable dans une industrie pharmaceutique. Pour la Metformine 850mg, on suit les absorbances de six comprimés qui se dissolvent dans un milieu à pH basique en utilisant un dissolutest à boucle fermée. Le test est conforme si 85% au minimum de la quantité introduite de la Metformine HCl est dissoute durant 30 minutes.
- Ø **Identification des impuretés par HPLC** : A côté du dosage du principe actif, le dosage et l'identification des substances apparentées de Metformine 850mg est très important. Ce test est réalisé dans le but de doser et d'identifier la principale impureté de la Metformine qui est la Dicyandiamide ainsi que le dosage individuel ou totale des autres impuretés (essai limite) (cf. chapitre IV).

3.2 Tests microbiologiques

Ce sont des tests quantitatifs et/ou qualitatifs de trois sortes de microorganismes dans les comprimés de Metformine 850 mg :

- Ø Dosage de Fungis (levures et moisissures) après cinq jours d'incubation à 22°C du produit dans un milieu saboraud. Le test est validé si Fungis $\leq 10^2$ cfu/g [10].
- Ø Dosage des germes aérobies totaux du produit dans un milieu TSA après cinq jours d'incubation à une température de 32°C [11].
- Ø Recherche E. Coli après 24 heures d'incubation du produit dans un milieu TSB à 32°C puis incubation dans un milieu BMC pendant vingt quatre heures enfin incubation dans GMC à 32°C ce qui inhibe la croissance d'autre bactérie excepte celle d'E. Coli. Le test est conforme si E. coli est absente dans 1g [12].

La chromatographie est une méthode de séparation des constituants présents dans des mélanges variés. Elle sert en analyse pour identifier et quantifier des composés au sein d'échantillons divers. Le principe de base repose sur les équilibres de concentration qui apparaissent lorsqu'un composé est mis en présence de deux phases non miscibles. Une, dite stationnaire, emprisonnée dans une colonne ou fixée sur un support et l'autre, dite mobile (liquide ou gaz), se déplace au contact de la première. Si plusieurs composés sont présents, ils se trouvent entraînés à des vitesses différentes, provoquant leur séparation [13].

Ce procédé hydrodynamique a donné naissance à une méthode analytique instrumentale qui a un très grand domaine d'application et par suite se trouve très répandue, notamment dans le domaine pharmaceutique [13].

Dans ce présent chapitre nous donnerons un aperçu général sur les différentes techniques chromatographiques, on s'accrochera sur la chromatographie liquide à haute performance et nous finirons par donner quelques paramètres importants lors de l'optimisation d'une méthode HPLC et l'importance de sa validation.

1. Techniques de séparation chromatographique

La classification des techniques chromatographiques se base soit sur la nature de la phase stationnaire ou de la phase mobile, soit sur le mécanisme utilisé pour la séparation [14]

La phase mobile peut être liquide (chromatographie en phase liquide), gaz (chromatographie en phase gazeuse) ou fluide (chromatographie en phase supercritique)

1.1. Classification selon le mécanisme de séparation

Selon le mécanisme de séparation, on peut distinguer plusieurs techniques chromatographiques :

Ø chromatographie d'adsorption (liquide-solide)

Repose sur des interactions entre le soluté et des sites actifs fixes d'un adsorbant solide finement divisé, utilisé comme phase stationnaire. Cette technique est principalement utilisée pour la séparation des espèces apolaires.

Ø chromatographie de partage (liquide-liquide)

Elle est comparable dans son principe à l'extraction par solvant. Elle est fondée sur la distribution des molécules de soluté entre deux phases liquides non miscibles selon leur solubilité relative. La phase stationnaire est un liquide fixe retenu par un support inerte

finement divisé. Cette technique chromatographique est utilisée pour la séparation des espèces non ioniques et polaires [15].

Ø Chromatographie d'exclusion stérique (SEC)

C'est une méthode de séparation dynamique des molécules en fonction de leur taille. Comme son nom l'indique, la séparation est basée sur l'exclusion des molécules à partir de l'espace poreux de la phase stationnaire en raison de leur encombrement stérique [16].

Lorsque les séparations se réalisent dans des solvants aqueux on parle de chromatographie par filtration sur gel. Lorsque les solvants sont non aqueux on parle de chromatographie par perméation de gel [15].

Ø Chromatographie d'échange d'ion

La chromatographie par échange d'ions repose sur la séparation des solutés ioniques ou ionisables basé sur la force de leurs interactions ioniques avec des groupes fonctionnels de la phase stationnaire. Le soluté et les groupes fonctionnels de la phase stationnaire possèdent des charges opposées, et la phase mobile est de même signe de charge que le soluté et donc en concurrence avec l'ion du soluté pour l'interaction avec la phase stationnaire [16].

Selon la charge du soluté on distingue deux type d'échangeur d'ion : cationiques si le soluté est de charge positive ou anioniques si le soluté est de charge négative.

1.2. Classification selon les procédés utilisés

Selon le procédé utilisé, on peut citer trois types de chromatographie :

- chromatographie sur colonne ;
- chromatographie sur papier ;
- chromatographie sur couche mince.

2. Chromatographie liquide à haute performance

La chromatographie liquide à haute performance est un type de chromatographie qui utilise une phase mobile liquide et une phase stationnaire très finement divisée. Pour obtenir un débit satisfaisant, il faut injecter l'éluant sous des pressions de plusieurs centaines de bars [17].

2.1. Avantages de la chromatographie liquide à haute performance

Parmi les avantages de cette technique, on peut citer [17,15]:

- Ø Efficacité, sélectivité et champ d'application étendu ;
- Ø Haute résolution ;

- Ø Séparation rapide ;
- Ø Ne nécessite que de petites quantité d'échantillon ;
- Ø Mesure quantitative précise ;
- Ø Répétabilité et reproductibilité des résultats pour une même colonne ;
- Ø Traitement des échantillons non volatils et thermiquement instable ;
- Ø Applicable aux ions inorganiques ;

2.2. Intérêt de la HPLC dans le contrôle qualité en industrie pharmaceutique

Dans l'industrie pharmaceutique moderne, la HPLC est l'outil majeur et partie intégrante d'analyse appliquée aux différentes phases du cycle de vie d'un médicament chimique ou biologique (découverte, développement et mise sur le marché) [18,16].

La HPLC occupe une place indétrônable dans le contrôle qualité des produits pharmaceutiques grâce aux nombreux intérêts qu'elle offre :

- Ø Identification et quantification des principes actifs et des impuretés;
- Ø Evaluation de l'uniformité de la dose et de la stabilité de la préparation lors du stockage;
- Ø Examiner la pureté et la qualité des préparations pharmaceutiques en particulier dans le cas où la chromatographie en phase gazeuse (CPG) est inappropriée en raison de sa stabilité thermique insuffisante ou de la faible volatilité des composants ;
- Ø Estimation précise de la composition qualitative et quantitative des produits pharmaceutiques multicomposants [18] ;
- Ø HPLC est utilisé dans le dosage et l'identification des liquides biologiques et des tissus ainsi que dans l'étude de leurs voies métaboliques et leur pharmacocinétique ;
- Ø Identification des différents excipients, des agents stabilisants et des agents conservateurs d'un médicament [19,20]
- Ø La grande sélectivité de la méthode permet le dosage des impuretés, des isomères et les produits de dégradation des produits pharmaceutiques [16,21].

2.3. Appareillage

Une installation HPLC tel que schématisé sur la figure 2 comporte divers modules spécialisés [17,14] :



Figure 2 : Schéma d'une installation HPLC [22].

- Ø système de pompage;
- Ø injecteur;
- Ø colonne chromatographique (éventuellement thermostatée);
- Ø détecteur;
- Ø un système d'acquisition des données (ou d'un intégrateur ou enregistreur).

La phase mobile, délivrée à partir d'un ou plusieurs réservoirs, circule à travers la colonne, généralement à débit constant, puis passe à travers le détecteur. Ces modules sont reliés entre eux par l'intermédiaire de canalisations de très faible diamètre interne (0,1 mm) pour assurer la circulation de la phase mobile [13,14].

2.3.1. Système de pompage

Les systèmes de pompage pour HPLC doivent fournir la phase mobile à un débit constant. Il convient de limiter autant que possible les fluctuations de pression, par exemple en faisant passer le solvant sous pression à travers un dispositif amortissant les pulsations. Les tubes et raccords doivent pouvoir résister aux pressions développées par la pompe. Les pompes pour HPLC peuvent être équipées d'un dispositif de purge qui permet de chasser les bulles d'air emprisonnées.

Les systèmes pilotés par microprocesseur sont capables de délivrer avec précision une phase mobile de composition constante (élution isocratique) ou variable (gradient d'élution), selon un programme défini. Pour les chromatographies à gradient d'élution, il existe des systèmes de pompage qui délivrent le(s) solvant(s) à partir de plusieurs réservoirs, le mélange pouvant être effectué soit en amont (basse-pression) soit en aval (haute-pression) de la (des) pompe(s).

2.3.2. Injecteurs

La solution à examiner est introduite dans la phase mobile circulante en tête de colonne, ou à proximité de celle-ci, à l'aide d'un système d'injection conçu pour fonctionner à pression élevée. Les injecteurs peuvent être à boucle fixe ou à volume variable, à fonctionnement manuel ou pilotés par un échantillonneur automatique. Le remplissage partiel des boucles, manuellement, peut entraîner une moindre fidélité du volume injecté.

2.3.3. Colonne chromatographique

La colonne se présente comme un tube, le plus souvent en acier inoxydable, dont la longueur et le diamètre intérieur présentent des différences selon les modèles [13,14]. La plupart des colonnes ont une longueur de 10 à 30 cm et un diamètre intérieur de 4 à 10 mm, avec des tailles particulières de 5 à 10 μm . ce type de colonne offre souvent de 40 000 à 60 000 plateaux théoriques par mètre [17].

La longueur de la colonne peut influencer non seulement sur la résolution d'une séparation donnée (le nombre de plateaux est d'autant plus grand que la colonne est longue) mais aussi sur la vitesse de la séparation. Souvent c'est ce dernier critère qui dicte le choix de la longueur de la colonne.

Les longueurs standard varient d'un fabricant à l'autre, mais les plus courantes sont de 300, 250, 150, 125, 100, 75 mm. Les colonnes les plus longues sont dites colonnes standards et les plus courtes colonnes rapides [15].

2.3.3.1. Classification des colonnes

Quatre caractéristiques distinctes pourraient être utilisées pour la classification des colonnes [16]:

- Ø Type (monolithique; poreuse ou non) ;
- Ø Géométrie (surface, volume des pores; diamètre des pores, la taille et forme des particules, etc) ;
- Ø Les interactions chimiques aux seins du garnissage de la colonne [23,24] (type de ligands liés, la densité de collage, etc) ;
- Ø Type de matériau de la phase stationnaire (silice; polymère; zircone; etc).

2.3.3.2. Caractéristiques de la colonne

Les paramètres qui permettent l'évaluation des performances d'une colonne sont les suivants :

2.3.3.2.1. Nombre de plateaux théorique N

La performance d'une colonne (efficacité apparente) peut être calculée à partir de données obtenues dans des conditions isothermes, isocratiques ou isodenses, selon la technique utilisée, en termes de nombre de plateaux (ou nombre apparent de plateaux théoriques) à l'aide de l'équation suivante :

$$N = 5.54 \left(\frac{t_R}{W_h} \right)^2 \quad (1)$$

N : nombre de plateaux théoriques ;

t_R : temps de rétention du pic correspondant au composant considéré ;

w_h : largeur du pic à mi-hauteur ;

t_R et w_h doivent être exprimés dans la même unité.

Le nombre de plateaux dépend de la nature de l'analyte, de la colonne et de sa température, de la nature de la phase mobile et du temps de rétention des analytes [14].

2.3.3.2.2. Hauteur Equivalente d'un Plateau Théorique (HEPT ou H)

Ce paramètre est calculé pour des composés de référence car il permet de comparer des colonnes de longueurs différentes, bien qu'il ne s'agisse en aucune façon d'une constante. Sa valeur dépend du composé choisi et des conditions de l'expérience.

La hauteur équivalente à un plateau théorique (HEPT) est donnée par la relation suivante [22]

$$H = \frac{L}{N} \quad (2)$$

L : longueur de la colonne ;

N : nombre de plateau théorique.

2.3.3.2.3. Résolution

La résolution est définie comme étant l'aptitude de la colonne à séparer deux solutés (1 et 2) donnant des pics voisins (Figure.3). Elle peut être calculée à l'aide de l'équation suivante :

$$R_s = 1.18 \frac{(t_{R2} - t_{R1})}{W_{h1} + W_{h2}} \quad (3)$$

$t_{R2} > t_{R1}$

t_{R1} , t_{R2} : temps de rétention des pics,

w_{h1} , w_{h2} : largeur des pics à mi-haut

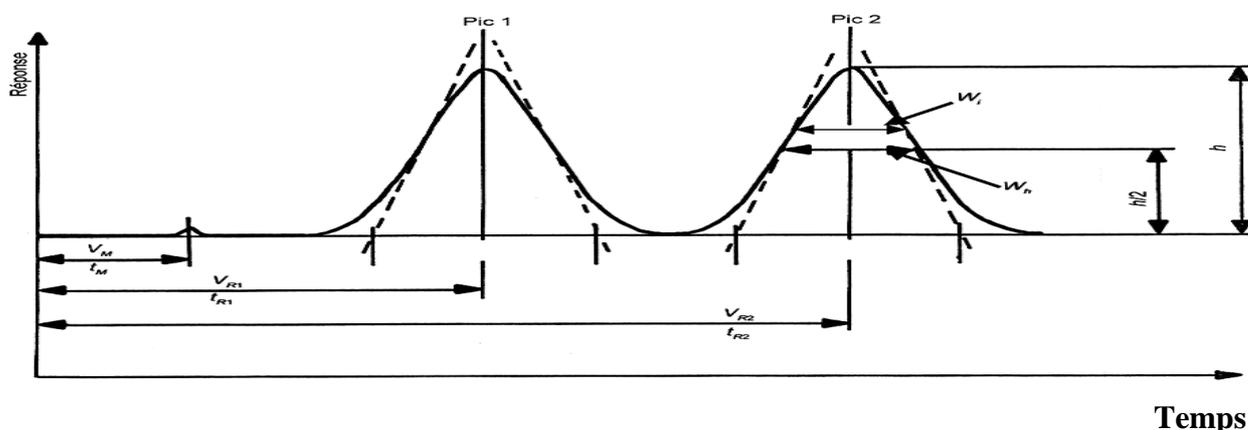


Figure 3 : Chromatogramme type [7].

2.3.3.3. La précolonne

La colonne est souvent précédée d'une précolonne, dite colonne de garde, courte (0,4 à 1 cm), remplie de la même phase stationnaire, ce qui sert à retenir certaines impuretés (figure 4). On augmente ainsi la durée de vie de la colonne principale en préservant ses performances. La phase stationnaire est retenue à chaque extrémité par un fritté d'acier inoxydable de porosité inférieure à $2 \mu\text{m}$ [11].

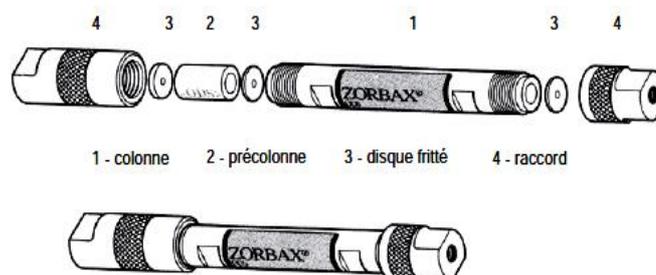


Figure 4 : Colonne standard et précolonne de HPLC [13].

2.3.4. Détecteurs

Les détecteurs les plus utilisés sont les spectrophotomètres dans l'ultraviolet/visible (UV/Vis), les détecteurs à barrette de diodes. La détection peut également reposer sur la fluorimétrie, la réfractométrie différentielle, des méthodes électrochimiques, la spectrométrie de masse, la dispersion de la lumière, la radioactivité.

Il existe d'autres spectrophotomètres à qui on fait jouer à la fois le rôle de détecteurs classiques (obtention du chromatogramme) et d'outils d'identification des espèces séparées, citons par exemple le couplage de la technique HPLC avec la spectrométrie de masse (CLHP/SM) ou avec la Résonance Magnétique Nucléaire (HPLC/RMN).

2.3.5. Phase stationnaire

La phase stationnaire est constituée de microparticules sphériques ou d'un solide poreux dont la surface au contact de la phase mobile atteint plusieurs centaines de m² par gramme, favorisant ainsi les mécanismes de partition avec les différents solutés présents [16].

De nombreux types de phases stationnaires sont utilisés citons : la silice (plus utilisé), l'alumine, des résines ou polymères à groupements acides ou basique et des supports chimiquement modifiés, préparés à partir de polymères, de silice ou de graphite poreux.

2.3.6. Phase mobile

Le choix et la préparation de la phase mobile est d'une grande importance vu qu'elle est le solvant et le vecteur de l'échantillon à analyser donc elle devrait être choisie et préparée en ayant une bonne compatibilité avec l'échantillon et le système.

Suivant un principe général, à une phase stationnaire polaire on oppose une phase mobile peu ou pas polaire et vice-versa. La chromatographie est dite en phase normale dans le premier cas et à polarité de phase inversée dans le second [13].

3. Optimisation d'une méthode HPLC

Réussir une bonne séparation des mélanges en un temps court par une méthode HPLC nécessite une optimisation de plusieurs paramètres.

La géométrie de la colonne, le débit, la température, la nature de la phase mobile et de la phase stationnaire sont des paramètres qui influent énormément sur le temps d'élution et la résolution en chromatographie.

Les objectifs de l'optimisation d'une méthode HPLC sont divers, les plus importants sont [25]:

- Ø Réduction du temps d'analyse ;
- Ø augmentation de la résolution entre les analytes ;
- Ø Réduction des coûts d'analyse;
- Ø Réduction des quantités de solvant ;
- Ø Augmentation de la durée de vie du matériel.

3.1. Choix de la température

Généralement, les colonnes HPLC sont portées à des températures d'environ 30°C. A cette température les colonnes s'affranchissent aux variations de température du laboratoire ainsi améliorent la reproductibilité des séparations. Selon les objectifs attendus, la température peut être diminuée ou augmentée :

3.1.1. Diminution de la température

A basse température, on aura :

- Ø une meilleure séparation des mélanges par conséquent une augmentation de la durée de vie de la colonne sera remarquable.
- Ø Des pics plus larges ;
- Ø un temps de rétention élevé ;
- Ø une augmentation de la sélectivité.

3.1.2. Augmentation de la température

Travailler à des températures de la colonne élevées est généralement l'option préférable, car cela nous permet de :

- Ø diminuer le temps de rétention ;
- Ø diminuer la pression de retour ;
- Ø améliorer l'efficacité ;
- Ø travailler à haute température facilite la diffusion des composés dans les deux phases d'où l'augmentation des vitesses de transfert entre la phase stationnaire et la phase mobile et donc, le nombre d'échanges. Le bénéfique se traduit alors par un gain de temps et des pic plus symétrique.

3.2. Choix du débit

Les colonnes HPLC à base de silice peuvent théoriquement accepter tout débit à condition de respecter une pression conforme.

L'efficacité de la colonne est directement liée au débit de la phase mobile comme le montre le graphe (Figure 5). La HEPT décroît puis remonte selon le débit en passant par un minimum pour lequel la colonne est plus efficace (nombre maximal de plateau théorique).

Il est donc préférable de travailler à un débit égal ou supérieur au débit optimal, de manière à garder la hauteur équivalente d'un plateau le plus petit possible et donc garantir un maximum d'efficacité.

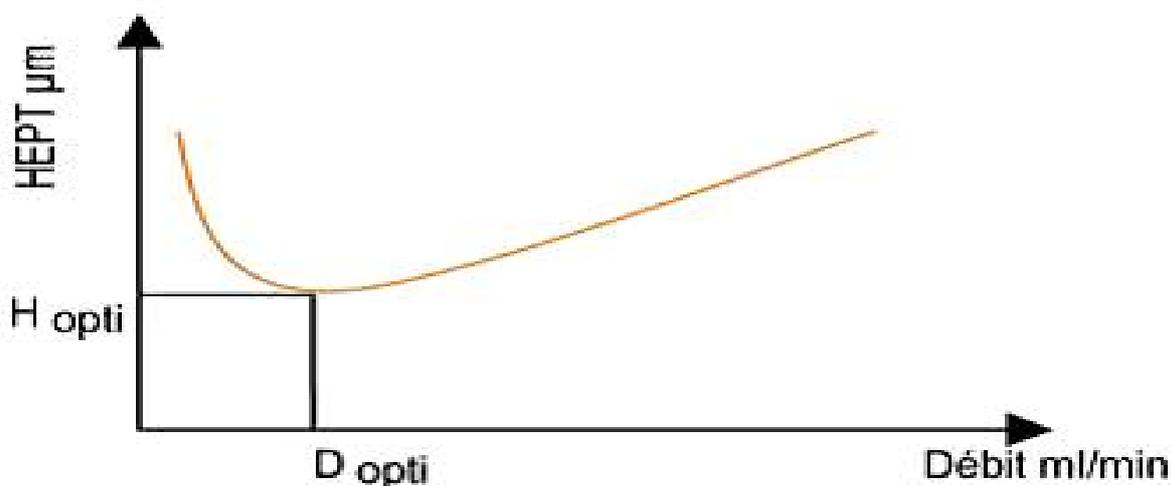


Figure 5 : Courbe de Van Deemter [22].

3.3. Optimisation d'une méthode HPLC et la conformité du système

Lors d'optimisation d'une méthode HPLC les différents éléments de l'appareillage doivent être qualifiés afin d'atteindre la performance requise pour la réalisation des analyses considérées.

Les essais de conformité du système font partie intégrante de la méthode. Ils visent à vérifier les performances du système chromatographique. Les paramètres généralement utilisés pour évaluer les performances de la colonne sont [14]:

- Ø l'efficacité apparente ;
- Ø le facteur de rétention (coefficient de distribution massique) ;
- Ø la résolution ;
- Ø la rétention relative ;
- Ø le facteur de symétrie.

4. Validation d'une méthode HPLC

En industrie pharmaceutique, l'interprétation des données issues des résultats de contrôle d'un produit pharmaceutique par HPLC ne serait fiable que si la méthode utilisée est valide, or toute valeur expérimentale est entachée d'une incertitude de mesure qui limite l'applicabilité de la méthode utilisée.

En effet, la validation d'une méthode de contrôle d'un médicament par HPLC garantit que chacune de ces mesures qui seront réalisées en routine avec cette méthode seront suffisamment proches de la vraie valeur [26].

La validation analytique d'une méthode HPLC repose sur l'étude de plusieurs paramètres (cf. chapitre III) conformément aux normes nationales et internationales.

La qualité des résultats d'analyse, outre la formation et l'expérience des analystes repose essentiellement sur la validité des méthodes d'analyses et la fiabilité de l'appareillage.

Dans l'industrie pharmaceutique, des études de validation sont fréquemment utilisées pour les méthodes analytiques, le matériel, les procédés de fabrications, le nettoyage etc.

La validation est une démarche qui démontre avec un degré de certitude et preuve à l'appui qu'une méthode ou procédé d'analyse atteignent les résultats escomptés de façon uniforme et continue.

La qualification de l'équipement ainsi que la formation et la qualification du personnel sont des prérequis avant la validation. Par la suite une assurance du maintien des performances du système sera systématiquement délivrée.

1. Définition de la validation

Le terme « validation » signifie l'établissement de la preuve, en conformité avec les principes de bonnes pratiques de fabrication , que la mise en œuvre ou l'utilisation de tout processus, procédure, matériel, matière première, article de conditionnement, produit, activité ou système permet réellement d'atteindre les résultats escomptés [27].

2. But de la validation

L'industrie pharmaceutique utilise des matériels chers, des installations et des équipements sophistiqués et du personnel qualifié. L'utilisation efficace de ces ressources est nécessaire pour le succès continu de l'industrie : il ne serait pas possible d'utiliser les équipements sans savoir s'ils produisent le médicament ayant les qualités requises. Les industries pharmaceutiques sont donc concernées par la validation, pour l'assurance de la qualité, la réduction des coûts et obéir aux autorités réglementaires. De plus, une étude détaillée, un contrôle du procédé de fabrication et une validation sont nécessaires pour diminuer les échecs et augmenter la productivité. Le terme de validation est notamment utilisé pour les procédés de fabrication, de nettoyage, les systèmes informatisés et les méthodes analytiques [28].

La validation des méthodes analytiques a pour principal objectif de s'assurer qu'une méthode analytique donnée fournit des résultats suffisamment fiables et reproductibles, compte tenu du but de l'analyse. Il faut donc définir correctement à la fois les conditions dans lesquelles la méthode sera utilisée et le but dans lequel elle sera employée. Ces principes s'appliquent à toutes les méthodes utilisées par un fabricant de produits pharmaceutiques, qu'elles soient ou non décrites dans une pharmacopée [29].

3. La validation analytique

La méthode d'analyse se définit comme étant la manière dont une analyse est réalisée. Chaque étape doit être décrite en détail. Il faut décrire notamment, mais non exclusivement, la préparation de l'échantillon, de l'étalon de référence et des réactifs, l'utilisation des appareils, la production de la courbe d'étalonnage, l'application des formules de calcul, etc. [30].

La démarche à suivre ne se limite pas à la production de procédures dont le suivi assure la traçabilité totale des résultats, Elle intègre également la qualification de l'appareillage utilisé, son suivi et surtout la validation de la méthode de dosage qui permet de prouver que cette méthode répond bien aux besoins pour lesquels elle a été développée, avec la possibilité de la transférer dans un autre laboratoire.

Ceci impose une caractérisation précise des critères de la méthode : Sélectivité, spécificité, exactitude, répétabilité, reproductibilité, linéarité, seuils de quantification et de détection, et robustesse. [29] Les méthodes doivent être validées ou revalidées [31] :

- Ø avant leur utilisation en routine ;
- Ø quand le Contrôle Qualité indique qu'une méthode établie change avec le temps ;
- Ø pour démontrer l'équivalence entre deux méthodes (par exemple, une nouvelle méthode et une méthode standard) [28] ;
- Ø en cas de modifications des conditions de validation de méthodes (par exemple, un instrument avec des caractéristiques différentes ou des échantillons avec une matrice différente).

4. Types de procédures analytiques à valider [30]

Parmi les procédures analytiques les plus courantes à valider citons :

- Ø Tests d'identification;
- Ø Les tests quantitatifs pour la teneur en impuretés ;
- Ø Tests limites pour le contrôle des impuretés ;
- Ø Tests quantitatifs du principe actif dans des échantillons de substance médicamenteuse ou produit pharmaceutique ou d'autre composant(s) choisi(s) dans le produit pharmaceutique.

4.1 Tests d'identification

Les tests d'identification sont effectués pour garantir l'identité d'un analyte dans un échantillon. Ceci est normalement réalisée par comparaison d'une propriété de l'échantillon

(par exemple, le spectre, le comportement chromatographique, une réactivité chimique, etc) à celle d'un standard (étalon) de référence;

4.2. Tests d'impuretés

Les tests d'impuretés peuvent être soit des tests quantitatifs ou test limite d'impureté, dans un échantillon. Chaque test reflète les caractéristiques de pureté de l'échantillon. Différentes Caractéristiques de validation sont nécessaires pour un test quantitatif que pour un test limite.

5. Critère de la validation

Les objectifs de la procédure analytiques doivent être clairement entendus c'est pourquoi on a régi des caractéristiques de validation (tableau 4) qui doivent être évaluées selon le type de la méthode analytique à valider.

- Ø Précision ;
 - Répétabilité ;
 - Précision intermédiaire ;
 - Reproductibilité.
- Ø Spécificité ;
- Ø Limite de détection ;
- Ø Limite de quantification ;
- Ø Linéarité ;
- Ø Gamme ;
- Ø Robustesse.

Tableau 4 : Tests de validation recommandés par les ICH.

Caractéristique		Type d'analyse			
		identification	Impureté		dosage
			quanti	Essai limite	
Exactitude		-	+	-	+
précision	Répétabilité	-	+	-	+
	Précision intermédiaire	-	+	-	+(1)
Spécificité (2)		+	+	+	+
Limite de détection		-	- (3)	+	-
Limite de quantification		-	+	-	-
Linéarité		-	+	-	+
Rang		-	+	-	+

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

(+) signifie que le test est à évaluer

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

(2) par défaut la spécificité d'une méthode analytique peut être compensé par d'autres tests.

(3) Le test peut être obligatoire dans certains cas.

5.1. Spécificité

La spécificité est la propriété qui fait qu'une méthode d'analyse rend compte sans ambiguïté de la substance analysée en présence d'autres composantes normalement présentes. Ces dernières peuvent inclure des impuretés, des produits de dégradation, la matrice, etc.

Si une méthode d'analyse est insuffisamment spécifique, cette déficience peut être compensée par la spécificité de l'une ou de plusieurs autres analyses complémentaires. Cette définition renvoie à plusieurs aspects :

Ø **Identification:** Il s'agit de vérifier l'identité de la substance analysée.

Ø **Pureté :** Il s'agit de vérifier si les analyses permettent de déterminer avec exactitude la teneur en impuretés de la substance analysée (recherche des substances apparentées, métaux lourds, résidus de solvants, etc.)

Ø **Dosage (teneur ou activité):** Il s'agit d'obtenir un résultat indiquant exactement la concentration ou l'activité de la substance analysée (teneur).

5.2. Exactitude

L'exactitude d'une méthode analytique exprime l'étroitesse de l'accord entre la valeur acceptée soit comme une valeur conventionnellement vraie ou d'une valeur de référence acceptée, et la valeur trouvée. Ce qui est parfois appelé la justesse.

5.3. La précision

La précision d'une méthode analytique exprime l'étroitesse de l'accord (degré de dispersion) entre une série de mesures obtenues à partir d'échantillonnage multiple du même échantillon homogène dans les conditions prescrites. La Précision peut être considérée à trois niveaux: répétabilité, précision intermédiaire et reproductibilité.

La précision doit être étudiée en utilisant des échantillons homogènes, et authentiques. Toutefois, si ce n'est pas possible d'obtenir un échantillon homogène, la précision peut être évaluée en utilisant des échantillons préparés artificiellement ou une solution d'échantillon.

La précision d'une méthode analytique est généralement exprimée comme une variance, écart-type ou un coefficient de variation d'une série de mesure.

5.3.1. La répétabilité

La répétabilité exprime la précision de l'analyse dans les mêmes conditions opératoires après un court intervalle de temps. La répétabilité est également appelée intra-dosage de précision.

5.3.2. La précision intermédiaire

La précision intermédiaire correspond aux variations survenant au sein du même laboratoire en variant les jours d'analyse, les analystes et les équipements, etc.

5.3.3. La reproductibilité

Reproductibilité exprime la précision entre différents laboratoires visant généralement la normalisation de la méthodologie.

5.4. Limite de détection

La limite de détection d'une méthode d'analyse individuelle correspond à la plus faible quantité d'analyte dans un échantillon que la méthode permet de détecter, mais pas nécessairement quantifiée en tant que valeur exacte.

5.5. Limite de quantification (limite de dosage)

La limite de dosage d'une méthode d'analyse individuelle correspond à la plus faible quantité de la substance analysée que la méthode permet de doser avec un degré acceptable de

précision et d'exactitude. La limite de dosage est un paramètre des analyses quantitatives des composés présents en faibles quantités dans les matrices d'échantillon ; elle est plus particulièrement utilisée dans le dosage des impuretés et (ou) des produits de dégradation.

5.6. La linéarité

La linéarité d'une méthode d'analyse est sa capacité dans une gamme donnée d'obtenir des résultats qui sont directement proportionnels à la concentration (quantité) de l'analyte dans l'échantillon.

5.7. La gamme

La gamme d'une méthode d'analyse est l'intervalle entre la concentration la plus élevée et la concentration la plus faible (quantités) de l'analyte dans l'échantillon pour lesquelles il a été démontré que la méthode d'analyse a un niveau approprié de précision, d'exactitude et de linéarité.

5.8. La robustesse

La robustesse d'une méthode d'analyse est une mesure de ses capacités de rester insensible à de petites variations apportées délibérément aux paramètres de la méthode ; elle fournit une indication de la fiabilité de la méthode aux conditions normales d'utilisation.

1. Matériels

Le matériel principal utilisé dans notre travail consiste en une Chaîne HPLC avec des colonnes échangeuses d'ions. En ce qui suit, nous donnerons un aperçu général sur les différentes parties de la chaîne HPLC ainsi que les caractéristiques des deux colonnes utilisées. Le différent matériel utilisé sera présenté dans ce chapitre.

1.1. Généralités sur le système HPLC Alliance

1.1.1. Les différents compartiments de La chaîne HPLC

Le module de séparations de l'alliance installé au niveau du laboratoire NNAPP est une plate-forme de gestion de solvants et d'échantillons intégrée. Cette intégration de deux éléments traditionnels de chromatographie liquide à haute performance simplifie l'exécution de toutes les séparations délicates.

Le module de séparations contrôle aussi [32] :

- Ø La programmation des méthodes ;
- Ø La composition des solvants ;
- Ø Le débit ;
- Ø Le lavage du joint de piston ;
- Ø Le lavage de l'aiguille ;
- Ø L'injection des échantillons ;
- Ø Le dégazeur intégré ;
- Ø Les évènements externes (coupures de courant...);
- Ø Le réchauffement de la colonne ;
- Ø Le réchauffement/refroidissement de l'échantillon.

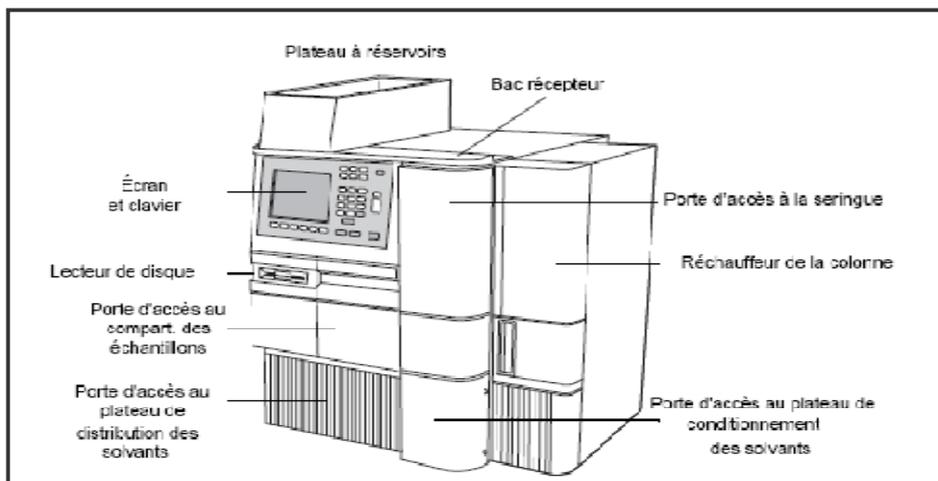


Figure 6: Module de séparation 2695 XE de waters (vue frontale) [33].

La chaîne HPLC Waters est dotée :

- Ø Système de gestion de solvant ;
- Ø Système de gestion des échantillons.

1.1.1.1. Système de gestion de solvant :

Les solvants contenus dans les réservoirs sont mélangés puis injectés dans le système de gestion des échantillons à un débit à faible dispersion et exempt de pulsations (Figure7)

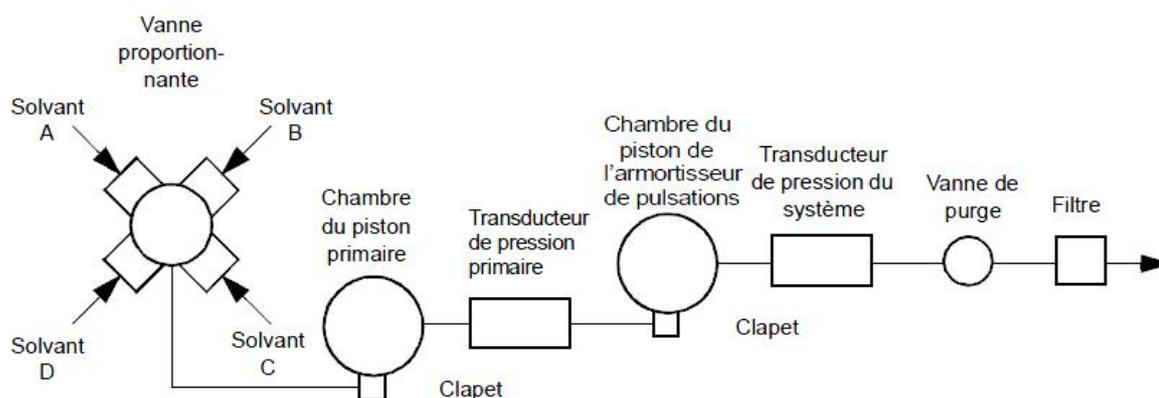


Figure 7 : Circuit fluide du système de gestion des solvants [33].

Ø Circulation de la phase mobile

La circulation de la phase mobile dans le système de gestion des solvants s'effectue comme suit:

- a. Le solvant est dégazé dans le réservoir par barbotage à l'hélium ou par mise sous vide.

- b. La vanne proportionnante mélange les solvants.
- c. Les solvants mélangés traversent le clapet d'entrée pour atteindre la chambre du piston primaire pendant que le piston de l'amortisseur de pulsations délivre du solvant sous pression au transducteur de pression du système.
- d. Juste avant que la chambre de l'amortisseur de pulsations ne se vide, le solvant présent dans la chambre du piston primaire est précomprimé à une pression légèrement inférieure à celle indiquée par le transducteur de pression du système.
- e. Lorsque la chambre du piston de l'amortisseur de pulsations est vide, le piston primaire délivre du solvant sous pression via le transducteur de pression primaire, remplit à nouveau la chambre du piston de l'amortisseur de pulsations puis délivre du solvant sous pression via le transducteur de pression du système tout en maintenant un débit constant dans le système. Le processus se répète à partir de l'étape c [33].
- f. Le transducteur mesure la pression de fonctionnement. Grâce à un algorithme, le logiciel compare la contre-pression primaire et la pression du système et régule l'étape de précompression pour équilibrer les pressions, ce qui permet d'obtenir un débit rigoureusement constant, sans pulsations ;
- g. L'acheminement du liquide se poursuit en passant du transducteur de pression à la vanne de purge puis à travers le filtre ;
- h. Ensuite, le solvant poursuit sa trajectoire dans le système de gestion des Echantillons. [33]

1.1.1.2. Système de gestion des échantillons

Le système de gestion des échantillons contient et positionne les flacons et injecte les échantillons dans le débit de solvant. Il est doté de cinq carrousels contenant chacun 24 flacons, ce qui équivaut à une contenance totale de 120 flacons conformes aux normes industrielles. Les carrousels exécutent une rotation pour se placer en station d'injection dans le compartiment des échantillons [33].

Ø Circuit d'écoulement

Le système de gestion des échantillons est doté de quatre vannes nommées V1 à V4 (Figure 8), qui contrôlent le débit de solvant, l'échantillon et le solvant de lavage de l'aiguille.

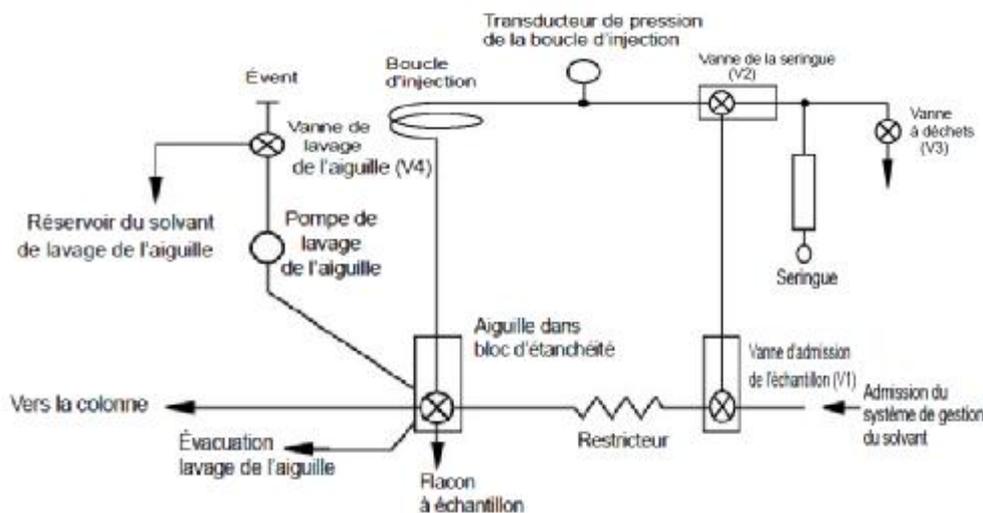


Figure 8 : Circuit fluide du système de gestion des échantillons [33].

Ø Dans le cas d'écoulement normal de la phase mobile

Au cours de l'écoulement normal, V1 est ouverte et le solvant injecté est divisé en deux flux différents :

- 95 % du solvant traverse V2, le transducteur de pression, la boucle d'échantillonnage et l'aiguille. L'orifice de l'aiguille est dégagé ce qui rend possible le passage du solvant qui traverse le bloc d'étanchéité et se dirige ensuite vers la colonne.
- Les 5 autres pour cent traversent le restricteur et le bloc d'étanchéité avant d'atteindre la colonne [33].

Ø Dans le cas d'injection de l'échantillon

L'injection s'effectue en trois étapes :

a. Isolement de la boucle d'échantillonnage de l'écoulement normal

V1, V2 et V3 se ferment tandis que V4 s'ouvre. La pompe de lavage se met en marche, l'aiguille se place au niveau du joint inférieur du bloc d'étanchéité, son orifice est alors obstrué. Ensuite, V2 et V3 s'ouvrent pour pressuriser la boucle d'échantillonnage.

b. Prélèvement de l'échantillon

V3 se ferme, la pompe de lavage s'arrête de fonctionner et l'aiguille pénètre dans le flacon. Le piston de seringue se déplace, ce qui permet de prélever l'échantillon du flacon et de l'entraîner dans la boucle d'échantillonnage. L'échantillon n'est pas aspiré dans la seringue.

c. Injection de l'échantillon

V2 se ferme tandis que V3 s'ouvre et l'orifice (latéral) de l'aiguille est dégagé pour pressuriser la boucle d'échantillonnage. V1 s'ouvre, permettant au solvant de reprendre son

écoulement normal. Le solvant entraîne l'échantillon en-dehors de la boucle d'échantillonnage, à travers l'aiguille puis dans la colonne. La seringue est se remet en position de repos et rejette le reste de solvant dans V3 qui se referme ensuite [33].

1.1.2. Détecteur Waters 2487 à doubles longueurs d'onde

Se compose d'un détecteur ultraviolet/visible (UV/Vis) programmable à deux canaux, conçus pour des applications en HPLC.

- Ø Le Détecteur Waters 2487 à doubles longueurs d'onde peut fonctionner soit en tant que module autonome (avec un enregistreur) soit en tant que module intégré à un système chromatographique [34].

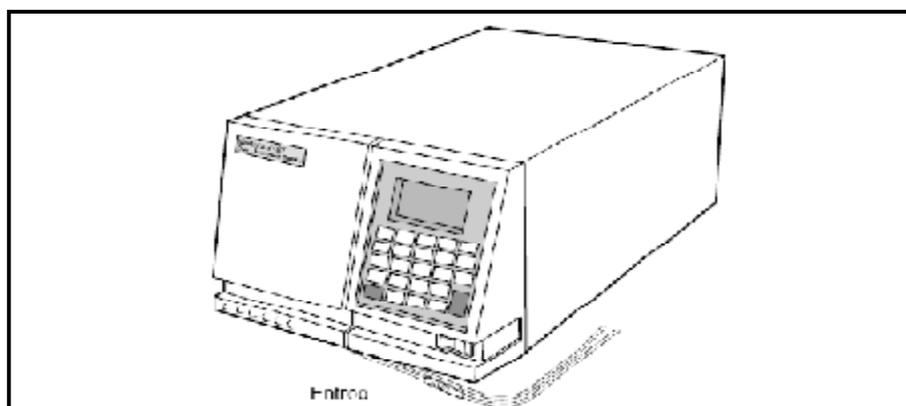


Figure 9 : Détecteur Waters 2487 à doubles longueurs d'onde [34].

1.1.3. Contrôle par le logiciel Empower 2

La chaîne HPLC Waters est pilotée par le système logiciel Empower version 2 de Waters comportant les éléments suivants :

- Ø instrumentation chromatographique;
- Ø Ordinateurs d'acquisition et de traitement de données chromatographiques ;
- Ø Logiciel Empower, une application logicielle 32 bits d'acquisition et de gestion de données dotée d'une architecture de bases de données intégrée et avancée.

Le système acquiert des informations chromatographiques, les traite, les gère et génère des rapports. Empower convertit des résultats précis de haute qualité en informations utiles, tout en respectant la réglementation en vigueur et les conditions requises de sécurité.

Le logiciel Empower 2 qui permet d'effectuer toute une série d'opérations qui aboutissent au résultat de l'analyse chromatographique du produit à savoir :

- Ø Des méthodes de pilotage HPLC (Instrument Method) ;
- Ø Des méthodes de traitement de chromatogramme (Processing Method) ;
- Ø Des méthodes d'édition de rapport d'analyse (Report Method) ;

1. 2. Colonne HPLC

Les colonnes HPLC utilisés dans ce travail sont échangeuses cationiques de type Nucleosil 10 SA remplies de la silice greffée par des groupements sulfonés [35].

Tableau 5 : Caractéristiques des colonnes 1 et 2

Colonne	Paramètres		
	Longueur (mm)	Diamètres interne (mm)	Porosité (µm)
Colonne 1	250	4.0	10
Colonne 2	150	4.6	5

1.3. Autre Equipements

Tableau 6 : Autre équipements utilisés pour le projet

Equipements de classe A	Equipements de classe B
Agitateur magnétique chauffant	pH mètre /Conductimètre Mettler Toledo
Bain Ultrasons Fisher Bioblock	Balance analytique Excellence Plus XP 205 DR/M.
Pompe à vide et compresseurs à membrane Fisher Bioblok	Etuve UNB200 Memmert

1.4. Matières premières et réactifs

- Ø Metformine 850 mg produit fini ;
- Ø Metformine HCl, Mélamine, Dicyandiamide (*Standards*) ;
- Ø Dihydrogenophosphate d'Ammonium $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$;
- Ø Acide phosphorique H_3PO_4 ;

- Ø Solution tampon pH 2, 4, 7, 10 ;
- Ø Eau ultra purifiée.

1.5. Verreries et autres

- | | |
|--|--|
| Ø Béchers, 20ml, 200ml, 1000ml ; | Ø Seringues 5ml ; |
| Ø Fioles, 20ml, 50ml, 100ml, 200ml, 1000ml ; | Ø Acrodisque LC, 0,45µm PVDF (Polyvinylidene Difluoride) ; |
| Ø Erlenmeyers, 5000ml ; | Ø Filtre GHP 0.45 µm. 47mm Ø ; |
| Ø Pipette graduée 5ml ; | Ø Poires ; |
| Ø Eprouvettes 1000ml, 2000ml ; | Ø Pissettes pour eau ; |
| Ø Mortiers en verre ; | Ø Pipettes en plastique pour ajustement ; |
| Ø Flacons HPLC (vials) ; | Ø Papier ; |
| Ø Spatules vibrantes ; | Ø Parafilm ; |
| Ø Barreaux magnétiques ; | Ø Gants et lunettes pour sécurité ; |
| Ø Micropipettes 10-100µl. | Ø Solution HCl à 37% ; |
| Ø Embouts pour micropipette 10-100µl ; | Ø Eau oxygénée à 10V |

2. Méthodes

2.1. Préparation de la solution tampon pH 3.00

Peser 34 g de $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$ dans un bécher de 200 ml compléter jusqu'à 150 ml avec l'eau purifié, placer un barreau magnétique et mettre sous agitation jusqu'à dissolution complète.

Mélanger la solution préparée précédemment dans 2 litres d'eau purifiée, et passer à la lecture du pH en ajustant le pH de la solution préparée à un $\text{pH } 3.00 \pm 0.02$ avec l'acide phosphorique, enfin filtrer la solution en utilisant un système de filtration avec un filtre GHP 0.45 µm. 47mm Ø [36].

2.2. Méthode de contrôle de produit fini Metformine 850 mg

La méthode principale utilisée dans ce travail est une méthode interne à Novo Nordisk destinée au contrôle du produit fini Metformine 850mg. La méthode est décrite dans la pharmacopée britannique (BP) développée par leur fournisseur en matière première. Elle possède deux parties principales :

A : Identification du principe actif (Metformine HCl) par rapport à un étalon

B : Identification et dosage des substances apparentées.

Pour ce qui concerne la partie optimisation (cf. chapitre V), aucun changement n'est nécessaire néanmoins, des changements seront apportés à la méthode selon les exigences de chaque test de validation (cf. chapitre VI).

Le mode opératoire de la méthode est décrit comme suit :

2.3. Préparation des solutions

Solution STD

Dissoudre 500 mg (475-0.525mg) de la Metformine HCl (étalon) dans 100 ml de phase mobile (solution mère). Prélever 1ml dans une fiole de 50 ml, ajuster avec la phase mobile. Diluer 1ml de la solution préparée dans 20 ml de phase mobile.

Solution 1

Dissoudre 545 mg (520-570 mg) de la Metformine 850mg produit fini dans 100ml de phase mobile (solution mère).

Solution 2

Dissoudre 20.0 mg (19.0 - 21.0 mg) de Dicyandiamide (1-cyanoguanidine) (étalon) dans 100 ml d'eau purifiée (solution mère).

Diluer 1ml de la solution préparée dans 200 ml avec la phase mobile.

Solution 3

Diluer 1ml de la solution 1 dans 50 ml de phase mobile, ensuite prélever 1 ml de cette dernière dans une autre fiole de 20 ml et ajuster avec la phase mobile.

Solution 4

Dissoudre 10 mg (9.5-10.5 mg) de la Mélamine (étalon) et 5 ml de la solution 1 dans 100 ml d'eau purifiée (solution mère).

Diluer 1ml de la solution dans une fiole de 50 ml et ajuster avec la phase mobile.

Conformité du système (Suitability test)

- Ø Injecter 20µl de la solution 2. Ajuster la sensibilité du système de manière à ce que la hauteur du pic principal sur le chromatogramme obtenu ne doit pas être inférieure ou égale à 50% de l'échelle d'enregistrement ;
- Ø Injecter 20µl de la solution 4 ;
- Ø Injecter séparément 20µl de la solution 3 et de la solution STD;
- Ø Injecter séparément 20µl des solutions 1, 2 et 3 pour les substances apparentées
Poursuivre l'acquisition jusqu'à deux fois le temps de rétention de la Metformine HCl.

1. Protocole d'optimisation de la méthode d'identification et dosage des impuretés et substances de dégradation de la Metformine (produit fini) :

Le travail qui sera effectué au cours de cette étude est l'optimisation de la méthode de contrôle classique de Metformine 850mg avec la technique HPLC. L'étude sera faite sur deux Colonne 1 et 2 (cf. Chapitre IV) de caractéristiques différentes en variant le débit de la phase mobile et la température de la colonne.

Les objectifs principaux de cette étude sont :

- Ø la réduction du temps d'analyse du produit fini de Metformine 850 mg donné par la colonne 1 (250* 4.0), actuellement estimé à 14 heures/lot ;
- Ø avoir une bonne résolution entre le principe actif Metformine HCl et la Mélamine dans la solution 4 décrite dans le (cf. Chapitre IV) ;
- Ø s'assurer de la conformité du système HPLC ;
- Ø Les résultats de l'étude d'optimisation sur la Metformine 850mg seront applicables pour le contrôle des autres dosages (Metformine 500 et 1000mg).

1.1.Prélèvement des échantillons de travail

Les boîtes de Metformine 850mg prélevées pour cette étude sont issues d'un lot précédemment contrôlé par le laboratoire contrôle qualité à NNAPP, approuvé et libéré par l'assurance qualité en conformité avec le cahier des charges.

1.2.La procédure de travail

Afin de réaliser cette étude, on utilise deux nouvelles différentes colonnes

Colonne 1 : elle est utilisée dans l'analyse de routine. On connaît le comportement de cette colonne à une température de 30°C et un débit de 1ml/min.

Colonne 2 : c'est la colonne réduite dont la longueur, le diamètre et la porosité sont modifiés (cf. chapitre IV)

On optimise la méthode de dosage et d'identification des substances apparentés de Metformine 850mg en utilisant les deux colonnes avec des débits et des températures différentes.

Les ajustements des paramètres de la colonne 2, des débits et des températures des deux colonnes sont en conformités avec les recommandations de ph. Eup et USP qui sont résumées dans le tableau 7.

Tableau 7: Variation des paramètres autorisés en vertu des exigences des pharmacopées (USP et EP)

Exigences		Ph.Eup	USP
Paramètres			
Débit		± 50 %	± 50%.
Paramètres de la colonne	granulométrie	réduction maximale de 50%. aucune augmentation n'est admise.	La granulométrie peut être réduite de 50%, mais ne peut pas être augmentée.
	longueur	± 70 %	± 70%
	diamètre interne (1)	± 25 %	Peut être ajusté si la vitesse linéaire est maintenue constante.
température		± 10 °C lorsque la température est spécifiée, sauf indication contraire.	La température de la colonne peut être ajustée de ± 10°C.

(1) Selon USP et ph. Eup lorsque les dimensions de la colonne sont modifiées, un ajustement du débit peut, si nécessaire, être effectué à l'aide de l'équation suivante :

$$F_2 = F_1 \frac{L_2 d_2^2}{L_1 d_1^2} \quad (4)$$

F₁: débit indiqué dans la monographie de Metformine, F₁=1ml/min

F₂ : débit ajusté, en ml/min à calculer

L₁ : longueur de la colonne indiquée dans la monographie, L₁=250mm

L₂ : longueur de la colonne utilisée; L₂=150mm

d₁ : diamètre interne de la colonne indiqué dans la monographie; d₁=4.0mm

d₂ : diamètre interne de la colonne utilisée ; d₂=4.6mm

Donc F₂≈0.8 ml/min.

Dans notre cas on a opté pour la variation du débit de ± 50% en prenant en considération la valeur F=0.8ml/ml

Les ajustements des caractéristiques de la colonne, du débit et de température tolérés pour cette étude sont résumés dans le **tableau 8**.

Tableau 8: Ajustements de l'étude

Paramètre	Ajustement
débit (ml/mn)	0,8 à 1,5
Température C°	± 10
Longueur (mm) / diamètre interne (mm)	Colonne 1:250 /4,0 Colonne 2:150/4.6
La taille des particules	Colonn1:10µm Colonne 2:5µm

1.3.Plan d'étude de l'optimisation

L'étude de l'optimisation sera effectuée en faisant varier les paramètres décrits dans le Tableau 8. Les tests seront effectués sur les deux colonnes 1 et 2 suivant le plan ci-après

Tableau 9 : Plan de l'étude

T(C°) F(ml/mn)	25	30	35	40
0.8	C1	C2	C3	C4
1.0	C5	C6	C7	C8
1.2	C9	C10	C11	C12
1.5	C13	C14	C15	C16

Tel que Ci : i : 1 —————>16 représente les résultats de l'étude à différentes combinaisons de température et de débit.

Ø Pour chaque combinaison, On prépare les solutions de la méthode décrites dans le chapitre IV.

1.4.Critères de sélection des modifications optimales

La sélection des modifications se fera en 4 étapes en se basant sur:

Etape 1 : Résultats de la Conformité du système

La performance du système HPLC est testée pour chaque colonne à une combinaison (T, F) donné. Les critères d'acceptation des performances du système sont décrits dans le tableau ci-dessus :

Tableau 10 : Critère d'acceptation des performances du système HPLC [9,39]

Parameters	Limits
R _S	>10 ⁽¹⁾
NPT _A	> 2000 Plateau théorique
K'	> 2
As	≤ 2

(1) En raison de la diminution de la résolution lors des tests de contrôle, la résolution de la colonne doit être optimale, ce qui nous donnera une durée de vie raisonnable, tout en ayant le temps de rétention le plus court possible.

Etape 2 : Calcul de pourcentage d'impureté de Metformine 850mg [38]:

Après chaque test, on calcule le pourcentage d'impureté de Dicyandiamide, pourcentage d'autres impuretés individuelles non identifiés par la méthode et pourcentage d'impureté totale. Le **tableau 11** donne les critères d'acceptation concernant le pourcentage d'impuretés toléré par la méthode

Le calcul du pourcentage de Dicyandiamide est donné par les formules suivantes:

$$\% \text{ Dicyandiamide} = \frac{\text{surface de DCDA Solution 1}}{\text{surface de DCDA Solution 2}} \times 0.02 \times \text{CEch} \times \text{C STD} \quad (5)$$

C Ech : correction échantillon ;

C STD : correction Standard (Dicyandiamide) ;

Prise d'essai échantillon théorique = 545.00mg

Prise d'essai STD (dicyandiamide) théorique = 20mg

$$\text{C Ech} = \frac{\text{Prise d'essai échantillon réelle}}{\text{Prise d'essai échantillon théorique}} \quad (5.1)$$

$$\text{C STD} = \frac{\text{Prise d'essai STD réelle}}{\text{Prise d'essai STD théorique}} \times \frac{\text{Titre STD}}{100} \quad (5.2)$$

Titre STD (Dicyandiamide) = 99.9%

Tableau 11 : Critère d'acceptation du pourcentage d'impureté de Metformine 850mg [9]

Impuretés	Critères d'acceptation (%)
Dicyandiamide	≤ 0.02
Autres impuretés	≤ 0.1
Impuretés totale	≤ 1.0

Le calcul du pourcentage des impuretés de Metformine se fait avec une feuille Excel verrouillée (on ne peut pas changer de paramètre ou modifier un résultat).

Etape 3 : Suivi de pression

Il est recommandé de travailler à des pressions portées au dessous de la pression limite de l'équipement (5000 psi) car l'augmentation de pression limite la durée de vie de la colonne et surtout provoque une usure prématurée des joints haute pression de la pompe. C'est pourquoi un suivi de pression en fonction du débit est envisagé en ayant comme limite d'acceptation une pression qui ne dépasse pas les 2000 psi.

Etape 4 : Temps de rétention

On s'intéresse au temps de rétention de la Metformine HCl (principe actif) parce qu'elle est l'analyte le plus retenu par la phase stationnaire.

On prend comme référence les résultats de la colonne 1 à une température de 30°C et un débit de 1ml/min vu qu'on cherche à réduire son temps de rétention.

La combinaison qui sera choisie, doit donner un temps de rétention réduit et possède le meilleur profil de la résolution entre les impuretés et le principe actif.

2. Résultats et discussions de la partie optimisation

Les résultats obtenus dans la partie optimisation seront discutés en se référant aux exigences préétablies dans le protocole.

2.1.Résultats de la conformité du système (system Suitability Test ou SST)

Les résultats de la colonne 1 et la colonne 2 sont regroupés dans les **tableaux 12 et 13** respectivement.

Tableau 12 : Résultats de la conformité du système colonne 1 (250*4.0)

N°	Paramètres étudiés				Observations
	Rs >10	K' > 2	As ≤ 2	NPT _A > 2000	
C1	22.30758	112.700449	0.9367467	4427.137	Résultat conforme
C2	23.12534	125.657614	0.8386380	4746.172	Résultat conforme
C3	22.19423	108.256528	0.9253844	4689.826	Résultat conforme
C4	21.77815	92.994923	0.8818621	4749.094	Résultat conforme
C5	21.56026	104.311560	0.7830377	4069.154	Résultat conforme
C6	20.76118	82.659641	0.8458386	4207.049	Résultat conforme
C7	19.51818	57.506204	0.9482015	4064.364	Résultat conforme
C8	21.40836	66.675581	1.056762	4553.738	Résultat conforme
C9	19.91436	73.370843	0.8588013	3658.860	Résultat conforme
C10	19.91356	64.628603	0.9201673	3869.582	Résultat conforme
C11	20.02408	55.985406	0.8906627	4029.670	Résultat conforme
C12	19.74822	49.382864	0.8435978	4271.990	Résultat conforme
C13	19.05371	55.080217	0.8299969	3243.087	Résultat conforme
C14	19.32498	48.958736	0.9121659	3535.631	Résultat conforme
C15	18.90188	43.245542	0.8470700	3650.151	Résultat conforme
C16	18.81306	37.939978	0.8370373	3845.302	Résultat conforme

Tableau 13 : Résultats de la conformité du système colonne 2 (150*4.6)

N°	Paramètres étudiés				Observations
	Rs >10	K' > 2	As ≤ 2	NPT _A > 2000	
C1	23.41823	53.824656	1.537455	5569.970	Résultat conforme
C2	27.29370	74.497158	1.454289	6534.727	Résultat conforme
C3	26.95766	63.049266	1.405160	7010.741	Résultat conforme
C4	26.33057	53.150096	1.357941	7351.392	Résultat conforme
C5	25.19429	59.096598	1.446559	5624.157	Résultat conforme
C6	25.46357	51.472698	1.435173	6049.546	Résultat conforme
C7	25.09629	42.854177	1.395232	6411.357	Résultat conforme
C8	24.50477	36.927389	1.344134	6882.342	Résultat conforme
C9	23.63782	42.624743	1.440129	5184.434	Résultat conforme
C10	23.84106	37.480512	1.394721	5725.840	Résultat conforme
C11	23.66250	32.587831	1.446757	6021.631	Résultat conforme
C12	23.26231	28.183153	1.344358	6392.633	Résultat conforme
C13	22.24885	30.316043	1.541204	4805.659	Résultat conforme
C14	22.39103	26.987631	1.413433	5219.431	Résultat conforme
C15	22.24330	23.880414	1.349166	5586.617	Résultat conforme
C16	21.66889	20.930738	1.314629	5866.657	Résultat conforme

Ø Discussion des résultats du SST

D'après les deux **tableaux 12 et 13** on constate que tous les paramètres de la conformité du système des deux colonnes sont conformes.

Les résolutions obtenues par la colonne 2 sont très acceptables, elles sont supérieures à 10 et même dépassent celles trouvées dans la colonne 1. Donc ces paramètres excepte la

résolution ne seront pas trop considérés lors du choix de la meilleure combinaison étant donné qu'ont est conforme aux exigences de notre protocole.

2.2. Calcul de pourcentage d'impuretés dans la solution 1

Les données brutes utilisées dans le calcul du pourcentage d'impureté dans la solution 1 sont regroupées dans les **tableaux 14 et 15** correspondant aux résultats de pesées et de surface trouvés pour la colonne 1 et 2 respectivement.

Tableau 14 : Données brutes utilisées dans le calcul du pourcentage d'impuretés (colonne 1)

N° combinaison	Pesée réelle DCDA (mg)	Pesées réelle échantillon (mg)	Surface de DCDA dans la solution 1	Surface de DCDA dans la solution 2
C1	20.03	545.00	39171	211817
C2	20.09	545.06	48111	221609
C3	20.09	545.06	60036	221391
C4	20.09	545.06	50469	224014
C5	20.00	545.00	35053	377785
C6	20.00	545.00	42901	174545
C7	20.00	545.17	44468	183737
C8	20.00	545.08	41435	160225
C9	20.03	545.00	40509	152099
C10	20.03	545.00	39118	155341
C11	20.00	545.00	40631	150587
C12	20.00	545.00	38693	154670
C13	20.00	545.00	30972	118498
C14	20.00	545.00	33963	122915
C15	20.00	545.00	31427	120799
C16	20.00	545.00	42478	121007

Tableau 15 : Données brutes pour le calcul du pourcentage d'impuretés (colonne 2)

N° combinaison	Pesée réelle DCDA (mg)	Pesées réelle échantillon (mg)	Surface de DCDA dans le sol 1	Surface de DCDA dans la sol 2
C1	20.02	545.12	90142	214889
C2	20.01	545.06	62583	221123
C3	20.01	545.06	68533	218854
C4	20.01	545.06	56508	214704
C5	20.01	545.06	43099	174348
C6	20.01	545.06	41150	180068
C7	20.01	545.06	51183	173746
C8	20.01	545.06	44921	173537
C9	20.01	545.06	37452	143488
C10	20.01	545.06	36555	292111
C11	20.02	545.12	37169	143694
C12	20.02	545.12	37552	143418
C13	20.02	545.12	28546	113819
C14	20.02	545.12	29859	114961
C15	20.02	545.12	29675	115660
C16	20.02	545.12	27667	119368

Remarque

La formule (6) donnée dans le protocole de l'optimisation est utilisée pour le calcul du pourcentage d'impuretés.

Exemple de calcul

Soit à calculer pourcentage de Dicyandiamide de la solution 1 obtenue avec la combinaison C1 (1 ml/min, 25°C) en utilisant la colonne 1.

$$\% \text{ Dicyandiamide} = \frac{39171}{211817} \times 0.02 \times CEch \times C \text{ STD}$$

$$C \text{ Ech} = \frac{545.00}{545.00}$$

$$C \text{ STD} = \frac{20.03}{20.00} \times \frac{99.9}{100}$$

Titre STD (Dicyandiamide) = 99.9%

% dicyandiamide = 0.0037004 ≈ 0.004

Les résultats obtenus après calcul du pourcentage d'impuretés de la colonne 1 et 2 sont regroupés dans les **tableaux 16 et 17** respectivement.

Tableau 16 : Résultats du pourcentage d'impureté calculés (colonne 1)

N°	% impuretés			Observations
	% Dicyandiamide ≤0.2	% Autres impuretés ≤ 0.1	% Impuretés totale < 1.0 %	
C1	0.004	<0.1	0.017	Résultat conforme
C2	0.004	<0.1	0.019	Résultat conforme
C3	0.005	< 0.1	0.031	Résultat conforme
C4	0.005	< 0.1	0.024	Résultat conforme
C5	0.004	< 0.1	0.022	Résultat conforme
C6	0.005	< 0.1	0.018	Résultat conforme
C7	0.005	<0.1	0.025	Résultat conforme
C8	0.005	< 0.1	0.025	Résultat conforme
C9	0.005	<0.1	0.014	Résultat conforme
C10	0.005	< 0.1	0.016	Résultat conforme
C11	0.005	< 0.1	0.017	Résultat conforme
C12	0.005	< 0.1	0.019	Résultat conforme
C13	0.005	< 0.1	0.010	Résultat conforme
C14	0.006	< 0.1	0.014	Résultat conforme
C15	0.005	<0.1	0.015	Résultat conforme
C16	0.007	< 0.1	0.013	Résultat conforme

Tableau 17 : Pourcentage d'impureté calculé pour la colonne 2

N°	% impuretés			Observations
	% Dicyandiamide ≤0.2	% Autres impuretés ≤ 0.1	% Impuretés totale <1.0 %	
C1	0.008	< 0.1	0.012	Résultat conforme
C2	0.006	< 0.1	0.041	Résultat conforme
C3	0.006	< 0.1	0.038	Résultat conforme
C4	0.005	< 0.1	0.041	Résultat conforme
C5	0.005	< 0.1	0.016	Résultat conforme
C6	0.005	< 0.1	0.017	Résultat conforme
C7	0.006	< 0.1	0.019	Résultat conforme
C8	0.005	<0.1	0.020	Résultat conforme
C9	0.005	< 0.1	0.012	Résultat conforme
C10	0.005	< 0.1	0.021	Résultat conforme
C11	0.005	< 0.1	0.019	Résultat conforme
C12	0.005	< 0.1	0.021	Résultat conforme
C13	0.005	<0.1	0.012	Résultat conforme
C14	0.005	< 0.1	0.017	Résultat conforme
C15	0.005	<0.1	0.021	Résultat conforme
C16	0.005	< 0.1	0.019	Résultat conforme

Les pourcentages d'impuretés des deux colonnes sont conformes aux exigences de la méthode de contrôle du produit fini.

2.3.Résultats du suivi de pression de la colonne 1 et colonne 2

Les pressions maximales atteintes pendant les tests d'optimisation des deux colonnes, sont notées et mentionnées dans le **tableau 18**.

Tableau 18 : Suivis de pression des deux colonnes 1 et 2

N° combinaison	Pression colonne 1 (psi)	Pression colonne 2 (psi)
C1	1050	1340
C2	900	1240
C3	843	1160
C4	806	1080
C5	1300	1650
C6	1120	1750
C7	1000	1640
C8	923	1530
C9	1500	1990
C10	1340	2130
C11	1980	1980
C12	1250	1850
C13	1850	2450
C14	1670	2640
C15	1590	2460
C16	1590	2320

A partir des deux graphes (**figure 10, 11**) on constate que la pression augmente avec le débit. La pression notée pour un débit de 1.5ml/min dépasse les 2000 psi pour la colonne 2 et approche les 2000psi pour la colonne 1, ce qui est désavantageux pour la durée de vie de la colonne et pour les joints haute pression de la pompe sans oublier que la pression peut augmenter à cause d'une légère obturation de la colonne due aux sels de la solution tampon, et cela peut engendrer un arrêt du système et donc il faudra refaire l'analyse à cause de cet incident.

Nous avons noté que la pression nécessaire pour atteindre un débit précis à une température donnée est différente d'une colonne à une autre. La pression est plus grande en utilisant la colonne 2 et cela est dû à la différence de granulométrie des phases stationnaires (plus petite dans la colonne 2).

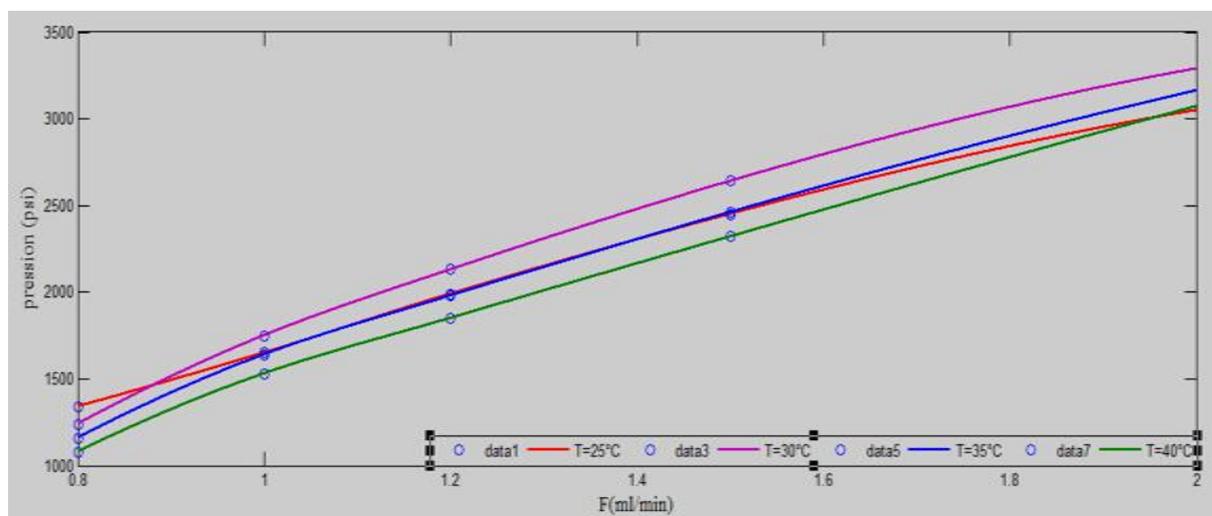


Figure 10 : Graphe de la variation de la pression en fonction du débit pour la colonne 2

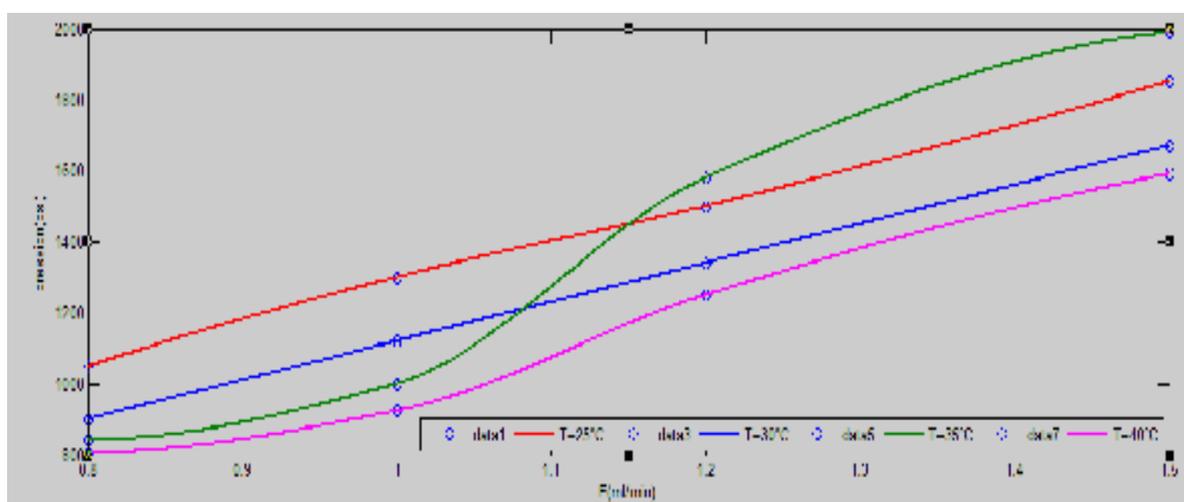


Figure 11: Graphe de suivi de pression en fonction du débit colonne 1

Conclusion

La pression nécessaire à l'obtention d'un débit quelconque est inversement proportionnelle à la granulométrie de la phase stationnaire.

Toutes les combinaisons ayant un débit de 1.5ml/min sont à éviter malgré le temps de rétention de la Metformine HCl qui est très satisfaisant (**tableau 19**).

2.4.Résultats des temps de rétention

Les temps de rétentions de différents analytes (Metformine HCl, Dicyandiamide, Mélamine) injectés sont regroupés dans **le tableau 19**.

Tableau 19 : Temps de rétention de la Metformine HCl colonne 1 et colonne 2

N°	Temps de rétention des pics (mn)					
	Colonne 1			Colonne 2		
	Metformine HCl (sol STD)	DCDA (sol 2)	Mélatamine (sol 4)	Metformine HCl (sol STD)	DCDA (sol 2)	Mélatamine (sol 4)
C1	68.220	3.712	14.203	32.895	2.953	7.895
C2	75.995	3.712	15.576	45.268	2.966	9.503
C3	65.554	3.670	14.344	38.430	2.937	8.744
C4	56.397	3.631	13.258	32.490	2.909	8.083
C5	63.187	3.001	12.518	36.058	2.390	7.490
C6	50.196	2.965	11.087	31.484	2.368	6.988
C7	35.104	2.899	8.878	26.313	2.344	6.415
C8	40.605	2.900	9.875	22.756	2.324	6.015
C9	44.623	2.476	9.315	26.175	1.985	5.775
C10	39.377	2.448	8.694	23.088	1.969	5.428
C11	34.191	2.426	8.030	20.153	1.952	5.064
C12	30.230	2.403	7.567	17.510	1.937	4.752
C13	33.648	1.979	7.075	18.790	1.585	4.333
C14	29.975	1.960	6.662	16.793	1.574	4.087
C15	26.547	1.943	6.272	14.928	1.560	3.870
C16	23.364	1.924	5.917	13.158	1.549	3.680

N.B : Le temps de rétention donné par la combinaison C6 (1ml/min, 30°C) coloré en vert (**tableau19**) est considéré comme référence.

2.4.1. Temps de rétention à un débit de 0.8ml/ml

L'histogramme de la figure 12 représente le temps de rétention de la Metformine HCl à un débit de 0.8ml/min en variant la température. Ces temps de rétentions sont ceux obtenus par l'utilisation de la colonne 1. L'histogramme montre que la diminution du débit engendre un temps de rétention élevé selon la température de la colonne.

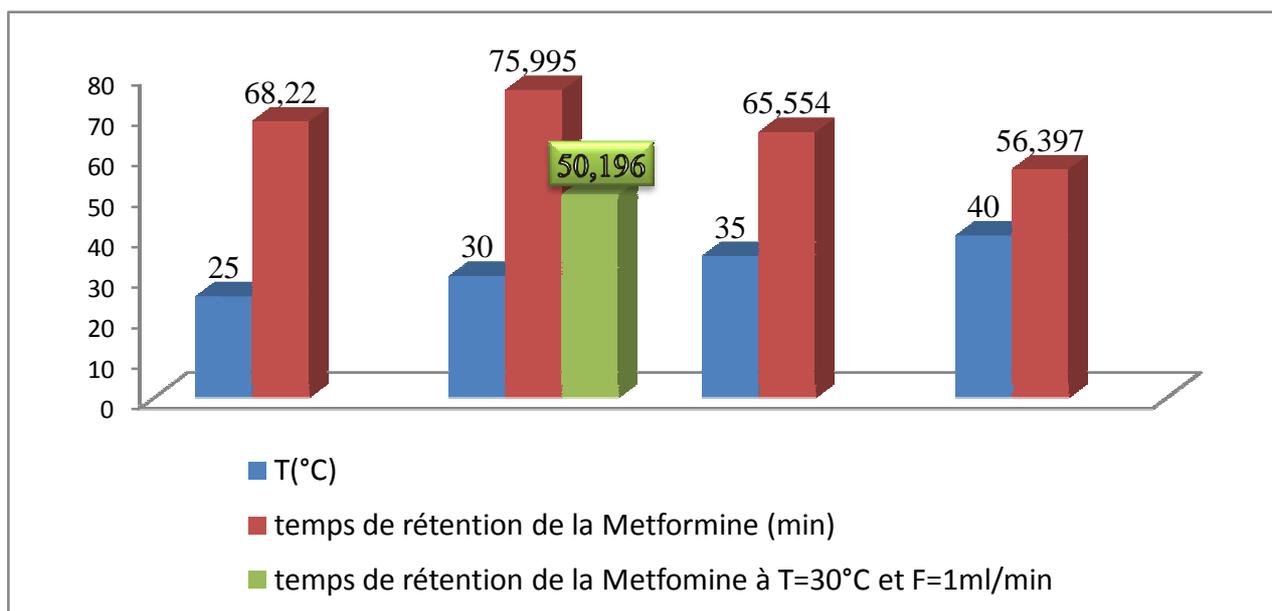


Figure 12 : Temps de rétention de Metformine HCl à un débit de 0.8 ml/min (colonne 1)

Conclusion

- ∅ La diminution du débit n'est pas recommandée dans notre cas puisque le temps de rétention observé est élevé chose qui est contradictoire à nos objectifs.
- ∅ Jusqu'à maintenant, on a éliminé toutes les combinaisons à un débit de 0.8ml/min et 1.5ml/min.

Les combinaisons possibles restantes sont : C5, C6, C7, C8, C9, C10, C11, C12.

2.4.2. Choix de la colonne et de la combinaison de travail

2.4.2.1. Choix de la colonne

Les histogrammes de la (figure 13,14) montrent que l'utilisation d'une colonne plus courte (colonne 2) avec des températures et des débits différents (C5 à C12) nous permet de :

- ∅ Diminuer le temps de rétention de la Metformine HCl ;
- ∅ Augmenter la résolution de la colonne.

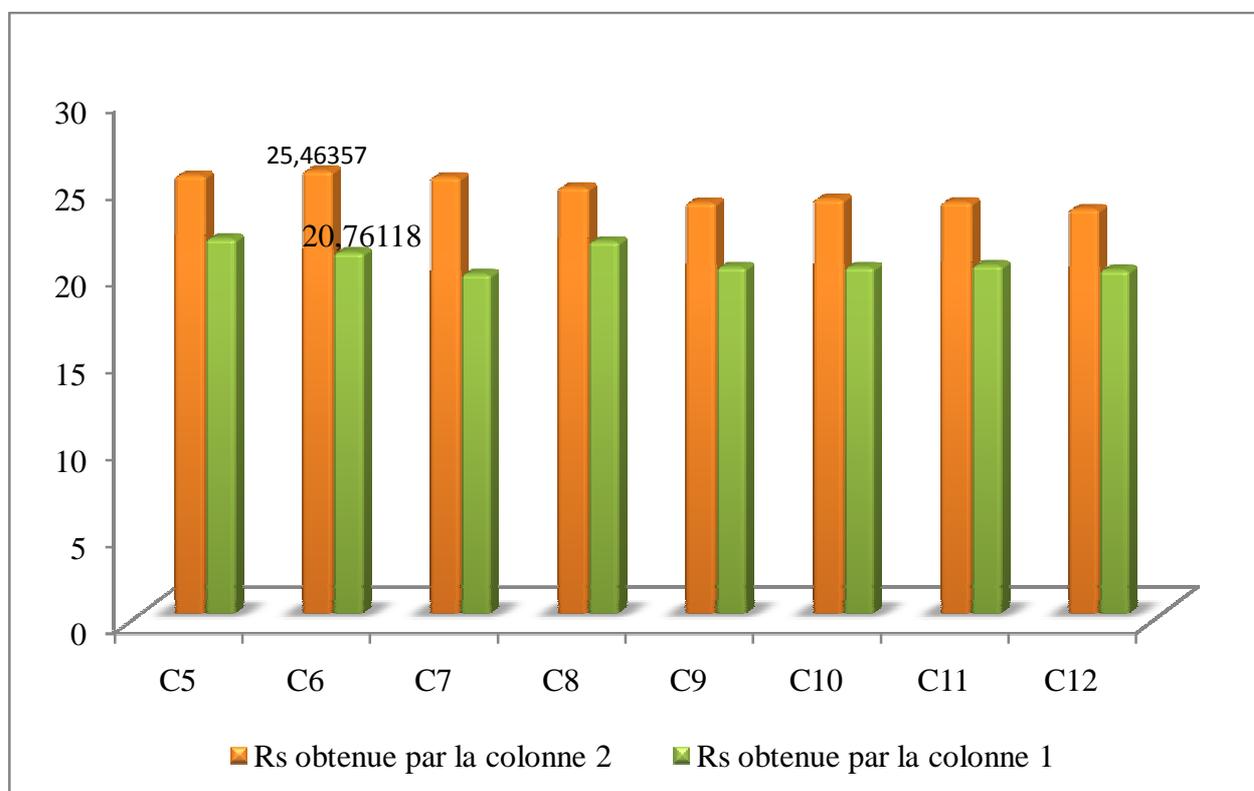


Figure 13 : Résolution obtenues par les colonnes 1 et 2

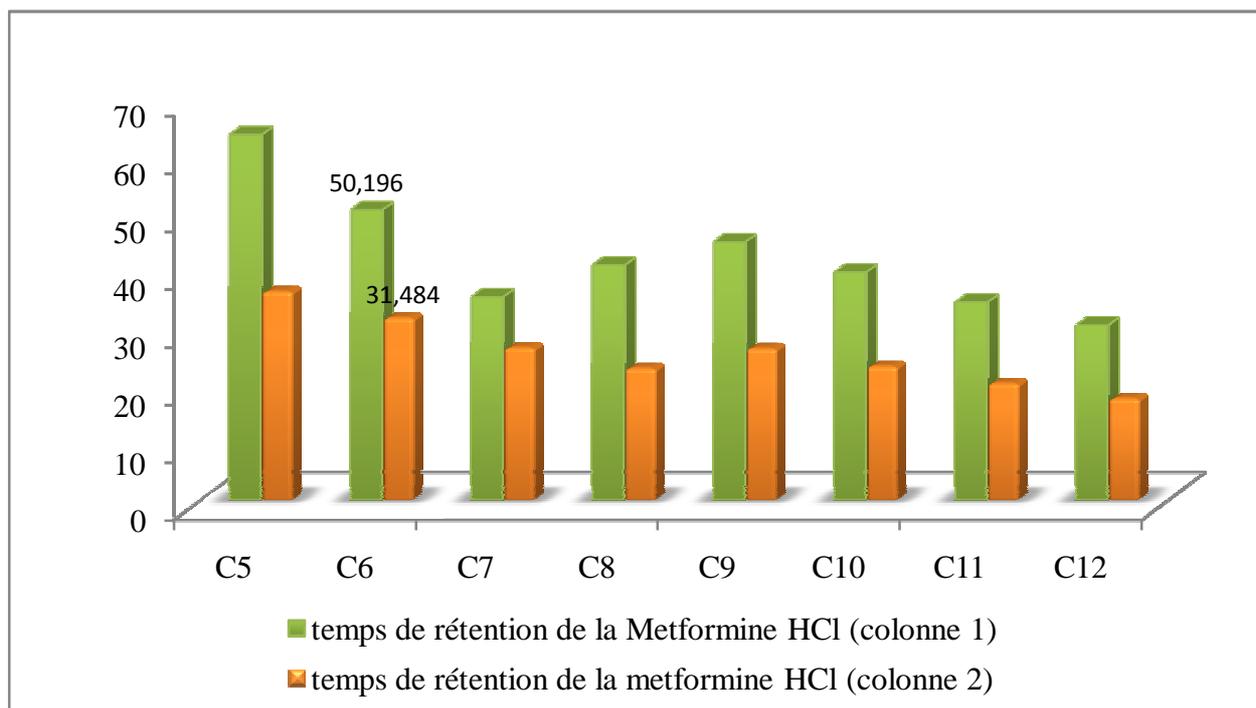


Figure 14 : Temps de rétention de la Metformine HCl (colonne 1 et colonne 2)

2.4.2.2.Choix de la combinaison

La combinaison C12 (1.2ml/min, 40°C) a donné le meilleur profil du temps de rétention (**figure 14**) quoique la combinaison choisie soit la C6 (1ml/min, 30°C) pour les raisons suivantes :

- Ø La combinaison C6 est celle qui a donné le meilleur profil de résolution, ce qui veut dire une plus grande durée de vie de la colonne durant son utilisation (**Figure13**) ;
- Ø Avec l'augmentation de la température on risque d'altérer la phase stationnaire de la colonne et de causer des variations de pH de la phase mobile, ce qui influe négativement sur les contrôles du produit fini (apparition d'impuretés inattendues) ;
- Ø La durée de vie de la colonne n'est pas estimée à des conditions de températures et de débit différent de la combinaison (1ml/min, 30°C) ;
- Ø Le temps de rétention de la Metformine HCl donné par les autres combinaisons n'est pas trop loin de celui trouvé par la combinaison C6.

Conclusion

L'étude d'optimisation de la méthode avec les colonnes 1 et 2 a prouvé que la réduction de la taille de la colonne de 60 % à diminuer le temps de rétention du principe actif de 37.3% avec une augmentation de la résolution de 21.37% sans prendre le risque d'augmenter la température et/ou le débit qui pourrait être un choix défavorable dans l'avenir.

A cet effet, prendre le moindre risque par la variation d'un seul paramètre chromatographique à savoir la taille de la colonne a été le choix retenu après concertation avec l'ensemble des responsables du département qualité.

La validation analytique sera effectuée à travers ce changement.

1. Protocole de validation de la méthode de contrôle de Metformine 850mg

Une validation analytique de la méthode de dosage et d'identification des substances apparentées de Metformine 850 mg fera l'objet de ce présent chapitre. Cette validation est envisagée suite au changement apporté à la méthode (changement de la colonne HPLC).

La validation comprend les paramètres suivants:

- Ø Spécificité/ stabilité ;
- Ø Précision ;
 - Répétabilité ;
 - Précision intermédiaire ;
- Ø Linéarité ;
- Ø Exactitude ;
- Ø Limite de détection (LD) ;
- Ø Limite de quantification (LQ).

1.1. Validation

La validation est effectuée selon ce présent protocole et les analyses sont réalisées selon la procédure analytique spécifique à NNAPP (cf. chapitre IV).

1.2. Définition des tests de validation

1.2.1. Spécificité

Afin de confirmer la spécificité de la méthode, la séparation entre la Metformine HCl et la Dicyandiamide est à évaluer.

La préparation des solutions est décrite ci-après :

- Ø Préparer la solution STD et la solution 2 selon la méthode décrite dans le chapitre IV
- Ø **Préparation de la solution STD chargé de DCDA**
 - Dissoudre 500mg (475-525mg) de Metformine HCl dans une fiole de 100ml, ajuster avec la phase mobile, diluer 1ml dans 50ml de phase mobile ;
 - Dissoudre 20mg de Dicyandiamide dans une fiole 100ml de l'eau ultra purifiée. Diluer 1ml dans une fiole de 200ml, ajouter 10ml de la dernière dilution de la solution STD
- Ø Injecter le blanc, la solution2, STD (non chargé de DCDA), la solution STD chargée de DCDA.

Ø Rationnel

Les chromatogrammes individuels : solution 2 et solution STD sont utilisés afin d'identifier leur pics. Par contre le chromatogramme de la solution STD chargé de DCDA est utilisé pour l'identification des pics et pour l'évaluation de la séparation entre STD et DCDA.

Ø Critère d'acceptation

- Ø La spécificité de la méthode est acceptée si la séparation de la dicyandiamide dans la (solution STD chargé de DCDA) est possible avec une bonne résolution ;
- Ø Le test est positif s'il n'est ya pas d'interférences sauf au début (interférence qui peut être due à l'injection) dans les solutions injectées ;

1.2.2. La stabilité:

En vue de prouver que la méthode possède une capacité suffisamment bonne pour séparer les composants de dégradation des comprimés de Metformine, nous exposons le produit à des tests de stress extrême décrits ci-dessous :

a. Hydrolyse acide

Ø Préparation de la solution d'acide chlorhydrique à 0.1 M

A partir des caractéristiques d'une solution d'acide chlorhydrique commerciale on prépare une solution diluée à 0.1M.

$$M_{\text{HCl}} = 36.46 \text{ g/mol.}$$

$$\text{Densité} = 1.19 \longrightarrow 1\text{L de la solution pèse } 1190\text{g}$$

$$\text{Pureté} = 37\% : 100\text{g de solution} \longrightarrow 37\text{g de HCl}$$

$$1190\text{g} \longrightarrow m = 440.3\text{g de HCl (dans 1L de solution)}$$

La concentration de la solution commerciale :

$$C_{\text{commerciale}} = 12.08 \text{ mol/l}$$

$$C_{\text{commerciale}} \times V_{\text{prélevé}} = C_{\text{fille}} \times V_{\text{Préparé}}$$

$$C_{\text{fille}} = 0.1 \text{ mol/l}$$

$$V_{\text{Préparé}} = 100 \text{ ml}$$

$$\text{Donc } V_{\text{prélevé}} = 0.83 \text{ ml} = 830\mu\text{l}$$

- Ø Dissoudre 545mg (520-570mg) de Metformine 850mg produit fini et 1 ml d'acide chlorhydrique à 0,1 M dans 100 ml de phase mobile. Soumettre la solution à une chaleur de 60 ° C dans une étuve pendant 4 jours. Injecter 20µl de la solution pour analyse par HPLC

b. Hydrolyse basique

Ø Préparation de 100ml de la solution de NaOH à 0.1 M. :

$$M_{\text{NaOH}} = 40\text{g/mol}$$

$$C = n/V = m/M.V$$

$$m = C.M.V$$

$$m = 0.4\text{g} = 400\text{mg}$$

Dissoudre 545mg (520-570mg) de Metformine 850mg (produit fini) et 1 ml de NaOH à 0,1 M dans 100 ml de phase mobile. Exposer la solution à une chaleur de 60 ° C pendant 4 jours. Ensuite analyser par HPLC.

c. Oxydation :

Dissoudre 545mg (520-570mg) Metformine 850mg, produit fini, ajouter 1 ml de l'eau oxygénée (H₂O₂) à 10V dans 100 ml de phase mobile. Exposer la solution à une chaleur de 60 ° C dans une étuve pendant 4 jours. Ensuite analyser par HPLC.

d. Stockage des solutions mères de la méthode

- Ø Préparer la solution mère de la solution 1, solution STD, solution 2 et solution 4 (cf. chapitre IV).
- Ø Stocker les solutions sur la paillasse pendant 1 semaine ;
- Ø Préparer des solutions fraîches selon la méthode ;
- Ø Injecter les solutions stockées et celles fraîchement préparées ;
- Ø Récolter les chromatogrammes et interpréter les résultats.

e. Dégradation forcée des échantillons de Metformine HCl

- Ø Préparer cinq solutions 1 nommées A, B, C, D et E ;
- Ø Remplir les flacons HPLC de chaque solution ;
- Ø Injecter la solution A (fraîche) et soumettre les autres flacons à une température de 93°C dans une étuve.
- Ø On injecte les solutions B, C, D et E après 1, 2, 3 et 5 jours respectivement [41]

1.2.3. Linéarité

1.2.3.1. Linéarité de Dicyandiamide chargé de Metformine HCl

Le rang valide pour la détermination des impuretés de Metformine est de 80% de la limite reportée jusqu'à 120% de la spécification. Les concentrations de DCDA correspondantes sont 0.8µg/ml jusqu'à 1.2 µg/ml. Les solutions des tests de la linéarité de DCDA chargé de Metformine HCl sont préparées comme suit :

- Ø Dissoudre 20mg (19.0-21.0 mg) de Dicyandiamide dans une fiole de 100ml, ajuster jusqu'au trait de jauge avec de l'eau ultra purifiée (solution mère) ;
- Ø Dissoudre 500mg (475-525mg) de Metformine HCl dans une fiole de 100ml de phase mobile, diluer 1ml dans une fiole de 50ml, ajuster avec la phase mobile ;
- Ø Préparer 5 fioles de 200ml. Diluer dans chacune 10ml prélevé de la dernière dilution de la solution décrite ci-dessus, remplir à 70% avec la phase mobile. Ajouter pour chaque fiole un volume de 800, 900, 1000, 1100 et 1200 µl pris de la solution mère de Dicyandiamide.
- Ø Réaliser trois essais.
- Ø Injecter le blanc, puis injecter les solutions préparées.

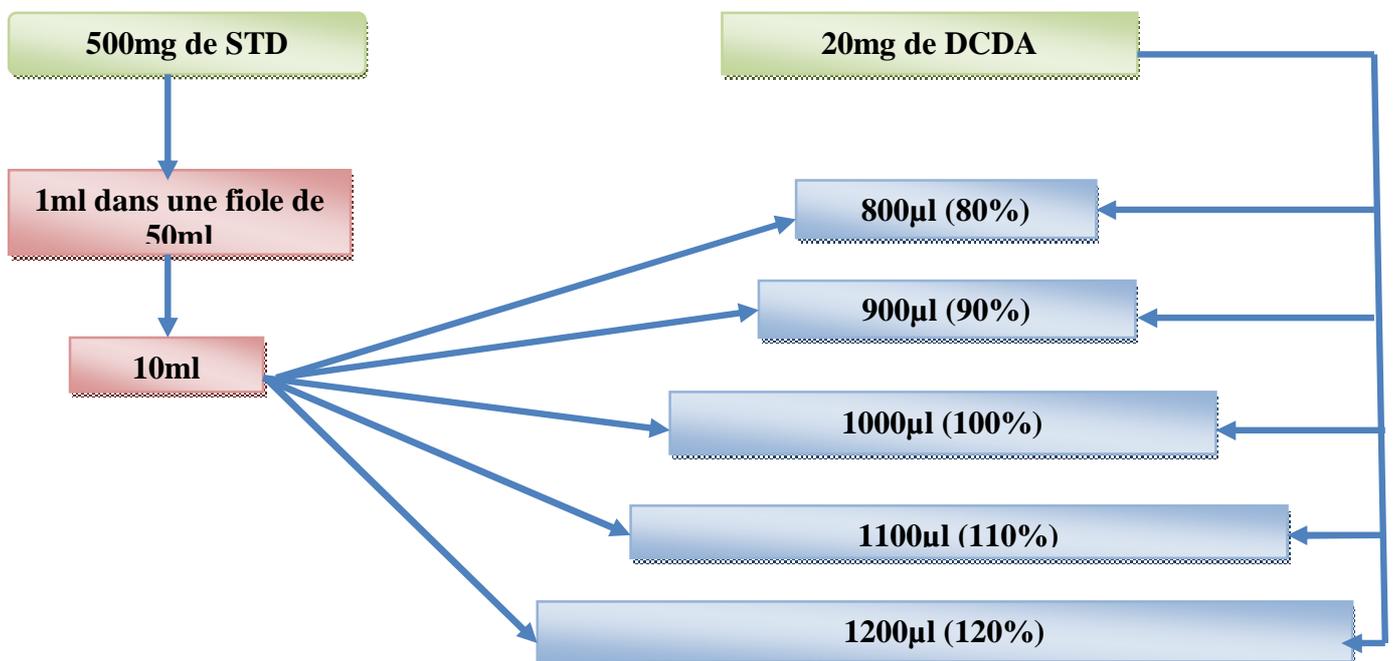


Figure 11: Etapes de préparation des solutions du test de la linéarité de DCDA chargée de STD (pour un essai).

1.2.3.2. Linéarité de DCDA seule

- Ø Dissoudre 20mg (19.0-21.0 mg) de Dicyandiamide dans une fiole de 100ml, ajuster jusqu'au trait de jauge avec de l'eau ultra purifiée (solution mère) ;
- Ø Préparer 5 fioles de 200ml. Diluer dans chacune 800, 900, 1000, 1100 et 1200 µl pris de la solution mère de Dicyandiamide. Ajuster avec la phase mobile.
- Ø Réaliser trois essais.
- Ø Injecter le blanc, puis injecter les solutions préparées.

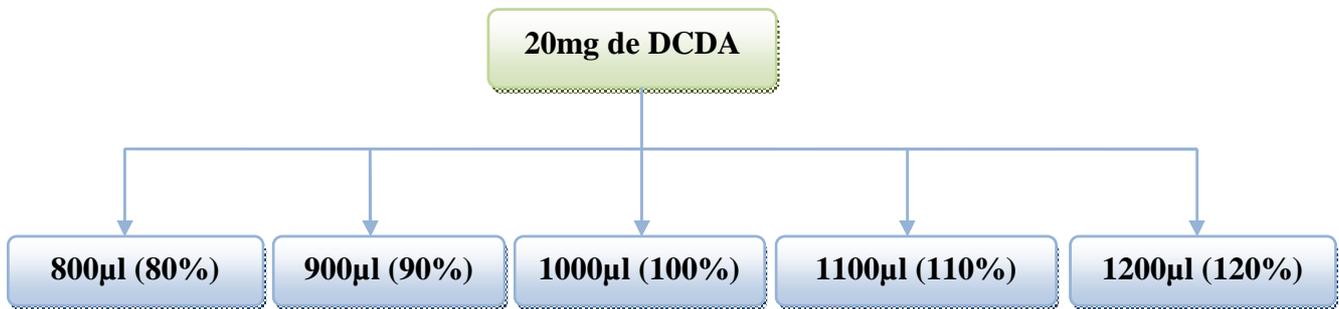


Figure 12 : Etapes de préparation des solutions du test de la linéarité de DCDA seule (pour un essai)

1.2.3.3 Etude statistique des résultats de la linéarité

Une étude statistique des résultats des tests de la linéarité sera réalisée selon la démarche de SFSTP décrite comme suit

Soient :

(D₁) : $y_1 = a_1 x + b_1$ équation de la droite de régression linéaire (DCDA chargé de STD.)

(D₂) : $y_2 = a_2 x + b_2$ l'équation de la droite de régression linéaire (DCDA seule).

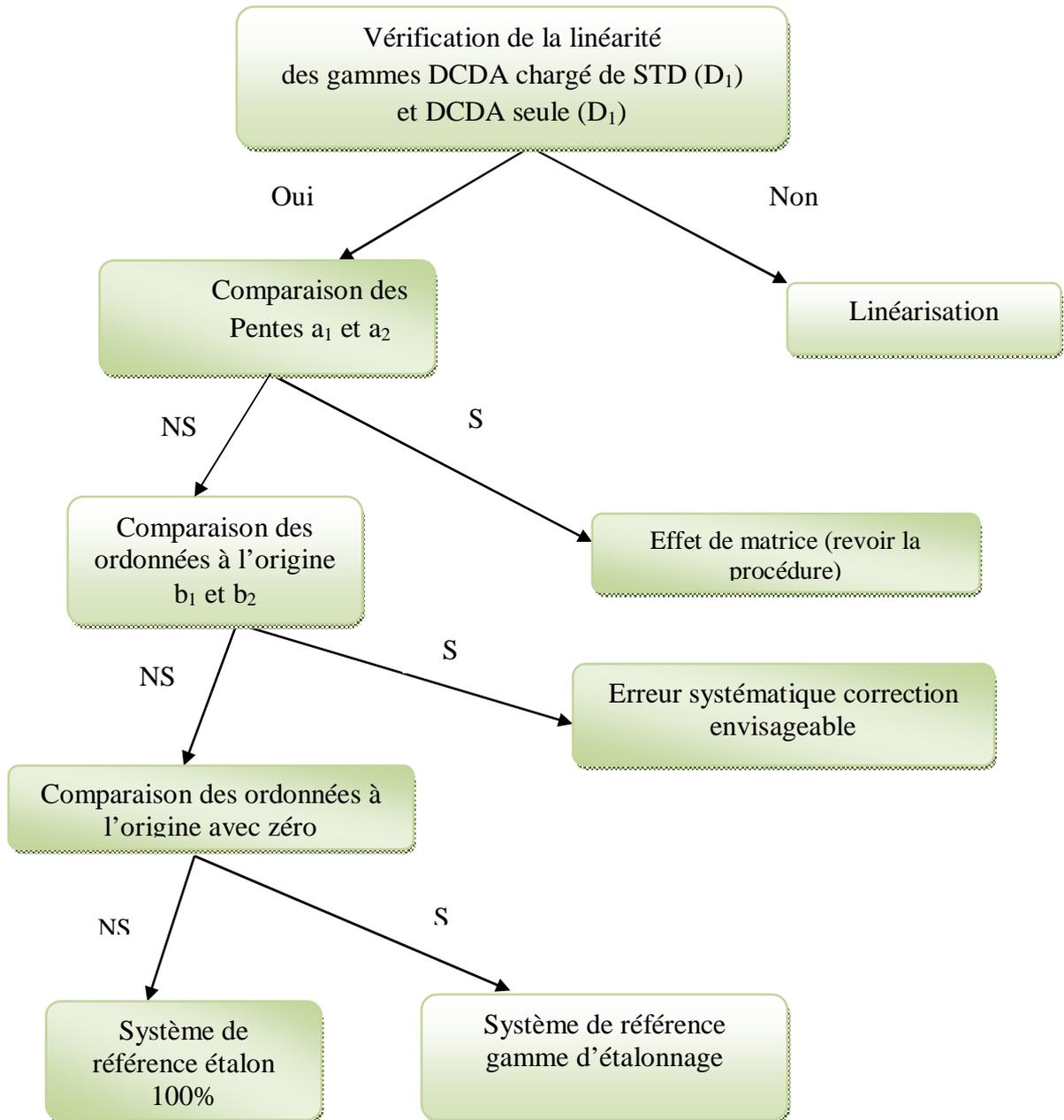


Figure 13 : Démarche statistique de l'étude de la linéarité

Ø Calcul de la pente (a)

L'estimation de la pente **a** est obtenue en appliquant la méthode des moindres carrés : le but est de rendre minimal la somme des carrés des écarts $(y_{ij} - \hat{y}_{ij})$ entre les valeurs expérimentales y_{ij} et les valeurs estimées \hat{y}_{ij}

$$a = \frac{\sum_{j=1}^k \sum_{i=1}^{nj} (x_{ij} - \bar{x})(y_{ij} - \bar{y})}{\sum_{j=1}^k \sum_{i=1}^{nj} (x_{ij} - \bar{x})^2} \quad (7)$$

Tel que :

x_{ij} : valeur brute indépendante.

y_{ij} : valeur brute dépendante.

\bar{x} : Moyenne générale des valeurs x_{ij} des k groupes.

\bar{y} : Moyenne générale des observations y_{ij} des k groupes.

Ø Calcul de l'ordonnée à l'origine(b)

Selon la méthode des moindres carrés, la droite de régression linéaire passe par le point de coordonnées \bar{x} et \bar{y} , donc l'équation suivante est vérifiée :

$$b = \bar{y} - a \bar{x} \quad (8)$$

Ø Calcul du coefficient de corrélation

Soient :

$S_{x_{ij}}$ et $S_{y_{ij}}$ les écarts types respectifs des variables x_{ij} et y_{ij}

$S_{x_{ij}y_{ij}}$ la covariance des variables x_{ij} et y_{ij}

• **Calcul de la covariance**

$$S_{x_{ij}y_{ij}} = \sum_{j=1}^k \sum_{i=1}^{n_j} (x_{ij} - \bar{x})(y_{ij} - \bar{y}) / (N - 1) \quad (9)$$

Soient r_1 et r_2 les coefficients de corrélation respectifs des droites D_1 et D_2 .

$$r = S_{x_{ij}y_{ij}} / S_{x_{ij}} * S_{y_{ij}} \quad (10)$$

Ø Comparaison des pentes des droites D_1 et D_2

Soient $S_{a_1}^2$ et $S_{a_2}^2$ les variances respectives des pentes a_1 et a_2 des droites D_1 et D_2 .

La comparaison des pentes a_1 et a_2 s'effectue avec un test de Student ($t_{calculé}$)

$$t = \frac{|a_1 - a_2|}{\sqrt{S_{a_1}^2 + S_{a_2}^2}} \quad (11)$$

Si $t_{cal} < t(\alpha, N_1 + N_2 - 4)$ lu dans la table de Student, on peut affirmer que les pentes ne sont pas significativement différentes au risque $\alpha = 0.01$.

Ø Comparaison des ordonnées à l'origine des droites D_1 et D_2

La comparaison des ordonnées à l'origine b_1 et b_2 s'effectue avec le test de Student :

$$t = \frac{|b_1 - b_2|}{\sqrt{S_{b_1}^2 + S_{b_2}^2}} \quad (12)$$

Si $t_{\text{cal}}(\alpha, N_1+N_2-4)$ lu dans la table de Student, on peut conclure que les ordonnées à l'origine des droites D_1 et D_2 ne sont pas significativement différentes au risque α

S_{b1} et S_{b2} sont les écarts types respectifs des ordonnées à l'origine des droites D_1 et D_2 .

Ø Comparaison de l'ordonné à l'origine avec le point zéro

Soient S_{b1} et S_{b2} les écarts types respectifs des ordonnées à l'origine des droites D_1 et D_2 .

Soit S_b l'écart type de l'ordonné à l'origine on vérifie l'inégalité :

$$\frac{|b|}{s_b} < t(\alpha; N - 2) \quad (13)$$

Avec $t(\alpha; N-2)$ lu dans la table de Student, si celle-ci est vérifiée on peut affirmer que l'ordonnée à l'origine n'est pas significativement différente de 0 au seuil de probabilité de $p=1-\alpha$

Critère d'acceptation

Ø Le coefficient de corrélation r doit être ≥ 0.98 [41]

1.2.4. Exactitude

Les résultats de la linéarité sont utilisés pour évaluer l'exactitude de la méthode. Une étude statistique de ces résultats sera faite selon les tests décrits ci-après :

Ø Système de référence considéré : étalon 100%

Soient x_{100} et y_{100} respectivement la concentration et la surface correspondant à la solution de référence .effectuer le changement de variable suivant :

$$Y_{ij}=y_{ij} \cdot x_{100}/x_{ij} \cdot y_{100} \quad (14)$$

Ø Vérification de l'homogénéité des variances liées

Effectuer le test de Cochran en considérant les valeurs y_{ij} pour vérifier l'homogénéité des variances des différents groupes j . le critère à utiliser est :

$$C=S^2 \max/\sum_{j=1}^k S_j^2 \quad (15)$$

S_j^2 : variance du groupe j ;

$S^2 \max$: variance la plus élevée des k groupe j ;

Si l'inégalité suivante est vérifiée : $C_{\text{calculé}} < C(\alpha; k; n-1)$, l'ensemble des variance des différents groupes j peut être considéré comme homogène au risque α .

Ø **Estimation du recouvrement moyen : droite de régression de DCDA seule**

On peut estimer le recouvrement moyen et son intervalle de confiance en utilisant :

$$\text{Quantité retrouvée} = (\text{surface} - b_2)/a_2 \quad (16)$$

$$\text{Recouvrement} = \text{quantité retrouvée}/\text{quantité introduite} \quad (17)$$

Il est possible de calculer la valeur du recouvrement moyen et son intervalle de confiance par la relation :

$$I_{Rm} = \bar{Y} \pm t_{(\alpha; N-1)} S_T / N \quad (18)$$

Avec $t_{(\alpha; N-1)}$ lu dans la table de student.

1.2.5. La précision

La précision de la méthode est considérée à deux niveaux : la répétabilité et la précision intermédiaire [40].

La répétabilité est évalué par la répétition de l'analyse pendant six jours par contre la précision intermédiaire consiste à la réalisation des tests de la répétabilité par deux analystes différents.

1.2.5.1. Préparation des solutions

- Ø Préparer la solution 2, la solution STD et la solution 4. (cf. chapitre IV)
- Ø Injecter le blanc, la solution STD, injecter deux fois la solution 2.

Tableau 20: Tests de précision (répétabilité et précision intermédiaire)

analyste	jours	détermination
A	1	1
		2
B	2	1
		2
B	3	1
		2
A	4	1
		2
A	5	1
		2
B	6	1
		2
Nombres totale de détermination		12 déterminations

1.2.5.2. Etude statistique des tests de la précision

Ø Système de référence considéré : étalon 100%

- Transformation des données brutes en quantités retrouvées (concentrations estimés)

$$X_{ij}=y_{ij}/a_2 \quad (19)$$

- Détermination des pourcentages de recouvrement

$$Y_{ij}=X_{ij}.100/x_{ij} \quad (20)$$

- Moyenne des groupes

La moyenne m_j des n_j répétition à l'intérieure du groupe j est donnée par

$$m_j = \sum Y_{ij}/n_j \quad (21)$$

Ø Dispersions à l'intérieur des groupes de mesures

La variance de répétabilité à l'intérieure du groupe j est donnée par :

$$S_j^2 = \sum (Y_{ij}-m_j)^2/n_j-1 \quad (22)$$

Ø Test d'homogénéité des variances à l'intérieure des groupes (Test de Cochran)

- Le critère à utiliser est :

$$C=S_j^2 \max / \sum S_j^2 \quad (23)$$

Ø **Variance de répétabilité**

Lorsque tous les groupes ont le même nombre de mesures n

$$S_r^2 = \sum (S_j^2) / k \quad (24)$$

Nombre de degré de liberté=k (n-1).

Ø **Variance intergroupes**

$$S_g^2 = (\sum (m_j - \bar{m})^2 / k - 1) - (S_r^2 / n) \quad (25)$$

$$\bar{m} = \sum m_j / k$$

Ø **Variance de fidélité intermédiaire**

$$S_R^2 = S_r^2 + S_g^2 \quad (26)$$

Ø **Coefficient de variation de répétabilité**

$$CVR = \frac{\sqrt{S_r^2}}{\bar{m}} * 100 \quad (27)$$

Ø **Coefficient de variation total**

$$CVR = \frac{\sqrt{S_g^2}}{\bar{m}} * 100 \quad (28)$$

Ø **Critères d'acceptation**

- La résolution entre la Mélamine et la Metformine HCl dans la solution 4 doit être supérieur à 10
- CV_r < 2.0%
- CV_R < 5.0% [42]

1.2.6. Limite de détection et limite de quantification

Les résultats de la droite de régression linéaire de DCDA seront utilisés pour le calcul de la limite de détection et la limite de quantification suivant les formules (29,30)

$$LD = 3.3 * (S_b / a) \quad (29)$$

$$LQ = 10 * (S_b / a) \quad (30)$$

LD : limite de détection

LQ : limite de quantification

Sb: écart type de l'ordonnée à l'origine de la droite de régression de DCDA seule

a : pente de la droite de régression de DCDA seule

Critère d'acceptation

LD doit être $< 1\mu\text{g/ml}$

2. Résultats et discussions

2.1 Spécificité

Les chromatogrammes de la solution STD (**figure 18**), Dicyandiamide (**figure 19**) et celui de la phase mobile (**figure 20**) ne présentent aucun autre pic au temps de rétention correspondant à celui de la Dicyandiamide et du standard. Ils indiquent l'absence de pics interférents avec les autres composants (metformine HCl et Dicyandiamide).

Les temps de rétention donnés par le chromatogramme de la solution STD chargé de DCDA (**figure 21**) nous renseignent sur l'identité des pics enregistrés (STD et DCDA) par comparaison au temps de rétentions donnés par les chromatogrammes de la figure 18 et 19.

Nous avons enregistré une résolution de 30.28 min entre le STD et le DCDA. Les analytes du mélange (DCDA et STD) sont bien séparés.

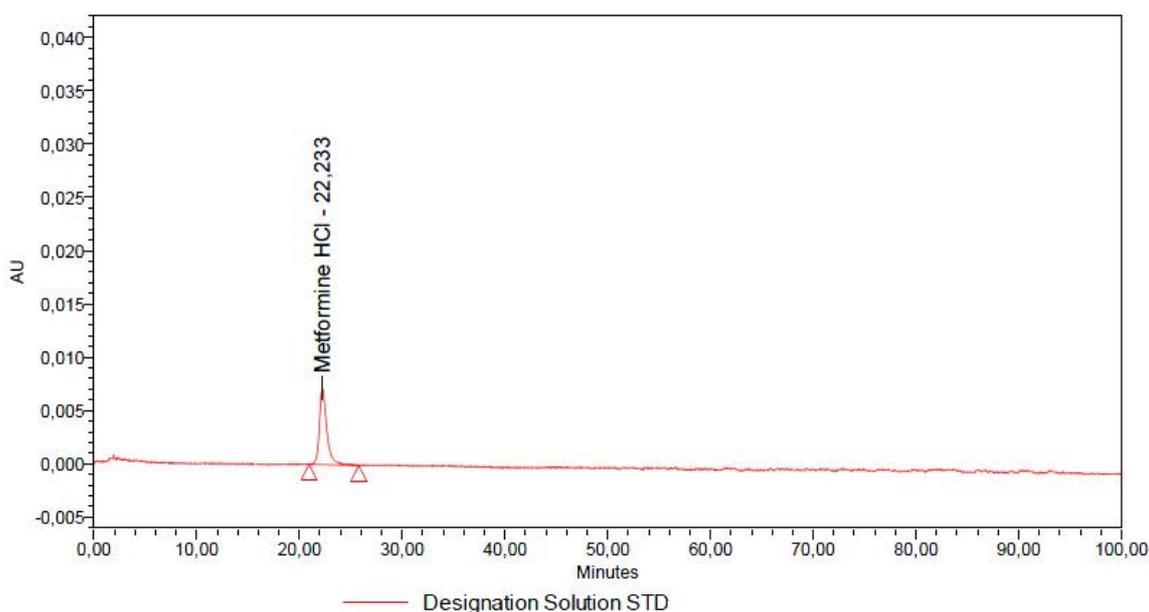


Figure 18 : Chromatogramme de STD (test spécificité)

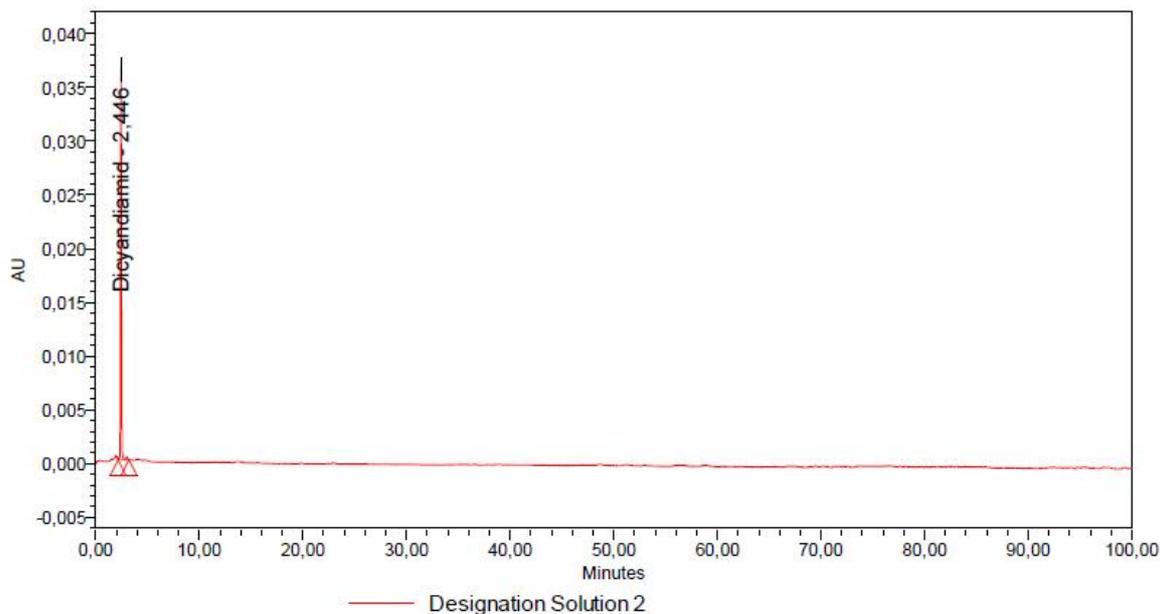


Figure 19 : Chromatogramme de DCDA (test spécificité)

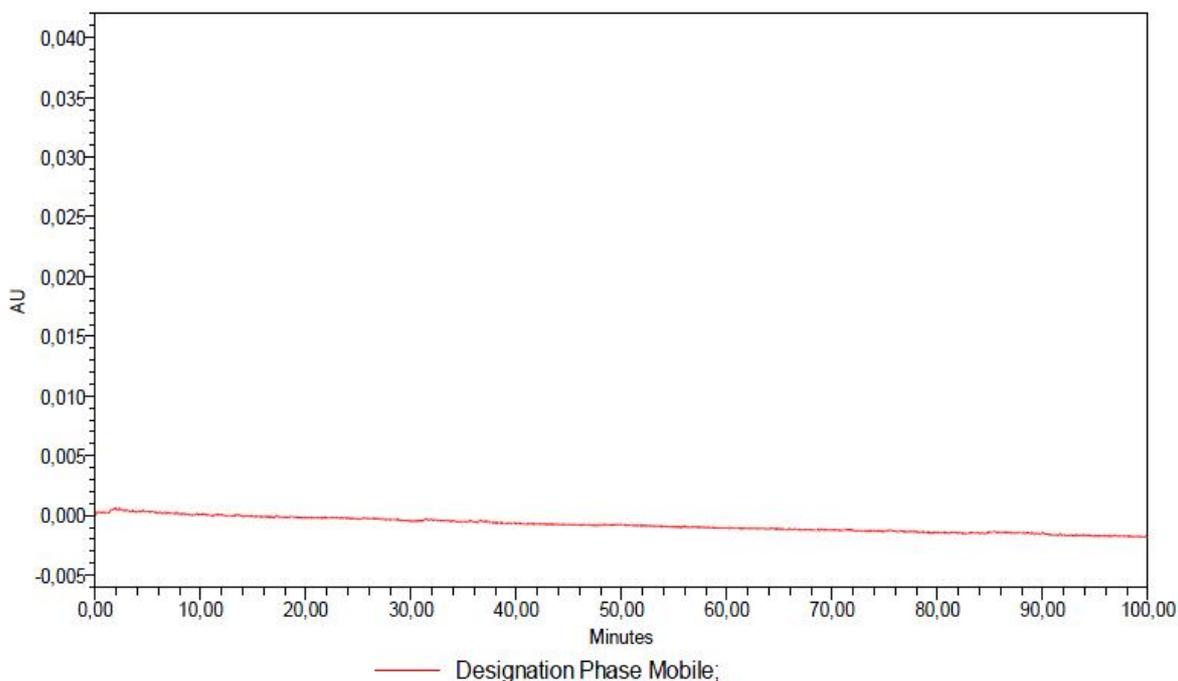


Figure 20 : Chromatogramme de la phase mobile (test spécificité)

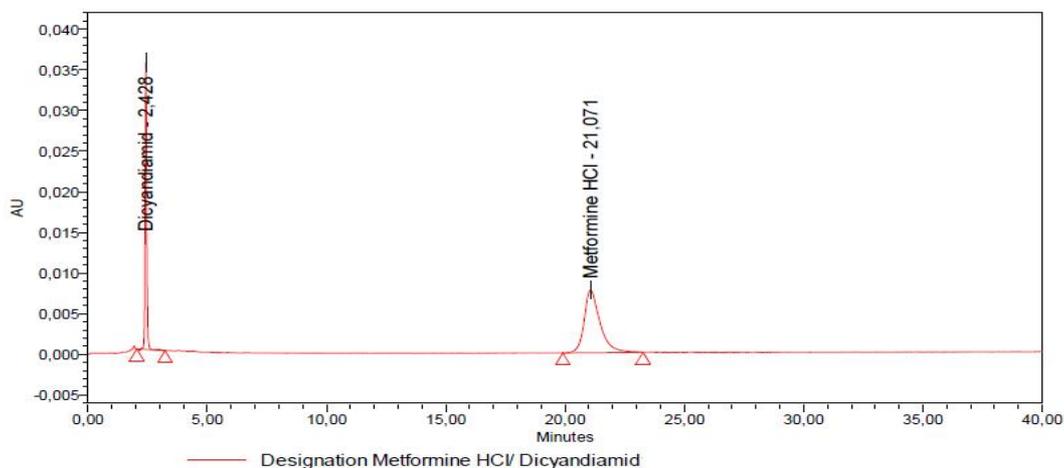


Figure 21 : Chromatogramme de STD chargé de DCDA (spécificité)

Conclusion

Tous les critères sont valides donc la méthode est spécifique. Elle garanti que les résultats obtenus ne proviennent que des composants analysés.

2.2. Stabilité

a. Interprétation des résultats de d'hydrolyse acide, hydrolyse basique et oxydation de la solution 1 (Metformine échantillon)

L'hydrolyse acide (**figure 22**), l'hydrolyse basique (**figure 23**) et l'oxydation (**figure 24**) de la Metformine ont dégradé le produit: apparition d'autres pics important autres ceux de la Dicyandiamide quoique le pourcentage de surface de Metformine HCl reste le plus considérable. Les résolutions entres les pics sont supérieurs 1.5 (**tableau 21**).

Conclusion

On constate que notre méthode est suffisamment capable de séparer les impuretés résultantes de la dégradation de la Metformine HCl (exemple Dicyandiamide) ou autres impuretés qui surviennent.

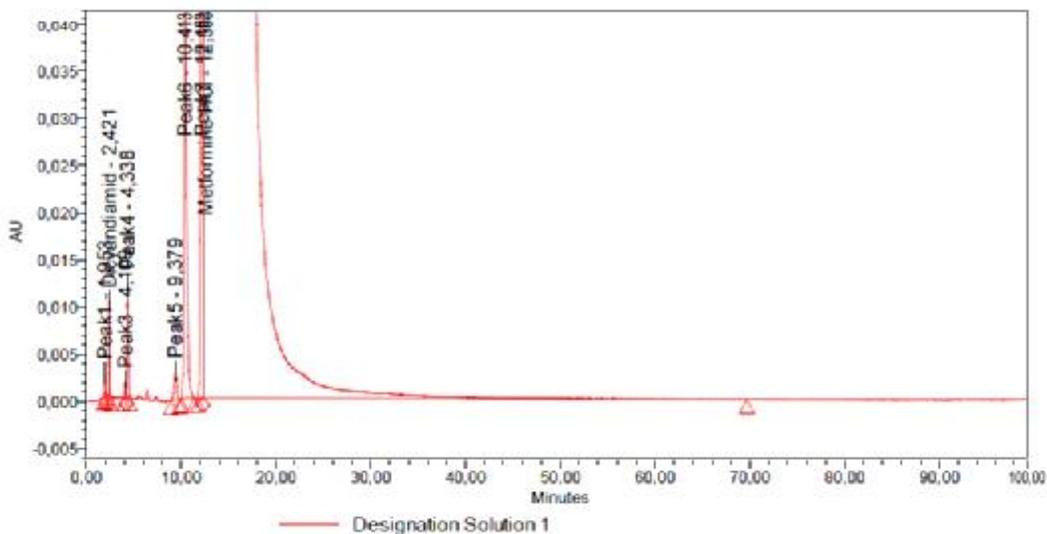


Figure 22 : Chromatogramme de l'hydrolyse acide (HCl) de la solution 1

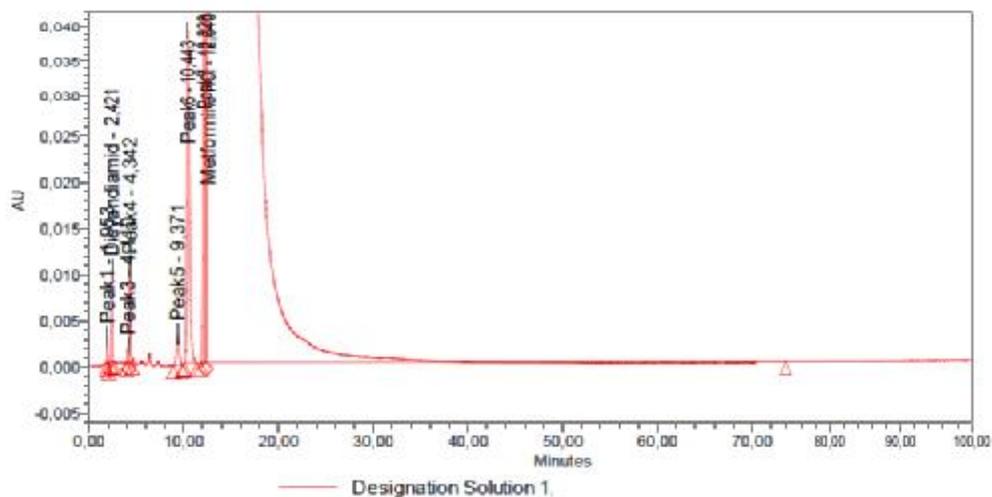


Figure 23 : Chromatogramme de l'hydrolyse basique (NaOH) de la solution 1

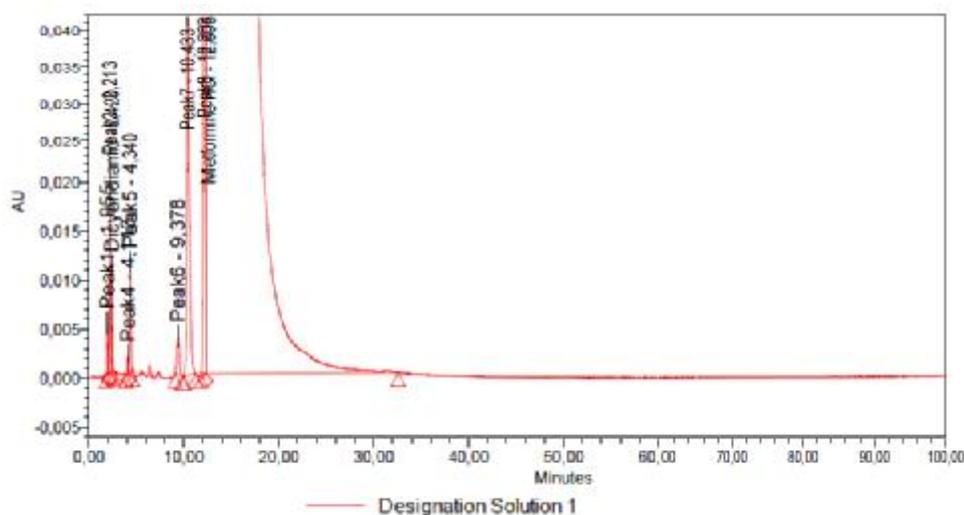


Figure 24 : Chromatogramme d'oxydation (H₂O₂) de la solution 1

Tableau 21 : Informations sur les pics de la solution 1 (hydrolyse acide, basique et oxydation de Metformine)

Pics	H2O2		NaOH		HCl	
	T _R (min)	R _s	T _R	R _s	T _R	R _s
DCDA	2.42	1.59	2.42	3.50	2.42	3.89
Metformine HCl	12.61	1.6	12.64	1.8	12.58	1.7
Pic 1	1.96	-	1.95	-	1.95	-
Pic 2	2.21	1.51	-	-	-	-
Pic 3	-	-	4.11	9.59	4.11	-
Pic 4	4.11	1.52	4.34	1.52	4.34	1.61
Pic 5	4.34	1.52	9.37	1.50	9.37	1.59
Pic 6	9.38	14.75	10.44	2.31	10,41	2.41
Pic 7	10.43	2.304	12.23	-	12.16	-

b. Résultats des solutions mères (STD, 1, 2, et 4) stockées

Ø Solution STD

La solution de Metformine HCl (STD) stockée pendant une semaine sur la paille n'a subi aucune dégradation en la comparant à la solution fraîche (**figure 25**).

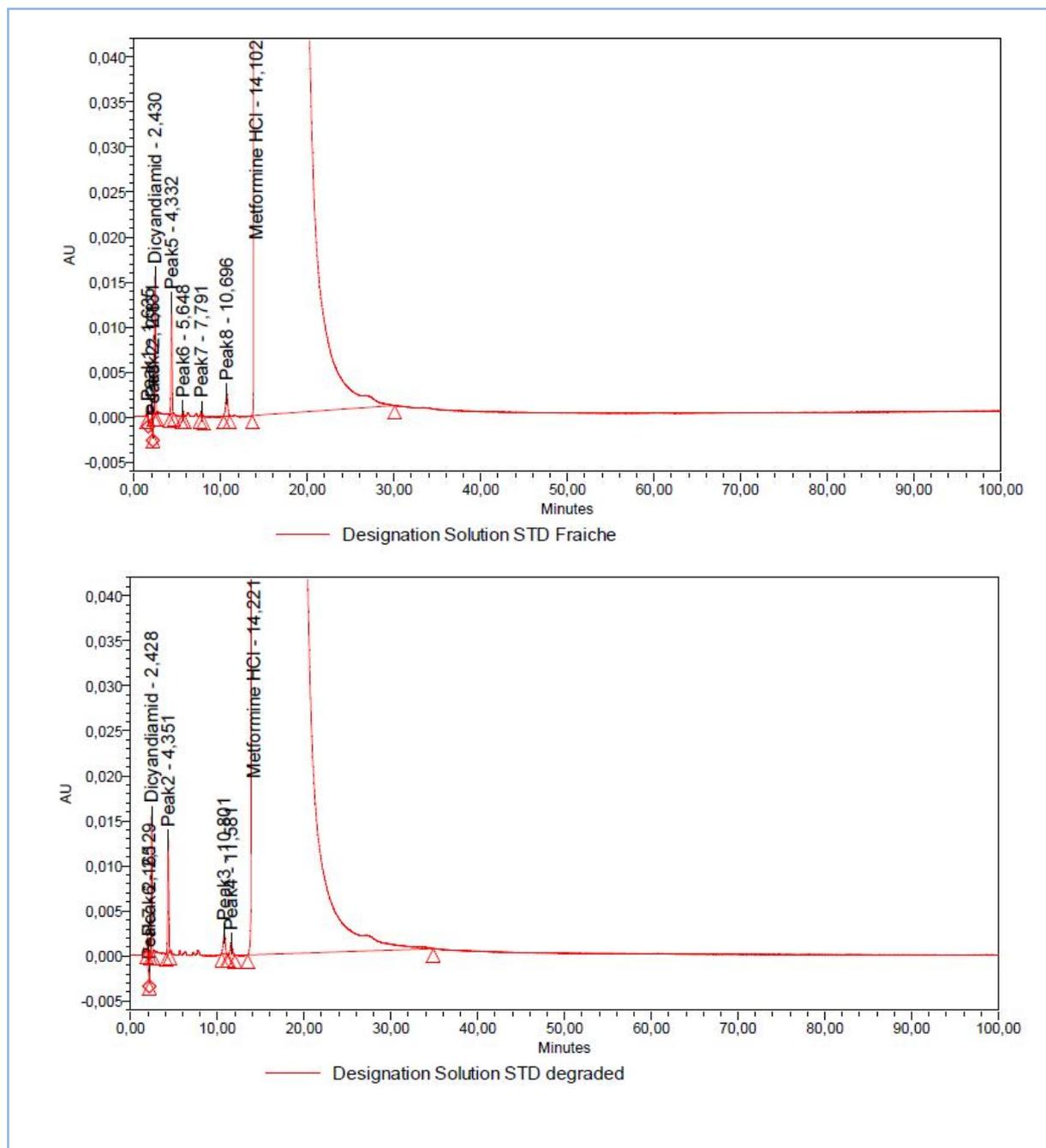


Figure 25 : chromatogrammes des solutions de STD (stockée et fraîche)

Solution 2

D'après le chromatogramme (**figure 26**), aucune différence n'a été décelée dans les deux chromatogrammes (solution 2 stockée et fraîche)

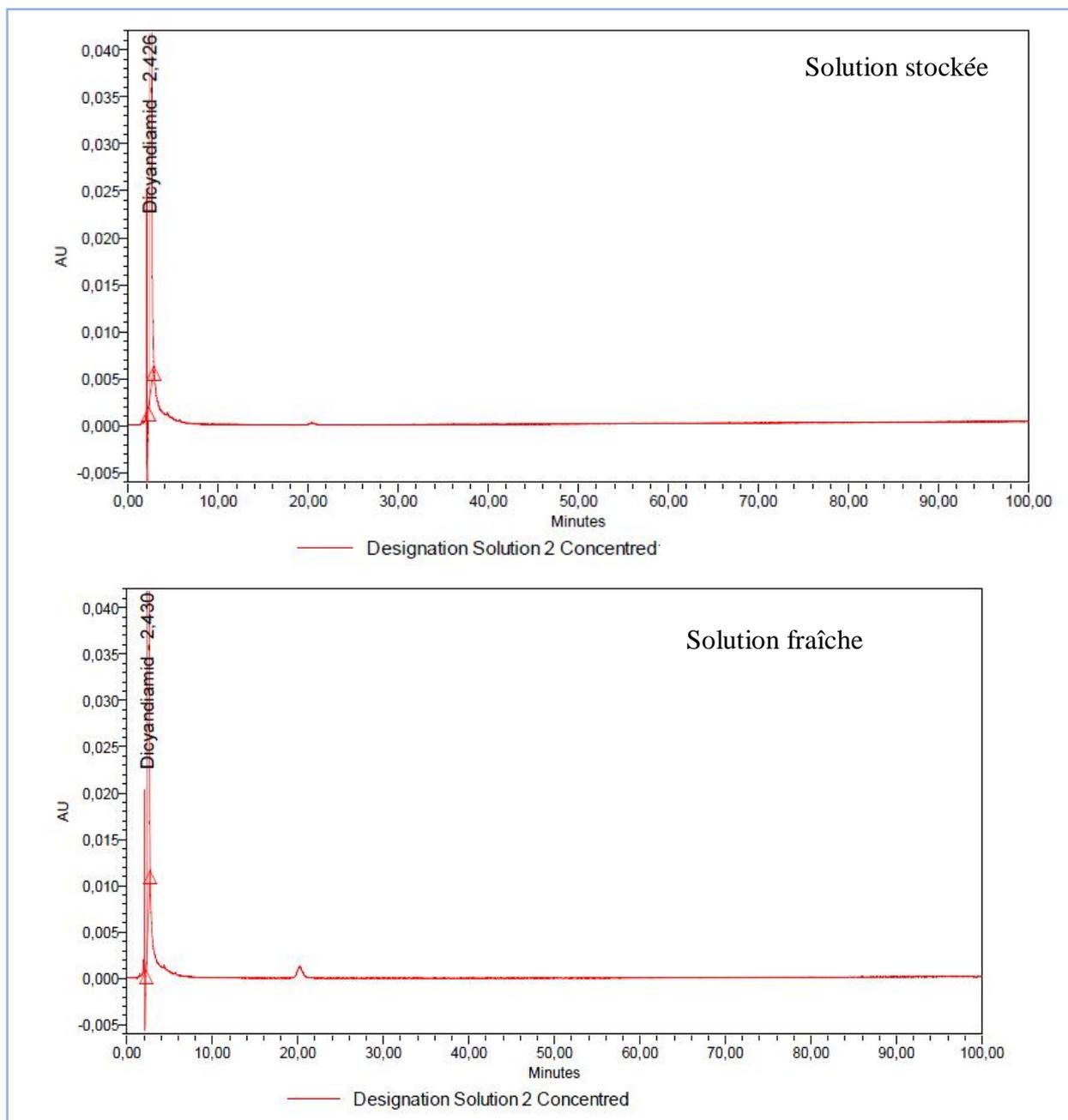


Figure 26 : Chromatogrammes des solutions de DCDA (stockée et fraîche)

Solution 1

On remarque l'augmentation significative d'un pic non identifié (pic 5) dans la solution 1 stocké (**figure 27**) par rapport à la solution fraîchement préparée.

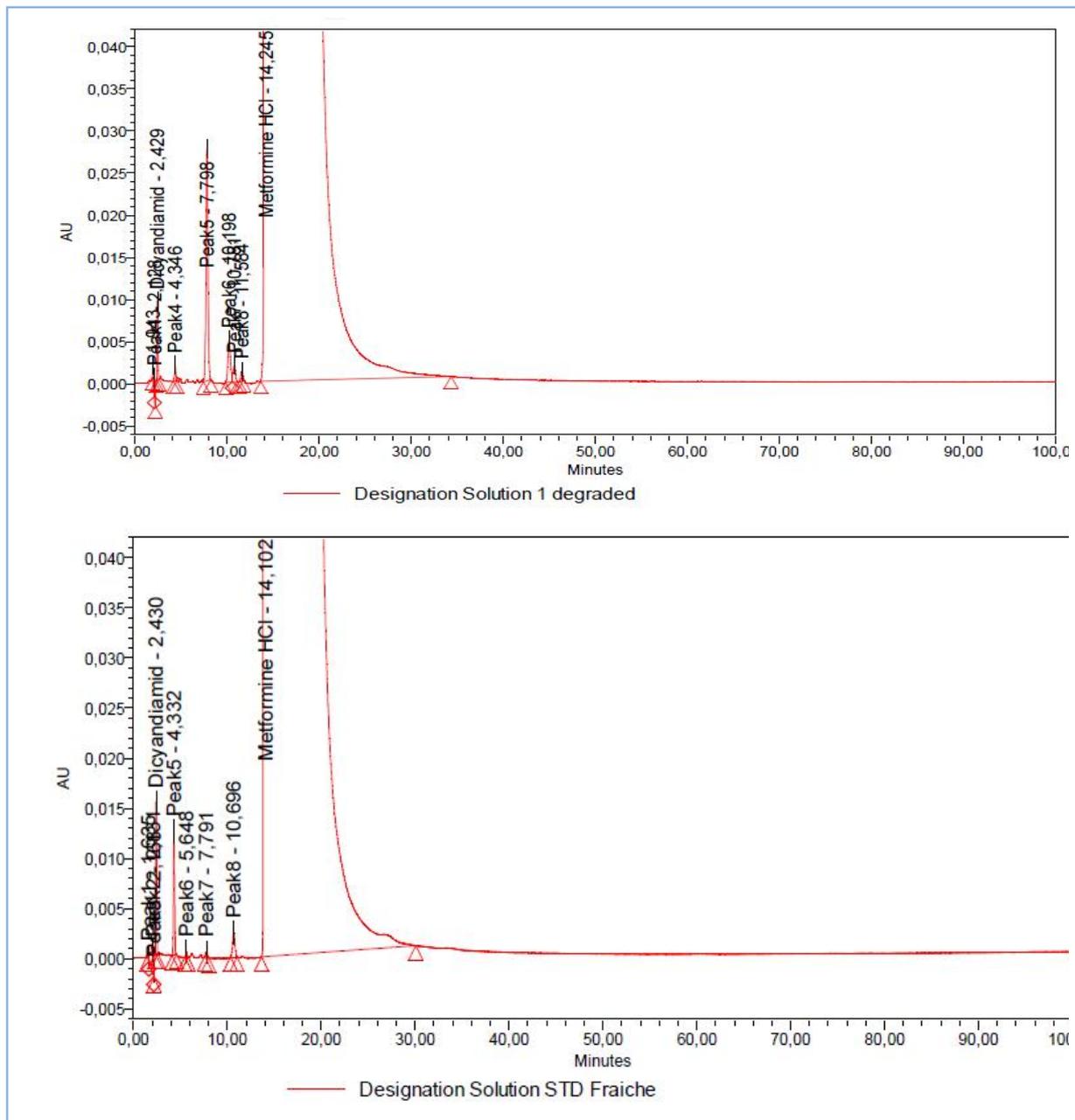


Figure 27 : Chromatogrammes des solutions 1 (stockée et fraîche)

Solution 4

Il est tout à fait cohérent à ce qu'il apparait une impureté dans le chromatogramme de la solution 4 stockée (**figure 28**) du moment où la metformine HCl a été dégradée dans la solution 1 stockée (elles contiennent la même quantité de metformine HCl et elles sont soumises aux mêmes conditions)

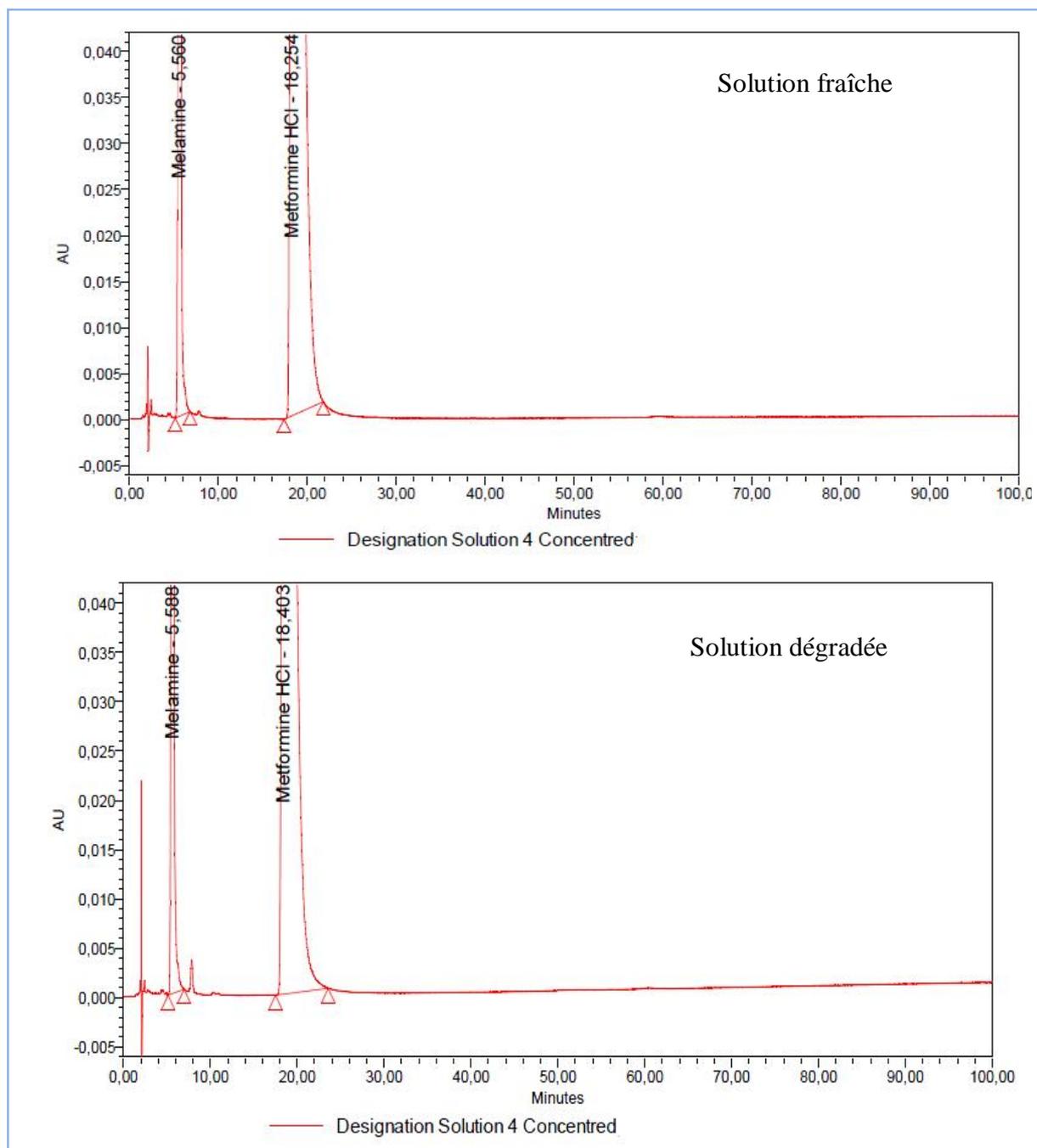


Figure 28 : Chromatogrammes des solutions 4 (stocké et fraîche)

Conclusion

On conclut que les produits standards (étalons) sont stables pour une semaine de stockage sur la paillasse à savoir la solution STD et la solution 2 par contre le stockage de la solution 1 et la solution 4 ne doit pas atteindre une semaine.

C. Résultat de l'étude de dégradation forcée de la solution 1 (échantillon)

La surface du pic de Dicyandiamide de la solution A (non dégradée) représente la plus grande surface par rapport à celles des autres pics (**figure 29**). Donc on peut dire que la Dicyandiamide est l'impureté principale de la Metformine HCl.

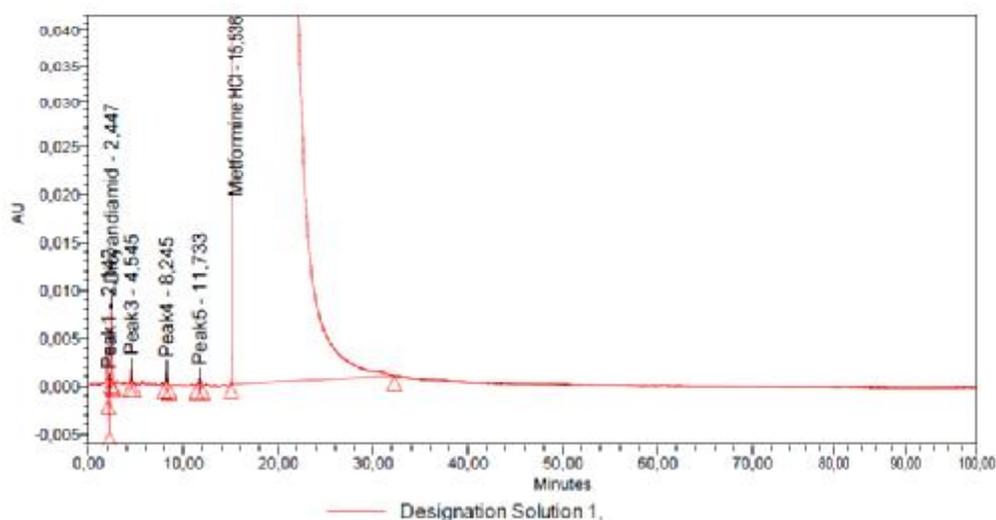


Figure 29 : Chromatogramme de la solution A (fraîche)

Les résultats des solutions B, C, D et E soumises à 93°C sont comparés dans le tableau 22.

Tableau 22 : Résultats de la dégradation forcée de Metformine 850mg (échantillon).

Solution	Temps (jours)	DCDA (air/%air)	Metformine (air/%air)
A	0	50252 /0.01	349513206/99.97
B	1	210508/0.07	313831264/98.29
C	2	211666 /0.07	275649279/97.16
D	3	108363/0.11	99217577/96.72
E	5	482319/0.20	239357002/96.98

Les surfaces des pics de la Metformine HCl diminuent en fonction de nombre de jours auxquelles elle a été soumise à la chaleur par contre les surfaces des pics de la Dicyandiamide et des autres impuretés (non identifiés) augmentent.

Conclusion

Le produit de dégradation principal de la Metformine HCl est bien la Dicyandiamide. La méthode d'identification et de dosage des substances apparentées de la Metformine HCl est suffisamment capable de déceler tous produit de dégradation du principe actif, excipients ou autre impuretés. La méthode est dite stable.

2.3. Résultats de la linéarité

2.3.1. Linéarité sur STD chargé de DCDA

Tableau 23 : Données brutes de la linéarité sur STD chargé de DCDA

niveau	Concentration de DCDA (µg/ml)	Surface de DCDA			
		Essai 1	Essai 2	Essai 3	Moyenne
80%	0.8	132615	136100	135438	134717,667
90%	0.9	151623	152224	151745	151864
100%	1	172451	170021	170345	170939
110%	1.1	184059	188315	189411	187261,667
120%	1.2	203229	201274	202762	202421,667

Ø La droite de régression linéaire

La droite de régression linéaire du STD chargé de DCDA est donnée dans **figure 30** dont l'équation est lancée comme suit :

$$(D_1) : Y_2 = 170805.66667 X_2 - 1364.86667$$

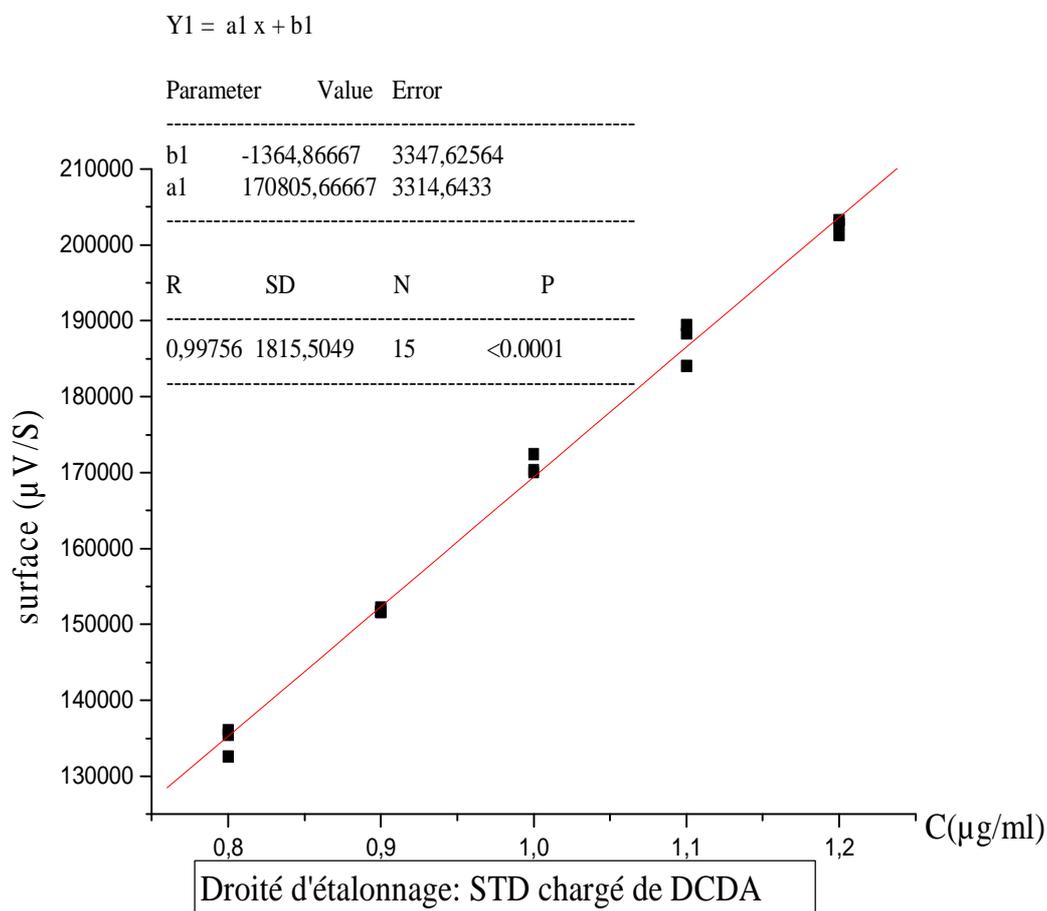


Figure 30 : Droite d'étalonnage de STD chargé de DCDA (logiciel origine 6.0)

2.3.2. Linéarité de DCDA

Tableau 24 : Données brutes de la linéarité DCDA seule

niveau	Concentration de DCDA (µg/ml)	Surface de DCDA			
		Essai 1	Essai 2	Essai 3	Moyenne
80%	0.8	147212	143742	142623	144525,667
90%	0.9	162488	158495	159427	160136,667
100%	1	179856	179531	178890	179425,667
110%	1.1	202123	200360	199821	200768
120%	1.2	215945	215541	215168	215551,333

Ø Droite de régression linéaire

La droite de régression linéaire de DCDA seule est donnée dans **figure 31** dont l'équation est lancée comme suit :

$$(D_2) : Y_2 = 182682.66667 X_1 - 2601.2$$

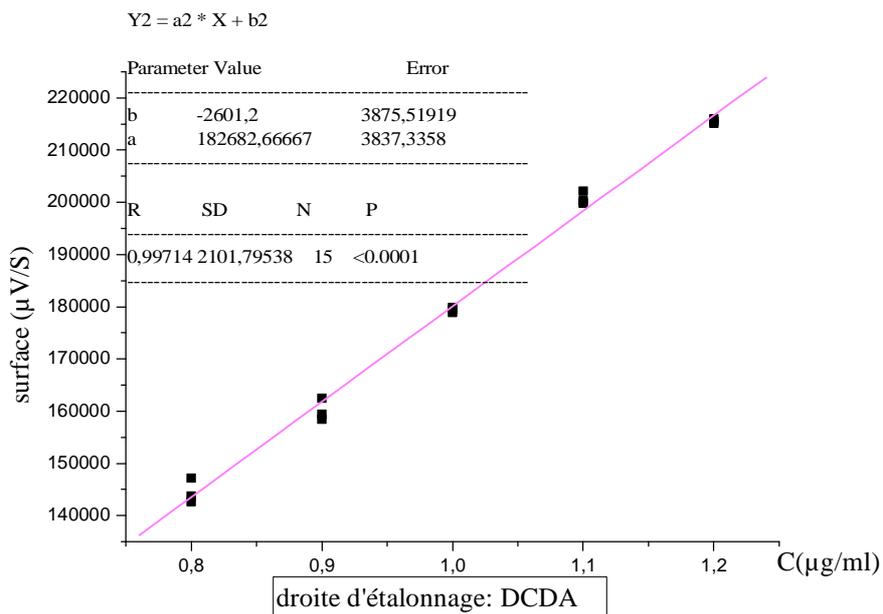


Figure 31 : Droite d'étalonnage DCDA seule (logiciel origine 6.0)

On a superposées les différents chromatogrammes de la linéarité de DCDA qui sont illustrés dans la **figure 32**.

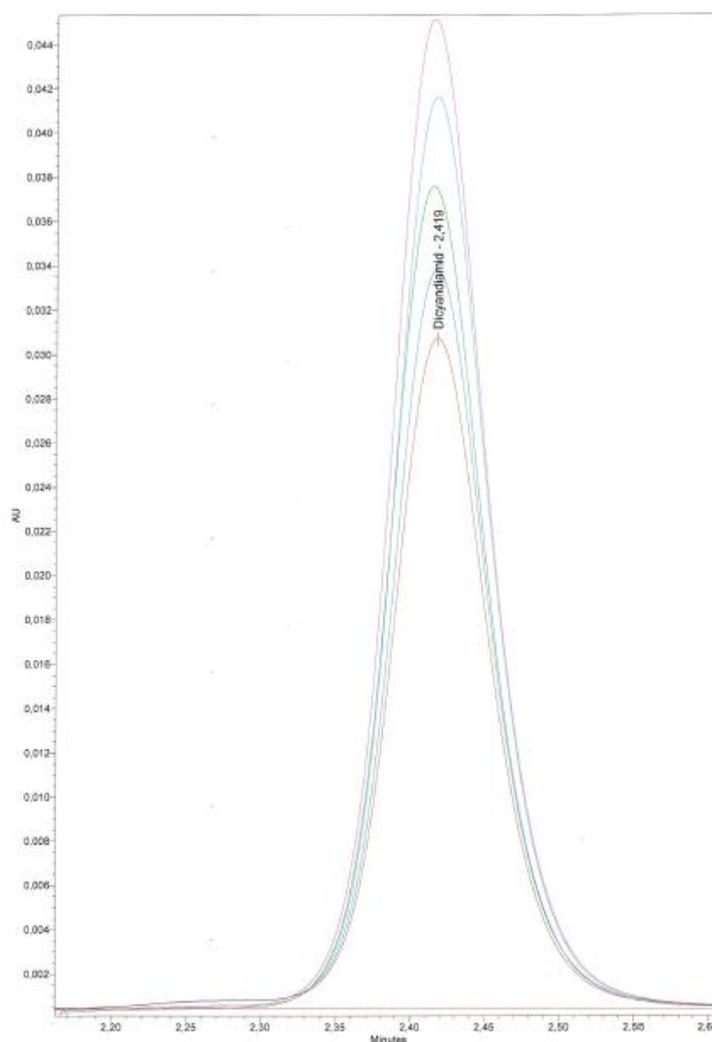


Figure 32 : Différents chromatogrammes superposés de la linéarité de DCDA

2.3.3. Etude statistique

Le tableau 25 résume les données tirées des deux courbes (DCDA seule et STD chargé de DCDA)

Tableau25 : résultats de l'estimation d'une droite de régression linéaire (DCDA seule et STD chargé de DCDA)

	DCDA seul	STD chargé de DCDA
Pente (a)	182682.66667	170805.66667
Ecart type (S _a)	3837.3358	3314.6433
Ordonnées à l'origine (b)	-2601.2	-1364.86667
Ecart type (S _b)	3875.51919	3347.62564
Coefficient de corrélation r	0.99714	0.99756

2.3.3.1. Test de comparaison des pentes des droites D_1 et D_2

En appliquant l'expression (11) donnée dans le protocole de validation, le test de comparaison des pentes D_1 et D_2 aura les résultats suivants (**tableau 26**).

Tableau 26 : Résultats du test de comparaison des pentes des droites D_1 et D_2

	$T_{\text{calculé}}$	$T_{\text{théorique}}$
Comparaison des pentes des droites D_1 et D_2	2.3422	$T(0.01, 26)=2.7787$
observation	$t_{\text{calculé}} < t_{\text{théorique}}$	

Au risque $\alpha = 0.01$
Les pentes ne sont pas significativement différentes

2.3.3.2. Tests de comparaison des ordonnés à l'origine

C'est l'expression (12) donnée dans le protocole de validation qui est utilisée pour ce calcul. Les résultats sont dans le tableau suivant.

Le tableau 27 : Résultats du test de comparaison des ordonnées à l'origine des droite D_1 et D_2

	$t_{\text{calculé}}$	$T_{\text{théorique}}$
Comparaison des pentes des droites D_1 et D_2	0.24278	$T(0.01, 26)=2.7787$
observation	$t_{\text{calculé}} < t_{\text{théorique}}$	

Au risque $\alpha = 0.01$
Les ordonnées à l'origine b_1 et b_2 ne sont pas significativement différentes

2.3.3.3. Test de comparaison des ordonnées à l'origine avec le point zéro

C'est l'expression (13) donnée dans le protocole de validation qui est utilisée pour ce calcul. Les résultats sont dans le tableau suivant.

Tableau 28 : Test de comparaison des ordonnées à l'origine avec le point zéro

		t calculé	T théorique
Test de comparaison des ordonnées à l'origine avec le zéro	DCDA	0.67119	t (0.01, 13) = 3.0123
	STD chargé de DCDA	0.40771	

Au risque $\alpha = 0.01$

Les ordonnées à l'origine b_1 et b_2 sont non significativement différentes de zéro. Cela signifie que notre système de référence sera l'étalon 100% (un point d'étalonnage)

Conclusion

- Ø Les coefficients de corrélation (r) des deux linéarités (STD chargé de DCDA et DCDA seul) sont > 0.98 ;
- Ø Les tests statistiques prévus pour l'étude de la linéarité sont tous conformes aux critères préétablis

Donc la méthode est jugée linéaire.

2.4. Résultats des tests de l'exactitude

Comme prévu dans le protocole, c'est les résultats de la linéarité qui sont utilisés pour évaluer l'exactitude de la méthode en utilisant comme système de référence l'étalon 100%.

L'étude statistique de l'exactitude est la suivante :

2.4.1. Changement de variable

Les résultats des changements de variables effectués sont obtenus en utilisant l'expression (14) donnée dans le protocole et sont regroupés dans le **tableau 29**.

Tableau 29 : résultats de changement de variable

niveau	surfaces	Index de recouvrement
80%	147212	1,02557791
	143742	1,00140355
	142623	0,99360784
90%	162488	1,00622294
	158495	0,9814959
	159427	0,9872674
100%	179856	1,00239839
	179531	1,00058706
	178890	0,99701455
110%	202123	1,02409084
	200360	1,0151583
	199821	1,01242736
120%	215945	1,00294551
	215541	1,00106915
	215168	0,99933677

2.4.2. Vérification de l'homogénéité des variances (test de Cochran)

L'application de l'expression (15) donnée dans le protocole de validation conduit aux résultats du **tableau 30**.

Tableau 30 : Résultats du test de Cochran

Index de recouvrement	variance	le $C_{\text{calculé}}$
1,02557791	0,00027788	0,56342131
1,00140355		
0,99360784		
1,00622294	0,00016734	
0,9814959		
0,9872674		
1,00239839	$7,5049 \cdot 10^{-6}$	
1,00058706		
0,99701455		
1,02409084	$3,7214 \cdot 10^{-5}$	
1,0151583		
1,01242736		
1,00294551	$3,2575 \cdot 10^{-6}$	
1,00106915		
0,99933677		

$$C_{\text{théorique}}(0.01, 5,2) = 0.7885$$

$C_{\text{calculé}} < C_{\text{théorique}}$ nous déduisons que le test de de Cochran est valide

Au risque $\alpha = 0.01$

Les variances des différents groupes peuvent être homogènes

2.4.3. Estimation du recouvrement moyen

On calcule le pourcentage de recouvrement moyen en utilisant les formules de calcul (16, 17 et 18) données dans le protocole. Les résultats sont résumés dans le **tableau 31**.

Tableau 31 : Résultats de l'estimation du recouvrement moyen

Niveau	essai	Concentration introduite (µg/ml)	concentration retrouvés (µg/ml)	% de recouvrement
80%	1	0.8	0,820073424	102,509178
	2	0.8	0,801078738	100,1348422
	3	0.8	0,794953362	99,36917022
90%	1	0.9	0,903693837	100,4104263
	2	0.9	0,881836263	97,98180694
	3	0.9	0,886938005	98,54866727
100%	1	1	0,998765802	99,87658015
	2	1	0,99698676	99,69867603
	3	1	0,993477944	99,34779435
110%	1	1.1	1,12065476	101,8777055
	2	1.1	1,111004146	101,0003769
	3	1.1	1,108053674	100,7321522
120%	1	1.2	1,196316016	99,69300134
	2	1.2	1,194104531	99,50871091
	3	1.2	1,192062739	99,33856158
moyenne				100,0018433
écart type				1,177984507
limité inférieur				97,98181
limité supérieur				102,50918
t calculé (0, 01,14)				3,012

Conclusion

L'intervalle de confiance trouvé est [97,50918-102,50918]

100% appartient à l'intervalle [97,98181 -102,50918] Donc la méthode est évalué comme étant exacte.

2.5. Résultat des tests de la précision : répétabilité et précision intermédiaire

Le tableau suivant regroupe les données brutes de ce test.

Tableau 32 : données brutes des résultats de la précision : répétabilité et précision intermédiaire

analyste	jours	détermination	Facteur de résolution(R)	Surface de DCDA
A	1	1	21.11293	175779
		2		173255
B	2	1	21.44437	174940
		2		175195
B	3	1	21.37314	187360
		2		186307
A	4	1	21.01389	183996
		2		184160
A	5	1	20.38879	183239
		2		183522
B	6	1	21.15392	175789
		2		176391

Les résolutions obtenues (tableau 32) sont supérieures à 10 (le critère du protocole est satisfait)

2.5.1. Calcul statistique :

Ø Système de référence considéré : étalon 100%

2.5.1.1. Transformation des données brutes en quantités retrouvées

Les concentrations estimées correspondent aux quantités retrouvées, sont regroupées dans le tableau ci-dessous. C'est la formule (19) qu'on utilise pour ce calcul.

Tableau 33 : concentrations estimées : répétabilité et précision intermédiaire

Analyste	Jours	détermination	Surface de DCDA ($\mu V/S$)	Concentrations retrouvés ($\mu g/ml$)
A	1	1	175779	0,962209514
		2	173255	0,948393206
B	2	1	174940	0,957616851
		2	175195	0,959012714
B	3	1	187360	1,025603597
		2	186307	1,019839503
A	4	1	183996	1,007189151
		2	184160	1,008086883
A	5	1	183239	1,003045354
		2	183522	1,004594488
B	6	1	175789	0,962264254
		2	176391	0,965559586

2.5.1.2. Détermination des pourcentages de recouvrement

En utilisant la formule (20) (cf. Protocole de validation) on obtient les résultats suivant :

Tableau 34 : pourcentage de recouvrement

Analyste	Jour	détermination	% de recouvrement
A	1	1	96,22095145
		2	94,83932064
B	2	1	95,76168511
		2	95,90127142
B	3	1	102,5603597
		2	101,9839503
A	4	1	100,7189151
		2	100,8086883
A	5	1	100,3045354
		2	100,4594488
B	6	1	96,22642542
		2	96,5559586

2.5.1.3. La moyenne des groupes

Nous évaluons la moyenne M_j pour chaque jour en utilisant la formule (21) du protocole de validation. Les résultats sont dans le tableau 35

Tableau 35 : Résultats des moyennes des groupes

Jour	détermination	% de recouvrement	Moyenne
1	1	96,22095145	95,53013604
	2	94,83932064	
2	1	95,76168511	95,83147826
	2	95,90127142	
3	1	102,5603597	102,272155
	2	101,9839503	
4	1	100,7189151	100,7638017
	2	100,8086883	
5	1	100,3045354	100,3819921
	2	100,4594488	
6	1	96,22642542	96,39119201
	2	96,5559586	

2.5.1.4. Dispersion à l'intérieur des groupes de mesure

Les variances de répétitions à l'intérieur de chaque groupe S_j^2 sont obtenues en appliquant la formule (22) du protocole. Les résultats sont les suivant :

Tableau 36 : dispersion à l'intérieur des groupes de mesure

jours	1	2	3	4	5	6
Variance S_j^2	0,95445184	0,00974217	0,16612388	0,00402961	0,01199909	0,05429606

2.5.1.5. Test d'homogénéité des variances à l'intérieure des groupes (Test de Cochran)

Le test de Cochran est appliqué à la dispersion à l'intérieur des groupes (formule 23 donnée dans le protocole de validation).

Tableau 37 : Test d'homogénéité des variances à l'intérieure des groupes

S_j^2 max	$\sum S_j^2$	$C_{calculé}$	k	n	$C_{théorique\ 1\%}$ (0.01 ; 6 ;2)	observation
0,95445184	1.20064264	0.794950809	6	2	0.8828	$C_{calculé} < C_{théorique}$

Le test de Cochran n'est pas significatif étant donné que $C_{calculé}$ est inférieur à $C_{théorique}$ au seuil 1%. Par conséquent l'ensemble des variances peut être considéré comme homogène.

2.5.1.6. Variance de répétabilité

La variance de répétabilité Sr^2 est la moyenne des variances à l'intérieur des groupes. Elle est obtenue par la formule (24) du protocole dont les résultats sont les suivant :

Tableau 38 : Variance de répétabilité

jours	1	2	3	4	5	6
S_j^2	0,95445184	0,00974217	0,16612388	0,00402961	0,01199909	0,05429606
Sr^2	0,20010711					

2.5.1.7. Variance intergroupe

Les résultats des calculs intermédiaires et finals de la variance intergroupe Sg^2 sont résumés dans le tableau 39. Cette variance est calculée à l'aide de la formule (25) donnée dans le protocole.

Tableau 39 : Variance intergroupes

Mj	\bar{m}	$m_j - \bar{m}$	$(m_j - \bar{m})^2$	Sr^2	Sg^2
95,53013604	98.52845918	-2,998323135	8,98994162	0,20010711	8.55577793
95,83147826		-2,696980917	7,27370607		
102,272155		3,743695812	14,0152583		
100,7638017		2,235342529	4,99675622		
100,3819921		1,853532906	3,43558424		
96,39119201		-2,137267169	4,56791095		

2.5.1.8. Variance de précision intermédiaire

Voir la formule de calcul (26) donnée dans le protocole

$$SR^2 = Sr^2 + Sg^2$$

$$SR^2 = 8.75588504$$

2.5.1.9. Coefficients de variation

Le calcul des erreurs de répétabilité et de précision intermédiaire sont exprimés par les coefficients de variations CV_r et CV_R respectivement. Leur calcul s'effectue en appliquant les formules (27, 28) données dans le protocole. Les résultats sont les suivants :

Tableau 40 : coefficient de variation de répétabilité et de précision intermédiaire

CV _r (%)	CV _R (%)
0.45401434	3.00322821

Conclusion

{ CV_r < 2% donc
CV_{SR} < 5%

La méthode est répétable avec une bonne précision

2.6. Limite de détection (LD) et limite de quantification (LQ)

Comme nous l'avons cité dans le protocole de validation, les résultats de la droite de régression linéaire de DCDA qui seront utilisés pour le calcul de la limite de détection et la

limite de quantification (LQ) suivant les formules (29, 30) données dans le protocole respectivement.

$$LD = (3.3 * 3875.51919) / 182682.66667$$

$$LD = 0,07000781 \mu\text{g/ml}$$

$$LD < 1\mu\text{g/ml}$$

$$LQ = (10 * 3875.51919) / 182682.66667$$

$$LQ = 0,21214488 \mu\text{g/ml}$$

Donc la méthode permet de détecter la Dicyandiamide à une concentration minimale de $0.07\mu\text{g/ml}$ et de quantifier toute concentration de Dicyandiamide $\geq 0.21\mu\text{g/ml}$.

Conclusion

Les tests de validation analytique de la méthode d'identification et de dosage des substances apparentées de la metformine HCl ont rempli toutes les exigences recommandées par les pharmacopées (FDA et ICH). A partir delà, la méthode est jugé spécifique, stable, linéaire, exacte, répétable avec une bonne précision.

Du point de vue de la gestion, l'évaluation de tout projet aboutit à un résultat qui peut être un bénéfice ou une perte. Pour ce qui concerne notre projet ; nous savons d'avance que la réalisation de cette étude sera bénéfique à l'entreprise d'un point de vu environnemental et économique. Une question qui nous vient à l'esprit est : **quels sont ces bénéfices ?**

1. Les gains du projet

1.1. Les gains économiques

1.1.1. Gain du temps

La réduction des paramètres de la colonne HPLC (colonne 1) suppose une réorganisation au sein de l'entreprise. Cette réorganisation peut être expliquée par la flexibilité technique de l'équipement HPLC, en d'autres termes s'adapter rapidement au changement pour accélérer le flux physique (la circulation du produit) et s'appuyer sur une polyvalence et une flexibilité de l'emploi du personnel ce qui peut être expliqué par les gains du temps.

Après l'étude de l'optimisation des deux colonnes 1 et 2 (cf. chapitre V), on a les résultats des temps d'analyses pour chaque colonne (**tableau 41**).

Tableau 41 : Temps de rétention donnée par les deux colonnes

	Temps d'analyse d'un lot(h)	Temps d'analyse de 10 lots(h)	Journées nécessaire pour le contrôle de 10 lots (jour)	% de réduction du temps d'analyse
Colonne 1	14	140	7	-
Colonne 2	8	80	4	43%

N.B : le laboratoire de contrôle qualité NNAPP contrôle environ dix lots de Metformine 850mg par semaine.

D'où : $14 \times 10 = 140h$ et $140/24 \approx 6$ jours (colonne 1).

$8 \times 10 = 80h$ et $80/24 \approx 3$ jours (colonne 2).

On remarque que pour chaque colonne on a rajoutée une journée laquelle consiste au temps nécessaire pour la récolte des résultats d'analyse (constitution des dossiers de lot)

Le pourcentage de réduction du temps d'analyse avec la colonne 2 qui est de 43% est un argument largement convainquant de l'utilité de la nouvelle colonne.

1.1.1.1. Avantages engendrés par le gain du temps

Le temps est une variable majeure des facteurs clés de succès de toute entreprise car maîtriser la gestion des temps est un signe de réussite dans l'environnement économique. Pour notre projet le temps gagné par l'utilisation de la nouvelle colonne est de trois jours dont on tire plusieurs avantages parmi eux :

Ø Avancement des délais de libération des lots

Ce qui permet de répondre aux exigences des clients à terme. C'est un avantage concurrentiel pour l'entreprise. Sans oublier le côté humain car sauver une vie d'un malade est un acte d'or.

Ø Flexibilité du personnel

Le temps gagné doit être exploité et géré au profit de l'entreprise. Il est de la responsabilité des dirigeants de réorganiser le travail quotidien du personnel du laboratoire de contrôle qualité. Le personnel sera appelé à effectuer d'autres tâches en ce temps gagné du moment où il est polyvalent.

Ø Augmentation de la productivité

Les trois jours gagnés ont pour conséquence l'accélération du rythme de productivité au laboratoire. Car l'équipement HPLC peut contrôler jusqu'à 18 lots par semaine avec la colonne 2.

8 Lots → 4 jours

17.5 Lots → 7 jours

1.1.2. Gain d'argent

L'augmentation de la productivité du laboratoire et donc de la libération des lots vers le marché entraîne forcément l'accroissement de la rentabilité de l'entreprise tout comme la mise à disposition du produit sur le marché.

1.1.3. Minimisation des coûts

La minimisation des coûts est dite stratégie de domination par les coûts, elle constitue un moyen de différenciation par rapport aux concurrents.

Cette minimisation se manifeste par la réduction des prix de la colonne et des prix des réactifs utilisés dans la méthode. Le **tableau 42** le résume

Tableau 42 : Etude de minimisation des coûts

	Colonne 1		Colonne 2		écart	
	Quantité/an	Prix/an	Quantité/an	Prix /an	Quantité/an	Prix/an
colonne	1	57587.40	-	50076.00	-	7511.4
NH ₄ H ₂ PO ₄	6.528kg	68368.4235DA	4.080	42723.72	2.448	25644.7035 DA
Phase mobile	384L	-	240L	-	144L	-

2. Gains écologiques

L'usine est certifiée ISO 14001 et OHSAS 18001. Il est naturel qu'elle intègre des évaluations environnementales à tous les processus décisionnels.

2.1. Réduction de l'énergie

L'équipement HPLC consomme 0.25K watt/h. la réduction de temps d'analyse de 72h réduira cette consommation de 50% ce qui diminuera le taux de CO₂ engendré (un bénéfice environnemental très considérable).

2.2. Réduction de déchets

Les déchets pharmaceutiques de l'équipement HPLC sont liquides et se composent d'une solution tampon (Ph 3.00), de méthanol et de l'acide phosphorique. La minimisation de ces déchets réduira automatiquement le danger qu'ils représentent pour l'humain et pour l'environnement.

Les objectifs principaux de cette modeste étude consistent en la réduction du temps d'analyse de la méthode d'identification et de dosage des produits de dégradation de Metformine par HPLC, ainsi que la validation analytiques de cette méthode suite aux changements qui lui sont apportés.

L'étude d'optimisation de la méthode a abouti à des résultats très satisfaisant vis-à-vis des objectifs préétablis.

L'utilisation de la colonne 2 (150*4.6) permet de diminuer le temps de rétention du principe actif d'environ 19 min (37%) par rapport au temps notée en utilisant la colonne 1 (250*4.0).

Arrondir les angles entre la résolution de la colonne et le temps de rétention du principe actif n'était qu'un souhait, et grâce à cette étude nous avons démontré que l'utilisation de la colonne 2 augmente la résolution d'environ 21%. Ce qui est rassurant sur la durée de vie de la colonne.

L'augmentation de la température de la colonne et du débit de la phase mobile diminue certainement le temps de rétention du principe actifs, mais cela présente des inconvénients sur l'équipement HPLC, la durée de vie de la colonne et sur la qualité des résultats du contrôle qualité de notre produit.

La validation analytique a démontré que la méthode est :

- Ø Spécifique à l'identification et dosage des produits de dégradations de Metformine ;
- Ø Suffisamment stable : les tests de la dégradation (hydrolyse, oxydation...) du produit ont démontré que la méthode possède une grande capacité de séparer les impuretés résultantes de la dégradation du principe actif du médicament ou de ces excipients ;
- Ø linéaire sur un intervalle de concentration de 0.8-1.2µg/ml avec des coefficients de corrélation de 0.998 (linéarité de STD chargé de DCDA) et de 0.997 (linéarité de DCDA seule) ;
- Ø exacte dans un intervalle de confiance de [97,509-102,509] ;

- Ø précise : les coefficients de variation aussi bien lors de l'étude de la répétabilité que la précision intermédiaire affirme la grande précision de la méthode.
- Ø Le coefficient de variation de la répétabilité qui est de 0.45% (inférieur à 2%) et le coefficient de variation de la précision intermédiaire est de 3.00% (inférieur à 5%)

D'un point de vue économique et environnementale, cette étude est très bénéfique pour l'entreprise. En effet, la réduction de la taille de la colonne de 60% nous fait gagner trois jours de temps ce qui avance les délais de livraison, réduit la consommation en réactif à savoir la consommation de la phase mobile qui passe de 384 litres par an à 144 litres. Les bénéfices écologiques (environnementaux) sont aussi considérables du moment où on a noté une diminution de déchets pharmaceutiques liquide de HPLC et une réduction en énergie consommée par l'équipement.

- [1] Intra web: NNAPP.
- [2] **Document interne à NNAPP** : Suivi journalier de température et d'humidité relative en zone contrôlée à NNAPP
- [3] **Document interne à NNAPP** : Production de la Metformine 1000 mg, 850 mg et 500 mg.
- [4] **Document interne à NNAPP** : Suivi journalier de la température et de l'humidité en zone contrôlées 02jan (2011).
- [5] Sterne. J, Pharmacology and mode of action of hypoglycemic guanidine derivatives, Oral hypoglycemic agents, Campbell G.D. Academic Press-London. (1969)
- [6] IDRISOU Yasmina magister génie des procédés option génies des polymères université A. Mira de Bejaia diffusion d'un principe actif, metformine, à travers une matrice poly (acide lactique). (2008).
- [7] Pharmacopée européenne 7.0. (2011)
- [8] USP (2012).
- [9] **document interne à NNAPP** : Spécifications techniques réglementaire du produit fini Metformine 850mg à NNAPP (2010).
- [10] **document interne à NNAPP** : Dénombrement des fungi par la méthode d'ensemencement en profondeur selon la ph. Eur (2011).
- [11] **document interne à NNAPP** : Dénombrement des germes aérobies totaux par la méthode d'ensemencement en profondeur selon la ph. Eur 11.déc.(2011).
- [12] **document interne à NNAPP** : Méthode de recherche d'Escheria Coli selon la ph.Eur.(2011).
- [13] Francis Rouessac , Annik Rouessak et al., Analyse chimique: method et thechnique instrumentales. 1-7 Ed : Dunod, (2009)
- [14] pharmacopée européenne 7.0 ; 2.2.29 chromatographie liquide (2011).
- [15] MENDHAM, DENNEY, BARNES et THOMAS. Analyse chimique quantitative de Vogel.1-6. (2006).
- [16] SKOOG, WEST et HOLLER. Chimie analytique. 1-7 Ed : Boeck Université Rue des Minimes 39, B-1000 Bruxelles p 701-715. (1997).
- [17] Yuri Kazakevich et Rosario LoBruttoHPLC for Pharmaceutical Scientists, Copyright © by John Wiley & Sons, Inc. .(2007).
- [18] KOSTARNOI et ALHigh-Performance Liquid Chromatography in the Analysis of Multicomponent Pharmaceutical Preparations, *Analytical Chemistry*, Vol. 63 p516-529. . (2008).

- [19] Fahmy, O.T., Korany, M.A., and Maher.H.M. *J.Pharm.Biomed. Anal.*vol. 34, no. 5, p. 1099. (2004)
- [20] .Gagliardi, L., De Orsi, D., Chimenti, P., Porra, R., andTonelli, D ., *Anal. Sci.* vol. 19, no. 8, p. 1195. (2003)
- [21] STAROVEROV et al.,. *Khim.- Farm. Zh.*, 2004, vol. 38, no. 3, p. 54. (2004)
- [22] <http://chemphys.ustrasbg.fr/mpb>
- [23] N. S.Wilson, J.W. Dolan, L. R. Snyder, P.W. Carr, L. C. Sander, Column selectivity in reversed-phase liquid chromatography III.The physico-chemical basis of selectivity, *J. Chromatogr. A* 961, 217–236. (2002)
- [24] J. Israelachvili,. *Intermolecular and Surface Forces*, Academic Press, Amsterdam, (2002)
- [25] *Principles of the Optimization of HPLC Illustrated by RP-Chromatography*
Stavros Kromidas
- [26] Cours de validation Duboste (2008).
- [27] Agence française e sécurité sanitaire des produits de santé ; bonnes pratiques de Fabrication, bulletin officiel N°2011/8 bis.
- [28] Melle Merriane RAYNAND ; validation du procédé de fabrication dans l’industrie Pharmaceutique, appliquée aux formes solides orales ; université de LIMOGES, faculté de Pharmacie (2011)
- [29] Olivier Nicolas ; Christine Farenc ; Françoise Bressole ; « A strategy of validation of bioanalytical methods to support pharmacokinetic and toxicological studies » *Annales de toxicologie analytique* VOL XVI N°2 ;(2004)
- [30] ICH Harmonised Tripartite Guideline, (2000)
- [31] Ludwig Huber; validation and qualification in analytical laboratories.
- [32] Utilisation et maintenance de la chaîne HPLC Waters Alliance avec le détecteur 2487 et le logiciel Empower 2 (2010)
- [33] documentmanuel de l’opérateur : module de séparation 2695 de Waters, Tome 1 34 Maple Street Milford, M A 01757. 715022695FR, Revision B]
- [34] Utilisation et maintenance de la chaîne HPLC Waters Alliance avec le détecteur 2487 et le logiciel Empower 2 (2010)
- [35] Certificat of analysis of column packing nucleosil 10-SA
- [36] Méthode de préparation de la solution tampon pH 3,0 [2009]
- [37] Document interne à NNAPP : Méthode de contrôle de Metformine de 850 mg (2011)
- [38] Document interne à NNAPP : Réception et gestion des colonnes (2007)

[39] Validation of Chromatographic Methods November (1994)

[40] Verification of suitability compendial analytical procedure protocol (2007).

[41] Validation report. Ph.Eur./BP/USP based method for determination of related substances/ degradation products in Metformin tablets and granulate, and an alternative HPLC assay method for metformine HCl in tablets and granulate] Weifa A/S [1995].

[42] Statistical analysis, verification of analytical procedure, identification of Metformine HCl and total impurities tests in granulate and metformine 850mg and 500mg in NNAPP (2007).

[43] Abrégés pharmacologie M. Moulin édition Masson. (2002)

[44] Abrégés (cours +exo). Initiation a la connaissance du médicament (2011).

1. Définition du diabète sucré

Le diabète se définit par l'existence d'une hyperglycémie chronique. Le taux normal de la glycémie chez l'adulte se situe entre 0.80g/l et 1.10g/l à jeun (soit 4.3 à 6.1 mmol/l).

Le diagnostic du diabète sucré est simple et repose sur le dosage de la glycémie à jeun (après 8 à 12 heures de jeûne)

- Ø Si la glycémie est supérieure à 1.26 g/l (7mmol/l), le sujet est diabétique. Pour les valeurs limites comprise entre 1.20 et g/l, il est nécessaire de confirmer le résultat par un second dosage ;
- Ø Si la glycémie est comprise entre 1.10 et 1.26 g/l, le sujet est dit atteint d'hyperglycémie à jeun. S'il n'est pas encore diabétique, il risque de le devenir en l'absence de prise en charge (après amaigrissement, la glycémie peu revenir à une valeur normale).

2. Type de diabète

Il existe différent type de diabète :

2.1. Diabète insulindépendant ou diabète de type 1

Il se voit le plus souvent chez le sujet jeune et maigre et est d'origine idiopathique. Le manque absolu d'insuline résulte d'une destruction complète ou du moins très importante des cellules β langerhansiennes. La capacité de sécrétion d'insuline est donc définitivement perdue. L'amaigrissement, la fatigue et un syndrome polyurodipsique sont les signes cliniques de la carence insulinique qui se traduit, sur le plan biologique, par une hyperglycémie permanente, une forte glycosurie et la présence de corps cétonique dans les urines. Ça s'observe surtout chez l'enfant et l'adulte jeune mais peu apparaître à tous les âges.

2.2. Diabète non insulindépendant (DNID) ou diabète de type 2

Le diabète «non insulindépendant » ou « diabète de type 2 » appelé également « diabète insulindépendant » touche le plus souvent des sujets obèses après la quarantaine. Les cellules β ne sont pas détruites mais seraient moins sensibles au stimulus normal du glucose, d'où une diminution de la sécrétion d'insuline. Il existe, de plus, une diminution de la sensibilité tissulaire aux effets de l'insuline (insulinorésistance) au niveau des muscles, du

foie et du tissu adipeux. Le diabète de type 2 entraîne peu de symptômes clinique : fatigue, jambes lourdes, mictions nocturnes.

Mis à part ces deux types principaux, il existe d'autres types de diabète pouvant nécessiter un traitement par l'insuline : diabète gestationnel, diabète du sujet âgé, de l'insuffisant hépatique ou du pancréatectomisé, etc.

3. Traitement médicamenteux

Le rétablissement de l'hyperglycémie est réalisé par la prescription de nombrables hypoglycémiantes oraux, injectable, selon le type d'insuline, leur cible, et leur mode d'action on trouve une panoplie de médicament.

3.1.Médicament du diabète de type 1

L'administration d'insuline est absolument nécessaire puisque la production d'insuline endogène est arrêtée.

3.1.1. Médicament du diabète de diabète de type 2 :

Il est possible d'utiliser les hypoglycémiantes oraux ou l'insulinothérapie.

Parmi les hypoglycémiantes oraux, on distingue principalement quatre grandes familles :

3.1.1.1. Les sulfamides hypoglycémiantes

Leur action hypoglycémiantes résulte surtout d'un effet pancréatique ; ils augmentent la sécrétion d'insuline par les cellules β et intensifient la sensibilité des récepteurs insuliniques des cellules périphériques.

3.1.1.2.Les biguanides (metformine)

Leur action hypoglycémiantes résulte d'un effet extra pancréatique ; ils diminuent la résorption du glucose dans l'intestin, inhibent la néoglucogenèse dans le foie et augmentent l'utilisation de glucose dans les tissus périphériques.

3.1.1.3.Les inhibiteurs des alpha glucosides :

Ils diminuent la dégradation intestinale des glucides complexes et des disaccharides ou monosaccharides absorbables. Ils diminuent ainsi l'hyperglycémie postprandiale.

Parmi ces hypoglycémiantes, la metformine reflète le principe actif de choix, il occupe une place particulière dans le traitement monothérapeutique du diabète non insulino-dépendant ayant pour seul objectif la réduction de l'insulinorésistance.

1. Médicament

On entend par «médicament » toute substance ou composition présentée comme possédant des propriétés curatives ou préventives à l'égard des maladies humaines et animales....ainsi que tout produit pouvant être administré à l'homme ou l'animal en vue d'établir un diagnostic médical, de restaurer, de corriger ou de modifier des fonctions organiques.

2. Principe actif

Tout composant d'un médicament, qui est destiné à exercer une action pharmacologique ou un autre effet direct en rapport avec le diagnostic, le traitement, la prévention d'une maladie, ou à agir sur la structure, les fonctions de l'organisme humain ou animal par des moyens pharmacologiques. Un médicament peut contenir plusieurs principes actifs. Terme équivalent : substance active. [44]

3. Excipient

Tout composant, autre que le principe actif, qui est présent dans un médicament ou utilisé pour sa fabrication. La fonction d'un excipient est de servir de vecteur au principe actif, ou d'entrer dans la composition du vecteur, contribuant ainsi à certaines propriétés du produit, telles que la stabilité, le profil biopharmaceutique, l'aspect et l'acceptabilité pour le patient, la facilité de fabrication, la formulation d'un médicament comprend généralement plusieurs excipients [44].

4. Générique

Les génériques sont des copies de médicaments princeps tombés dans le domaine public, contenant la même quantité de principe actif et présentés sous la même forme pharmaceutique. Ils doivent prouver leur équivalence thérapeutique pour légitimer leur substitution avec le princeps, à noter également qu'ils présentent des avantages économiques bien considérables.

5. Comprimé

Les comprimés sont des préparations solides, contenant une unité de prise d'un ou plusieurs principes actifs. Ils sont généralement obtenus en agglomérant par compression, un volume constant de particules. Ils sont destinés à la voie orale [7].

6. Matière première

Toute substance utilisée dans la fabrication d'un médicament, à l'exclusion des articles de conditionnements [7].

7. Conditionnement

Toutes les opérations, et compris le remplissage et l'étiquetage, que doit subir un produit vrac en vue de devenir un produit fini.

8. Article de conditionnement (ADC)

Tout élément utilisé lors du conditionnement des médicaments, à l'exclusion de l'emballage destiné au transport ou à l'expédition.

Les articles de conditionnement sont appelés primaires ou secondaires selon qu'ils sont respectivement destinés ou non à être en contact direct avec le médicament [7].

9. Le lot

Quantité définit d'une matière première d'un article de conditionnement ou d'un produit fabriqué en une opération ou en une série d'opération, telle qu'elle puisse être considérée comme homogène [7].

10. Produit intermédiaire

Produit partiellement manufacturé qui doit encore subir d'autres étapes de fabrication avant de devenir un produit vrac [7].

11. Produit vrac

Produit qui a subi toute les étapes de la fabrication à l'exclusion du conditionnement final. [7].

12. Produit fini

Médicament qui a subi tous les stades de fabrication et compris le conditionnement [7].

13. Qualification

Opération destinée à démontrer qu'un matériel fonctionne correctement et donne réellement les résultats attendus. Le concept de validation est parfois élargi pour comprendre celui de la qualification [7].

14. Zone contrôlée

Zone construite et utilisée de manière à limiter l'introduction de contaminations éventuelles, ainsi que les conséquences d'une fuite accidentelle d'organismes vivants. Le degré de contrôle exercé doit refléter la nature de l'organisme utilisé. Cette zone doit, au minimum, être maintenue en dépression par rapport à son environnement immédiat et permettre une élimination efficace des contaminations de l'air [7].

15. Pharmacopée

La pharmacopée est un recueil contenant :

- La nomenclature des drogues, des médicaments simples et composés des articles officinaux ;
- Une liste des dénominations communes des médicaments ;
- Les tableaux de posologie maximale et usuelle des médicaments pour l'adulte et pour l'enfant ;
- Des renseignements qui peuvent être utile au pharmacien pour la pratique pharmaceutique [7].

Les figures ci-après représentent les chromatogrammes obtenus par les deux colonnes (1 et 2) dans la partie optimisation à une température de 30°C et un débit de 1ml/min (C6).

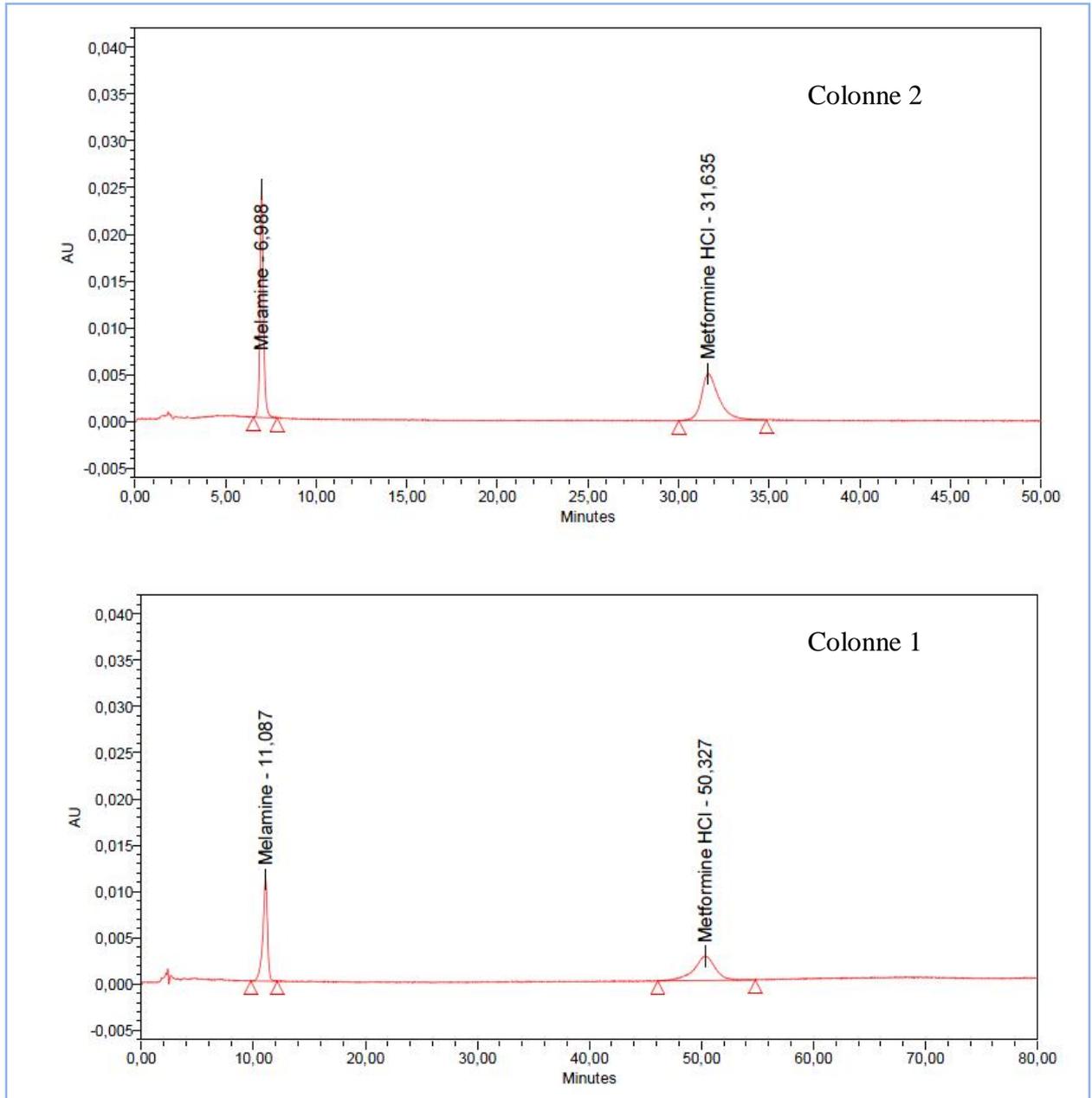


Figure 33 : chromatogramme des solutions 4 (partie optimisation)

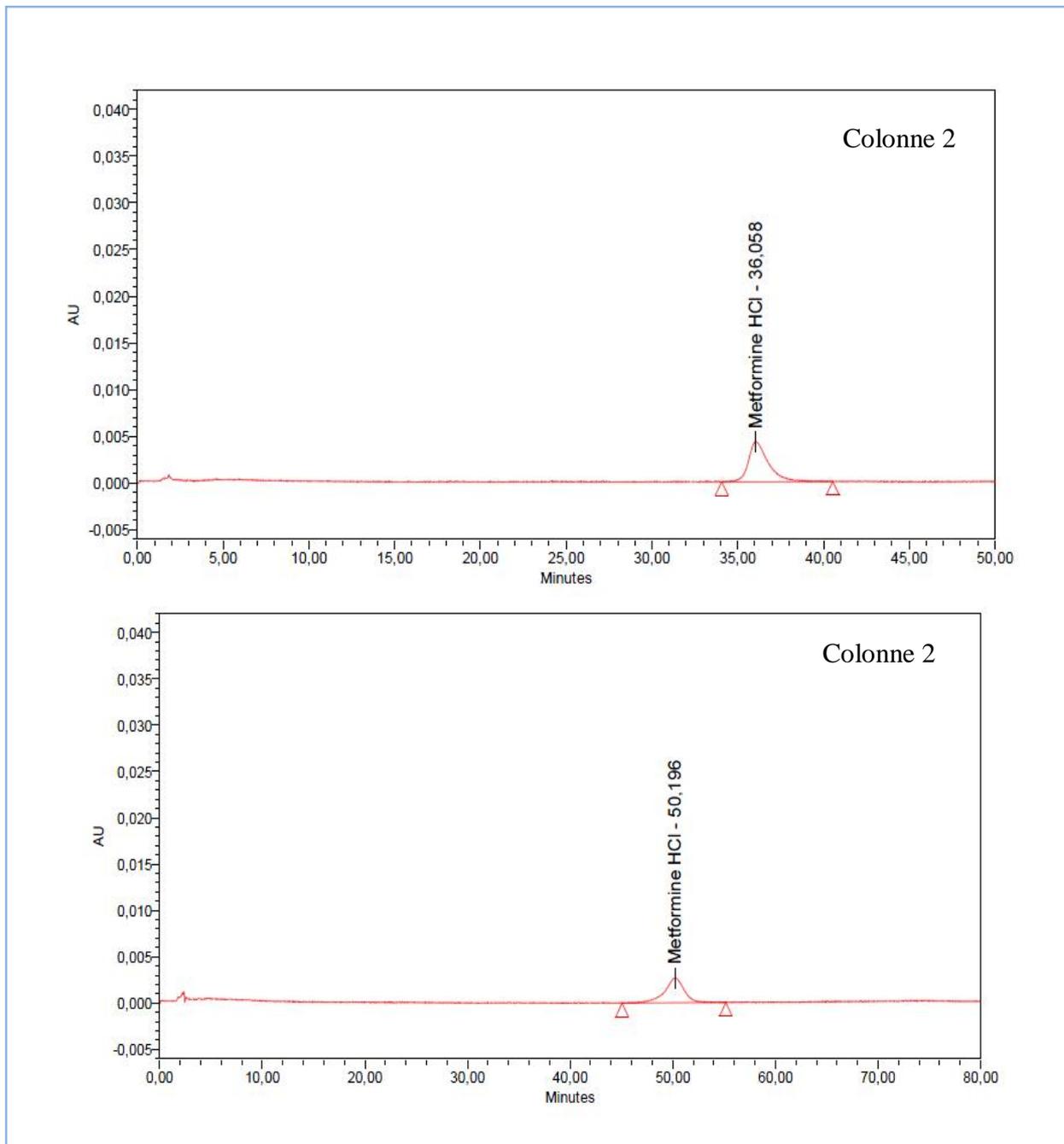


Figure 34 : chromatogrammes des solutions STD (partie optimisation)

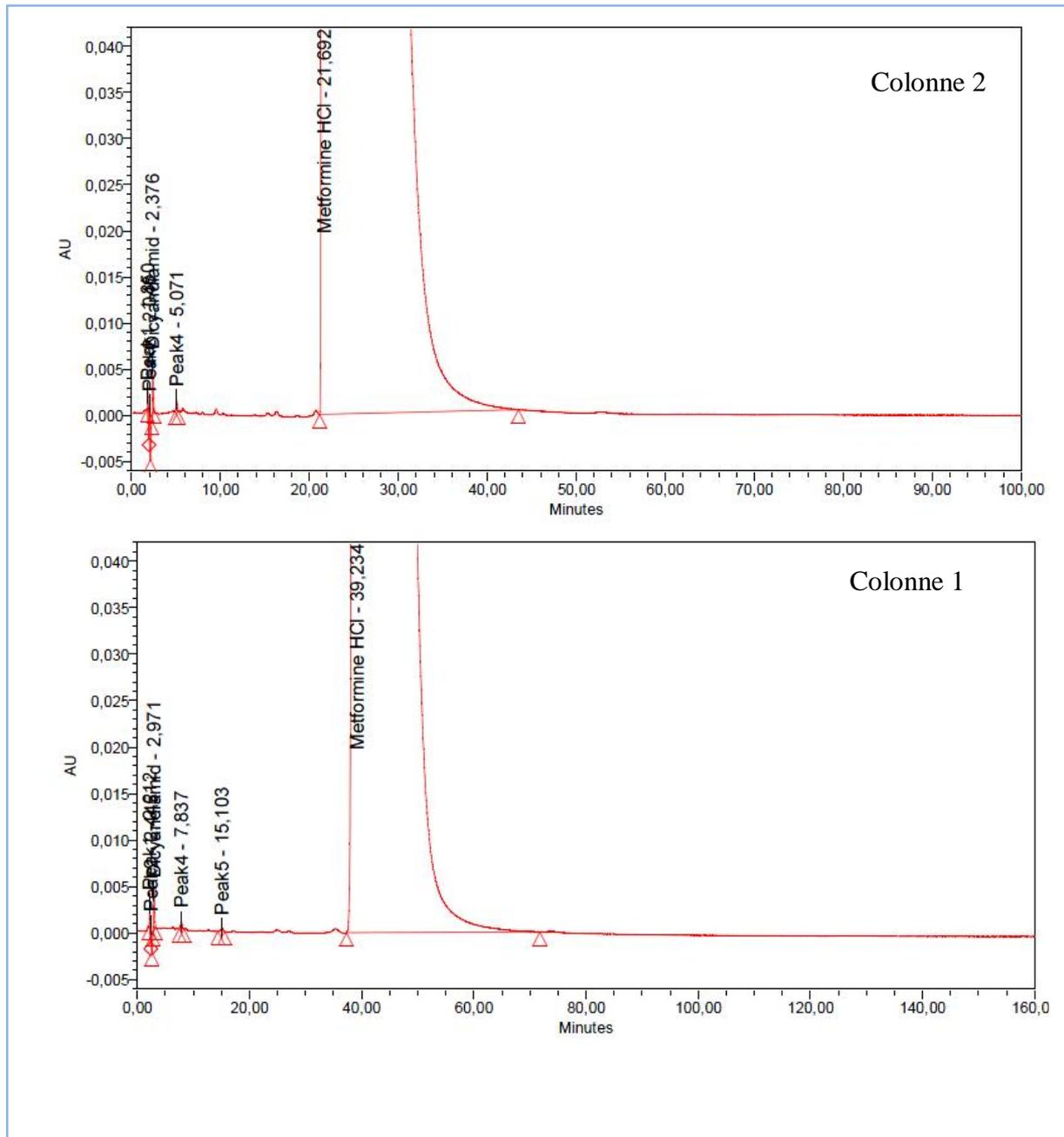


Figure 35 : chromatogrammes des solutions 1 (partie optimisation)

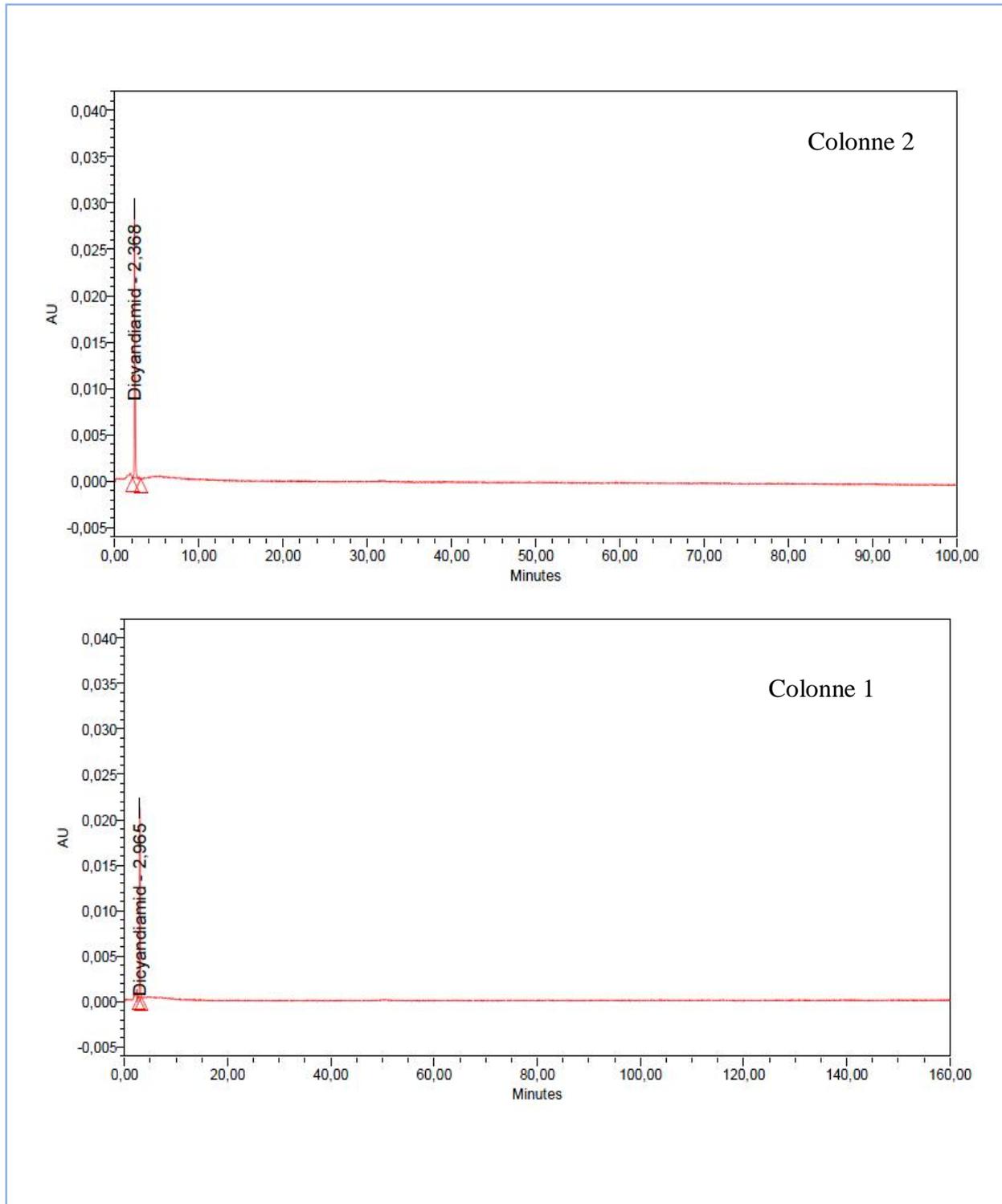


Figure 36: Chromatogrammes des solutions 2 (partie optimisation)

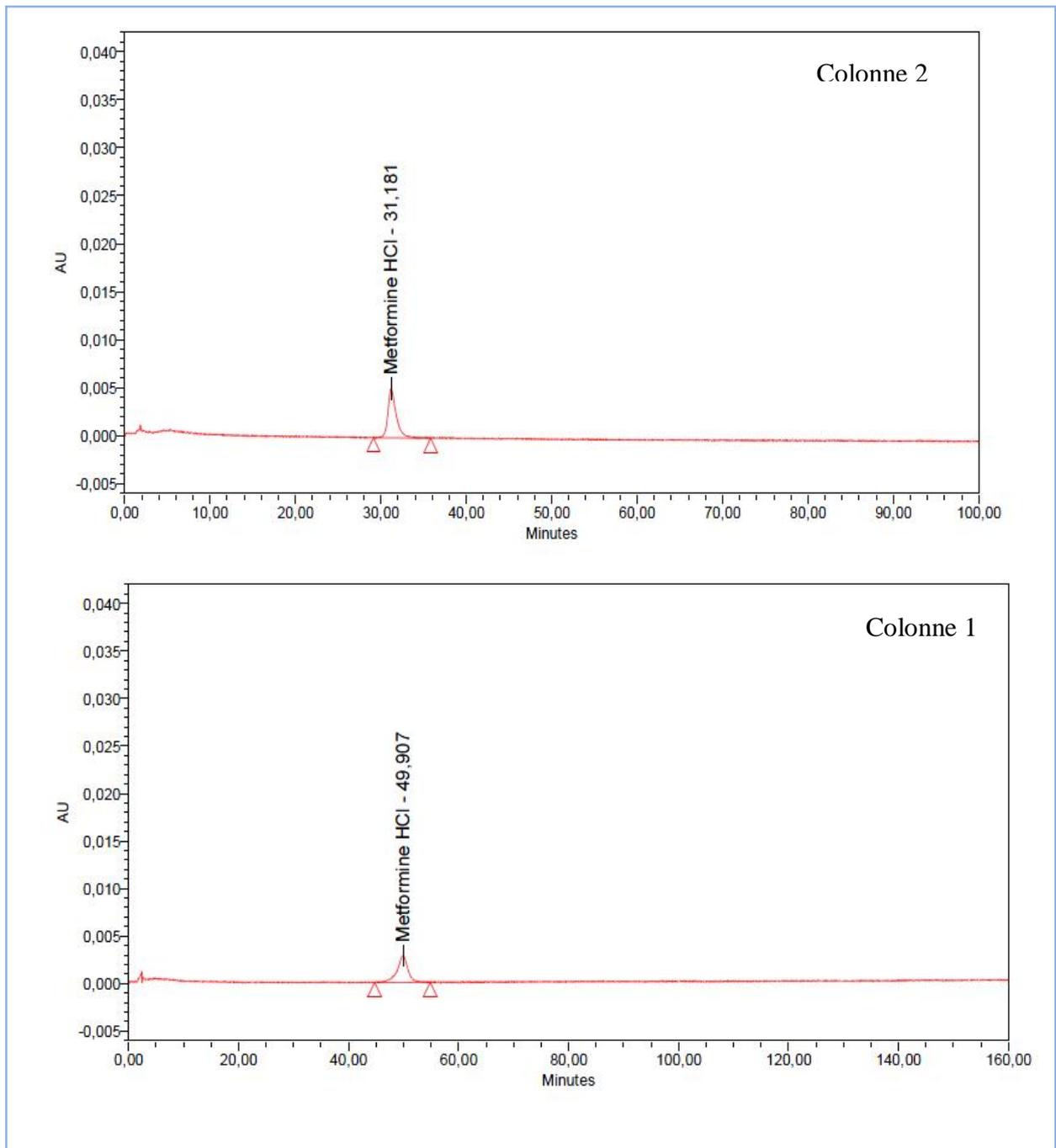


Figure 37 : Chromatogrammes des solutions 3(partie optimisation)

1. La variance

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

2. Ecart type

L'écart type se définit comme étant la racine carré de la variance.

3. Ordonnée à l'origine

Endroit où la droite d'un graphique coupe l'axe des ordonnés.

4. Pente

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

5. Risque α

Probabilité de rejeter une hypothèse vraie à l'issue d'un test statistique.

6. Coefficient de corrélation

Quotient de la covariance de deux caractères par le produit de leurs écarts types.

7. Coefficient de variation

Pour un caractère positif, il s'exprime par le rapport de l'écart type à la moyenne. Dans la plupart des cas, il est donné en pourcentage.

Résumé

Le contrôle qualité du médicament Metformine nécessite des tests physicochimique et microbiologique. L'identification et dosage des substances apparentées de Metformine par la technique HPLC est un test physicochimique dont le temps d'analyse est relativement lent.

L'objectif de notre travail consiste en la réduction du temps de contrôle du produit fini Metformine 850 mg par la méthode HPLC. Ainsi que la validation analytique de la méthode suite aux changements qui lui sont apportés.

L'optimisation de la méthode s'est réalisée en utilisant deux colonnes de caractéristique différentes : la colonne 1 (250*4.0) mm avec une porosité de 10µm et la colonne 2 (150*4.6).mm dont la porosité est de 5µm.

Pour chaque colonne nous avons répété 16 fois le test de contrôle sur un échantillon de produit fini libéré en variant la température de la colonne de (25 à 40°C) et le débit de la phase mobile (0.8 à 1.5 ml /min)

Grâce à cette étude, nous avons fini par démontrer que la colonne 2 permet de diminuer le temps de rétention du principe actif (Metformine HCl) à une température de 30 °C et un débit de 1ml/min d'environ 19 min.

Les paramètres de la validation étudiés ont été prouvé valide après une étude statistique et une interprétation judicieuse des résultats. La méthode est jugée spécifique, stable, linéaire dans le domaine de (0.8-1.2 µg/ml), exacte dans un intervalle de confiance de [97.51-102.51], précise avec une erreur de répétabilité exprimé par le coefficient de variation de 0.45% et une erreur de précision intermédiaire dont le coefficient de variation est de 3.00%. Cette méthode est jugée capable de détecter la Dicyandiamide à une concentration minimale de 0.07 µg/ml et aussi de la quantifiée si sa concentration minimale dans l'échantillon est de 0.21ug/ml.

L'évaluation économique et écologique du projet à justifier ce changement par apport d'un bénéfique d'ordre économique (gain de temps et d'argent) ainsi que d'ordre écologique qui se manifeste par la minimisation de déchets pharmaceutique et de l'énergie consommée par l'équipement.

Mots clés: *Metformine, temps de rétention, colonne, HPLC, débit, température, validation.*