

الجمهورية الجزائرية الشعبية الديمقراطية

République Algérienne Démocratique et Populaire

وزارة التعليم العالي والبحث العلمي

Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique

جامعة مولود معمري تيزي وزو

Université de Mouloud MAMMERY

كلية الطب

Faculté de MEDECINE

قسم الصيدلة

Département de Pharmacie

ⵜⴰⵎⴰⵎⵔⴰⵏⵜ ⵏ ⵙⵓⵔⵉⵔ ⵏ ⵙⵓⵔⵉⵔ ⵏ ⵙⵓⵔⵉⵔ ⵏ ⵙⵓⵔⵉⵔ ⵏ ⵙⵓⵔⵉⵔ



MEMOIRE DE FIN D'ETUDE

N° D'ORDRE :

***VALIDATION D'UNE METHODE DE DOSAGE DE LA LAMOTRIGINE  
DANS DES COMPRIMES DE 50mg PAR CHROMATOGRAPHIE  
LIQUIDE HAUTE PERFORMANCE PAR L'APPROCHE CAPABILITE***

Réalisé par :

ILLOUL Lamia    ISSAD Yasmine    KADRI Lynda    RICHE Massyl

Composition de jury :

Dr H.BEN SI SAID,	MAHU,	UMMTO,	Président
Dr K.AKLI,	ACA,	UMMTO,	Examinatrice
Pr M.MAMOU,	MCAHU,	UMMTO,	Promoteur
Dr A.ABDENNOURI,	RCA,	UMMTO,	Co-promoteur

ANNEE UNIVERSITAIRE : 2020/2021

**REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE**

**MINISTERE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR ET DE LA RECHERCHE  
SCIENTIFIQUE**

**Université de Mouloud MAMMERI**

**Faculté de MEDECINE**

**Département de pharmacie**

**TIZI-OUZOU**



**ⵜⴰⵎⴰⵎⵎⵉⵔⵉⵜ ⵏ ⵎⵓⵍⵓⵔ ⵎⴰⵎⵎⵉⵔⵉ**

**MEMOIRE DE FIN D'ETUDE**

**N° D'ORDRE :**

**En vue de l'obtention du diplôme de Docteur en Pharmacie**

**Thème :**

***VALIDATION D'UNE METHODE DE DOSAGE DE LA  
LAMOTRIGINE DANS DES COMPRIMES DE 50mg PAR  
CHROMATOGRAPHIE LIQUIDE HAUTE PERFORMANCE PAR  
L'APPROCHE CAPABILITE***

**Réalisé par :**

**ILLOUL Lamia    ISSAD Yasmine    KADRI Lynda    RICHE Massyl**

**Composition de jury :**

<b>Dr H.BEN SI SAID,</b>	<b>MAHU,</b>	<b>UMMTO,</b>	<b>Président</b>
<b>Dr K.AKLI,</b>	<b>ACA,</b>	<b>UMMTO,</b>	<b>Examinatrice</b>
<b>Pr M.MAMOU,</b>	<b>MCAHU,</b>	<b>UMMTO,</b>	<b>Promoteur</b>
<b>Dr A.ABDENNOURI,</b>	<b>RCA,</b>	<b>UMMTO,</b>	<b>Co-promoteur</b>

**ANNEE UNIVERSITAIRE : 2020/2021**

# *Dédicaces*

Je dédie ce projet de fin d'études :

A ma très chère **mère**,

A mon très cher **père**,

Qui m'ont procuré tout l'amour, courage et le soutien dont j'avais besoin afin de concrétiser mes objectifs. Je leur témoigne ma profonde reconnaissance pour tous leurs innombrables sacrifices et de me couvrir de force et bienveillance.

A ma grande sœur **Lydia** et à ma petite sœur **Chanez**,

Vous êtes ma source de bonheur, merci d'être toujours à mes côtés de m'épauler et m'encourager dans chaque pas que je fais. Vous avoir comme sœurs est une bénédiction dans ma vie.

A mon beau-frère **Sofiane**,

Pour le soutien moral, ses précieux conseils et encouragements.

Particulièrement à feu mon grand-père **Makhlouf**,

J'espère t'avoir rendu fier d'ici-bas et fait honneur à ton héritage à savoir l'éducation et l'instruction. Que le paradis soit ta dernière demeure.

A mes quadrinômes **Mr. Riche Massyl, Mlle Issad et Mlle Kadri**, merci d'avoir donné le meilleur de vous-mêmes pour ce travail.

*Iloul Lamia*

# Dédicaces

Je dédie ce projet de fin d'études :

A ma chère **mère**,

A mon cher **père**,

Qui n'ont jamais cessé, de me soutenir et de m'épauler tout au long de mon cursus universitaire pour que je puisse atteindre mes objectifs.

A mon grand frère **Saïd** et à mon adorable belle-sœur **Yasmine**,

Pour leur soutien moral et leurs précieux conseils tout au long de mes études et une spéciale dédicace à ma chère nièce **Alma** qui fête son deuxième mois de naissance et que je souhaite voir au plus vite.

A ma grande sœur **Mira**,

Aucune dédicace ne peut exprimer mon amour et ma gratitude de l'avoir comme sœur.

A mon aimable **beau-frère Ghiles**,

Sur lequel je compte toujours, et pour lequel je souhaite une vie prospère.

**Aux deux familles Issad et Ait Abdelmalek,**

Un grand merci à mes tantes et oncles pour leur soutien et encouragements.

A toutes les personnes chères à mes yeux, à mes amies d'enfance, ma meilleure amie, pour leur soutien, amour et bienveillance.

A mes chers quadrinômes **Kadri Lynda, Illoul Lamia et Riche Massyl**, mes amis avec lesquels j'ai partagé ce projet, et à toute la promotion Pharmacie 2015/2016.

*Issad Yasmine*

# Dédicaces

Je dédie ce projet de fin d'études :

A mon très cher **père**

Partit très tôt et qui j'espère rendre fier de là où il est.

A ma très chère **mère**

Pour tous ses indénombrables sacrifices, son soutien et son encouragement sans  
lesquels je n'aurai jamais réussi.

A mes merveilleuses Sœurs **Celia, Hanane,**

A mes trésors **Lyna et Tany,**

À qui je souhaite la réussite au baccalauréat avec brio

Tous les mots ne peuvent exprimer *mon* amour et ma gratitude à leur égard.  
Pour leur soutien moral, et leurs précieux conseils tout au long de mon parcours  
une dédicace **particulière** à mon adorable nièce **Louise**, qui aiguaye et embellit  
ma vie depuis sa naissance.

A mon admirable **frère Amirouche,**

Qui représente un exemple de réussite pour moi, sur qui je pourrais toujours  
compter, et pour lequel je souhaite tout ce qui est de meilleur dans la vie

**Aux deux familles Kadri et kolli**

A toutes les personnes chères à mes yeux, à **mes proches,**

Mes **meilleures amies** que je considère comme ma **deuxième famille** pour leur  
soutien, amour, amitié et compréhension. Et mon petit chat **Hugo** que j'aime  
inconditionnellement.

A mes chers quadrinômes **Issad Yasmine, Riche Massyl et Illoul Lamia,** mes  
amis avec lesquels j'ai partagé ce projet.

*Kadri Lynda*

## *Dédicaces*

Ô Dieu tout puissant, Allah confie chaque cœur l'amour et la santé, chaque âme le bonheur, chaque personne proche de moi la vie, protège ma famille et tous mes proches.

Je dédie ce projet de fin d'études :

### **A ma famille,**

A Mon Père, Ma Mère et Ma Sœur. Mes mentors depuis la première heure. Vous m'avez appris à aimer, vous m'avez appris à gagner. Vous avez tout fait pour que je réussisse. Vous avez toujours été là pour moi. Vous m'avez montré le chemin. Vous avez toujours savouré mes victoires. Cette victoire est la vôtre aussi. Mon dévouement et ma reconnaissance envers vous sont éternels. Je ne serais pas là, sans vous. Vous êtes plus qu'une famille.

### **A toutes celles et tous ceux qui m'ont aidé, qui m'ont soutenu et encouragé**

Vous êtes nombreux et nombreuses. Chacune et chacun de vous, a joué un rôle mineur ou majeur sur mon chemin vers la réussite. Nous nous sommes rencontrés dans différents lieux (**Ici et ailleurs**) participé à différents événements parfois **familiaux, amicaux, touristiques, scientifiques, associatifs dont ASEPT-Algérie, éducatifs, sportifs et humanitaires**. Nous nous parlons souvent, certaines fois rarement. Certains d'entre vous sont plus âgés, d'autres plus jeunes. Nous nous sommesentraîdés. Nous avons travaillé ensemble, d'autre fois joué ensemble. Nous avons ri ensemble et d'autres fois pleuré ensemble. Vous m'avez donné des coups de mains quand j'allais mal. De fil en aiguille, de flamme en flamme vous avez nourri l'espoir d'une meilleure fin.

### **A l'équipe du Laboratoire de Chimie Analytique et notre groupe de travail**

Je dédie ce travail à notre Promoteur, au prodigieux et honorable expert en Chimie Analytique le **Pr. Mamou** pour nous avoir offert le privilège de travailler sous ses ordres et légué tous les moyens nécessaires pour mener ce projet à merveille. Ce travail est aussi le fruit de l'inoxydable virtuose **Dr. Abdennouri** qui a fait montre de tout son potentiel phénoménal, sa classe et son amour pour le domaine dans lequel il excelle, un futur maestro à en devenir. A mes coéquipières ; **Lynda** pour son enthousiasme et sa perspicacité, **Lamia** pour son intransigeance et sa rigueur et **Yasmine** pour son courage et sa volonté implacable à y aller au bout. Vous avez été toutes les trois fantastiques, ce travail est le résultat de vos efforts. Notre victoire est collective. Ce mémoire est aussi dédié à **tous les membres du laboratoire de chimie analytique**.

### **A tous ceux qui m'ont guidé,**

A **Dieu**, qui écrit mon histoire chaque jour celui qui nourrit ma rage de vaincre et me soulage dans le besoin qui m'a entouré de gens de bonne foi, à ceux qui m'inspirent, ceux qui ne me connaissent pas et ont impacté positivement ma vie, qui m'ont permis d'arriver là où je suis.

Celles et ceux qui sont là-haut. Ce mémoire est aussi le résultat de vos empreintes.

« What we do in life echoes in eternity ».

*Richie Massyl*

## *Remerciements*

A l'issue de ce travail nous tenons à remercier notre promoteur le **Professeur Marzouk MAMOU**, Directeur du Laboratoire de Chimie Analytique, pour avoir suggéré le thème de cette recherche et pour nous avoir mené à la réussite dans nos études en pharmacie en dépit tous les aléas épidémiques. Sans les orientations, les conseils, et les encouragements qu'il nous a généreusement prodigués, ce mémoire n'aurait jamais vu le jour.

Nos vifs remerciements s'adressent aussi à notre co-promoteur **Dr. Abdelhamid ABDENNOURI** qui a su être un mentor de premier rang. Sa disponibilité, la mise à disposition de ses connaissances théoriques et pratiques, son écoute, aussi bien que sa patience ont été d'un grand apport dans la l'accomplissement de notre recherche.

Il va sans dire que ce mémoire comme toute recherche à ce stade reste à parfaire. C'est pour cela que nous remercions d'avance le **Dr. Hassan BEN SI SAID**, et le **Dr. Karima AKLI** d'avoir bien voulu accepter d'examiner notre mémoire en vue de l'enrichir avec leur feedback.

En dernier lieu, que toute personne qui a contribué de près ou de loin à la réalisation et à l'aboutissement de ce travail soit vivement remerciée.

# TABLE DES MATIERES

• Table des matières .....	I
• Liste des figures .....	VII
• Liste des tableaux .....	VIII
• Liste des abréviations .....	X
• Introduction générale.....	01
• Objectifs .....	03

## I – PARTIE THEORIQUE

### Chapitre 1 : Lamotrigine

1. Définition.....	04
2. Propriétés physico-chimiques .....	04
2.1 Aspect organoleptique .....	04
2.2 Solubilité .....	05
3. Propriétés pharmacologiques .....	05
3.1 Propriétés pharmacocinétiques .....	05
3.1.1 Absorption .....	05
3.1.2 Distribution .....	05
3.1.3 Métabolisme .....	05
3.1.4 Elimination .....	05
4. Propriétés pharmacodynamiques .....	06
5. Mécanisme d'action .....	06
6. Toxicité .....	07
7. Effets indésirables .....	08
8. Situations à risque ou déconseillées .....	08
9. Interactions médicamenteuses .....	09

### Chapitre 2 : Validation des méthodes analytiques

1. Définitions .....	10
2. But de la validation .....	10
3. Procédures analytiques à valider .....	11
4. Aspect réglementaire et normatif .....	11

4.1. Documents ISO 17025 .....	11
4.2. Documents ICH .....	11
4.3. Documents de la FDA (guidance of industry) .....	11
4.4. Documents des commissions de la SFSTP .....	11
5. Critères de la validation analytique .....	12
5.1. Spécificité / sélectivité .....	12
5.2. Exactitude .....	12
5.3. Linéarité .....	13
5.4. Fidélité .....	13
5.5. Justesse .....	13
5.6. Sensibilité .....	14
5.7. Limite de détection .....	14
5.8. Limite de quantification .....	14
5.9. Robustesse .....	14
5.10. Stabilité des solutions .....	14
6. Les différentes approches de la validation analytique .....	15
6.1. Approche descriptive .....	15
6.2. Approche globale .....	15
6.3. Approche capabilité .....	15
7. Etapes de la validation analytique .....	16
8. Etudes statistiques de la validation .....	16
8.1. Spécificité/ sélectivité .....	18
8.1.1 Approche empirique .....	18
8.1.2 Approche statistique .....	18
8.2. Fonction de réponse .....	19
8.2.1 Protocole .....	19
8.2.2 Etude statistique .....	19
8.3. Alignement des observations .....	20
8.3.1 Protocole .....	20
8.3.2 Etude statistique .....	20
8.4. Prédiction inverses .....	20

8.4.1 Protocole .....	21
8.4.2 Etude statistique .....	21
8.5. Justesse .....	21
8.5.1 Protocole .....	21
8.5.2 Etude statistique .....	21
8.6. Fidélité .....	22
8.6.1 Protocole .....	22
8.6.2 Etude statistique .....	22
8.7. Linéarité .....	23

### Chapitre 3 : Approche Capabilité

1. Définition .....	25
2. Principe de capabilité .....	25
2.1. Capabilité « potentielle » CP .....	25
2.2. Capabilité « réelle » CPK .....	27
3. Utilités de la capabilité dans la validation analytique .....	28
4. Modalité de calcul de l'indice capabilité .....	30
5. Calcul du Cpk tol et du Cpk tol .....	30
6. Détermination de la taille d'un échantillon d'une méthode de validation analytique ...	32

### II – PARTIE PRATIQUE

1. Matériel et méthodes .....	34
1.1 Matériel .....	34
1.1.1 Matières premières .....	34
1.1.2 Réactifs .....	34
1.1.3 Appareillage et équipements .....	35
1.1.4 Verreries et autres .....	35
1.2 Méthodes .....	35
1.2.1 Méthodologie de la validation analytique .....	35
1.2.1.1 Choix du protocole de validation .....	36
1.2.1.2 Choix des paramètres de validation .....	36

1.2.1.3	Choix du diluant .....	36
1.2.1.4	Choix de dilution .....	36
1.2.2	Préparation des solutions .....	36
1.2.2.1	Diluant .....	36
1.2.2.2	Préparation de la solution standard .....	36
a.	Solutions standards de la Lamotrigine .....	37
b.	Préparation de la phase mobile .....	38
1.2.2.3	Préparation de la solution d'excipients .....	38
1.3	Conditions chromatographiques .....	38
1.4	Préparation de la feuille de calcul .....	39
1.5	Simulation .....	39
2.	Résultats .....	40
2.1	Données brutes .....	40
2.2	Spécificité .....	42
2.3.	Modèle $Y = ax + b$ .....	43
2.3.1	Fonction de réponse .....	43
2.3.2	Alignement des observations .....	45
2.3.3	Prédictions inverses .....	45
2.3.4	Justesse .....	46
2.3.5	Fidélité .....	46
2.3.6	Calcul de l'indice de capabilité $C_{pk.tol}$ et $C_{pk.tol}$ .....	46
2.4.	Modèle $Y = ax$ .....	48
2.4.1	Fonction de réponse .....	48
2.4.2	Alignement des observations .....	50
2.4.3	Prédictions inverses .....	50
2.4.4	Justesse .....	51
2.4.5	Fidélité .....	51
2.4.6	Calcul de l'indice de capabilité $C_{pk.tol}$ et $C_{pk.tol}$ .....	51
2.5.	Modèle $\sqrt{y} = a\sqrt{x} + b$ .....	53
2.5.1	Fonction de réponse .....	53
2.5.2	Alignement des observations .....	55

2.5.3 Prédiction inverses .....	55
2.5.4 Justesse .....	56
2.5.5 Fidélité .....	56
2.5.6 Calcul de l'indice de capacité Cpk.tol et Cpk -tol .....	56
2.6. Modèle $\ln y = a\ln x + b$ .....	58
2.6.1 Fonction de réponse .....	58
2.6.2 Alignement des observations .....	60
2.6.3 Prédiction inverses .....	60
2.6.4 Justesse .....	61
2.6.5 Fidélité .....	61
2.6.2.6 Calcul de l'indice de capacité Cpk.tol et Cpk.tol .....	61
2.7. Etude de la linéarité .....	63
2.8. Représentation graphique des simulations .....	63
3. Discussion .....	66
Conclusion .....	69
Références bibliographiques .....	70

### Annexe I : Chromatographie

1. Introduction .....	74
2. Historique .....	74
3. Principe .....	74
4. Appareillage .....	75
4.1 Pompe et gradients d'éluion .....	75
4.1.1 Pompe pour éluant .....	75
4.1.2 Le réservoir de la phase mobile .....	76
4.2 Injecteur .....	76
4.3 Colonnes .....	77
4.4 Le détecteur .....	78
4.5 Le dégazeur .....	78
4.6 L'enregistreur .....	78
5. Polarité et chromatographie .....	78
5.1 Phase mobile .....	78

5.2 Phases stationnaires .....	78
5.2.1 Phase stationnaire normale .....	79
5.3 Phase stationnaire inversée .....	79
5.4 Polarité des solvants .....	80
6 . Spécifications techniques .....	81
7 . Points forts .....	81
8 . Limites .....	81
9 . L'utilisation de l'HPLC dans l'industrie pharmaceutique. ....	82
10.Renseignements apportés par la réponse instrumentale de l'HPLC .....	82
10.1. Grandeurs de rétention .....	83
10.1.1. Coefficient de partage .....	83
10.1.2. Le temps de rétention $t_r$ .....	83
10.1.3 Le temps mort $t_m$ .....	84
10.1.4 Le volume de rétention .....	84
10.1.5 Le volume mort .....	84
10.1.6 Le facteur de rétention .....	84
10.2. Evaluation de l'efficacité d'une colonne .....	85
10.3. La sélectivité .....	86
10.4. La résolution .....	86
10.5. Analyse quantitative .....	87
Annexe II : Chromatogrammes .....	88
Annexe III : Table de Student.....	102
<b>Résumé</b>	

## Liste des figures

Figure 01 : Structure chimique développée de la Lamotrigine .....	04
Figure 02 : Mécanisme d'action de la Lamotrigine.....	07
Figure 03 : Choix d'un protocole de validation .....	17
Figure 04 : Capabilité, intervalle de tolérance et dispersion.....	26
Figure 05 : Procédé centré et procédé décentré ayant la même dispersion .....	27
Figure 06 : Règle du six sigma indiquant Ppm et Cpk .....	28
Figure 07 : Chromatogramme de la gamme standard d'étalonnage .....	42
Figure 08 : Chromatogramme de la gamme standard de validation.....	42
Figure 09 : Chromatogramme de la gamme Placébo.....	43
Figure 10 : Courbes d'étalonnage obtenues avec la fonction $y=ax+b$ .....	44
Figure 11 : Courbes d'étalonnage obtenues avec la fonction $y=ax$ .....	49
Figure 12 : Courbes d'étalonnage obtenues avec la fonction $\sqrt{y}=a\sqrt{x+b}$ .....	54
Figure 13 : Courbes d'étalonnage obtenues avec la fonction $\ln y=a\ln x+b$ .....	59
Figure 14 : Courbe de linéarité obtenue avec la fonction $y=ax+b$ .....	63
Figure 15 : Simulation des cinq niveaux de concentration .....	63
Figure 16 : Schéma des modules de la HPLC .....	75
Figure 17 : Schéma d'un injecteur avec une boucle. ....	77
Figure 18 : Schéma d'une Colonne standard et précolonne de la HPLC .....	77
Figure 19 : Schéma représentant le gel de silice pour chromatographie .....	79
Figure 20 : Renseignements apportés par un chromatogramme .....	83
Figure 21 : Schéma représentant le facteur de résolution.....	87

<b><u>Liste des tableaux</u></b>		
<b>Tableau I:</b>	<b>Choix du nombre de standards d'étalonnage et de validation en fonction du Protocole choisi</b>	<b>17</b>
<b>Tableau II:</b>	<b>Exemples de fonction de réponse</b>	<b>19</b>
<b>Tableau III:</b>	<b>Règles d'alignement pour différentes fonctions de réponse</b>	<b>20</b>
<b>Tableau IV:</b>	<b>Calcul des prédictions inverses pour différentes fonctions de réponse</b>	<b>21</b>
<b>Tableau V:</b>	<b>Interprétation des études de capabilité</b>	<b>28</b>
<b>Tableau VI:</b>	<b>Le nombre de répétitions et de séries pour assurer les prérequis spécifiés de R</b>	<b>33</b>
<b>Tableau VII:</b>	<b>Réactifs utilisés</b>	<b>34</b>
<b>Tableau VIII:</b>	<b>Appareil Chromatographie Liquide Haute Performance SCHIMADZU</b>	<b>35</b>
<b>Tableau IX:</b>	<b>Les Autres Appareils utilisés</b>	<b>35</b>
<b>Tableau X:</b>	<b>Verreries et Autres</b>	<b>35</b>
<b>Tableau XI:</b>	<b>Tableau présentant les masses théoriques des niveaux de concentration des principes actifs pesées</b>	<b>37</b>
<b>Tableau XII:</b>	<b>Tableau présentant le protocole de la préparation des solutions des standards d'étalonnage</b>	<b>37</b>
<b>Tableau XIII:</b>	<b>Tableau présentant le protocole de la préparation des solutions des standards de validation</b>	<b>38</b>
<b>Tableau XIV:</b>	<b>Tableau présentant la Colonne et conditions Chromatographique</b>	<b>38</b>
<b>Tableau XV:</b>	<b>Données brutes des standards d'étalonnage</b>	<b>40</b>
<b>Tableau XVI:</b>	<b>Données brutes des standards de validation</b>	<b>41</b>
<b>Tableau XVII:</b>	<b>Résultats obtenus pour la fonction <math>y=ax+b</math></b>	<b>43</b>
<b>Tableau XVIII:</b>	<b>Alignement des réponses observées avec les 5 séries des SV</b>	<b>45</b>
<b>Tableau XIX:</b>	<b>Prédictions inverses obtenues avec les SV des 5 séries</b>	<b>45</b>
<b>Tableau XX:</b>	<b>Justesse calculée pour chaque niveau de concentration des standards de validation</b>	<b>46</b>
<b>Tableau XXI:</b>	<b>Calcul des écarts types, des CV de répétabilité et de fidélité intermédiaire</b>	<b>46</b>
<b>Tableau XXII:</b>	<b>Calcul de l'indice de capabilité <math>C_{pk-tol}</math> et <math>\pi_{C_{pk-tol}}</math></b>	<b>47</b>
<b>Tableau XXIII:</b>	<b>Résultats obtenus pour la fonction <math>y=ax</math></b>	<b>48</b>
<b>Tableau XXIV:</b>	<b>Alignement des réponses observées avec les 5 séries des SV</b>	<b>50</b>
<b>Tableau XXV:</b>	<b>Prédictions inverses obtenues avec les SV des 5 séries</b>	<b>50</b>
<b>Tableau XXVI:</b>	<b>Justesse calculée pour chaque niveau de concentration des standards de validation</b>	<b>51</b>

<b>Tableau XXVII:</b>	<b>Calcul des écarts types, des CV de répétabilité et de fidélité intermédiaire</b>	<b>51</b>
<b>Tableau XXVIII:</b>	<b>Calcul de l'indice de capabilité Cpk-tol et <math>\pi_{Cpk-tol}</math></b>	<b>52</b>
<b>Tableau XXIX:</b>	<b>Résultats obtenus pour la fonction <math>\sqrt{y}=\sqrt{x}</math></b>	<b>53</b>
<b>Tableau XXX :</b>	<b>Alignement des réponses observées avec les 5 séries des SV</b>	<b>55</b>
<b>Tableau XXXI:</b>	<b>Prédictions inverses obtenues avec les SV des 5 séries</b>	<b>55</b>
<b>Tableau XXXII:</b>	<b>Justesse calculée pour chaque niveau de concentration des standards de validation</b>	<b>56</b>
<b>Tableau XXXIII:</b>	<b>Calcul des écarts types, des CV de répétabilité et de fidélité intermédiaire</b>	<b>56</b>
<b>Tableau XXXIV:</b>	<b>Calcul de l'indice de capabilité Cpk-tol et <math>\pi_{Cpk-tol}</math></b>	<b>57</b>
<b>Tableau XXXV:</b>	<b>Résultats obtenus pour la fonction <math>\ln y=a \ln x</math></b>	<b>58</b>
<b>Tableau XXXVI:</b>	<b>Alignement des réponses observées avec les 5 séries des SV</b>	<b>60</b>
<b>Tableau XXXVII:</b>	<b>Prédictions inverses obtenues avec les SV des 5 séries</b>	<b>60</b>
<b>Tableau XXXVIII:</b>	<b>Justesse calculée pour chaque niveau de concentration des standards de validation</b>	<b>61</b>
<b>Tableau XXXIX:</b>	<b>Calcul des écarts types, des CV de répétabilité et de fidélité intermédiaire</b>	<b>61</b>
<b>Tableau XL:</b>	<b>Calcul de l'indice de capabilité Cpk-tol et <math>\pi_{Cpk-tol}</math></b>	<b>62</b>

## **Liste des abréviations**

ANOVA : Analyse de Variance

CI50 : La Concentration Inhibitrice Médiane

Cp : Indice de Capabilité du procédé

Cpk : Indice de capabilité minimal du procédé

CV : Coefficient de Variation

Dpm : Défectueux par million

FDA: Food and Drug Administration

h ERG: Human Ether Related Gene

HPLC: Chromatographie Liquide Haute Performance

ICH: International Conference on Harmonization

ISO: International Organization For Standardization

LD: Limite de Détection

LQ: Limite de Quantification

LTG : Lamotrigine

NMDA : Acide N-méthyl-D-aspartique

PE : Prise d'essai

SE : Standard d'Etalonnage

SFSTP : Société Française des Sciences Techniques et Pharmaceutiques

SNC : Système Nerveux Central

STP : Suivi Thérapeutique Pharmacologique

SV : Standard de Validation

UV : Ultraviolet

# **Introduction**

Comme le disait Paracelsus dans une citation devenue célèbre dans le domaine de la santé et du médicament, « Sola dosis facit venenum ». Littéralement « seule la dose fait le poison » [1]. Ceci signifie que la nature des substances médicamenteuses actives et leurs doses sont des paramètres capitaux qui déterminent leurs effets thérapeutiques et toxiques [2]. Dans le monde de la santé moderne et particulièrement celui de l'industrie pharmaceutique, le respect des bonnes pratiques de fabrication des produits finis chimiques ou biologiques de santé est primordial dans la pérennisation de l'efficacité, de la qualité, et surtout de la sécurité de ces derniers durant toute leur durée de validité [3]. Par conséquent, l'analyse qualitative et quantitative des médicaments suscite l'intérêt de plus en plus grand, des chercheurs, des laboratoires auxquels ils sont affiliés, et autres agences gouvernementales et non gouvernementales du contrôle des médicaments de par le monde [3] [4].

Si le médicament est généralement défini comme tout produit pharmaceutique, ayant un principe actif et des excipients, employé à but curatif et préventif des maladies [2], l'exigence du contrôle de son efficacité et de sa toxicité engage la responsabilité des industriels dans sa commercialisation [5][6].

Outre la satisfaction des besoins de santé de la population et les bénéfices économiques engendrés par leurs ventes, les laboratoires commercialisant leurs produits de santé doivent assurer que leur usage est efficace, sûr, et respecte les normes de l'assurance qualité. Le contrôle de la qualité répond à ses exigences réglementaires en employant différentes méthodes de dosage. Ceci dit, afin qu'une méthode de dosage analytique soit employée à bon escient, une validation de cette dernière au préalable est inconditionnellement requise [5].

Le but final de toute validation est de confirmer la qualité de la méthode analytique [5]. Ceci dit, la validation des méthodes de dosage par HPLC ont fait objet de plusieurs recherches. Celles d'Hubert et al. (2006) et de Feinberg et al. (2011) sont représentatives dans ce domaine. On relève que dans leurs travaux, ils se sont appuyés régulièrement sur les Guides techniques de la SFSTP qui consiste au déploiement d'un outil de décision statistique connu sous la dénomination de profil d'exactitude, élaboré par l'approche harmonisée en 2006. Cet outil de décision est toujours d'actualité [7].

Cependant l'approche capacité se voit attribué une importance de plus en plus grande dans ce domaine après avoir conquis plusieurs autres domaines industriels [7], [8], [9]. Un des objectifs de notre travail est l'application en laboratoire de cette nouvelle approche élaborée par la SFSTP dans le domaine du médicament. Nous justifierons un tant soit peu son utilisation et éventuellement son utilité dans la validation des méthodes de dosage. C'est dans

cet esprit que nous entreprenons cette nouvelle approche de validation dans le dosage du médicament.

L'application du protocole SFSTP-2010 nous permettra-t-elle d'obtenir des résultats satisfaisants les exigences et les performances requises dans cette approche de capabilité et Justifiera-t-elle ainsi son utilité dans la validation de méthode de dosage ? Telle est la problématique posée.

Dans notre étude nous nous sommes focalisés davantage sur la validation de la méthode de dosage (en appliquant le protocole SFSTP-2010) par HPLC de la Lamotrigine dans des comprimés de 5 mg.

Afin d'apporter une réponse à cette problématique posée et de valider la méthode de dosage de la Lamotrigine par HPLC, nous avons réparti notre travail en deux (02) parties.

La première partie est théorique. Elle est subdivisée en trois chapitres :

- Chapitre I : Lamotrigine
- Chapitre II : Validation analytique.
- Chapitre III : Capabilité.

Quant à la seconde partie de cette recherche, elle est consacrée à l'expérimentation. Nous présenterons dans un premier temps le matériel et les méthodes utilisées avant d'exposer les résultats et la discussion. Cette est suivie par une conclusion qui fera la synthèse sur la validité de la méthode de dosage de la Lamotrigine dans les comprimés de 50 mg, qui est le médicament sur lequel la validation a été pratiquée. Il est évident que cette synthèse se fera sur la base des résultats et de la discussion en intégrant les notions théoriques expliquées dans la première partie.

## **OBJECTIFS**

## OBJECTIFS

---

L'objectif principal de notre étude effectuée au sein du laboratoire de chimie analytique du département de pharmacie à l'UMMTO est de valider une méthode de dosage pour la Lamotrigine dans des comprimés de 50 mg par chromatographie liquide haute performance (HPLC) en utilisant l'approche capabilité qui repose sur l'estimation du risque de non-conformité d'une caractéristique d'un produit.

Outre cet objectif principal, les objectifs secondaires assignés à ce travail sont :

- Savoir manipuler les différentes verreries de laboratoire ;
- Etablir un protocole de validation, et ce en fonction des caractéristiques du principe actif utilisé.
- Réalisation d'une analyse chromatographique par HPLC.
- Maîtrise des différents outils statistiques utilisés en validation des méthodes analytiques
- Validation de la méthode de dosage selon l'indice de capabilité après analyse des résultats.

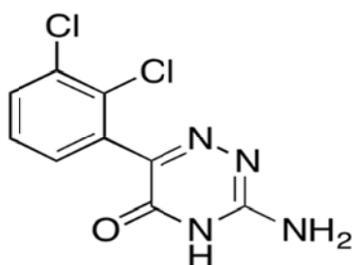
## **Chapitre I : Lamotrigine**

## 1. Définition :

La Lamotrigine, **6-(2,3-Dichlorophenyl) -1,2,4-triazine-3,5-diamine**, dérivé phenylthiazine (LTG) est un antiépileptique de deuxième génération efficace dans les épilepsies généralisées et partielles. Devant son large spectre antiépileptique et son bon profil de tolérance, la Lamotrigine est devenu progressivement un antiépileptique prescrit en première intention [10].

Le profil pharmacocinétique de la Lamotrigine est favorable toutefois, en cas de sa prise concomitante avec des médicaments antiépileptiques inducteurs enzymatiques et des contraceptifs oraux, ses concentrations plasmatiques peuvent diminuer avec potentiellement un impact sur son effet thérapeutique

La LTG est particulièrement prescrite pour le traitement d'épilepsie des femmes en âge de procréer et des femmes enceintes car son potentiel tératogène sera faible par rapport à d'autres alternatives thérapeutiques [10].



- **Formule brute :** C<sub>9</sub>H<sub>7</sub>Cl<sub>2</sub>N<sub>5</sub>
- **CAS :**84057-84-1
- **Solubilité dans l'eau :** 170 mg/L
- **Masse molaire :** 256.09 g/mol
- **Log pka:** 2,5
- **Classe pharmaceutique :** Anticonvulsivant
- **Médicaments contenant du Lamotrigine:** Lamictal® [11]

## 2. Propriétés physico-chimiques

### 2.1. Aspect organoleptique

Comprimé dispersible ou à croquer.

Comprimé rond blanc à blanchâtre avec une odeur de cassis. Une face à un bord biseauté et marqué « LTG ». L'autre face est marquée par deux super ellipses. Les comprimés peuvent être légèrement marbrés [12].

## 2.2. Solubilité

Le principe actif lamotrigine est très faiblement soluble dans l'eau et faiblement soluble dans les acides forts [13].

## 3. Propriétés pharmacologiques

### 3.1. Propriétés pharmacocinétiques

La lamotrigine présente une pharmacocinétique linéaire de premier ordre [10].

#### 3.1.1. Absorption

La lamotrigine est très rapidement et complètement absorbée au niveau gastro-intestinal avec un effet de premier passage hépatique négligeable. Il est à noter que le bol alimentaire retarde le pic de concentration plasmatique d'environ 1h30 [12].

#### 3.1.2. Distribution

Le volume de distribution est compris entre 1,25 et 1,47 L / kg et la liaison aux protéines est d'environ 55%. La demi-vie de la lamotrigine est comprise entre 24,1 et 35 heures chez les adultes, mais peut être modifiée par des médicaments inducteurs et inhibiteurs enzymatiques. Les essais cliniques n'ont montré aucune preuve d'auto-induction ou de métabolisme saturable. Les jeunes enfants (0,17 à 5 ans) éliminent la lamotrigine plus rapidement que les enfants plus âgés (5 à 10 ans). Les enfants peuvent être plus sujets à l'induction enzymatique que les adultes [14].

#### 3.1.3. Métabolisme

La lamotrigine est métabolisée de façon très importante au niveau du foie, en subissant une oxydation et une glucuroconjugaison. Son métabolisme peut être affecté par l'utilisation concomitante d'autres antiépileptiques en particulier les effets inducteurs qui accélèrent son métabolisme. En fonction de l'association avec un autre antiépileptique, les posologies doivent être ajustées [10].

#### 3.1.4. Élimination

La clairance plasmatique apparente chez le sujet sain est d'environ 30 ml/min. La clairance de la lamotrigine est initialement métabolique avec l'élimination consécutive de dérivés glucuronoconjugués dans les urines. Moins de 10 % sont excrétés inchangés dans les urines. Seulement 2 % environ des métabolites sont excrétés dans les fèces.

La clairance et la demi-vie d'élimination sont indépendantes de la dose administrée. La demi-vie plasmatique apparente chez le sujet sain est estimée à approximativement 33 heures (valeurs limites allant de 14 à 103 heures). Dans une étude chez des sujets atteints du

syndrome de Gilbert, la clairance apparente moyenne a été réduite de 32 % par rapport au groupe contrôle, mais les valeurs sont restées dans les valeurs limites de la population générale.

La demi-vie de la lamotrigine est grandement affectée par les co-médications. La demi-vie moyenne est réduite approximativement à 14 heures avec des inducteurs de la glucuronisation comme la carbamazépine et la phénytoïne et augmente à 70 heures en moyenne quand la lamotrigine est administrée avec du valproate seul [12].

### **3.2. Propriétés pharmacodynamiques**

L'activité de la lamotrigine est généralement rattachée à son action sur les canaux voltage-dépendants (pré- et post synaptiques), en stabilisant les membranes neuronales. Elle inhibe également la libération du glutamate (excitateur) lors des potentiels répétés.

Les études pharmacologiques ont montré que la lamotrigine n'interagissait pas avec les principaux récepteurs (et en particulier avec le récepteur NMDA) ou neurotransmetteurs de l'organisme mis à part une faible inhibition du récepteur 5HT3. Par ailleurs, la lamotrigine serait un inhibiteur de la dihydrofolate réductase [12].

### **4. Mécanisme d'action**

Les résultats d'études pharmacologiques suggèrent que la lamotrigine bloque les canaux sodium voltage-dépendants. Cela inhibe l'activation répétitive et soutenue des neurones et inhibe la libération du glutamate (le neurotransmetteur qui joue un rôle clé dans la genèse des crises d'épilepsie). Ces effets contribuent probablement aux propriétés anti-convulsivantes de la lamotrigine.

A l'inverse, les mécanismes par lesquels la lamotrigine exerce son action thérapeutique sur les troubles bipolaires n'ont pas été établis, bien que les interactions canaux sodium voltage-dépendants soient probablement importantes [12].

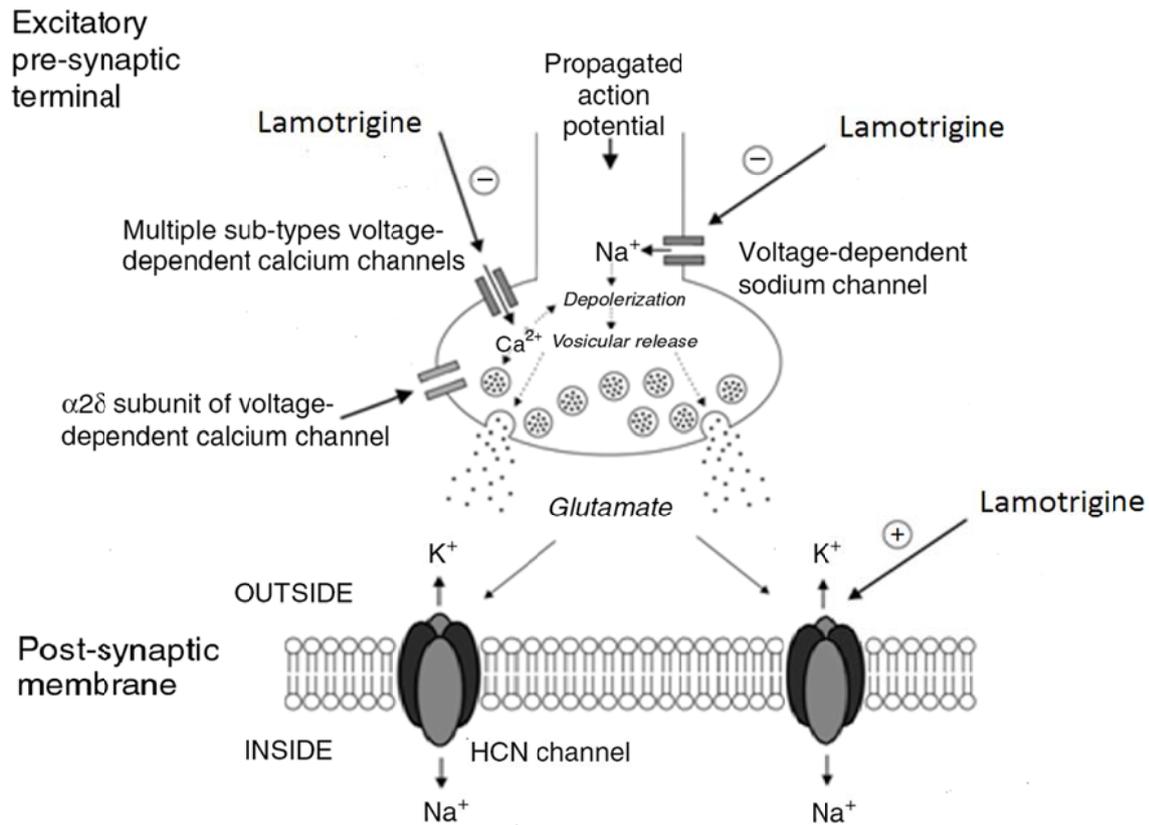


Figure 02 : Mécanisme d'action de la Lamotrigine [16].

## 5. Toxicité

Les données non cliniques issues des études conventionnelles de pharmacologie de sécurité, toxicologie en administration répétée, génotoxicité, cancérogénèse n'ont pas révélé de risque particulier pour l'homme.

Dans les études sur la toxicité de reproduction et développementale chez les rongeurs et les lapins, aucun effet tératogène mais une réduction du poids fœtal et un retard de l'ossification du squelette ont été observés, à des niveaux d'exposition inférieurs ou similaires à l'exposition clinique attendue. Etant donné que des niveaux d'exposition supérieurs ne peuvent être testés chez l'animal en raison de la sévérité de la toxicité maternelle, le potentiel tératogénique de la lamotrigine n'a pas été caractérisé au-delà de l'exposition clinique.

Chez les rats, une augmentation de la mortalité fœtale et post-natale a été observée lorsque la lamotrigine a été administrée durant la phase tardive de la gestation et pendant la période post-natale précoce. Ces effets ont été observés à l'exposition clinique attendue.

Les expériences animales n'ont pas révélé de baisse de la fertilité par la lamotrigine. La lamotrigine a réduit les taux d'acide folique fœtal chez les rats. Un déficit en acide folique est

connu pour être associé à un risque accru de malformations congénitales chez l'animal comme chez les humains.

La lamotrigine a provoqué une inhibition dose-dépendante du courant à l'extrémité des canaux hERG dans les cellules rénales embryonnaires humaines. La CI50 a été environ 9 fois supérieure à la concentration maximale sans effet thérapeutique. La lamotrigine n'a pas provoqué de prolongation de l'espace QT chez l'animal à des expositions allant jusqu'à 9 fois la concentration maximale sans effet thérapeutique. Dans un essai clinique, il n'y a eu aucun effet cliniquement significatif de la lamotrigine sur l'espace QT chez des adultes volontaires sains.

La plupart des cas rapportant des expositions à la lamotrigine ont observé une toxicité légère ou nulle ; cependant, des expositions importantes ont été associées à une dépression sévère du SNC, des convulsions, des retards de conduction cardiaque, une tachycardie complexe large et la mort. Chez les adultes dont la concentration sérique est  $> 25$  mg / L, une toxicité sévère peut survenir. Chez les patients âgés de  $\leq 3,5$  ans, l'ingestion de  $\geq 525$  mg peut entraîner une dépression sévère du SNC et des convulsions [12].

## 6. Effets Indésirables

Les risques les plus importants avec la lamotrigine sont :

- les effets indésirables cutanés graves, à type de Steven Johnson et syndromes de Lyell, plus particulièrement chez les enfants.
- les réactions d'hypersensibilité, qui peuvent se manifester par une fièvre, un malaise, des symptômes grippaux, une somnolence, une lymphadénopathie, des œdèmes faciaux et quelquefois par des dysfonctionnements hépatiques, une leucopénie et une thrombopénie. La conjonction avec une éruption cutanée est possible.
- des effets plus généraux à type d'œdème de Quincke, photosensibilité, diplopie, vision trouble, conjonctivite, étourdissement, somnolence, insomnie, maux de tête, ataxie, nystagmus, tremblements, fatigue, nausées, vomissements, irritabilité, agression, hallucination, agitation et confusion.
- des effets hépatiques [10].

## 7. Situations à risque ou déconseillées

En raison de la toxicité cutanée de la lamotrigine qui peut apparaître au cours de la mise en place du traitement, il est nécessaire de respecter strictement les doses initiales prescrites, les adaptations posologiques et les délais d'augmentation de posologie. En effet, l'augmentation trop rapide des doses ou une dose initiale trop importante favorise largement la survenue de ces réactions cutanées (principalement au cours des huit premières semaines de traitement).

Par ailleurs, les réactions cutanées sont plus fréquentes chez l'enfant que chez l'adulte, ce qui justifie de réserver ce traitement aux formes sévères des épilepsies partielles ou généralisées,

réfractaires aux thérapeutiques antiépileptiques habituelles. Enfin, la toxicité cutanée doit conduire à éviter l'association de la lamotrigine avec des antiépileptiques également toxiques au niveau cutané, comme l'acide valproïque.

La survenue d'une toxicité cutanée ou allergique doit conduire à l'arrêt de la lamotrigine et à sa contre-indication.

L'utilisation de la lamotrigine est possible pendant la grossesse. La supplémentation par l'acide folique quatre semaines avant la conception et huit semaines après ne semble pas avoir d'effets sur les folates. Une surveillance clinique est nécessaire puisqu'une diminution de ses concentrations plasmatiques est possible au cours de la grossesse [10].

### **8. Interactions médicamenteuses**

Ce médicament ne doit pas être associé au millepertuis : risque de diminution de sa concentration dans le sang et de son efficacité.

La mise en route ou l'arrêt d'une contraception orale (pilule) peut déséquilibrer le traitement et, selon les cas, nécessiter une augmentation ou une réduction de la dose d'antiépileptiques.

Il peut interagir avec le valproate de sodium et les autres antiépileptiques : le médecin en tient compte dans sa prescription. Ne modifiez jamais votre traitement sans avis médical [15].

**Chapitre II :**  
**Validation des méthodes analytiques**

Dans les industries chimiques, pharmaceutiques et autres secteurs industriels où la chimie analytique est omniprésente, les méthodes analytiques sont obligatoires pour tous produits manufacturés. Si la qualité d'une méthode analytique est douteuse, la décision basée sur les données obtenues par le contrôle qualité de la valeur vraie de l'échantillon (produit fini) soumis à l'analyse, en utilisant cette procédure analytique peut être déclarée non conforme. Cependant la démonstration qu'une méthode analytique est capable de quantifier d'une manière exacte est d'une grande importance pour assurer la qualité, la sécurité du produit fini

La validation n'est pas uniquement exigée par les autorités réglementaires (ICH) ou pour accéder à l'accréditation (ISO 17025), mais elle est aussi la phase ultime avant son utilisation dans la routine

La validation de la méthode analytique doit apporter la confiance pour les laboratoires dans les résultats qui seront trouvés et qui seront utilisés pour prendre des décisions critiques qui correspondent à différentes situations [17].

## 1. Définitions

- ✧ Selon la norme ISO17025 : La validation est « La confirmation par examen et apport de preuves objectives du fait que les exigences particulières en vue d'une utilisation prévue déterminée sont remplies » [18].
- ✧ Selon la FDA : « Valider une méthode consiste à démontrer, avec un degré de confiance élevée et sous une forme documentée que la méthode permet d'obtenir un résultat analytique qui atteint les spécifications à l'avance » [19].
- ✧ Selon l'ICH Q2A : « L'objectif d'une procédure analytique est de démontrer qu'elle est appropriée à l'usage auquel elle est destinée » [20].
- ✧ Selon la pharmacopée américaine : « Processus par lequel il est établi, par des études au laboratoire, que les caractéristiques de performance d'une méthode satisfont aux exigences pour ses applications analytiques prévues » [21].

## 2. But de la validation

- Démontrer que les résultats obtenus correspondent à l'usage pour lequel elle est prévue.
- Estimer la fidélité, le biais ou la justesse d'une méthode.
- Certifier que chaque procédure routinière produite est comprise dans une limite d'acceptation adéquate au type de procédure analytique et au produit concerné.

- Minimiser le risque associé à l'utilisation de la méthode analytique validée [22].

### 3. Procédures analytiques à valider

Toutes les procédures analytiques doivent être validées.

Selon les normes EN-NF-ISO /CEI doivent être validé au laboratoire :

- Les différentes méthodes conçues et développées au sein du laboratoire ;
- Les méthodes normalisées employées en dehors de leurs domaines d'application prévues ;
- Les applications et les modifications de méthodes normalisées ;
- Les procédures de la Pharmacopée Européenne et la Pharmacopée Américaine doivent être considérées comme validées [23].

### 4. Aspect réglementaire et normatif

Les procédures de validation analytiques sont décrites dans les principaux référentiels suivants : [24].

#### 4.1 Documents ISO 17025

Exigences générales concernant la compétence des laboratoires d'étalonnages et d'essais ;  
ISO 5725 Exactitude (justesse et fidélité) des résultats et méthodes de mesure.

#### 4.2 Documents ICH

- ICH Q2A: text on validation of analytical procedures “definitions and terminology”1995.
- ICH Q2B: text on validation of analytical procedures “methodology”1997.
- ICH Q2(R1): validation of analytical procedures text and methodology (2005).

#### 4.3 Documents de la FDA (guidance of industry)

- Validation of chromatographic methods. FDA – November 1994.
- Validation of Bioanalytical Method (2001)
- Analytical Procedures and Methods Validation. Guidance for Industry (Draft guidance). July 2015.
- Analytical Procedures and Methods Validation for Drugs and Biologics. Guidance for Industry July 2015.

#### 4.4 Documents des commissions de la SFSTP

- SFSTP « guide de validation, rapport d'une commission SFSTP »
  - Méthodologie (1992)
  - Exemples d'application (1992)

- SFSTP « dosage dans les milieux biologiques par des méthodes chromatographiques » (1997).
- SFSTP « validation des procédures analytiques : harmonisation des démarches »
  - Partie I : généralités, parues dans STP Pharma Pratique en 2003
  - Partie II : statistiques, parues dans STP Pharma Pratique en 2006
  - Partie III : exemples d'application :
    - + Parus dans STP Pharma Pratique en 2006
    - + Parus dans Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis en 2008
- SFSTP « analyse des performances d'une méthode analytique Evaluation des risques lors d'une utilisation en routine » (2011).

## 5. Critères de la validation analytique

### 5.1. Spécificité/Sélectivité

- Selon la norme ISO 17025 : Une procédure d'analyse est dite « spécifique » lorsqu'elle permet de garantir que le signal mesuré provient seulement de la substance à analyser. Il s'agit de démontrer que la ou les substance(s) quantifiée(s) au sein de la matrice sont bien le ou les analyte (s) recherché(s) [18].
- Selon l'ICH Q2R1 : 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. [21].

Si une méthode d'analyse est insuffisamment spécifique, cette déficience peut être compensée par la spécificité de l'une ou de plusieurs des autres analyses complémentaires.

Cette définition renvoie à plusieurs aspects :

- Identification : Il s'agit de vérifier l'identité de la substance analysée.
- 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.)
- Dosage (teneur ou activité) : Il s'agit d'obtenir un résultat indiquant exactement la concentration ou l'activité de la substance analysée dans l'échantillon [21].

### 5.2. Exactitude

- Selon la norme ISO 17025 : l'exactitude sera déterminée par comparaison d'une valeur de concentration théorique avec la valeur expérimentale. En général exprimée sous forme de % de recouvrement. Cette évaluation devra être confirmée sur 9 préparations

minimum (en général 3 préparations sur 3 niveaux) en recouvrant la gamme de validation [18].

- Selon l'ICH Q2R1 : L'exactitude correspond au degré de concordance entre la valeur de la méthode obtenue et la valeur de référence ou la valeur considérée comme véritable par convention. L'exactitude est confondue avec la justesse [21].

### **5.3. Linéarité**

- Selon la norme ISO 17025 : Capacité d'une méthode d'analyse, à l'intérieur d'un certain intervalle, à fournir des résultats proportionnels à la quantité en analyte à doser dans l'échantillon pour laboratoire [18].
- Selon l'ICH Q2R1 : La linéarité d'une méthode d'analyse est sa capacité de donner des résultats qui sont directement (à l'intérieur de certaines limites) proportionnels à la concentration (quantité) de la substance analysée dans un échantillon [21].

### **5.4. Fidélité**

- Selon la norme ISO 17025/ ICH Q2R1 : La fidélité exprime l'étroitesse d'accord entre plusieurs résultats d'essai issus d'un même échantillon homogène dans des conditions prescrites [18] [21].
  - Conditions de répétabilité : conditions où les résultats d'essai indépendants sont obtenus par la même méthode sur des individus d'essai identiques dans le même laboratoire, par le même opérateur, utilisant le même équipement et pendant un court intervalle de temps.
  - Fidélité intermédiaire : Reproduire la partie répétabilité (ou exactitude) dans le même laboratoire en y incluant plusieurs paramètres extérieurs changeant, par exemple : technicien différent, jour différent et/ou équipement différent.
  - Conditions de reproductibilité : conditions où les résultats d'essai sont obtenus par la même méthode sur des individus d'essais identiques dans différents laboratoires, avec différents opérateurs et utilisant des équipements différents.

### **5.5. Justesse**

- Selon la norme ISO 17025 : La justesse exprime la différence entre la valeur moyenne obtenue à partir d'une large série de résultats d'essais et une valeur de référence. Elle est déterminée par rapport à un matériau de référence certifié (MRC). En l'absence de MRC, une valeur qui est acceptée comme une valeur conventionnellement vraie peut être utilisée [18].
- Selon l'ICH Q2R1 : confondue avec l'exactitude [21].

### **5.6. Sensibilité**

- Selon la norme ISO 17025 : La sensibilité d'une procédure d'analyse peut être définie comme étant le rapport de la variation de la réponse de la méthode d'analyse à la variation de la quantité d'analyte [18].
- Selon l'ICH Q2R1 : non définit.

### **5.7. Limite de détection**

- Selon la norme ISO 17025 : Limite de Détection, correspond à la plus petite concentration de la substance pouvant être détectée, mais non quantifiée, dans les conditions expérimentales décrites de la méthode. Autrement dit, il s'agit de la limite en-dessous de laquelle l'analyte est considéré comme « non détecté » [18].
- Selon l'ICH Q2R1 : La limite de détection d'une méthode d'analyse individuelle correspond à la plus faible quantité de la substance analysée que la méthode permet de détecter, sans nécessairement fournir la valeur exacte [21].

### **5.8. Limite de quantification**

- Selon la norme ISO 17025 : Limite de Quantification, correspond à la plus petite concentration de la substance pouvant être quantifiée avec une incertitude acceptable, dans les conditions expérimentales décrites de la méthode [18].
- Selon l'ICH Q2R1 : est la concentration la plus basse quantifiable. Les seuils seront déterminés en analysant la substance à des concentrations de plus en plus faibles jusqu'à ses limites [21].

### **5.9. Robustesse**

- Selon la norme ISO 17025 : qualité d'une méthode capable de donner des résultats d'une exactitude et d'une précision acceptables dans des conditions diverses [18].
- Selon l'ICH Q2R1 : La robustesse d'une méthode d'analyse est une mesure de sa capacité à supporter sans conséquence de petites variations apportées délibérément aux paramètres de la méthode ; elle donne une idée de la fiabilité de la méthode dans les conditions normales d'utilisation [21].

### **5.10. Stabilité des solutions**

- Selon l'ICH Q2R1 : Les essais de stabilité fournissent des données sur la manière dont la qualité d'un produit pharmaceutique varie en fonction du temps et sous l'effet de divers facteurs environnementaux (la température et l'humidité). Ceci permet de définir, les conditions de conservations et de déterminer la durée de validité des produits.

Les études de stabilité doivent être menées sur toutes les dimensions et types de conditionnements prévus pour la mise sur le marché du produit [21].

## **6. Les différentes approches de la validation analytique**

### **6.1. Approche descriptive**

L'approche descriptive consiste à définir les critères qui servent à valider le dosage, estimer ces critères et comparer ces estimations aux limites fixées. C'est le type le plus communément utilisé. Il existe différentes façons de valider une méthode analytique par ses critères de performance. Deux critères reviennent automatiquement, ce sont la fidélité et la justesse. La fidélité se mesure soit par un écart type, soit par un coefficient de variation. Plus l'écart type ou plus le coefficient de variation est élevé et moins la méthode de dosage est fidèle. La justesse se mesure par le biais. Plus le biais est élevé et moins la méthode de dosage est juste [23].

L'approche descriptive a pour avantage principal d'être facile à procéder. En contrepartie, elle ne permet aucune gestion du risque si elle est utilisée seule. Des méthodes peu performantes peuvent en effet passer les critères d'acceptation sans assurer une réelle validité de la méthode [24].

### **6.2. Approche globale**

L'approche globale se base sur des critères décisionnels objectifs, comme par exemple, l'estimation des limites dans lesquelles se trouve le résultat par rapport à la vraie valeur, ou bien, les limites dans lesquelles se trouve la vraie valeur par rapport au résultat. La confrontation de ces limites aux limites imposées en routine, permet de valider ou de rejeter la méthode de dosage. A partir de 2003, La SFSTP propose une alternative à la méthode descriptive de validation de méthodes de dosage [25]. De nouvelles approches doivent être recherchées, comme par exemple, la validation de la méthode de dosage en utilisant le profil d'exactitude comme outil de décision [26]. Une bonne méthode de dosage doit pouvoir quantifier, les quantités inconnues de la substance que le laboratoire aura à déterminer, le plus exactement possible. D'une autre façon, que la différence entre le résultat rendu et la vraie valeur non connue de l'échantillon soit la plus petite possible, et au moins inférieur à une limite d'acceptation fixée par l'analyste en fonction de la finalité de la méthode telle qu'elle sera utilisée en routine [23].

### **6.3. Approche capabilité**

La capabilité est un indicateur qualité largement utilisé dans l'industrie pour analyser la performance d'une méthode analytique en routine. Les indices de capabilité sont calculés afin d'évaluer si le procédé à l'étude est capable de fournir des unités conformes suffisantes. Par

analogie, les indices de capabilité pourraient donc être utilisés pour évaluer si la méthode analytique seule est en mesure de fournir suffisamment de résultats conformes et vérifier si une méthode est adaptée à l'usage auquel elle est destinée.

En outre, la capabilité des méthodes analytiques peut également être utilisée pour évaluer les risques inhérents aux transferts de méthodes analytiques afin d'augmenter ou de diminuer la charge de travail de transfert de méthodes [27].

### **7. Etapes de la validation analytique**

Toute validation d'une méthode d'analyse nécessite une méthodologie rigoureuse. Par conséquent, chaque étape doit être scrupuleusement exécutée afin d'avoir les meilleurs résultats escomptés.

La validation requiert au préalable un mode opératoire à appliquer et une définition des paramètres que l'on veut mesurer. Ensuite déterminer la gamme de concentrations (le domaine analytique de validation) ainsi qu'une valeur minimale d'acceptabilité consensuelle qui est le but de notre démarche. Puis sélectionner des standards de validation avec une valeur de référence établie et choisir un plan d'expérience de validation. De plus planifier l'expérience d'étalonnage en cas de méthode indirecte. Une fois les données de cette dernière collectées, calculer les résultats par étalonnage inverse.

Calculer les écarts types de fidélité, de fidélité intermédiaire et les biais de justesse, utiliser un outil de décision qui convient à la méthode analytique envisagée.

Enfin interpréter les résultats obtenus et juger si la méthode est valide, ou invalide, en d'autres termes si cette dernière comporte un risque est non adéquate aux spécifications [6][28].

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

L'ICH Q2(R1) a décrit plusieurs paramètres de validation d'une méthode de dosage analytique dont : la spécificité, la linéarité, la fidélité, la justesse et la limite de quantification et de détection. Ce guide étant principalement descriptif, la SFSTP a donc élaboré une méthodologie statistique complémentaire à la description des paramètres cités précédemment. Le protocole de validation qui sera sélectionné selon le guide de la SFSTP 2006 déterminera le nombre des standards d'étalonnage (SE) et des standards de validation(SV) sur lequel les essais seront effectués. Il est à noter que  $i$  représentera l'indice de série,  $j$  l'indice de niveau de concentration et  $k$  l'indice de répétition [29].

**Tableau I : Choix du nombre de standards d'étalonnage et de validation en fonction du protocole choisi [29].**

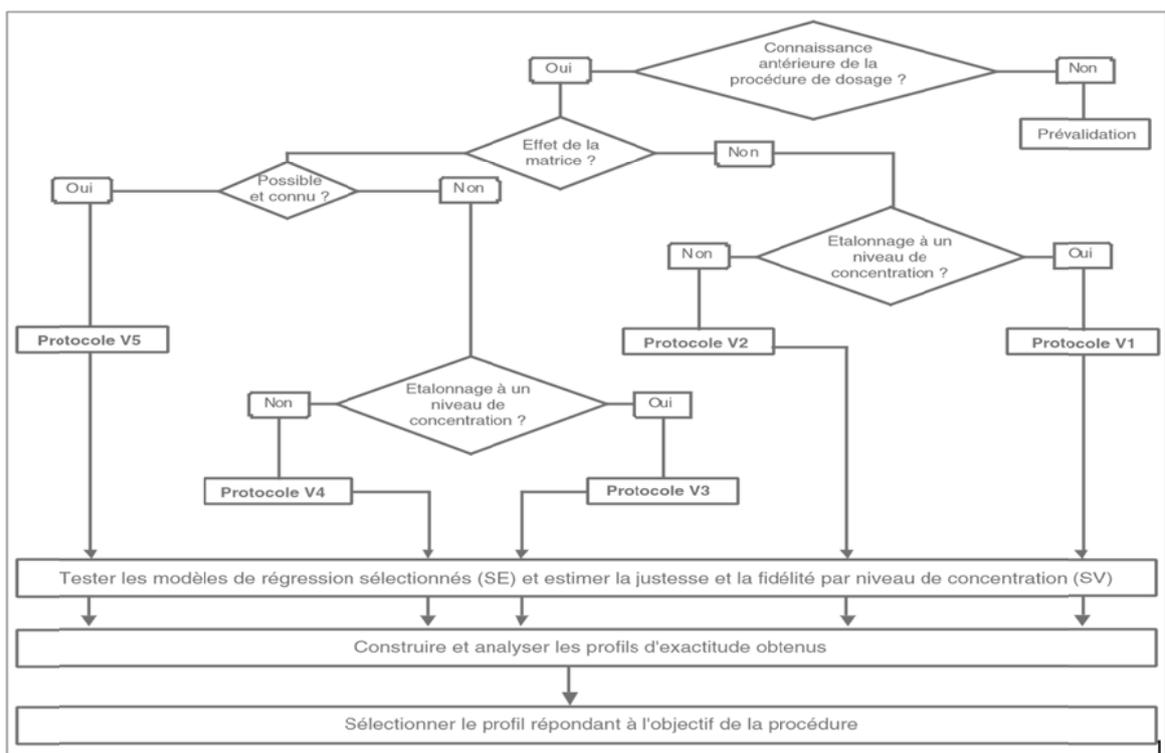
Standards	Niveau de concentration	Protocole				
		V1	V2	V3	V4	V5
SE. Etalonnage Sans la matrice	Bas		2		2	
	Médian	2	2 <sup>(2)</sup>	2	2 <sup>(2)</sup>	
	Haut	2 <sup>(1)</sup>	2	2 <sup>(1)</sup>	2	
SE. Etalonnage Avec la matrice	Bas				2	2
	Médian			2	2 <sup>(2)</sup>	2 <sup>(2)</sup>
	Haut			2 <sup>(1)</sup>	2	2
	Additif					2 <sup>(3)</sup>
SV. Validation Avec la matrice	Bas	3	3	3	3	3
	Médian	3	3	3	3	3
	Haut	3	3	3	3	3
Nombre minimum de séries		3	3	3	3	3
Nombre total d'essais		33	45	39	63	45

1 : Sélection d'un niveau de concentration supérieure à la concentration cible pour l'étalonnage (exemple : 120% de la concentration cible).

2 : Suppression possible du niveau de concentration médian pour l'étalonnage sur la base du modèle de régression retenu pour exprimer la fonction de réponse (exemple : modèle plus simple comme le modèle mathématique des moindres carrés). Dans ce cas, le nombre total est de 39 essais pour les protocoles V2 (sans matrice) et V5 (avec la matrice). Le nombre d'essais est de 51 pour le protocole V4.

3 : Addition d'un niveau de concentration supplémentaire pour une fonction de réponse nécessitant un modèle plus complexe (exemple : fonction logistique à quatre paramètres).

Le guide SFSTP 2003 suggère un logigramme concis pour choisir un protocole de validation, dont dépendra impérativement la préparation des SE et SV. Il faudra notamment prendre en compte la nécessité et les caractéristiques de la méthode de dosage qui sera évaluée ultérieurement.



**Figure 03 : Choix d'un protocole de validation [29].**  
**SE : standard d'étalonnage. SV : standard de validation**

## 8.1 Spécificité/Sélectivité

L'étude statistique de la spécificité peut être réalisée avec deux approches, la première est empirique, la seconde est statistique.

### 8.1.1. Approche empirique

Cette approche consiste à préparer et à analyser différents types de solutions avant d'entamer l'étude de spécificité.

- Une solution placebo (sans principe actif)
- Une solution standard (avec un standard à 100%) (Par rapport à la concentration théorique).
- Une solution échantillon (forme reconstituée à 100%) (par rapport à la concentration théorique).

Les résultats obtenus doivent suivre une logique comme suit, la solution placebo dans un cas normal doit donner une réponse nulle.

Quant aux signaux des deux solutions standards 100% et échantillon 100% ils doivent être similaires en termes de temps de rétention et d'air du pic [28].

### 8.1.2. Approche statistique

La droite obtenue avec les standards de validation sera comparée avec celle obtenue à partir des standards d'étalonnage.

La comparaison de la pente  $a_1$  de la droite de régression D1 de la gamme standard avec la pente  $a_2$  de la droite D2 de la gamme de validation, connaissant l'écart type fait sur  $a_1$  et  $a_2$  respectivement ( $\sigma_{a1}$  et  $\sigma_{a2}$ ) permettra d'appliquer le test t de Student comme suit

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

Le  $t_{calculé}$  est comparé à la valeur  $t^{\circ}(\alpha ; n_1 + n_2 - 4)$  lue sur la table de Student,  $\alpha$  étant le risque d'erreur accepté (5%).  $n_1$  et  $n_2$  tailles des échantillons réalisés sur les deux gammes et  $n_1 + n_2 - 4$  le degré de liberté

**Si  $t_{calculé} < t^{\circ}$  : les pentes sont comparables. L'absence d'effet matrice, la méthode est Spécifique [30].**

## 8.2. Fonction de réponse

### 8.2.1. Protocole

L'établissement de la relation entre la réponse instrumentale  $Y$  et (concentration) de l'analyte  $X$  se fait après avoir rassemblé les résultats des expériences opérées sur les standards d'étalonnage (SE) [30].

### 8.2.2. Etude Statistique

La relation entre les réponses expérimentales et les concentrations est définie par une fonction  $f$  qui doit être strictement monotone soit strictement croissante ou bien strictement décroissante sur l'intervalle de dosage déterminé.

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

$\varepsilon$  : l'erreur associée à la fonction de réponse dénommé erreur résiduelle.

L'évaluation des paramètres du modèle se fera dans le but de réduire l'erreur résiduelle en ajustant la fonction de réponse.

Les fonctions de réponse utilisées pour la validation d'une méthode de dosage sont diverses et chacune est employée pour un type de méthode particulier. Si c'est une méthode physicochimique le choix se portera régulièrement sur une fonction linéaire, par conséquent sa représentation sera une droite passant par l'origine ou non. Si c'est une méthode bio-analytique il faudra utiliser une fonction quadratique. Quant aux immuno-dosages, il est recommandé d'utiliser les fonctions logistiques à 4 ou 5 paramètres [30].

Le tableau II ci-dessous énumère quelques exemples de fonctions de réponses.

**Tableau II : Exemples de fonction de réponse [30].**

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

### 8.3. Alignement des observations

#### 8.3.1. Protocole

L'alignement consiste à transformer les réponses observées afin de les positionner sur la concentration moyenne. Compte tenu de l'indépendance des pesées, cette étape est essentielle car les quantités introduites, pour un niveau de concentration, ne sont pas équivalentes pour toutes les séries.

Cette démarche est exigée pour le calcul de variance (évaluation de la répétabilité et de la fidélité intermédiaire) [30].

#### 8.3.2. Etude statistique

L'alignement s'applique aux réponses obtenues avec les échantillons de validation en utilisant les équations ou fonction de réponses obtenues avec les standards d'étalonnage qui peuvent être réalisés sans la matrice (en l'absence d'effet matrice prouvée) ou avec la matrice, utilisés pour évaluer les différentes fonctions de réponse  $y = f(x)$  afin d'effectuer les prédictions inverses.

L'interpolation a pour objectif d'ajouter à la réponse observée la différence entre la valeur de la fonction de réponse considérée à la concentration moyenne et la valeur de cette fonction à la concentration introduite.

Pour  $n_{ij}$  répétitions du niveau de concentration  $j$  de la série  $i$  l'alignement se traduit par la relation :

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

Le tableau III ci-après définit les règles d'alignement des réponses pour les fonctions usuelles.

**Tableau III : Règles d'alignement pour différentes fonctions de réponse [30].**

Fonction de réponse	Règle d'alignement
Droite (passant ou pas par 0)	$y_{ijk,c} = y_{ijk} + \hat{\beta}_i [\bar{x}_{ij} - x_{ijk}]$
Fonction quadratique	$y_{ijk,c} = y_{ijk} + \hat{\beta}_i [\bar{x}_{ij} - x_{ijk}] + \hat{\gamma}_i [\bar{x}_{ij} - x_{ijk}]^2$
Fonction logistique	$y_{ijk,c} = y_{ijk} + (\hat{\delta}_i - \hat{\alpha}_i) \left[ \frac{1}{1 + \left(\frac{\hat{\gamma}_i}{\bar{x}_{ij}}\right)^{\hat{\beta}_i}} - \frac{1}{1 + \left(\frac{\hat{\gamma}_i}{x_{ijk}}\right)^{\hat{\beta}_i}} \right]$

### 8.4. Prédictions inverses

#### 8.4.1. Protocole

Les prédictions inverses sont utilisées comme moyen de détermination des concentrations calculées, à partir des résultats de la validation. Elles peuvent être définies en tant que forme inverse des fonctions de réponse de la courbe d'étalonnage [30].

### 8.4.2. Etude statistique

La formule employée est définie comme suit :

$$x_{calc} = f^{-1}(y)$$

Le tableau IV ci-dessous établit les prédictions inverses pour les différentes fonctions de réponses.

**Tableau IV : Calcul des prédictions inverses pour différentes fonctions de réponse [7] [28].**

Type de la fonction de réponse	Equation
Droite passant par 0	$x_{ijk,calc} = \frac{y_{ijk}}{\hat{\beta}_i}$
Droite (ne passant pas par 0)	$x_{ijk,calc} = \frac{y_{ijk} - \hat{\alpha}_i}{\hat{\beta}_i}$
Fonction quadratique	$x_{ijk,calc} = \frac{-\hat{\beta}_i + \sqrt{\hat{\beta}_i^2 - 4\hat{\gamma}_i(\hat{\alpha}_i - y_{ijk})}}{\hat{\beta}_i}$
Fonction logistique à 4 paramètres	$x_{ijk,calc} = \hat{\gamma}_i \left( \frac{\hat{\delta}_i - \hat{\alpha}_i}{y_{ijk} - \hat{\alpha}_i} - 1 \right)^{\frac{1}{\hat{\beta}_i}}$
Fonction logistique à 5 paramètres	$x_{ijk,calc} = \hat{\gamma}_i \left( \left( \frac{\hat{\delta}_i - \hat{\alpha}_i}{y_{ijk} - \hat{\alpha}_i} - 1 \right)^{\frac{1}{\hat{\psi}_i}} \right)^{\frac{1}{\hat{\beta}_i}}$

**Note :**

- Si les observations ont été alignées, il convient de remplacer les valeurs de  $y_{ijk}$  par celles de  $y_{ijk,c}$  dans le tableau précédent.
- Si une transformation a été utilisée il est demandé de réaliser les transformations inverses après ce calcul en retour [30].

## 8.5. Justesse

### 8.5.1. Protocole

L'évaluation de la justesse se fait à partir des concentrations calculées provenant des standards de validation en phase de validation, ces derniers doivent toujours être réalisés avec la matrice [30].

### 8.5.2. Etude statistique

La justesse nommée également biais de la méthode au niveau de concentration est obtenue en calculant la différence entre la moyenne arithmétique des concentrations introduites et la moyenne des concentrations calculées.

Elle peut s'exprimer en termes absolu, relatif ou de recouvrement par rapport aux quantités introduites [30].

$$\begin{aligned} \mathbf{biais}_j &= \hat{\mu}_j - \bar{x}_j \\ \mathbf{biais}(\%)_j &= 100 \times \frac{\hat{\mu}_j - \bar{x}_j}{\bar{x}_j} \\ \mathbf{Recouvrement}(\%)_j &= 100 \times \frac{\hat{\mu}_j}{\bar{x}_j} \\ \hat{\mu}_j &: \text{Moyenne des concentrations prédites} \\ \bar{x}_j &: \text{Moyenne des concentrations introduites} \end{aligned}$$

## 8.6. Fidélité

### 8.6.1. Protocole

L'évaluation de la fidélité se fait aussi à partir des concentrations calculées des standards de validation qui doivent toujours être réalisés avec la matrice [30].

### 8.6.2. Etude statistique

L'erreur expérimentale est considérée indépendante de la série. C'est une variable aléatoire ayant une distribution normale de moyenne 0 et de variance  $\sigma^2_{w,j}$ . [30].

La variance de répétabilité est estimée par l'évaluation de la variance intra-série.

$$\mathbf{Répétabilité} : \hat{\sigma}_{Re,j}^2 = \hat{\sigma}_{W,j}^2$$

$$\mathbf{CV}_{\text{répétabilité}} = 100 \hat{\sigma}_{W,j} / \bar{x}_{j,calc}$$

La variance de fidélité intermédiaire est calculée par la somme des estimations des variances intra et inter-série.

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

$$\mathbf{CV}_{\text{Fidélité intermédiaire}} = 100 \hat{\sigma}_{I,P} / \bar{x}_{j,calc}$$

$\sigma^2_{w,j}$  variance intra-série.

$\sigma^2_{B,j}$  variance inter-série.

Il faut noter qu'à chacun des niveaux J niveaux de concentration pris en considération, une estimation statistique est réalisée selon le modèle ci-dessous :

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

$x_{ijk}$  est la  $k^{\text{ième}}$  concentration calculée du niveau  $j$  de la  $i^{\text{ème}}$  concentration.

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

$\alpha_{ij}$  est l'écart entre la moyenne de la  $i^{\text{ème}}$  série et la moyenne  $\mu_j$ . au niveau  $j$ ,  $\alpha_{ij}$  est considéré comme une variable aléatoire ayant une distribution normale de moyenne 0 et de variance  $\sigma^2 B_j$ ;  $\epsilon_{ijk}$  est l'erreur expérimentale ;

La méthode de maximum de vraisemblance restreint est employée pour évaluer à chaque niveau de concentration  $j$  les niveaux de concentration  $j$ , les paramètres  $\mu_j, \sigma^2 w_j, \sigma^2 B_j$  du modèle :

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

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

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

– Si  $MSE_j < MSM_j$  ;

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

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

– Si  $MSE_j > MSM_j$  ;

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

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

Avec :

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

$\bar{X}_{ij,calc}$  : Moyenne des concentrations calculées du niveau  $j$  de la série  $i$  ;

$x_{ijk,calc}$  : Concentration calculée du niveau  $j$  de la série  $i$  répétition  $k$  ;

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

$n$  : nombre de répétitions

$p$  : nombre de série.

Si le nombre de répétitions est identique pour tout niveau de concentration dans chaque série  
Les composantes de la variance du niveau sont estimées comme suit :

Avec  $n$  nombre de répétitions dans chaque série [30].

## 8.7. Linéarité

C'est la capacité d'une méthode analytique d'obtenir des résultats corrélés, directement proportionnels à la quantité (ex : concentration) en analyte dans l'échantillon, et ce à l'intérieur d'un intervalle de dosage déterminé.

---

La linéarité est un pré-requis à l'estimation de la justesse. Elle est exigée aux résultats (concentration calculée = f (concentrations introduites)), pas aux réponses (signal = f (concentrations introduites)).

La fonction de réponse établit la relation entre la réponse instrumentale et la concentration par contre le critère de linéarité correspond à la relation entre la quantité introduite et la quantité calculée (résultat) d'analyte à partir de la courbe d'étalonnage. Pour mémoire, l'existence de linéarité entre la concentration estimée et la concentration introduite ne permet point de se prononcer sur la justesse de la méthode [29].

**CHAPITRE III :**  
**Approche capacité**

## 1. Définition

La capabilité est un indicateur qualité largement utilisé dans l'industrie pour analyser la performance d'une méthode analytique en routine, elle est décrite depuis 2007 par la Pharmacopée Américaine [9]. C'est une approche mise en place pour éviter de rejeter à tort des produits acceptables du fait de l'erreur sur le dosage.

Elle est définie comme étant « une estimation du risque de non-conformité d'une caractéristique d'un produit ».

Ainsi, on distingue deux principaux indicateurs couramment utilisés en supposant que le processus est centré sur la dimension nominale (**Cp**) ou non (**Cpk**) [10].

## 2. Principe de capabilité

L'étude de capabilité permet de vérifier si un procédé est apte à produire les performances compatibles avec la qualité attendue. Pour un procédé, l'étude de capabilité compare l'intervalle de tolérance à la dispersion. Lors de l'étude d'un procédé, le terme capabilité désigne son aptitude.

L'intervalle de tolérance est défini par la distance comprise entre les tolérances supérieure (USL) et Inférieure (LSL). Si les valeurs obtenues à partir des échantillons dépassent ces tolérances, les échantillons sont alors considérés comme non-conformes. Cet intervalle théorique dans lequel le paramètre doit évoluer, est le plus souvent déterminé par le service de développement lors de la mise au point galénique et des études de faisabilité. [8] [10] [32] [33] [38]. Par exemple, l'intervalle de tolérance correspond aux normes figurant dans le dossier d'AMM [9] [32] [37].

Pour le paramètre étudié, la dispersion du procédé est définie par le calcul de son écart type.

Dans le cas idéal, la distribution de ce paramètre suit une loi de Gauss centrée sur la valeur moyenne. De plus, l'écart type de ce paramètre est correctement maîtrisé. La dispersion à « six écarts types » ( $6\sigma$ ) correspond à l'intervalle contenant 99,73 % des valeurs du paramètre étudié. Autrement dit, la probabilité de trouver une valeur comprise entre plus ou moins trois écarts types est de 0,9973, soit 99,73%.

Plus la dispersion du paramètre sera faible, plus l'écart type sera réduit et plus le risque de dépasser les tolérances sera faible ou si l'on préfère, plus l'écart type sera réduit, plus la production sera conforme. Ainsi, on distingue deux principaux indicateurs couramment utilisés en supposant que le processus est centré sur la dimension nominale (**Cp**) ou non (**Cpk**).

### 2.1. La capabilité « potentielle » (**Cp**)

La capabilité potentielle (**Cp**) compare l'intervalle de tolérance (IT) des spécifications à la

dispersion du procédé. La formule permettant de calculer la capabilité est la suivante [38] :

$$Cp = \text{intervalle} \frac{\text{tolérance}}{\text{dispersion}} = \frac{IT}{6\sigma}$$

IT : Intervalle de tolérance [LSL, USL]

$\sigma$ : Dispersion du procédé

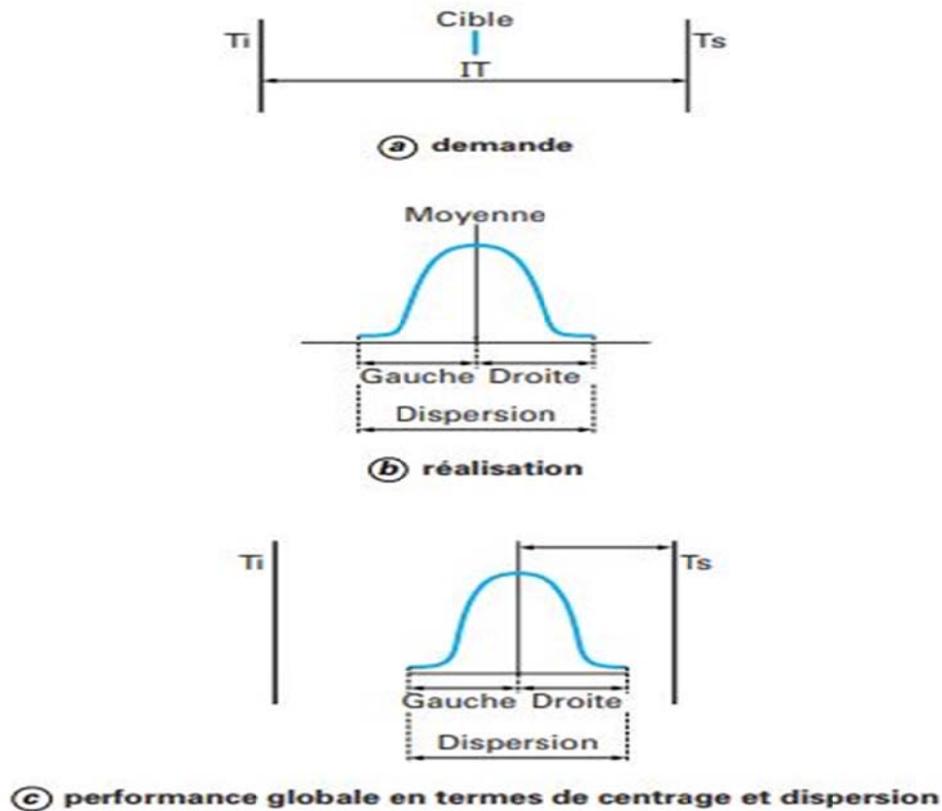


Figure 04 : Capacité, Intervalle de tolérance et dispersion [35]

$Cp$  est l'indice de capacité le plus utilisé. Il vise à mesurer si la dispersion de la variable étudiée est plus ou moins grande que l'intervalle défini par la spécification limite du processus. Il mesure le pourcentage de l'intervalle de spécification utilisé par la variable mesurée.

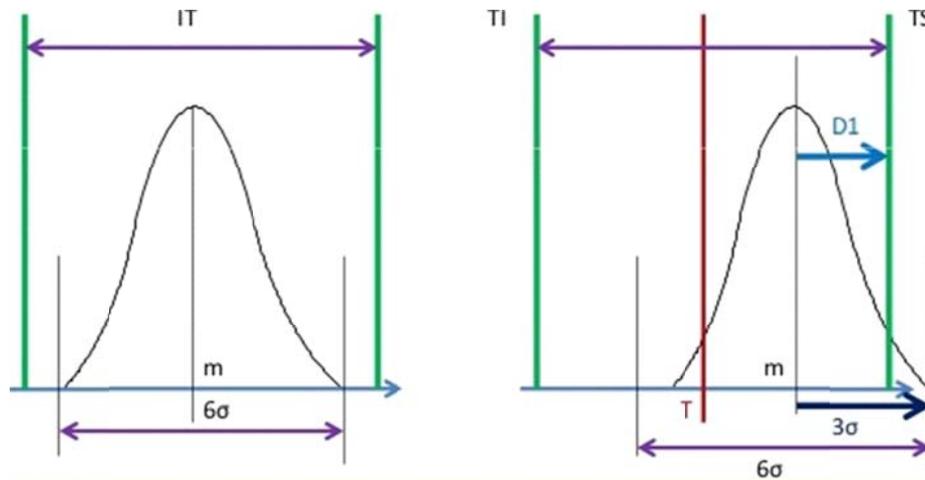
Pour caractériser la performance d'un procédé, le calcul de la capabilité potentielle n'est pas suffisant. En effet, l'étude de la capabilité potentielle ne reflète pas la tendance centrale du procédé, car deux procédés ayant une dispersion identique, peuvent se situer différemment au sein de l'intervalle de tolérance.

L'indicateur de capabilité simple ( $Cp$ ) permet de savoir si après avoir effectué un réglage, le

processus pourrait-être capable. C'est donc un indicateur en termes de dispersion de la moyenne.

## 2.2. La capabilité « réelle » (Cpk)

La capabilité réelle permet de mesurer le centrage du procédé par rapport à la valeur cible attendue.



Le premier procédé est centré alors que le second est décentré, cependant leurs capacités potentielles sont comparables puisque leurs dispersions sont identiques. Dans ces deux cas, le risque d'obtenir une production hors norme, c'est-à-dire en dehors des limites de tolérance, est différent. C'est pourquoi, il est nécessaire de mettre en place un autre indicateur, la capabilité réelle, notée Cpk, tenant compte du centrage du procédé.

Lorsque les indicateurs Cp et Cpk sont identiques, le procédé est parfaitement centré sur la valeur cible et sont la moyenne et l'écart type du processus à l'étude

Cependant cet indice ne donne aucune information sur la position de la variable par rapport à une valeur cible.

S'il est évident que les méthodes analytiques sont sujettes aux écarts systématiques, l'indice Cp est inutile car il suppose que la méthode d'analyse à l'étude est centrée sur la référence ou concentration nominale de l'échantillon étudié. Si les méthodes analytiques sont adaptées à leur objectif et donc déclarées comme valides en utilisant les valeurs Cpk. En effet, l'indice Cpk mesure simultanément la position et la dispersion de la variable mesurée. Par exemple, les valeurs Cpk obtenues à partir d'expériences pourraient être comparées à des valeurs minimales consensuelles telles que [36] :

- $Cpk \geq 1.0$
- $Cpk \geq 1.33$
- $Cpk \geq 2$

L'annexe 2 du chapitre USP (1080) exprime que [9] [37] :

Les valeurs Cpk supérieures à 1.33 montrent que le processus est adéquat pour répondre aux spécifications, les valeurs comprises entre 1.00 et 1.33 indiquent que le processus, bien que suffisant pour répondre aux spécifications, nécessitera un contrôle étroit. Les valeurs inférieures à 1.00 indiquent que le processus n'est pas adéquat pour répondre aux spécifications et que le processus et / ou les spécifications doivent être modifiées.

L'interprétation des études de capabilité est résumée dans le tableau ci-après.

3]

Cpk	Evaluation de la capabilité	Valeur de $\sigma$	Air sous la courbe (%)	Parties non conformes par million (ppm)	
				Spécifications unilatérales	Spécifications bilatérales
0.33	Terrible	1	68.27	158650	317300
0.67	Insuffisante	2	95.45	22750	45500
1.00	Marginalement Capable	3	99.73	1350	2700
1.33	Capable	4	99.993636	32	64
1.67	Bonne	5	99.999942	0.29	0.58
2.00	Excellente	6	99.999998	0.001	0.002

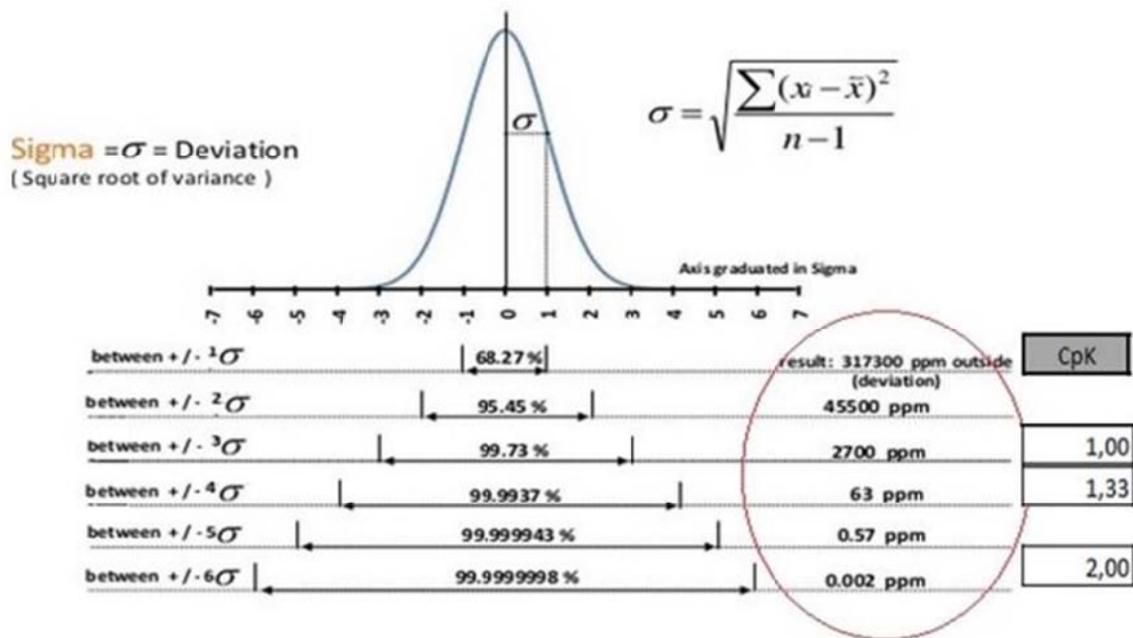


Figure 06 : Règle du six sigma indiquant Ppm et Cpk [34]

Un procédé est apte ou « capable », lorsque sa dispersion ne dépasse pas 75% de l'intervalle de tolérance soit Cpk supérieur à 1,33.

### 3. Utilité de la capabilité dans la validation analytique

Les critères de validation des méthodes de dosage ont fait l'objet de plusieurs descriptions par les référentiels internationaux réglementant l'industrie pharmaceutique tels qu'ISO17025 et ICHQ2A. Cependant ces derniers manquent considérablement de profondeur car ils se limitent aux principes généraux de la validation, sans pour autant guider les industriels à appliquer ces recommandations réglementaires [30]. Conséquemment la SFSTP a conçu des guidelines pour aider à l'application de ces recommandations, ainsi qu'à la progression du domaine de la validation analytique et ce en plusieurs étapes ; en 1992 pour les analyses de spécialités chimiques et pharmaceutiques, en 1997 pour les analyses sur matrice biologique, présentant toute fois des lacunes concernant la prise de décision quant à la validité de la méthode [30] , les recommandations de 2003 complétées en 2006 s'en sont suivies pour proposer une approche harmonisée qui différencie entre les outils de décision et les paramètres de diagnostic. Ainsi le profil d'exactitude, qui repose sur le principe d'erreur totale (biais + écart type) est la pièce maitresse sur laquelle repose cette recommandation, lui permettant ainsi de statuer sur la validité de la méthode.

En 2010 la SFSTP a développé une nouvelle approche, plus rigoureuse quant à la prise de décision sur la validité d'une méthode de dosage. Dénommée approche capabilité, le cheminement protocolaire est similaire à la démarche harmonisée bien que l'outil de décision indice de capabilité diffère du profil d'exactitude. L'évaluation de l'indice de capabilité requiert de ce fait, l'étude de la Justesse, de la Fidélité (répétabilité et Fidélité Intermédiaire) ainsi que de la Linéarité de la méthode de dosage [27]. Un simple calcul de la capabilité de la méthode permet d'estimer les performances de la méthode et les risques de résultats faux négatifs [29].

Avant toute application d'une technique analytique, il est indispensable de connaître les performances de la méthode au préalable. La capabilité alloue une aptitude décisionnelle pour se prononcer sur l'usage auquel est destinée la méthode de dosage. Elle permet de prédire si cette dernière est performante et de démontrer un tant soit peu si elle est capable de donner les résultats escomptés. De plus, évaluer la performance d'une méthode de dosage apporte beaucoup plus de renseignements convaincants que le statut réglementaire de «méthode analytique validée». Car ce statut ne garantit pas à lui seul, la performance de la méthode de dosage pour l'usage auquel elle est prévue. En outre, il est probable que la conformité aux critères de validation diffère selon l'approche choisie et de ce fait complique la prise de décision quant à son usage en routine [29].

L'indice de capabilité permet de contrôler le risque client aussi bien que le risque producteur d'une méthode de dosage dont la performance a été vérifiée. D'une part, le risque client est réduit par l'estimation du risque de générer des résultats faux positifs ; qui doivent être traités comme des vrais OOS (Out Of Specification) (pour des spécifications 95.0-105.0%, classiques pour un dosage de principe actif dans un produit fini) pour un lot tout à fait conforme. D'autre part l'évaluation de la performance de la méthode de dosage requiert la détermination de la taille optimale de l'échantillon avant validation, ce qui diminue faux OOS [29] [39].

#### 4. Modalités de calcul de l'indice de capabilité

Il est indispensable de disposer de modalités pour calculer l'indice de capabilité. D'abord les données doivent avoir une distribution normale. Aussi les valeurs de  $\mu$  et  $\sigma$  doivent être conjecturées au préalable. Pourtant les données générées par le nombre d'échantillons dans la validation d'une méthode de dosage selon les guidelines de l'ICH Q2 est insuffisant car l'évaluation de la capabilité requiert un nombre plus important [9] [36], supérieur à 30 résultats, c'est pourquoi ils ne permettent que d'avoir une évaluation approximative de la capabilité. Par ailleurs la moyenne  $\mu$  et l'écart type  $\sigma$  ne seront pas connus à la fin de la validation. Le calcul de la capabilité comme mentionné précédemment n'est qu'une estimation approximative de la capabilité réelle de la méthode. En utilisant les mêmes modalités, la proportion des résultats non conformes  $\pi$ -Cpk se trouvant en dehors de l'intervalle de prédiction sera estimé comme suit [27].

$$\pi\text{-Cpk} = P(X < LSL) + P(X > USL) = P\left(Z < \frac{LSL - \mu}{\sigma}\right) + P\left(Z > \frac{\mu - USL}{\sigma}\right) \quad \text{où : } Z \sim N(0,1)$$

#### 5. Calcul du Cpk-tol et $\pi$ -Cpk-tol

Du moment que le petit nombre d'échantillons utilisés lors de la validation d'une méthode de dosage est un obstacle contraignant qui remet en cause l'utilité de l'évaluation de la capabilité, les données sont insuffisantes pour estimer précisément la moyenne et l'écart type de la méthode analytique. En revanche ceci est résoluble en se référant au travail de recherche d'Hubert, suggérant un tant soit peu de calculer l'indice de capabilité amélioré **Cpk-tol** ainsi que  $\pi$ -**Cpk-tol** en lieu et place de **Cpk** et  $\pi$ -**Cpk** [27].

Pour prendre en compte l'incertitude de l'analyse moyenne de la méthode et de l'écart type lors du calcul de **Cpk**, l'utilisation d'un intervalle de tolérance est souhaitable. Les intervalles de tolérance permettent de décrire l'ensemble des résultats individuels de la population en fonction d'un échantillon de la variable aléatoire à l'étude.

Beta expectation, également appelés <<intervalles de tolérances de couverture moyenne>> ou <<intervalles de prédiction>> sont des intervalles pour lesquels chaque futur résultat a bêta (e.g.  $\beta=95\%$ ) probabilité de tomber dans l'intervalle calculé.

De plus, l'estimation de la moyenne et de l'écart type des méthodes analytiques doit être faite en suivant le modèle statistique représentant la manière dont les expériences ont été effectuées.

Les expériences de validation de méthodes doivent être exécutées en incluant plusieurs séries comme répétitions dans ces séries pour obtenir des estimations fiables de ces paramètres. Ces essais suivent donc un schéma d'échantillonnage hiérarchique ou stratifié qui devrait être pris en compte lors du calcul des résultats moyens analytiques et de l'écart type et donc pour le calcul de l'indice de capabilité [40] [41]. Pour ce schéma d'échantillonnage aléatoire stratifié couramment rencontré lors de la validation, la formule des intervalles de tolérance [27] [35] [38] :

$$[L, U] = [\hat{\mu} - k_E \hat{\sigma}_{IP}; \hat{\mu} + k_E \hat{\sigma}_{IP}]$$

**L** : Limite Inférieure.

**U** : Limite supérieure.

**[L, U]** : Intervalles de tolérance.

**$\mu$**  : Moyenne estimée des résultats.

**IP** : Fidélité intermédiaire

$K_E$  étant le facteur de recouvrement, il est calculé comme suis :

$$k_E = t_{(df, (1+\beta)/2)} \sqrt{1 + \frac{J\hat{R} + 1}{JI(\hat{R} + 1)}}$$

$t_{(df, (1+\beta)/2)}$  :  $\gamma$  centile d'une distribution de Student.

**df** : degré de liberté.

Le degré de liberté étant défini par :

$$df = \frac{(\hat{R}+1)^2}{\left(\hat{R} + \frac{1}{I}\right)^2 / J - 1 + (1 - (1/I)/JI)}$$

**J** : nombre de séries réalisées

**I** : nombre de répétitions par séries

$$\hat{R} = \frac{\hat{\sigma}_B^2}{\hat{\sigma}_W^2}$$

$B$  : Variance inter-série

$w$  : Variance intra-série ou répétabilité par méthodologie d'analyse de variance à un seul facteur (ANOVA)

La variance de fidélité intermédiaire peut être estimée en utilisant :

$$\hat{\sigma}_{IP}^2 = \hat{\sigma}_W^2 + \hat{\sigma}_B^2$$

**Cpk-tol** est donc basé sur ces intervalles de tolérance et est calculé comme suit :

$$Cpk-tol = \min \left[ \frac{USL - \hat{\mu}}{t_{(df, (1+\beta)/2)} \sqrt{1 + \frac{J\hat{R}+1}{J(\hat{R}+1)} \hat{\sigma}_{IP}}}, \frac{\hat{\mu} - LSL}{t_{(df, (1+\beta)/2)} \sqrt{1 + \frac{J\hat{R}+1}{J(\hat{R}+1)} \hat{\sigma}_{IP}}} \right]$$

L'indice **Cpk** étant calculé avec  $3\sigma$  au dénominateur pour un processus centré, la fraction maximale de résultats non conformes serait d'environ **2700 défectueux par million** (précisément **2699,796dpm**).

Pour garder cette même couverture théorique de la distribution utilisée avec le **Cpk index** (soit  $\pm 3\sigma$ ), la probabilité de l'indice **Cpk-tol** est fixée à **0.9973** [27].

Ensuite, la fraction de résultats non conformes sera estimée par réarrangement de l'expression dans l'équation du **Cpk-tol** :

$$\begin{aligned} \pi_{Cpk-tol} &= P[X_i < LSL] + P[X_i > USL] \\ &= P \left[ t(df) < \frac{LSL - \hat{\mu}}{\hat{\sigma}_{IP} \sqrt{1 + \frac{I\hat{R}+1}{J(\hat{R}+1)}}} \right] + P \left[ t(df) > \frac{USL - \hat{\mu}}{\hat{\sigma}_{IP} \sqrt{1 + \frac{I\hat{R}+1}{J(\hat{R}+1)}}} \right] \end{aligned}$$

**Cpk-tol** et  $\pi$ -**Cpk-tol** prennent donc en compte les modèles statistiques mentionnés précédemment pour la validation des méthodes de dosage ainsi que l'incertitude des paramètres conjecturés.

### 6. Détermination de la taille de l'échantillon d'une méthode de validation analytique

Afin de valider une méthode de dosage, il est nécessaire de déterminer la taille de l'échantillon qui est constitué de deux éléments, le nombre de séries et le nombre de répétitions par séries. La validation d'une méthode de dosage par approche capabilité requiert l'utilisation d'un modèle reposant sur un compromis entre le risque client et le risque producteur pour définir la taille de l'échantillon [9] [27].

Selon le travail accompli par Hubert et al. Sur l'influence de la taille de l'échantillon sur la validité du plan d'échantillonnage suivi, le nombre de série ainsi que le nombre de répétitions par série optimal est étroitement lié à la valeur du ratio R.

Le nombre de séries requis augmente avec la valeur du ratio R. Par conséquent, le nombre de séries est d'une importance capitale. Il permettra de déterminer  $\sigma^2_B$  avec une précision satisfaisante. La taille minimale habituelle de l'échantillon de 3 séries de 3 répétitions est généralement insuffisante.

Si la répétabilité  $\sigma^2_w$  est la plus grande source de variabilité, le nombre des répétitions doit être augmenté à 5. Lorsque le rapport **R** est proche de **1** ou plus grand alors c'est le nombre de séries qui devrait être augmenté. Le nombre optimal d'expériences à réaliser pour valider les méthodes doivent être estimées au cas par cas sur des informations préalables sur l'ampleur des composantes de la variance (par exemple, obtenu par une optimisation robuste ou une pré-validation). Néanmoins, en suivant cette méthodologie, la capabilité sera utilisée dans le cadre pratique pour atteindre cet objectif.

**Tableau VI : Le nombre de répétitions et de séries pour assurer les prérequis spécifiés de R**  
[27]

<b>R</b>	<b>Nombre de répétitions</b>	<b>Nombre de séries</b>
<b>0.5</b>	5	3
<b>1.0</b>	4	5
<b>2.0</b>	4	7

Avec :  $R = \sigma^2_B / \sigma^2_w$  et  $R \in (0.5, 1.2)$ .

## **PARTIE PRATIQUE**

## **MATERIEL ET METHODES**

## 1. Matériel et méthodes

La Validation analytique d'une méthode de dosage de la Lamotrigine est le sujet de notre projet de fin d'études. Cette étude a pour visée de valider une méthode de dosage d'un principe actif « Lamotrigine » dans des comprimés dosés à 50 mg par chromatographie liquide à haute performance (HPLC) par approche capabilité. Ce travail expérimental a été réalisé dans le laboratoire de Chimie Analytique du Département de Pharmacie de Tizi-Ouzou, et ce en conformité avec le protocole de validation analytique détaillé dans les guides de validation publiés par la commission Française des Sciences Techniques et Pharmaceutique (SFSTP) respectivement en 2006 et 2010.

### 1.1. Matériel

#### 1.1.1. Matières premières

Le Principe Actif utilisé est la Lamotrigine STD. Les excipients sont préalablement préparés au sein du laboratoire de Chimie Analytique de Tizi-Ouzou.

#### 1.1.2. Réactifs

Réactifs	Propriétés physicochimiques	Précautions d'emploi
<b>Méthanol</b>	Formule brute : CH <sub>4</sub> O N° CAS : 67-56-1 Mr : 32.04 g/mol $\rho$ : 1.19 g.cm <sup>-3</sup>	
<b>Acétonitrile</b>	Formule brute : C <sub>2</sub> H <sub>3</sub> N N° CAS : 75-05-8 Mr : 41.05 g/mol $\rho$ : 0.786 g.cm <sup>-3</sup>	
<b>Acétate d'ammonium</b>	Formule brute : C <sub>2</sub> H <sub>7</sub> NO <sub>2</sub> N° CAS : 631-61-8 Mr : 77.0825 g/mol $\rho$ : 1.17 g.cm <sup>-3</sup>	
<b>Triéthylamine</b>	Formule brute : N(CH <sub>2</sub> CH <sub>3</sub> ) <sub>3</sub> N° CAS : 121-44-8 Mr : 101,19 g/mol $\rho$ : 0.726 g.cm <sup>-3</sup>	

<b>Acide acétique Glacial</b>	Formule brute : $C_2H_4O_2$ N° CAS : 64-19-7 Mr : 60.052 g/mol $\rho$ : $1.05 \text{ g.cm}^{-3}$	
<b>Eau distillée</b>	Formule brute : $H_2O$ N° CAS : 7732-18-5 Mr : 18 g/mol $\rho$ : $1 \text{ g.cm}^{-3}$	<b>Aucune</b>

### 1.1.3 Appareillages et équipements

Les équipements et appareils que nous avons utilisés pour la réalisation de ce travail sont cités dans les tableaux ci-dessous :

**Tableau VIII : Appareil Chromatographie Liquide Haute Performance SCHIMADZU (LC20)**

Nom	Equipements	Spécifications
<b>HPLC SCHIMADZU (LC 20)</b>	Pompe	Lc 20 at
	Injecteur automatique	SIL 20 A
	Contrôleur	CBM-20
	Logiciel d'exposition	LC-solution
	Compartiment de la colonne	CTO-20 A
	Détecteur	Spectrophotomètre UV-Visible

**Tableau IX : Les Autres Appareils utilisés**

Appareils	Dénomination	Usage
Etuve	MEMMERT	Séchage
Balance Analytique	METTLER-TOLEDO	Pesée
Balance Analytique	KERN	Pesée du Principe Actif
Sonicateur	Advantage-LAB	Solubilisation
pH mètre	METTLER-TOLEDO	Mesure et Ajustement du pH

### 1.1.4. Verreries et Autres

Nous avons fait usage, durant notre travail, de la verrerie procurée par le laboratoire de Chimie Analytique de Tizi-Ouzou :

<b>Verrerie</b>
Verre de montre Béchers Epruvettes de 1000 ml et 2000 ml Pipettes jaugées 2 ml et 5 ml Fioles jaugées 50 ml, 100 ml 1000 ml et 2000 ml Erlenmeyer Entonnnoirs Vials pour HPLC

D'autres matériels ont été utilisés notamment : des spatules, du papier filtre, des pissettes à eau et des compte-gouttes.

## 1.2 Méthodes

### 1.2.1. Méthodologie de la validation analytique

Pour valider la méthode de dosage de la Lamotrigine dans des comprimés de 50mg par HPLC. Nous nous sommes référés au protocole de validation élaboré par la commission SFSTP 2010 ainsi qu'à l'article « Utilité des indices de capabilité dans le cadre de la validation des méthodes analytiques » publié dans Analytica Chemica Acta paru en 2012, où l'indice de capabilité a été adapté à la validation des méthodes de dosage.

#### 1.2.1.1. Choix du protocole de Validation

Notre choix s'est porté sur le logigramme proposé par la commission SFSTP 2006 et le tableau V du même guide. L'absence d'effet matrice a éventuellement permis de choisir le protocole V2, pour un total de 5 séries nous avons effectué 4 répétitions pour chaque niveau, en supposant que le  $R=1$  comme indiqué dans le guide SFSTP 2010, l'étalonnage est effectué à plusieurs niveaux de concentration, en utilisant 5 niveaux de concentration pour chacun des standards d'étalonnage (SE) et de validation (SV).

#### 1.2.1.2. Choix des paramètres de Validation

- **Limites d'acceptabilité ( $\lambda$ )** :  $\lambda = \pm 5\%$ .
- **Probabilité de confiance ( $\beta$ )** :  $\beta = 99.73 \%$ ,
- **Risque d'erreur accepté ( $\alpha$ )** :  $\alpha = 0.27\%$

#### 1.2.1.3. Choix du diluant

Pour dissoudre la lamotrigine, la pharmacopée américaine recommande d'utiliser le solvant composé du mélange 60% méthanol et de 40% tampon, cependant le méthanol reste un produit cher et toxique. Par conséquent nous avons opté pour un mélange préalablement préparé de tampon à 70% et de méthanol à 30% au sein du laboratoire de Chimie Analytique.

#### 1.2.1.4. Choix de dilution

Nous avons effectué des pesées dans des fioles de 100ml pour chaque niveau de concentration, par la suite on a procédé à des dilutions 5/50 dont le but essentiel est de garantir une concentration appropriée égale à 0.05mg/ml pour le niveau de concentration de 100% afin d'assurer la bonne lecture des résultats.

### 1.2.2 Préparation des Solutions

#### 1.2.2.1. Diluant

- Préparation de la solution tampon : Mélange Solution Acétate d'Ammonium 0.8 g/L +

Méthanol (70%-30%).

Sur un verre de montre peser 0.8g d'acétate d'ammonium et mettre cette quantité dans une fiole de 1L puis ajuster le volume final d'eau distillée au trait de jauge. Ajuster la solution au pH=4 avec de l'acide acétique glacial à l'aide du pH mètre.

### 1.2.2.2. Préparations des solutions standards

Nous avons effectué des pesées correspondant à chaque niveau de concentration dans des fioles 100 ml. Les masses théoriques sont indiquées dans le tableau ci-dessous :

**Tableau XI : Tableau présentant les masses théoriques des niveaux de concentration des principes actifs pesées**

Niveaux de concentrations en %	80	90	100	110	120
Masses théoriques de Lamotrigine	40 mg	45 mg	50 mg	55 mg	60 mg

#### a- Solutions standards de la Lamotrigine

Nous procédons à la préparation des solutions des standards d'étalonnage et de validation, dans des fioles de 100ml, ces solutions mères feront l'objet de dilutions de 5/50, 2ml de la solution d'excipients est ajoutée uniquement aux standards de validation. Compléter au trait de jauge puis passer au sonicateur.

Les étapes suivies pour la préparation des standards d'étalonnage et de validation sont respectivement détaillées dans les tableaux ci-joints.

**Tableau XII : Tableau présentant le protocole de la préparation des solutions des standards d'étalonnage**

Niveaux de concentrations en %	80%	90%	100%	110%	120%
<b>Protocole</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Peser chaque PE théorique de Lamotrigine pour chaque répétition dans une fiole de 100 ml (solution mère)</li> <li>- Ajouter le diluant et mettre dans le sonicateur pour une dissolution complète.</li> <li>- Compléter au trait de jauge avec le diluant pour ainsi obtenir des solutions mères</li> <li>- A l'aide d'une pipette jaugée, prélever 5ml de la solution mère, verser dans une fiole de 50ml</li> <li>- Compléter au trait de jauge avec le diluant (une dilution 5/50)</li> </ul>				

	- Agiter par retournement à chaque fois et remplir les vials
<b>Solutions à préparer</b>	<b>SE = 5x5x2 = 50 solutions (5 niveaux, 5 séries, 2 répétitions)</b>

**Tableau XIII: Tableau présentant le protocole de la préparation des solutions des standards de validation**

<b>Niveaux de concentrations en %</b>	<b>80%</b>	<b>90%</b>	<b>100%</b>	<b>110%</b>	<b>120%</b>
<b>Protocole</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Peser chaque PE théorique de Lamotrigine pour chaque répétition dans une fiole de 100 ml</li> <li>- Ajouter le diluant et mettre dans le sonicateur pour une dissolution complète</li> <li>- Compléter au trait de jauge avec le diluant pour ainsi obtenir des solutions mères</li> <li>- à l'aide d'une pipette jaugée, prélever 5ml de la solution mère, verser dans une fiole de 50ml</li> <li>- Ajouter 2 ml de la solution d'excipients</li> <li>- Compléter au trait de jauge avec le diluant (une dilution 5/50)</li> <li>- Agiter par retournement à chaque fois et remplir les vials.</li> </ul>				
<b>Solutions à préparer</b>	<b>SV = 5x5x4 = 100 solutions (5 niveaux, 5 séries, 4 répétitions)</b>				

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

#### **Mélange de 60% solution tampon, 15% d'acétonitrile et 25% de méthanol**

Peser 0.8g d'Acétate d'Ammonium, mettre cette masse dans une fiole jaugée de 1L, Compléter au trait de jauge avec de l'eau distillée, ajouter 1 ml de triéthylamine puis ajuster au pH=6 avec l'acide acétique glacial. Dans une éprouvette on mélange 60% de la solution tampon, 15% d'acétonitrile et 25% de méthanol, mettre au sonicateur, filtrer puis dégazer.

#### **1.2.2.3. Préparation de la solution d'excipients**

Dans une fiole jaugée de 100 ml peser 100 mg du mélange d'excipients, dissoudre dans un volume suffisant de diluant, puis filtrer à l'aide d'un papier filtre.

### **1.3. Conditions Chromatographiques**

**Tableau XIV : Colonne et conditions Chromatographique**

<b>Colonne</b>	Longueur	15 cm
	Diamètre	4.6 mm
	Taille des particules	5µm
	Phase stationnaire	C18 Gel de silice Octadécyle
<b>Volume Injecté</b>	10µl	

---

<b>Débit</b>	1ml/min
<b>Température</b>	Température ambiante
<b>Détecteur</b>	Spectrophotomètre UV-Visible : longueur d'onde $\lambda=220$ nm

#### 1.4 Préparation de la Feuille de Calcul

Nous avons réalisé l'étude statistique sur Excel de Microsoft Office 2019 enregistré et installé sur Microsoft Office 2019 installé sur Windows 10 authentique, et ce en introduisant dans ce logiciel les feuilles de calcul conçues par l'équipe du Laboratoire de Chimie Analytique de Tizi-Ouzou. L'indice de capacité est calculé subséquemment aux équations rentrant dans l'étude statistique de la validation, ces dernières permettent d'avoir les résultats définitifs à l'introduction des données brutes en termes de prises d'essais et de leurs réponses instrumentales.

#### 1.5 Simulation

Dans cette étude, nous avons procédé à une simulation des résultats pour les 5 niveaux de concentrations, effectuées sur 100 échantillons au total sur un intervalle de 95-105. Cette démarche consiste à appuyer les résultats obtenus à la suite des manipulations.

## **RESULTATS**

## 2. Résultats

Les chromatogrammes obtenus sont indiqués dans l'annexe II

### 2.1. Données brutes

Dans les tableaux suivants ; sont mentionnées les données brutes obtenues par les standards d'étalonnage et de validation :

**Tableau XV : Données brutes des standards d'étalonnage**

<i>DONNEES BRUTES OBTENUES (STANDARD D'ETALONNAGE)</i>											
<i>NIVEAU CONC</i>	<i>Rep</i>	<i>SERIES J</i>									
		<i>Série 1</i>		<i>Série 2</i>		<i>Série 3</i>		<i>Série 4</i>		<i>Série 5</i>	
		<i>Quantit és introdui tes</i>	<i>Réponse instrumen tale</i>	<i>Quantit és introdui tes</i>	<i>Réponse instrumen tale</i>	<i>Quantit és introdui tes</i>	<i>Réponse instrumen tale</i>	<i>Quantit és Intro duites</i>	<i>Réponse instrumen tale</i>	<i>Quantit és Intro duites</i>	<i>Réponse instrumen tale</i>
<i>k</i>	<i>i</i>	<i>x</i>	<i>y</i>								
1	1	40,10	2132525	40,32	2124260	40,32	2137462	40.02	2168267	40.00	2133647
	2	40,65	2193688	40,05	2097263	40,08	2115599	40.00	2168091	40.01	2182115
2	1	45,50	2449380	45,56	2376302	44,96	2429586	44.98	2465816	45.03	2421832
	2	45,24	2473732	45,24	2373324	45,00	2421832	45.09	2503784	45.08	2429586
3	1	50,72	2787125	49,99	2649999	50,45	2665330	50.18	2720352	49.99	2707837
	2	50,03	2711400	50,01	2677320	50,17	2623737	49.95	2707831	50.01	2647646
4	1	55,00	2996367	55,05	2903745	55,03	2951266	55.18	2951266	55.02	3014891
	2	55,02	2990298	55,98	2951266	55,28	2970566	55.08	2995778	54.98	3009369
5	1	60,02	3155104	60,02	3184261	60,02	3128691	60.20	3246758	60.09	3374231
	2	60,08	3217235	59,82	3128691	60,30	3184489	60.55	3247087	60.10	3350597

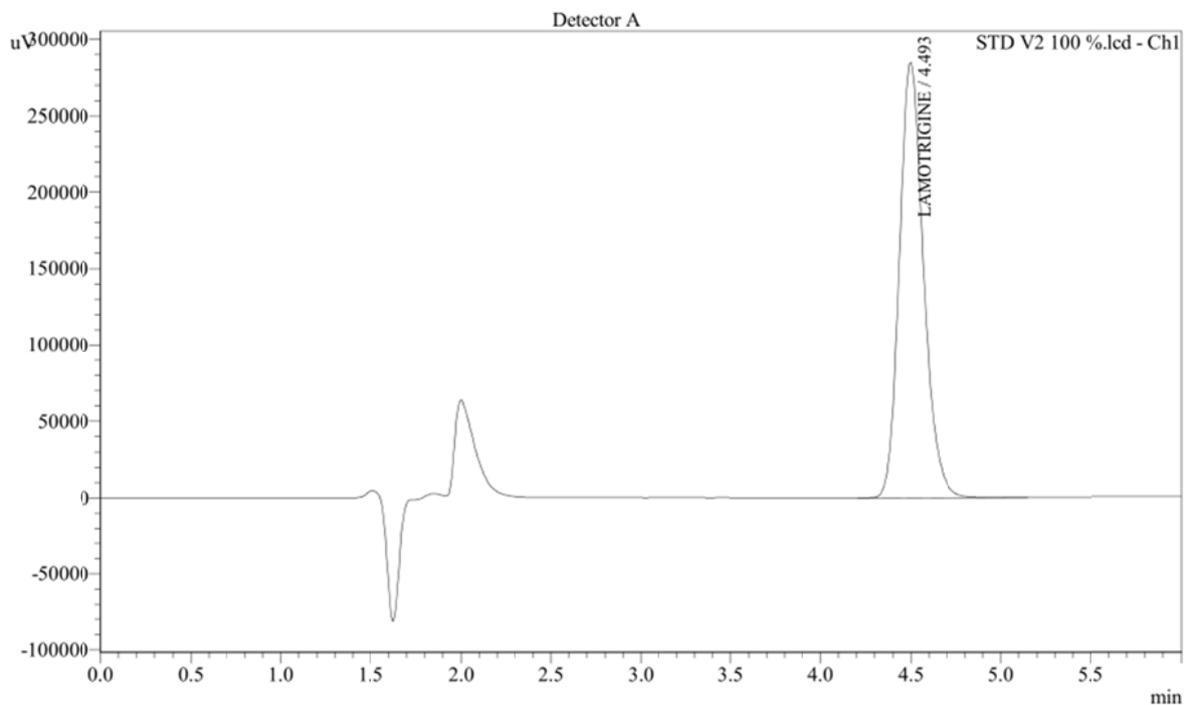
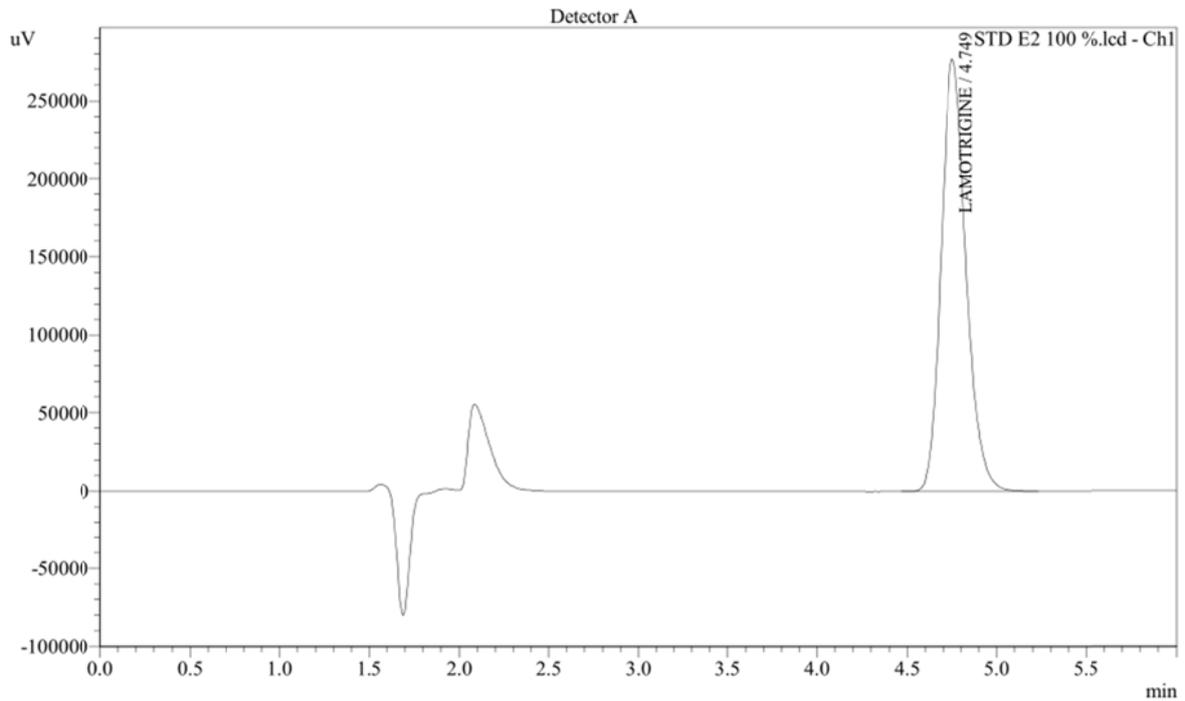
Tableau XVI: Données brutes des standards de validation

<i>DONNEES BRUTES OBTENUES (STANDARD DE VALIDATION)</i>											
<i>NIVEAU CONC</i>	<i>Rep</i>	<i>SERIES J</i>									
		<i>Serie 1</i>		<i>Serie 2</i>		<i>Serie 3</i>		<i>Serie 4</i>		<i>Serie 5</i>	
		<i>Quantités introduites</i>	<i>Réponse instrumentale</i>								
	<i>i</i>										
1	1	40,10	2133647	40,32	2137462	40,32	2132615	39,97	2133647	40,00	2156894
	2	40,65	2182115	40,05	2111102	40,08	2115704	40,15	2193688	39,99	2132525
	3	39,97	2158550	40,23	2132751	40,72	2133647	40,02	2182115	40,06	2158550
	4	40,03	2156878	40,08	2114681	40,25	2112578	40,00	2166863	40,01	2133647
2	1	45,50	2470975	45,56	2429586	44,96	2429586	45,60	2473732	45,01	2429586
	2	45,25	2425352	45,30	2415124	44,97	2387942	45,03	2449380	45,03	2468830
	3	45,60	2476302	45,08	2415689	45,21	2449916	44,98	2429586	44,98	2421832
	4	45,50	2433309	45,01	2429586	44,95	2421832	45,09	2465816	44,98	2415689
3	1	50,72	2685501	49,99	2665330	50,45	2671090	50,45	2725282	50,02	2761300
	2	50,03	2637701	50,01	2631138	50,17	2665330	50,46	2737390	49,99	2737390
	3	50,25	2678686	49,98	2656932	50,13	2610389	50,18	2746872	50,01	2770502
	4	50,02	2649951	50,30	2695722	50,10	2641078	49,96	2707831	49,99	2707837
4	1	55,00	2952027	55,05	2912637	55,03	2903745	55,01	2946832	55,01	3091212
	2	54,98	2966191	54,95	2903745	55,28	2945778	55,13	3006988	55,10	3090699
	3	55,24	2991385	55,36	2934046	55,02	2920298	55,18	3012380	55,02	3084578
	4	55,02	2990298	55,38	2951266	55,27	2966191	55,08	2995778	55,02	3082380
5	1	60,02	3228691	60,37	3171399	60,02	3118623	60,26	3249502	60,09	3355548
	2	60,08	3229735	59,82	3128691	60,30	3178297	60,07	3246758	60,10	3374231
	3	60,63	3284489	60,27	3164250	60,26	3133849	60,20	3247087	60,00	3338052
	4	60,16	3255104	59,97	3179883	59,98	3197437	60,55	3278297	60,08	3350597

## 2.2. Spécificité

La spécificité de la méthode est démontrée par la comparaison du chromatogramme du standard d'étalonnage, du standard de validation et du placebo.

Ces derniers sont respectivement placés comme suit :



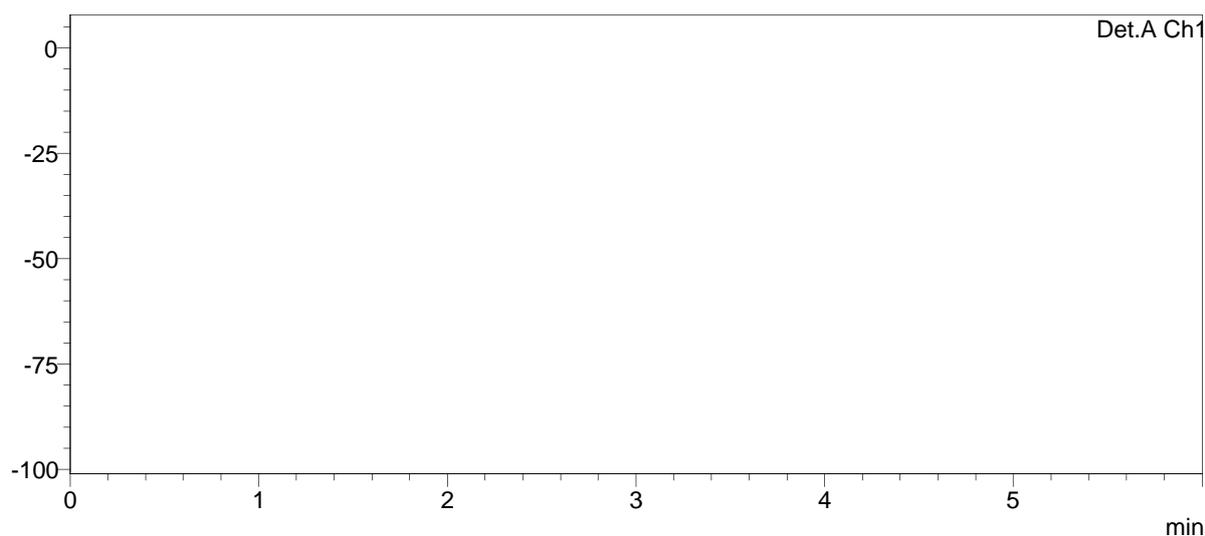


Figure 09 : Chromatogramme de la gamme placebo

### 3. Modèle $y=ax+b$

#### 3.1. Fonction de réponse

La corrélation entre la réponse instrumentale (air du pic) et la masse introduite de la solution de la Lamotrigine obtenue avec 5 séries des SE est représentée pour quatre modèles mathématiques approuvés, dont le modèle qui suit :

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

DONNEES BRUTES OBTENUES (STANDARD D'ETALONNAGE)											
NIVEAU CONC	Rep	SERIES J									
		Série 1		Série 2		Série 3		Série 4		Série 5	
		Quantités introduites	Réponse instrumentale								
k	i	x	y	x	y	x	y	x	y	x	y
1	1	40,10	2132525	40,32	2124260	40,32	2137462	40.02	2168267	40.00	2133647
	2	40,65	2193688	40,05	2097263	40,08	2115599	40.00	2168091	40.01	2182115
2	1	45,50	2449380	45,56	2376302	44,96	2429586	44.98	2465816	45.03	2421832
	2	45,24	2473732	45,24	2373324	45,00	2421832	45.09	2503784	45.08	2429586
3	1	50,72	2787125	49,99	2649999	50,45	2665330	50.18	2720352	49.99	2707837
	2	50,03	2711400	50,01	2677320	50,17	2623737	49.95	2707831	50.01	2647646
4	1	55,00	2996367	55,05	2903745	55,03	2951266	55.18	2951266	55.02	3014891
	2	55,02	2990298	55,98	2951266	55,28	2970566	55.08	2995778	54.98	3009369
5	1	60,02	3155104	60,02	3184261	60,02	3128691	60.20	3246758	60.09	3374231
	2	60,08	3217235	59,82	3128691	60,30	3184489	60.55	3247087	60.10	3350597

On trace les courbes d'étalonnage des 5 séries de SE à partir des données du tableau précédent :

PARTIE PRATIQUE

RESULTATS

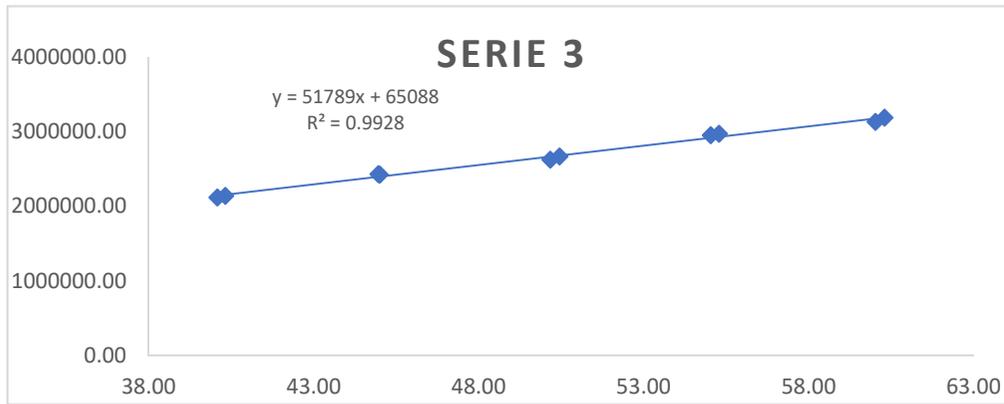


Figure 10 : Courbes d'étalonnage obtenues avec la fonction  $y=ax+b$

### 3.2. Alignement des observations

L'alignement des réponses sur la moyenne des concentrations introduites est exigé et cela pour chaque niveau de concentration lorsque les quantités introduites ne sont pas identiques. L'alignement des réponses obtenues avec les échantillons de validation est résumé dans le tableau suivant :

**Tableau XVIII : Alignement des réponses observées avec les 5 séries des SV**

<i>Serie 1</i>	<i>Serie 2</i>	<i>Serie 3</i>	<i>Serie 4</i>	<i>Serie 5</i>
<b>Yijk,c</b>	<b>Yijk,c</b>	<b>Yijk,c</b>	<b>Yijk,c</b>	<b>Yijk,c</b>
2138255,49	2129466,59	2133780,24	2137030,41	2157790,58
2157755,84	2117498,33	2129298,51	2187701,96	2134019,30
2170005,39	2129552,84	2114096,80	2182895,79	2155860,25
2165173,28	2119478,25	2117368,45	2168684,84	2133945,86
2468999,93	2412395,87	2432822,79	2451609,69	2428988,28
2436544,05	2411792,58	2390660,90	2456927,61	2467036,83
2469060,09	2424084,18	2440205,64	2439736,24	2423027,44
2431333,93	2441712,37	2425586,67	2470240,46	2416884,44
2661010,17	2669594,22	2658790,21	2715522,16	2760253,99
2649551,40	2634336,16	2667531,02	2727109,63	2738137,15
2678949,34	2661729,25	2614661,56	2751166,33	2770053,71
2662328,09	2683462,37	2646904,22	2723576,88	2708584,15
2955187,11	2919832,87	2909959,63	2951516,72	3092855,74
2970404,48	2916271,14	2939045,48	3005426,43	3086963,24
2981904,68	2924718,02	2927030,52	3008215,80	3085624,01
2992404,74	2940871,96	2959976,37	2996819,05	3083426,01
3239356,36	3157407,03	3124837,63	3250022,52	3354203,13
3237240,26	3144015,54	3170010,82	3257168,50	3372288,40
3263026,60	3155588,30	3127634,37	3250730,67	3342086,62
3258395,78	3187212,13	3205723,18	3263722,30	3349849,85

### 3.3. Prédiction inverse

Les prises d'essai prédites avec la fonction de réponse choisie sont présentées dans le tableau suivant :  $y=ax+b$

**Tableau XIX: Prédictionn inverses obtenues avec les SV des 5 séries**

<i>Prédictionn inverses xijk,calc</i>					<b>Moy des prédictions inverses</b>
<i>Serie 1</i>	<i>Serie 2</i>	<i>Serie 3</i>	<i>Serie 4</i>	<i>Serie 5</i>	
xijk,calc	xijk,calc	xijk,calc	xijk,calc	xijk,calc	
39,37	40,50	39,94	38,97	40,51	<b>39,95</b>
39,74	40,28	39,86	39,94	40,11	
39,97	40,50	39,56	39,85	40,47	
39,88	40,31	39,63	39,58	40,11	
45,65	45,81	45,72	45,01	45,04	<b>45,41</b>
45,03	45,80	44,91	45,12	45,68	
45,65	46,03	45,86	44,79	44,94	
44,93	46,36	45,58	45,37	44,84	
49,29	50,63	50,08	50,08	50,58	<b>50,07</b>
49,08	49,97	50,25	50,31	50,21	

49,63	50,49	49,23	50,77	50,75	
49,32	50,89	49,85	50,24	49,72	
54,88	55,33	54,93	54,62	56,15	55,50
55,17	55,26	55,49	55,65	56,05	
55,39	55,42	55,26	55,71	56,03	
55,58	55,72	55,90	55,49	55,99	
60,27	59,79	59,08	60,35	60,52	60,20
60,23	59,54	59,95	60,49	60,82	
60,72	59,75	59,14	60,37	60,32	
60,64	60,35	60,64	60,62	60,45	

### 3.4. Justesse

Elle est exprimée en termes de biais absolu, de biais relatif, et de pourcentage de recouvrement (%) pour chaque niveau de concentration des standards de validation comme indiqué dans le tableau ci-dessous.

**Tableau XX : justesse calculée pour chaque niveau de concentration des standards de validation**

Biais Absolus	Biais relatifs	% de Recouvrement
-0,196	-0,488	99,51
0,226	0,501	100,50
-0,091	-0,181	99,82
0,395	0,717	100,72
0,040	0,067	100,07

### 3.5. Fidélité

La fidélité de notre méthode est évaluée dans des conditions de répétabilité et de fidélité intermédiaire. Elle est calculée pour chaque niveau de concentration, exprimée en écart type et en termes de coefficients de variations.

Les résultats sont mentionnés dans le tableau suivant :

**Tableau XXI : calcul des écarts types, des CV de répétabilité et de fidélité intermédiaire**

Variance intra-Série $\sigma^2w,j$	Variance inter-Série $\sigma^2B,j$	Ecartype de la répétabilité	Ecartype Intersérie	Ecartype de la fidélité intermédiaire	CV Répétabilité	CV Fidélité Intermédiaire
0,072	0,117	0,268	0,342	0,434	0.668	1.082
0,120	0,110	0,346	0,332	0,480	0.767	1.062
0,140	0,194	0,374	0,441	0,578	0.745	1.152
0,112	0,072	0,335	0,269	0,429	0.608	0.779
0.159	0,113	0,399	0,336	0,551	0.622	0.866

### 3.6. Calcul de l'indice de capabilité $C_{pk-tol}$ et $\pi_{C_{pk-tol}}$

L'indice de capabilité est calculé en incluant les paramètres mentionnés dans le tableau suivant :

Tableau XXII : Calcul de l'indice de capabilité Cpk-tol et  $\pi$  Cpk-tol

Niveaux	Quantité Moy Intro	Quantité Moy Préd	LSL	ULS	R	df	t (df, (1+ $\beta$ )/2)	Ecartype de la fidélité intermédiaire	Ke	Ke x $\sigma$	Cpk-tol	$\pi$ Cpk-tol
1	40,15	39,95	38,14	42,16	1,627	7,516	3,9688834	0,434373938	4,265063	1,852632	<b>0,977929</b>	<b>0,410022</b>
2	45,18	45,41	42,92	47,44	0,920	9,707	3,6401056	0,479932224	3,85199	1,848694	<b>1,099567</b>	<b>0,197698</b>
3	50,16	50,07	47,65	52,67	1,391	8,043	3,7784608	0,577793502	4,043939	2,336561	<b>1,034546</b>	<b>0,37369</b>
4	55,11	55,50	52,35	57,86	0,643	11,396	3,4529373	0,429261435	3,617927	1,553037	<b>1,519891</b>	<b>0,014798</b>
5	60,16	60,20	57,15	63,17	0,710	10,912	3,535	0,521236947	3,714189	1,935973	<b>1,532887</b>	<b>0,026594</b>

## 4. Modèle $y=ax$

### 4.1. Fonction de réponse

La corrélation entre la réponse instrumentale (air du pic) et la masse introduite de la solution de la Lamotrigine obtenue avec 5 séries des SE est représentée pour le modèle qui suit :

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

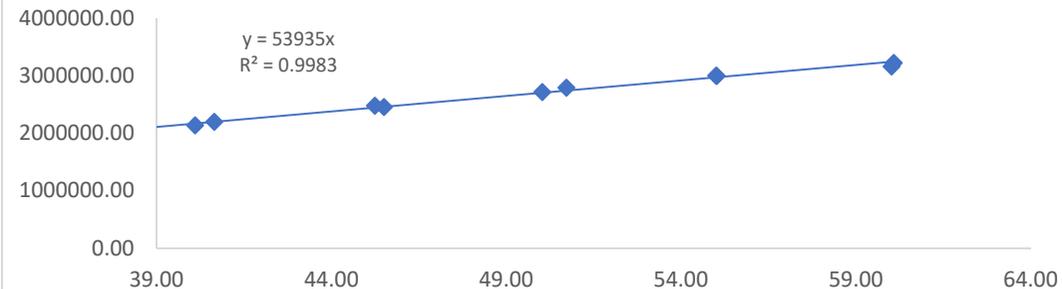
<i>DONNEES BRUTES OBTENUES (STANDARD D'ETALONNAGE)</i>											
<i>NIVEAU CONC</i>	<i>Rep</i>	<i>SERIES J</i>									
		<i>Série 1</i>		<i>Série 2</i>		<i>Série 3</i>		<i>Série 4</i>		<i>Série 5</i>	
		<i>Quantit és introdui tes</i>	<i>Réponse instrumen tale</i>	<i>Quantit és introdui tes</i>	<i>Réponse instrumen tale</i>	<i>Quantit és introdui tes</i>	<i>Réponse instrumen tale</i>	<i>Quantit és Introdu ites</i>	<i>Réponse instrumen tale</i>	<i>Quantit és Introdu ites</i>	<i>Réponse instrumen tale</i>
<i>k</i>	<i>i</i>	<i>x</i>	<i>y</i>								
1	1	40,10	2132525	40,32	2124260	40,32	2137462	40.02	2168267	40.00	2133647
	2	40,65	2193688	40,05	2097263	40,08	2115599	40.00	2168091	40.01	2182115
2	1	45,50	2449380	45,56	2376302	44,96	2429586	44.98	2465816	45.03	2421832
	2	45,24	2473732	45,24	2373324	45,00	2421832	45.09	2503784	45.08	2429586
3	1	50,72	2787125	49,99	2649999	50,45	2665330	50.18	2720352	49.99	2707837
	2	50,03	2711400	50,01	2677320	50,17	2623737	49.95	2707831	50.01	2647646
4	1	55,00	2996367	55,05	2903745	55,03	2951266	55.18	2951266	55.02	3014891
	2	55,02	2990298	55,98	2951266	55,28	2970566	55.08	2995778	54.98	3009369
5	1	60,02	3155104	60,02	3184261	60,02	3128691	60.20	3246758	60.09	3374231
	2	60,08	3217235	59,82	3128691	60,30	3184489	60.55	3247087	60.10	3350597

On trace les courbes d'étalonnage des 5 séries de SE à partir des données du tableau précédent :

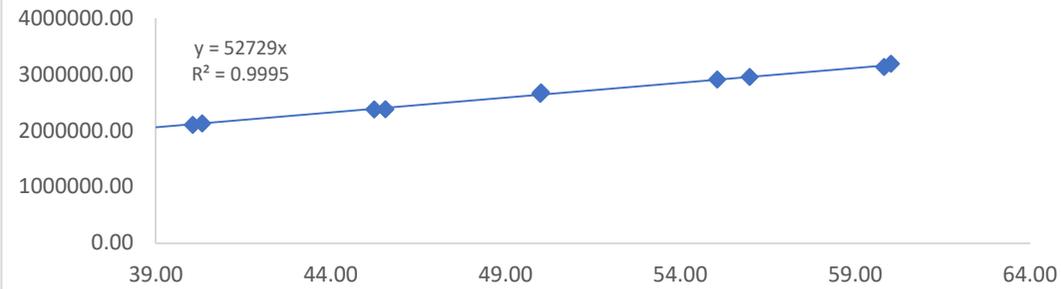
PARTIE PRATIQUE

RESULTATS

**SERIE 1**



**SERIE 2**



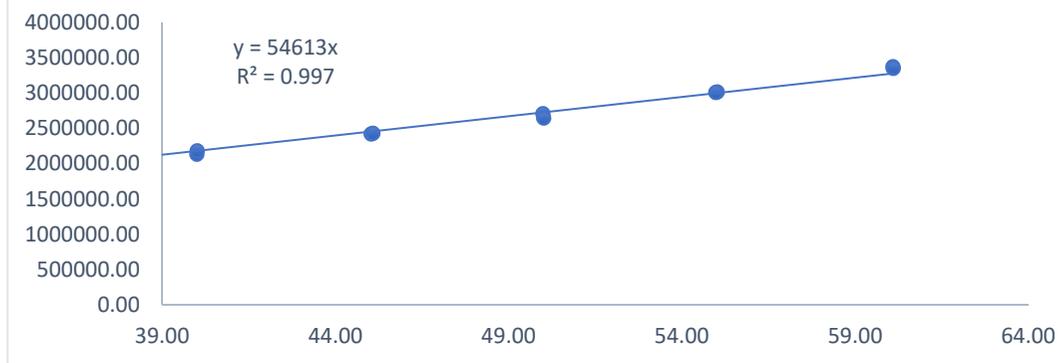
**SERIE 3**



**SERIE 4**



**SERIE 5**



**Figure 11 : Courbes d'étalonnage obtenues avec la fonction  $y=ax$**

#### 4.2. Alignement des observations

L'alignement des réponses sur la moyenne des concentrations introduites est exigé et cela pour chaque niveau de concentration lorsque les quantités introduites ne sont pas identiques. Des réponses obtenues avec les échantillons de validation est résumé dans le tableau suivant :

**Tableau XXIV : Alignement des réponses observées avec les 5 séries des SV**

<i>Alignement des réponses</i>				
<i>Serie 1</i>	<i>Serie 2</i>	<i>Serie 3</i>	<i>Serie 4</i>	<i>Serie 5</i>
<i>Y'ijk,c</i>	<i>Y'ijk,c</i>	<i>Y'ijk,c</i>	<i>Y'ijk,c</i>	<i>Y'ijk,c</i>
2138366,30	2129552,65	2133808,87	2137168,25	2157713,20
2157170,11	2117429,48	2129632,46	2187458,10	2133890,33
2170280,84	2129587,26	2113616,55	2182927,60	2156092,40
2165372,75	2119426,61	2117486,12	2168759,06	2133920,07
2468952,44	2412580,90	2432902,30	2450708,45	2429039,87
2436813,17	2411828,44	2390727,69	2457235,09	2467191,60
2468885,95	2423993,82	2439967,10	2440149,75	2422924,27
2431286,44	2441581,85	2425678,91	2470420,71	2416781,27
2660421,27	2669548,32	2658488,06	2715124,55	2760344,27
2649836,35	2634301,74	2667585,08	2726690,82	2738072,67
2678955,67	2661677,61	2614766,52	2751341,28	2770092,40
2662625,70	2683594,33	2647047,34	2724218,35	2708519,67
2955263,09	2919755,41	2910112,29	2951707,58	3092713,87
2970505,79	2916136,31	2938880,10	3005362,81	3087285,67
2981676,72	2924818,43	2927195,90	3008046,15	3085533,73
2992455,40	2940983,85	2959823,71	2996861,46	3083335,73
3239612,82	3157557,64	3124990,29	3250043,73	3354319,20
3237420,72	3143850,58	3169807,27	3257592,61	3372456,07
3262510,53	3155681,54	3127481,71	3250879,11	3341738,40
3258474,93	3187133,24	3205926,73	3263128,54	3349914,33

#### 4.3. Prédiction inverse

Les prises d'essai prédites avec la fonction de réponse choisie sont présentées dans le tableau suivant :  $y=ax$

**Tableau XXV : Prédictionn inverses obtenues avec les SV des 5 séries**

<i>Prédictionn inverses xijk,calc</i>					<i>Moyenne des prédictions inverses <math>\mu_j</math></i>
<i>Serie 1</i>	<i>Serie 2</i>	<i>Serie 3</i>	<i>Serie 4</i>	<i>Serie 5</i>	
<i>xijk,calc</i>	<i>xijk,calc</i>	<i>xijk,calc</i>	<i>xijk,calc</i>	<i>xijk,calc</i>	
39,65	40,39	40,21	39,45	39,51	<b>39,927</b>
40,00	40,16	40,14	40,38	39,07	
40,24	40,39	39,83	40,30	39,48	
40,15	40,19	39,91	40,03	39,07	
45,78	45,75	45,85	45,24	44,48	<b>45,385</b>
45,18	45,74	45,06	45,36	45,18	
45,78	45,97	45,98	45,04	44,37	
45,08	46,30	45,72	45,60	44,25	
49,33	50,63	50,10	50,12	50,54	<b>50,076</b>
49,13	49,96	50,27	50,33	50,14	
49,67	50,48	49,28	50,79	50,72	
49,37	50,89	49,89	50,29	49,59	

54,79	55,37	54,84	54,49	56,63	<b>55,533</b>
55,08	55,30	55,39	55,48	56,53	
55,28	55,47	55,17	55,53	56,50	
55,48	55,78	55,78	55,32	56,46	
60,07	59,88	58,89	59,99	61,42	<b>60,243</b>
60,02	59,62	59,74	60,13	61,75	
60,49	59,85	58,94	60,01	61,19	
60,41	60,44	60,42	60,24	61,34	

#### 4.4. Justesse

Elle est exprimée en termes de biais absolu, de biais relatif, et de pourcentage de recouvrement (%) pour chaque niveau de concentration des standards de validation comme indiqué dans le tableau ci-dessous.

**Tableau XXVI : justesse calculée pour chaque niveau de concentration des standards de validation**

<b>Niveaux</b>	<b>Biais Absolus</b>	<b>Biais relatifs</b>	<b>% de Recouvrement</b>
1	-0,223	-0,555	99,45
2	0,206	0,455	100,46
3	-0,085	-0,168	99,83
4	0,427	0,774	100,77
5	0,081	0,135	100,14

#### 4.5. Fidélité

La fidélité de notre méthode est évaluée dans des conditions de répétabilité et de fidélité intermédiaire. Elle est calculée pour chaque niveau de concentration, exprimée en écart type et en termes de coefficients de variations.

Les résultats sont mentionnés dans le tableau suivant :

**Tableau XXVII : calcul des écarts types, des CV de répétabilité et de fidélité intermédiaire**

<b>Variance intra-Série</b> $\sigma^2w,j$	<b>Variance inter-Série</b> $\sigma^2B,j$	<b>Ecartype de la répétabilité</b>	<b>Ecartype Intersérie</b>	<b>Ecartype de la fidélité intermédiaire</b>	<b>CV Répétabilité</b>	<b>CV Fidélité intermédiaire</b>
0,071	0,090	0,265	0,353	0,441	0,660	1,099
0,120	0,113	0,349	0,484	0,597	0,771	1,321
0,140	0,196	0,381	0,412	0,561	0,759	1,119
0,112	0,091	0,324	0,547	0,636	0,589	1,153
0,158	0,119	0,394	0,690	0,794	0,655	1,321

#### 4.6. Calcul de l'indice de capabilité $C_{pk-tol}$ et $\pi_{C_{pk-tol}}$

L'indice de capabilité est calculé en incluant les paramètres mentionnés dans le tableau suivant :

Tableau XXVIII : Calcul de l'indice de capacité Cpk-tol et  $\pi$  Cpk-tol

Niveaux	Quantité Moy Intro	Quantité Moy Préd	LSL	ULS	R	df	t (df, (1+ $\beta$ )/2)	<i>Ecartype de la fidélité intermédiaire</i>	Ke	Ke x $\sigma$	Cpk-tol	$\pi$ Cpk-tol
1	40,15	39,93	38,14	42,16	1,774	7,249	3,9688834	0,441154866	4,27438	1,885663	<b>0,95</b>	<b>0,47</b>
2	45,18	45,39	42,92	47,44	1,931	7,003	3,9688834	0,596760787	4,283295	2,556102	<b>0,80</b>	<b>1,09</b>
3	50,16	50,08	47,65	52,67	1,170	8,693	3,7784608	0,561188944	4,0251	2,258842	<b>1,07</b>	<b>0,31</b>
4	55,11	55,53	52,35	57,86	2,840	6,082	4,2466556	0,635548813	4,622592	2,937883	<b>0,79</b>	<b>0,94</b>
5	60,16	60,24	57,15	63,17	3,070	5,930	4,6869151	0,794444755	5,10977	4,05943	<b>0,72</b>	<b>1,79</b>

5. Modèles  $\sqrt{y}=\sqrt{x} + b$ Tableau XXIX : Résultats obtenus pour la fonction  $\sqrt{y}=a\sqrt{x} +b$ 

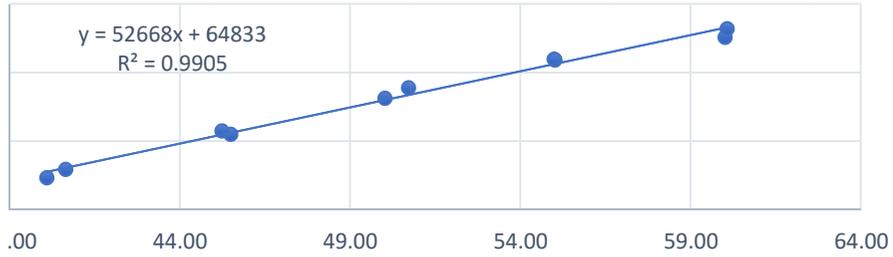
STANDARD D'ETALONNAGE											
NIVEAU CONC	Rep	SERIES <i>i</i>									
		Serie 1		Serie 2		Serie 3		Serie 4		Serie 5	
		Quantités introduites	Réponse instrumentale								
<i>j</i>	<i>k</i>	x	Y	x	y	x	y	x	y	x	Y
1	1	6,33	1460,32	6,35	1457,48	6,35	1462,01	6,33	1472,50	6,32	1460,70
	2	6,38	1481,11	6,33	1448,19	6,33	1454,51	6,32	1472,44	6,33	1477,20
2	1	6,75	1565,05	6,75	1541,53	6,71	1558,71	6,71	1570,29	6,71	1556,22
	2	6,73	1572,81	6,73	1540,56	6,71	1556,22	6,71	1582,33	6,71	1558,71
3	1	7,12	1669,47	7,07	1627,88	7,10	1632,58	7,08	1649,35	7,07	1645,55
	2	7,07	1646,63	7,07	1636,25	7,08	1619,80	7,07	1645,55	7,07	1627,16
4	1	7,42	1731,00	7,42	1704,04	7,42	1717,92	7,43	1717,92	7,42	1736,34
	2	7,42	1729,25	7,48	1717,92	7,44	1723,53	7,42	1730,83	7,41	1734,75
5	1	7,75	1776,26	7,75	1784,45	7,75	1768,81	7,76	1801,88	7,75	1836,91
	2	7,75	1793,67	7,73	1768,81	7,77	1784,51	7,78	1801,97	7,75	1830,46

## 5.1. Fonction de réponse

La corrélation entre la réponse instrumentale (air du pic) et la masse introduite de la solution de la Lamotrigine obtenue avec 5 séries des SE est représentée pour le modèle qui suit :

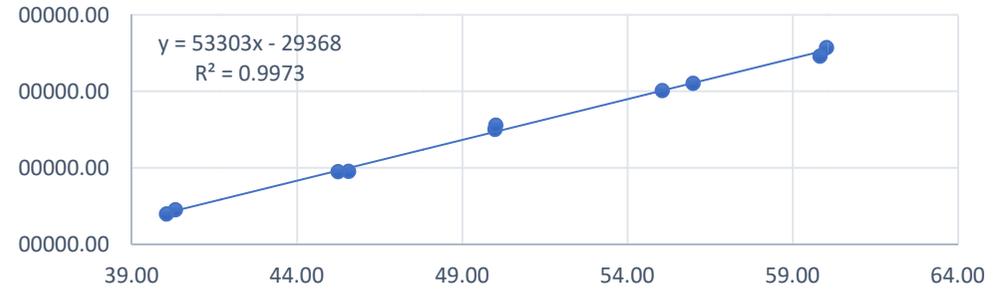
PARTIE PRATIQUE

SERIE 1

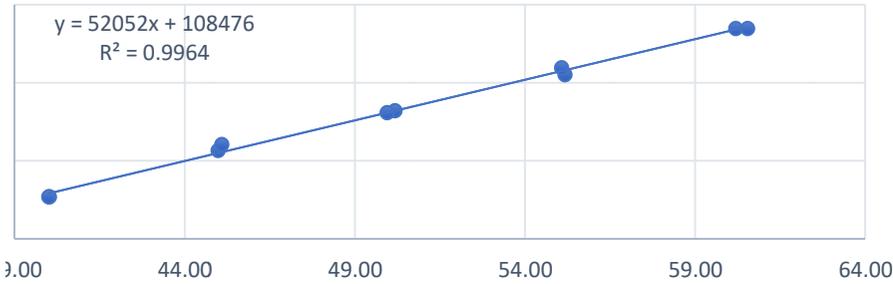


RESULTATS

SERIE 2



SERIE 4



SERIE 3



SERIE 5



## 5.2. Alignement des observations

L'alignement des réponses sur la moyenne des concentrations introduites est exigé et cela pour chaque niveau de concentration lorsque les quantités introduites ne sont pas identiques. L'alignement des réponses obtenues avec les échantillons de validation est résumé dans le tableau suivant :

**Tableau XXX : Alignement des réponses observées avec les 5 séries des SV**

<i>Alignement des réponses</i>				
<i>Serie 1</i>	<i>Serie 2</i>	<i>Serie 3</i>	<i>Serie 4</i>	<i>Serie 5</i>
Yijk,c	Yijk,c	Yijk,c	Yijk,c	Yijk,c
1462,27	1459,26	1460,74	1461,85	1468,94
1468,89	1455,16	1459,20	1479,08	1460,82
1473,11	1459,29	1454,01	1477,46	1468,29
1471,46	1455,84	1455,11	1472,65	1460,80
1571,30	1553,14	1559,76	1565,74	1558,52
1560,95	1552,98	1546,18	1567,46	1570,68
1571,30	1556,97	1562,07	1561,96	1556,60
1559,27	1562,65	1557,44	1571,70	1554,63
1631,28	1633,90	1630,57	1647,88	1661,40
1627,72	1623,06	1633,26	1651,38	1654,73
1636,74	1631,49	1616,98	1658,67	1664,35
1631,65	1638,09	1626,93	1650,33	1645,78
1719,07	1708,76	1705,86	1717,99	1758,66
1723,49	1707,72	1714,35	1733,61	1756,97
1726,80	1710,17	1710,86	1734,41	1756,60
1729,86	1714,87	1720,44	1731,13	1755,97
1799,83	1776,91	1767,71	1802,78	1831,45
1799,24	1773,12	1780,45	1804,76	1836,37
1806,33	1776,40	1768,52	1802,98	1828,14
1805,11	1785,28	1790,46	1806,57	1830,26

## 5.3. Prédictionn inverses

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

**Tableau XXXI : Prédictionn inverses obtenues avec les SV des 5 séries**

<i>Prédictionn inverses xijk,calc</i>					<i>Moyennes des prédictionn inverses <math>\mu_j</math></i>
<i>Serie 1</i>	<i>Serie 2</i>	<i>Serie 3</i>	<i>Serie 4</i>	<i>Serie 5</i>	
xijk,calc	xijk,calc	xijk,calc	xijk,calc	xijk,calc	<b>39,97</b>
39,45	40,51	39,98	39,02	40,43	
39,81	40,29	39,90	39,98	40,02	
40,05	40,51	39,60	39,89	40,40	
39,95	40,33	39,67	39,62	40,02	
45,68	45,82	45,73	45,02	45,03	<b>45,42</b>
45,07	45,81	44,92	45,13	45,67	
45,68	46,04	45,87	44,80	44,93	
44,97	46,37	45,59	45,38	44,82	
49,30	50,64	50,08	50,08	50,61	

49,08	49,98	50,25	50,30	50,24	<b>50,07</b>
49,63	50,49	49,23	50,76	50,78	
49,32	50,90	49,85	50,23	49,74	
54,85	55,32	54,92	54,60	56,19	<b>55,49</b>
55,14	55,26	55,48	55,64	56,09	
55,35	55,41	55,25	55,69	56,07	
55,55	55,72	55,88	55,47	56,04	
60,21	59,77	59,06	60,34	60,56	<b>60,19</b>
60,17	59,52	59,93	60,48	60,86	
60,66	59,74	59,12	60,35	60,36	
60,57	59,84	60,62	60,60	60,49	

#### 5.4. Justesse

Elle est exprimée en termes de biais absolu, de biais relatif, et de pourcentage de recouvrement (%) pour chaque niveau de concentration des standards de validation comme indiqué dans le tableau ci-dessous.

**Tableau XXXII : justesse calculée pour chaque niveau de concentration des standards de validation**

Niveau	Biais Absolus	Biais relatifs	% de Recouvrement
1	-0,179	-0,445	99,56
2	0,235	0,521	100,52
3	-0,087	-0,173	99,83
4	0,389	0,706	100,71
5	0,026	0,042	100,04

#### 5.5. Fidélité

La fidélité de notre méthode est évaluée dans des conditions de répétabilité et de fidélité intermédiaire. Elle est calculée pour chaque niveau de concentration, exprimée en écart type et en termes de coefficients de variations.

Les résultats sont mentionnés dans le tableau suivant :

**Tableau XXXIII : calcul des écarts types, des CV de répétabilité et de fidélité intermédiaire**

Variance intra-Série $\sigma^2w,j$	Variance inter-Série $\sigma^2B,j$	Ecartype de la répétabilité	Ecartype Intersérie	Ecartype de la fidélité intermédiaire	CV Répétabilité	CV Fidélité intermédiaire
0,071	0,090	0,267	0,300	0,402	0,665	1,000
0,120	0,113	0,346	0,337	0,483	0,766	1,069
0,140	0,196	0,374	0,443	0,579	0,745	1,155
0,112	0,091	0,334	0,302	0,451	0,606	0,818
0,158	0,119	0,398	0,345	0,526	0,661	0,875

#### 5.6. Calcul de l'indice de capabilité Cpk-tol et $\pi_{Cpk-tol}$

L'indice de capabilité est calculé en incluant les paramètres mentionnés dans le tableau suivant :

Tableau XXXIV : Calcul de l'indice de Capabilité Cpk-tol et  $\pi_{Cpk-tol}$ 

Niveaux	Quantité Moy Intro	Quantité Moy Préd	LSL	ULS	R	df	t (df, (1+ $\beta$ )/2)	<i>Ecartype de la fidélité intermédiaire</i>	Ke	Ke x $\sigma$	Cpk-tol	$\pi_{Cpk-tol}$
1	40,15	39,97	38,14	42,16	1,262	8,402	3,7784608	0,401656932	4,033346	1,620021	<b>1,13</b>	<b>0,18</b>
2	45,18	45,41	42,92	47,44	0,947	9,581	3,6401056	0,482907355	3,855046	1,86163	<b>1,09</b>	<b>0,21</b>
3	50,16	50,07	47,65	52,67	1,406	8,007	3,7784608	0,579349239	4,045024	2,343482	<b>1,03</b>	<b>0,38</b>
4	55,11	55,50	52,35	57,86	0,820	10,233	3,5351763	0,45058287	3,728949	1,680201	<b>1,40</b>	<b>0,03</b>
5	60,16	60,19	57,15	63,17	0,750	10,655	3,5351763	0,526344727	3,719677	1,549479	<b>1,52</b>	<b>0,03</b>

## 6. Modèle $\ln y = a \ln x + b$

### 6.1. Fonction de réponse

La corrélation entre la réponse instrumentale (air du pic) et la masse introduite de la solution de la Lamotrigine obtenue avec 5 séries des SE est représentée pour le modèle qui suit :

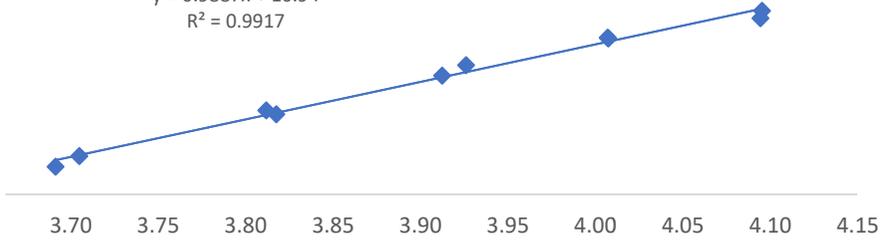
**Tableau XXXV : Résultats obtenus pour la fonction  $\ln y = a \ln x + b$**

Rep	Standards d'étalonnage SERIES i									
	Serie 1		Serie 2		Serie 3		Serie 4		Serie 5	
	Quantités introduites	Réponse instrumentale	Quantités introduites	Réponse instrumentale	Quantités introduites	Réponse instrumentale	Quantités introduites	Réponse instrumentale	Quantités introduites	Réponse instrumentale
k	X	y	x	Y	x	y	x	y	x	y
1	3,69	14,57	3,70	14,57	3,70	14,58	3,69	14,59	3,69	14,57
2	3,70	14,60	3,69	14,56	3,69	14,56	3,69	14,59	3,69	14,60
1	3,82	14,71	3,82	14,68	3,81	14,70	3,81	14,72	3,81	14,70
2	3,81	14,72	3,81	14,68	3,81	14,70	3,81	14,73	3,81	14,70
1	3,93	14,84	3,91	14,79	3,92	14,80	3,92	14,82	3,91	14,81
2	3,91	14,81	3,91	14,80	3,92	14,78	3,91	14,81	3,91	14,79
1	4,01	14,91	4,01	14,88	4,01	14,90	4,01	14,90	4,01	14,92
2	4,01	14,91	4,02	14,90	4,01	14,90	4,01	14,91	4,01	14,92
1	4,09	14,96	4,09	14,97	4,09	14,96	4,10	14,99	4,10	15,03
2	4,10	14,98	4,09	14,96	4,10	14,97	4,10	14,99	4,10	15,02

On trace les courbes d'étalonnage des 5 séries de SE à partir des données du tableau précédent :

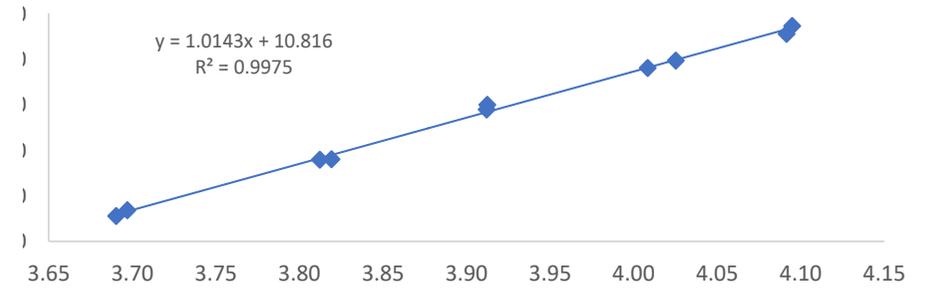
**SERIE 1**

$y = 0.9887x + 10.94$   
 $R^2 = 0.9917$



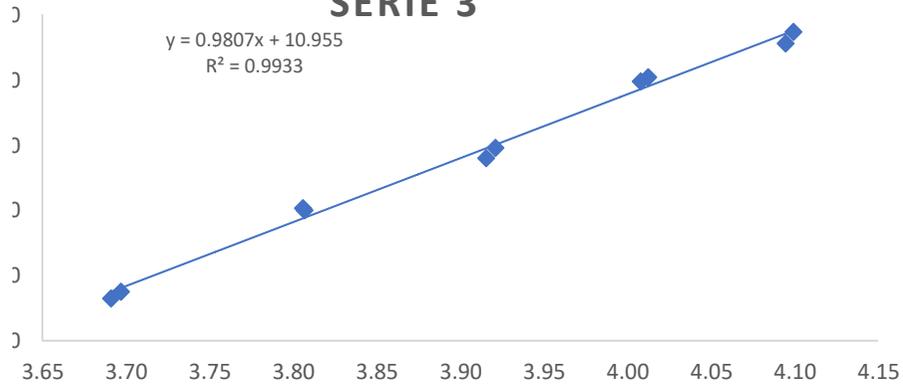
**SERIE 2**

$y = 1.0143x + 10.816$   
 $R^2 = 0.9975$



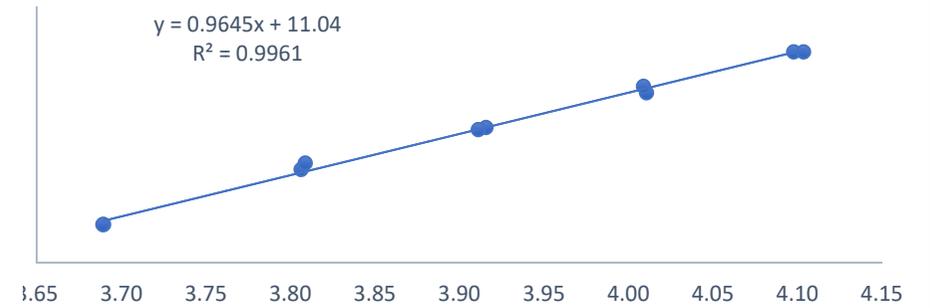
**SERIE 3**

$y = 0.9807x + 10.955$   
 $R^2 = 0.9933$



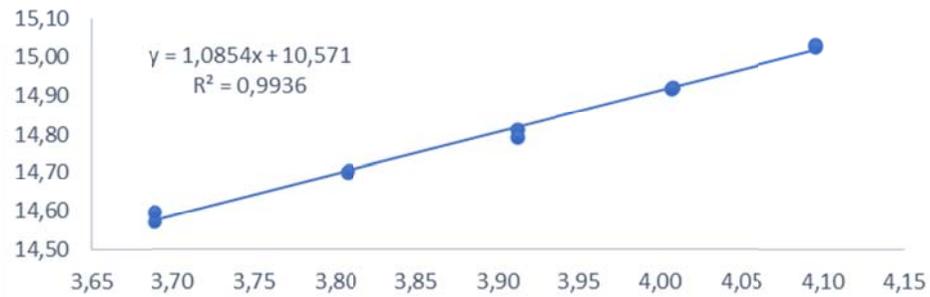
**SERIE 4**

$y = 0.9645x + 11.04$   
 $R^2 = 0.9961$



**SERIE 5**

$y = 1.0854x + 10.571$   
 $R^2 = 0.9936$



## 6.2. Alignement des observations

L'alignement des réponses sur la moyenne des concentrations introduites est exigé et cela pour chaque niveau de concentration lorsque les quantités introduites ne sont pas identiques. L'alignement des réponses obtenues avec les échantillons de validation est résumé dans le tableau suivant :

**Tableau XXXVI : Alignement des réponses observées avec les 5 séries des SV**

<i>Alignement des réponses</i>				
<i>Serie 1</i>	<i>Serie 2</i>	<i>Serie 3</i>	<i>Serie 4</i>	<i>Serie 5</i>
Yijk,c	Yijk,c	Yijk,c	Yijk,c	Yijk,c
14,58	14,57	14,57	14,57	14,58
14,58	14,57	14,57	14,60	14,57
14,59	14,57	14,56	14,60	14,58
14,59	14,57	14,57	14,59	14,57
14,72	14,70	14,70	14,71	14,70
14,71	14,70	14,69	14,71	14,72
14,72	14,70	14,71	14,71	14,70
14,70	14,71	14,70	14,72	14,70
14,79	14,80	14,79	14,81	14,83
14,79	14,78	14,80	14,82	14,82
14,80	14,79	14,78	14,83	14,83
14,79	14,80	14,79	14,82	14,81
14,90	14,89	14,88	14,90	14,94
14,90	14,89	14,89	14,92	14,94
14,91	14,89	14,89	14,92	14,94
14,91	14,89	14,90	14,91	14,94
14,99	14,97	14,95	14,99	15,03
14,99	14,96	14,97	15,00	15,03
15,00	14,96	14,96	14,99	15,02
15,00	14,97	14,98	15,00	15,02

## 6.3. Prédictionn inverses

**Tableau XXXVII : Prédictionn inverses obtenues avec les SV des 5 séries**

<i>Prédictionn inverses xijk,calc</i>					<i>Moyennes des prédictionn inverses <math>\mu_j</math></i>
<i>Serie 1</i>	<i>Serie 2</i>	<i>Serie 3</i>	<i>Serie 4</i>	<i>Serie 5</i>	
xijk,calc	xijk,calc	xijk,calc	xijk,calc	xijk,calc	
39,51	40,52	40,01	39,05	40,36	<b>39,99</b>
39,88	40,30	39,93	40,01	39,95	
40,11	40,52	39,64	39,92	40,33	
40,02	40,34	39,70	39,66	39,95	
45,70	45,82	45,74	45,03	45,01	<b>45,42</b>
45,10	45,81	44,93	45,13	45,66	
45,70	46,05	45,88	44,80	44,91	
45,00	46,38	45,60	45,39	44,81	
49,30	50,64	50,07	50,07	50,64	<b>50,08</b>
49,08	49,98	50,24	50,29	50,27	
49,64	50,49	49,23	50,75	50,81	
49,32	50,90	49,85	50,22	49,77	

54,82	55,32	54,90	54,58	56,24	<b>55,49</b>
55,10	55,25	55,46	55,62	56,14	
55,31	55,41	55,23	55,67	56,12	
55,51	55,71	55,86	55,45	56,08	
60,15	59,75	59,04	60,32	60,60	<b>60,17</b>
60,11	59,50	59,91	60,46	60,90	
60,59	59,72	59,09	60,33	60,40	
60,51	60,31	60,60	60,58	60,53	

#### 6.4. Justesse

Elle est exprimée en terme de biais absolu, de biais relatif, et de pourcentage de recouvrement (%) pour chaque niveau de concentration des standards de validation comme indiqué dans le tableau ci-dessous.

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

Niveau	Biais Absolus	Biais relatifs	% de Recouvrement
1	-0,164	-0,407	99,59
2	0,244	0,539	100,54
3	-0,083	-0,166	99,83
4	0,383	0,695	100,69
5	0,009	0,014	100,01

#### 6.5. Fidélité

La fidélité de notre méthode est évaluée dans des conditions de répétabilité et de fidélité intermédiaire. Elle est calculée pour chaque niveau de concentration, exprimée en écart type et en termes de coefficients de variations.

Les résultats sont mentionnés dans le tableau suivant :

**Tableau XXXIX : calcul des écarts types, des CV de répétabilité et de fidélité intermédiaire**

Variance intra-Série $\sigma^2w,j$	Variance inter-Série $\sigma^2B,j$	Ecartype de la répétabilité	Ecartype Intersérie	Ecartype de la fidélité intermédiaire	CV Répétabilité	CV Fidélité intermédiaire
0,071	0,072	0,266	0,268	0,378	0,663	0,942
0,120	0,116	0,346	0,341	0,486	0,766	1,075
0,139	0,199	0,373	0,446	0,582	0,744	1,160
0,111	0,113	0,333	0,337	0,474	0,604	0,859
0,158	0,127	0,397	0,357	0,534	0,660	0,887

#### 6.6. Calcul de l'indice de capabilité Cpk-tol et $\pi_{Cpk-tol}$

L'indice de capabilité est calculé en incluant les paramètres mentionnés dans le tableau suivant :

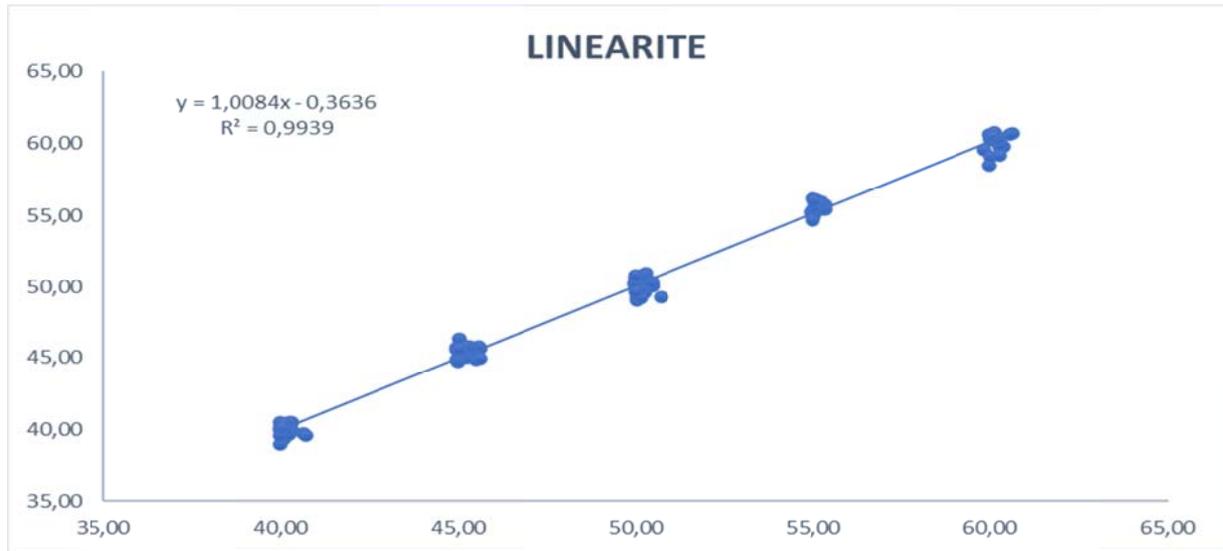
Tableau XL : Calcul de l'indice de capabilité Cpk-tol et  $\pi$  Cpk-tol

Niveaux	Quantité Moy Intro	Quantité Moy Préd	LSL	ULS	R	df	t (df, (1+ $\beta$ )/2)	<i>Ecartype de la fidélité intermédiaire</i>	Ke	Ke x $\sigma$	Cpk-tol	$\pi$ Cpk-tol
1	40,15	39,99	38,14	42,16	1,016	9,276	3,6401056	0,378137588	3,862607	1,460597	<b>1,26</b>	<b>0,09</b>
2	45,18	45,42	42,92	47,44	0,971	9,468	3,6401056	0,485739925	3,857813	1,873894	<b>1,08</b>	<b>0,22</b>
3	50,16	50,08	47,65	52,67	1,427	7,954	3,9688834	0,581752419	4,250573	2,472781	<b>0,98</b>	<b>0,51</b>
4	55,11	55,49	52,35	57,86	1,022	9,248	3,6401056	0,473625383	3,863295	1,829754	<b>1,29</b>	<b>0,06</b>
5	60,16	60,17	57,15	63,17	0,807	10,307	3,5351763	0,533923284	3,727295	1,99009	<b>1,51</b>	<b>0,03</b>

## 7. Etude de la linéarité

L'étude de la linéarité a été faite pour la fonction choisie  $ax+b$  (voir ci-après).

Un modèle de régression linéaire a été ajusté sur les concentrations calculées en fonction des concentrations introduites dans le but d'obtenir l'équation suivante :  $Y = 1.005x - 0.203$

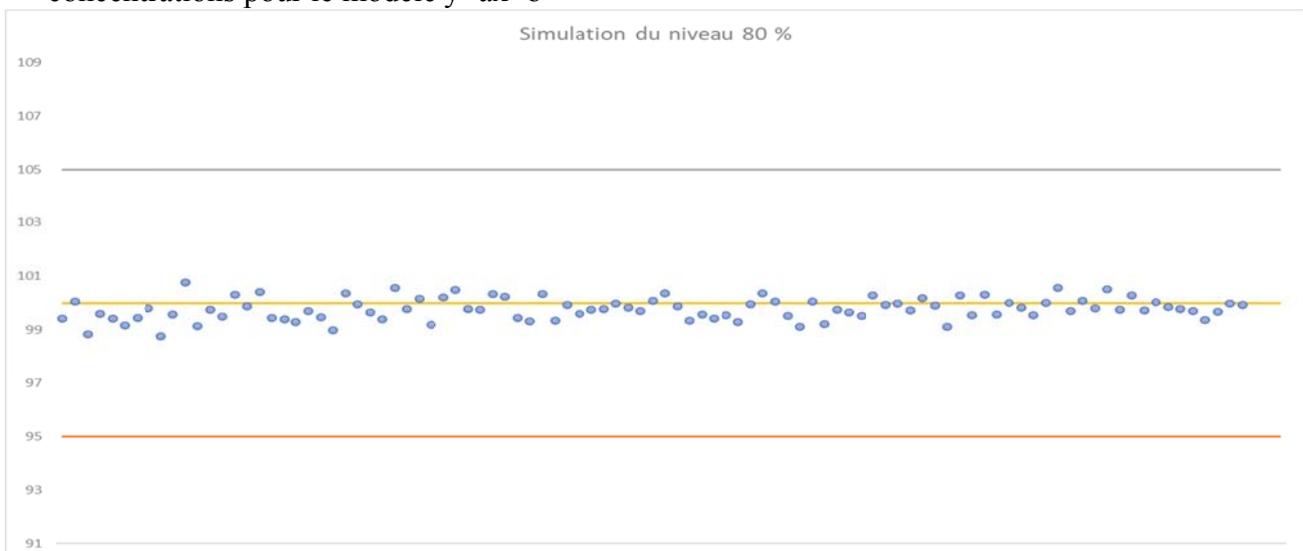


Le tableau suivant résume les tests statistiques appliqués pour l'étude de la linéarité :

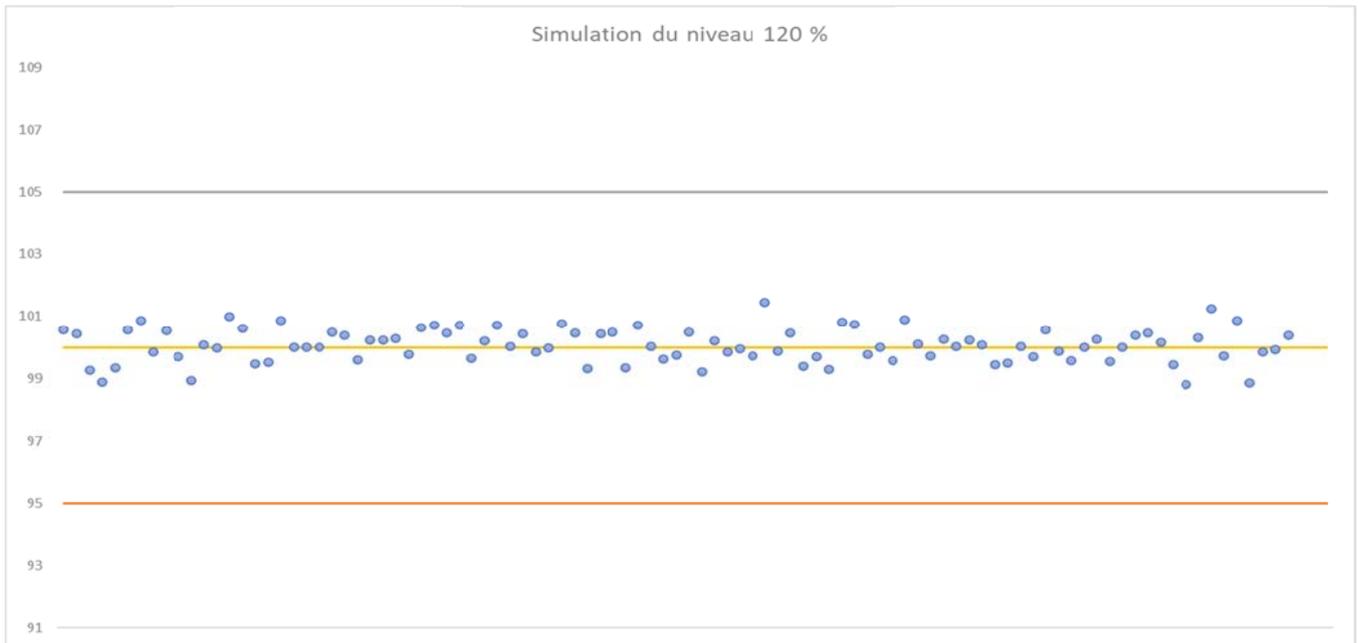
	Comparaison de la pente avec 1	Comparaison de l'ordonnée à l'origine avec 0
<b>t calculé</b>	<b>0.94</b>	<b>0.64</b>
<b>t(0.05 ;98)</b>	<b>1.98</b>	<b>1.98</b>
<b>P</b>	<b>&gt; 0.05</b>	<b>&gt; 0.05</b>

## 8. Représentation graphique des simulations :

Les schémas suivants représentent les simulations effectuées pour les 5 niveaux de concentrations pour le modèle  $y=ax+b$







**Figure 15 : Simulation des cinq niveaux de concentration**

## **DISCUSSION**

### 3. Discussion

A partir des résultats que nous avons obtenus, la solution placebo a donné une réponse nulle illustrée par la figure 07. De plus, les signaux obtenus à partir des deux solutions ; SV 100% et SE 100% illustrés respectivement par les figure 05 et 06 sont similaires par rapport à leurs temps de rétention et air du pic respectif. Nous déduisons que la méthode de dosage est sélective.

Après avoir rassemblé les résultats des expériences opérées sur les standards d'étalonnage (SE) nous avons utilisé les modèles d'étalonnage figurants sur les figures 10,11,12 et 13 : Régression linéaire avec une équation :  $Y = ax + b$ , Régression linéaire avec une équation :  $Y = ax$ , Fonction logarithmique népérien  $\text{Ln } y = a \text{Ln} x + b$ , Fonction racine carré  $\sqrt{y} = a\sqrt{x} + b$ , ces derniers présentent un facteur de détermination  $R^2 > 0.99$ . Donc nous pouvons appliquer ces modèles d'étalonnages pour notre méthode de dosage afin d'évaluer ses paramètres de validation.

Les résultats provenant des SV, nous ont permis d'évaluer la fidélité et la justesse de notre méthode de dosage. En premier lieu, le CV que nous avons obtenu à partir de la répétabilité et la fidélité intermédiaire de notre méthode, observé à tous les niveaux de concentration en utilisant les modèles d'étalonnage cités précédemment, sont inférieurs à 2%. Notre méthode de dosage présente une bonne fidélité.

En second lieu, le calcul du biais absolu a donné des valeurs proches de 0, de plus, le calcul du pourcentage de recouvrement a montré des résultats inclus dans un intervalle de [99.45-100.77] %, nous démontrons de ce fait l'étroitesse de l'accord entre la moyenne des masses introduites et des masses prédites. Par conséquent notre méthode de dosage présente une bonne justesse.

En ce qui concerne le modèle d'étalonnage régression linéaire :  $ax + b$  et on se référant au tableau V, le tableau VIII nous renseigne que nous avons obtenu un indice  $C_{pk-tol} < 1$  et  $\pi C_{pk-tol} > 0.27$  pour le niveau 80 ce qui démontre une capacité moindre, pour les niveaux 90 et 100,  $1 \leq C_{pk-tol} \leq 1.33$  la méthode est donc marginalement capable et répond suffisamment aux limites de spécifications inférieures et supérieures, préalablement établies. Pour les niveaux 110 et 120,  $C_{pk-tol} > 1.33$  la méthode est capable et répond aux spécifications exigées. Ceci dit, les résultats que nous avons examinés démontrent que la méthode de dosage utilisée avec ce modèle d'étalonnage présente une variabilité totale acceptable et donc, assez performante pour l'utiliser en routine.

Concernant le modèle d'étalonnage de régression linéaire :  $ax$ , notre observation du tableau XIV nous a permis de constater que  $1 \leq C_{pk-tol} \leq 1.33$  pour le niveau 100 donc la méthode est relativement capable et satisfaite quant à la marge de variabilité tolérée par les spécifications pour ce niveau. En revanche, pour les niveaux 80, 90, 110, 120, elle n'est pas assez capable et ne répond pas aux spécifications déterminées car  $C_{pk-tol} < 1$  et  $\pi C_{pk-tol} > 0.27$ . Nos résultats obtenus permettent ainsi de déduire que ce modèle d'étalonnage ne convient guère à ce que nous l'appliquons pour valider notre méthode de dosage.

A propos du modèle d'étalonnage fonction racine carré  $\sqrt{y} = a\sqrt{x}+b$ , nous notons à partir du tableau XX que l'indice de capabilité pour les niveaux 80, 90, 100 ;  $1 \leq Cpk\text{-tol} \leq 1.33$ , ce qui indique une performance de la méthode relativement acceptable. Quant aux niveaux 110, 120 ; la méthode est entièrement capable car  $Cpk\text{-tol} > 1.33$ . Nos résultats sont convaincants et nous indiquent que la méthode est valide pour son utilisation en routine. Aussi, à l'égard du modèle d'étalonnage Fonction Logarithme Népérien :  $\ln y = \ln x + b$  ; nous observons à partir du tableau XXVI que l'indice de capabilité pour les niveaux 80, 90 et 110 ;  $1 \leq Cpk\text{-tol} \leq 1.33$  ; la méthode est donc assez capable pour ces trois niveaux. Pour le niveau 120, la méthode est capable car  $Cpk\text{-tol} > 1.33$ , par contre pour le niveau 100, la méthode n'est pas assez capable sachant que  $Cpk\text{-tol} < 1$  et  $\pi Cpk\text{-tol} > 0.27$ . Toutefois les résultats que nous avons obtenus sont probants. En conséquence le modèle d'étalonnage Fonction Logarithme Népérien :  $\ln y = \ln x + b$  est adapté pour valider notre méthode de dosage.

En définitive, nous choisissons le modèle d'étalonnage régression linéaire :  $ax+b$ , pour sa simplicité par rapport aux modèles fonction racine carré et Logarithme Népérien. De plus le modèle pour lequel nous optons, est convenable pour les méthodes de dosage physico-chimiques [29]

Les valeurs du  $\pi Cpk\text{-tol}$  que nous avons obtenues sont inversement proportionnelles à l'indice de capabilité de la méthode. C'est à dire la probabilité d'occurrence de OOS diminue avec l'augmentation de l'indice de capabilité de la méthode et vice versa. Pour appuyer notre étude, nous avons effectué des simulations pour les 5 niveaux de concentration illustrés par la figure 15, incluant 100 échantillons. Nos résultats émanant des simulations démontrent l'absence de OOS pour les 5 niveaux évalués. Ainsi nous confirmons que l'indice  $Cpk\text{-tol}$  indique véritablement la performance de la méthode et que le  $\pi Cpk\text{-tol}$  permet d'estimer le nombre probable de faux OOS générés. Nous affirmons de surcroît les résultats figurant sur le Tableau VIII ; plus la moyenne des quantités prédites se rapproche de la moyenne des quantités introduites plus la capabilité augmente ce qui témoigne de l'importance d'une bonne justesse pour la performance d'une méthode, Aussi plus l'écart type de la fidélité intermédiaire estimée diminue, plus la performance de la méthode s'améliore. Ceci démontre l'importance d'une bonne fidélité. Nous soulignons aussi l'importance du facteur de recouvrement  $K_e$ , qui nous a permis de garder la même couverture théorique de la distribution utilisée avec le  $Cpk$  index (soit  $\pm 3\sigma$ ).

Les résultats que nous avons illustrés sur le tableau VIII prouvent que la performance de la méthode est proportionnelle à l'augmentation des quantités introduites, ceci s'explique par l'influence des masses sur la variance totale de la méthode. En d'autres termes, la variance de la fidélité intermédiaire a un effet plus marqué sur la variabilité des basses quantités que sur les quantités élevées. En effet pour le niveau 80 équivalent à 40 mg, l'indice de capabilité  $Cpk\text{-tol} < 1$  et  $\pi Cpk\text{-tol} > 0.27$ , pour améliorer la performance de la méthode de dosage pour ce niveau en analyse de routine, c'est-à-dire, diminuer le risque de générer des résultats OOS, il est recommandé de réaliser trois dosage sur ce niveau afin de trancher sur l'origine de ces derniers [44]. Si on trouve la même proportion de OOS, il s'agit de vrais OOS et donc ces derniers sont générés par l'échantillon. Par contre si ça ne se répète pas les OOS sont dû à la méthode [44].

---

Il est noté que les méthodes de dosage par HPLC présentent une capacité amoindrie [24] [45] ceci explique les performances marginales pour le dosage de 45 mg et 50 mg. Néanmoins, après simulation nous avons démontré la pertinence de l'approche capacité quant à l'estimation réelle de la performance de la méthode de dosage. L'indice de capacité  $C_{pk-tol}$  témoigne de la bonne justesse, de la bonne fidélité estimée. Ceci dit la variabilité de ces deux paramètres influencent grandement sur la capacité de la méthode, En ce qui concerne le degré de confiance sur l'estimation de la variabilité totale de notre méthode de dosage, le ratio R nous permet de fixer le nombre de série et de répétition adéquat pour cela. En d'autres termes, d'avoir une estimation fiable de la justesse et de la fidélité de notre méthode [27] [44].

Pour parfaire l'étude des paramètres de validation, nous avons évalué la linéarité avec la fonction  $Y=ax+b$  pour cinq niveaux de concentration. L'analyse de variance de la régression nous a permis de vérifier l'existence d'une pente significative comparable à 1 avec une probabilité  $>0.05$  et l'existence d'une ordonnée à l'origine comparable à zéro avec une probabilité  $>0.05$ . Avec un facteur de détermination  $R^2 = 0.9938$ . Nous confirmons donc la corrélation entre les masses introduites et les masses prédites et par conséquent la linéarité de la méthode.

## **CONCLUSION**

## CONCLUSION

---

L'industrie pharmaceutique est un domaine très réglementé et complexe et ce dans le but d'assurer la qualité, l'efficacité et surtout la sécurité des produits pharmaceutiques dispensés aux patients et prévenir tout incident pouvant mettre en péril les entreprises elles-mêmes [3].

Par conséquent, les méthodes de dosage constituent un arsenal analytique indispensable pour satisfaire les exigences réglementaires en matière de contrôle qualité si bien que la précision des résultats constitue l'essence de ces méthodes analytiques qualitatives et quantitatives.

La validation de ces dernières est de ce fait primordiale afin de garantir la fiabilité des résultats car toute expérimentation génératrices de résultats de mesures est sujette au risque d'erreur de sous-évaluation ou de surévaluation [7].

Ainsi le but de notre étude a été de valider une méthode de dosage de la Lamotrigine dans des comprimés de 50 mg, et ce par chromatographie liquide à haute performance en utilisant l'approche capabilité qui est une démarche récente proposée par la commission de la SFSTP publiée en 2010 dans la revue STP Pharma Pratique. Cette commission a utilisé l'indice de capabilité  $C_{pk-tol}$  ainsi que la probabilité d'occurrence de résultats non conformes ( $\pi_{C_{pk-tol}}$ ) comme outils de décision [27].

En premier lieu, nous avons évalué la sélectivité de la méthode analytique. En second lieu nous avons évalué la fidélité et la justesse de cette dernière à partir des standards d'étalonnage et des standards de validation. Nous avons utilisé ces derniers pour estimer les paramètres statistiques des différents modèles d'étalonnage afin de calculer les indices de capabilité  $C_{pk-tol}$  et la probabilité d'occurrence de résultats non conformes ( $\pi_{C_{pk-tol}}$ ) pour chaque modèle d'étalonnage.

Notre expérience a satisfait tous les critères de l'approche capabilité et compte tenu du haut niveau de fiabilité et de précision des résultats obtenus, elle a clairement démontré la validité de la méthode utilisée. Cette dernière a été évaluée dans des intervalles de tolérance incluant des limites de spécification ( $\pm 5\%$ ), une probabilité de confiance  $\beta=99,73\%$  et une couverture théorique  $\sigma=\pm 3$ . Il s'ensuit que la méthode de dosage est valide et adaptée pour analyser la Lamotrigine dans des comprimés de 50 mg. Après avoir analysé les résultats émanant des outils de décisions numériques  $C_{pk-tol}$  et  $\pi_{C_{pk-tol}}$ , nous concluons que l'approche capabilité permet de valider notre méthode de dosage au niveau du Laboratoire de Chimie-Analytique. Toutefois pour doser 40 mg, il est conseillé de vérifier l'origine des OOS générés et ceci par répétition du dosage en routine [44]. Après simulation nous avons démontré la pertinence de cette approche. L'indice de capabilité  $C_{pk-tol}$  témoigne d'une bonne justesse, une bonne fidélité estimée. Les résultats provenant du  $\pi_{C_{pk-tol}}$  confirment la performance de la méthode avec une probabilité négligeable d'occurrence des faux OOS.

Enfin, l'étude de capabilité des méthodes de dosage est une approche pertinente qui s'impose de manière progressive vu son utilité à évaluer la performance des méthodes de dosage [9] [26]. L'application de cette approche est donc rigoureuse avec des limites de tolérance très restrictives un tel niveau que les méthodes de dosage par HPLC présentent une capabilité amoindrie.[26][45]

## **REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES**

- [1] : Guy Bechtel Paracelse, Original l'Université du Michigan 1970 18 juil. 2007 page 229
- [2]: KD Tripath, Essentials of Medical Pharmacology, USA, 1985
- [3]: Anne M. Baldeshwiler History of FDA good laboratory practices Pages: 157-161 29 Juillet 2003
- [4]: Kathleen E. McCormick Quality (Pharmaceutical Engineering Series) 2002 page 120
- [5] : The Association, Journal of the Association of Official Analytical Chemists, 1986 l'Université de Californie 12 août 2009
- [6]: Andrew Teasdale, David Elder, Raymond W. Nims ICH Quality Guidelines: An implementation An Introduction to ICH Quality Guidelines: Opportunities and Challenges (Pages: 1-2) 2017
- [7] : Max Feinberg Validation des méthodes d'analyse quantitative par le profil d'exactitude Numéro spécial 201027 Mise en œuvre du profil d'exactitude 2010
- [8]: Johnston.D The Decline of six sigma- Pharm.Tech.Eur 15,57-61 2003
- [9] : USPC-USP30-NF25 Chapitre (1080) Rockville 2007
- [10]: <http://resimede.info/>
- [11]: [pharmacomedicale.org](http://pharmacomedicale.org)
- [12]: <http://agence-prd.ansm.sante.fr/>
- [13]: Pharmacopée Européenne
- [14]: National Library Of Medicine
- [15]: Vidal 2019
- [16] : Maciej Gasior, Frank Wiegand Edited by James E. Barrett, Joseph T. Coyle, Michael Williams, Cambridge University Press, Translational Neuroscience Applications in Psychiatry, Neurology, and Neurodevelopmental Disorders Chapter 13 – Epilepsy, Juillet 2012
- [17] : Les technologies de laboratoire 4(14)2009
- [18] : ISO 17025
- [19] : FDA
- [20] : ICH Q2A
- [21] : ICH Q2R1

---

[22] : CVO-EUROPE

[23] : Thèse de SIAVELIS Armand pour le diplôme d'état de docteur en Pharmacie, université d'Angers 2014-2015, Analyse des différentes approches de validation des méthodes de dosage et proposition d'un guide de validation de méthode de dosage en pharmacie hospitalière.

[24] : STP Pharma pratiques volume 21-N°2 -mars-avril 2011. Analyse des performances d'une méthode analytique, Evaluation des risques lors d'une utilisation en routine - Avantages et inconvénients des différentes approches. << G. de Fontenay, J. Respaud, P. Puig, C. Lemaire. >>

[25] : Hubert et al., 2003, 2006 a,b.

[26] : Algranti et al., 1992 ; Hubert et al., 2003.

[27]: (C.S. Raska, T.S, Bennett, S.A. Goodberlet. Anal. Chem. 82 (2010) 5932-5936) Usefulness of capability indices in the framework of analytical methods validation

- Analytica Chimica Acta 714 (2012) 47-56

[28] : << FEINBERG M. Validation des méthodes d'analyse quantitatives au moyen du profil d'exactitude. Dossier TECHNIQUES DE L'INGENIEUR, l'expertise technique et scientifique de référence.

[29] : G.De Fontenay, J.Respaud, P.Puig, C.Lemaire , ST Pharmapratique, Analyse des performances d'une méthode analytique, Evaluation des risques lors d'une utilisation en routine Mars-Avril 2011

[30] : Hubert Ph, Nguyen JJ, Boulanger B, Chapuzet E, Chiap P, Cohen N, et al. SFSTP.

Validation des procédures analytiques quantitatives : Harmonisation des démarches Partie I : Généralités.

[31] : Commission SFSTP, Hubert Ph, Nguyen-Huu J.J, Boulanger E, Chapuzet E, et al.2006. Validation des procédures analytiques quantitatives : Harmonisation des démarches Partie II – Statistiques

[32] : 17. Kane EV, "Process Capability Indices" Journal of Quality Technology, 1986; 18(1):41-52

[33] : U. Inokon, Approaches to GMP inspection

[34] Use of the Ppm and its function in the production process L. Bebr, K. Bícová, H. Zídková University of West Bohemia in Pilsen, Univerzitiní 22, Pilsen 301 00, Czech Republic

[35] LE COZ (E.). – Méthodes et outils de la qualité. Nouveaux outils. AG 1 771, traité

**L'Entreprise industrielle (2001).**

**[36] C. Burgess, Aberrant or atypical results: analytical process capability, in: J. Ermer, J.H. Miller (Eds.), Method Validation in Pharmaceutical Analysis. A Guide to Best Practice, Wiley-Verlag, Weinheim, 2005, pp. 362–366.**

**[37] USP 33 NF 28 S1, U.S. Pharmacopeia, 2007. USP–NF General Chapter <1080>.**

**[38] P. Ferignac, Revue de statistique appliquée 10 (1962) 13–32.**

**[39] G.J. Hahn, W.Q. Meeker, Statistical Intervals: A Guide for Practitioners, Wiley Edition, 1991, 392 p.**

**[40] Ph. Hubert, J.J. N'guyen-Huu, B. Boulanger, E. Chapuzet, P. Chiap, N. Cohen, P.A. Compagnon, W. Dewé, M. Feinberg, M. Lallier, M. Laurentie, N. Mercier, G. Muzard, C. Nivet, L. Valat, E. Rozet, J. Pharm. Biomed. Anal. 45 (2007) 82–96.**

**[41] A. Bouabidi, E. Rozet, M. Fillet, E. Ziemons, E. Chapuzet, B. Mertens, R. Klinkenberg, A. Ceccato, M. Talbi, B. Streel, A. Bouklouze, B. Boulanger, Ph. Hubert, J. Chromatogr. A 1217 (2010) 3180–3192, <http://hdl.handle.net/2268/29471>.**

**[42] R.W. Mee, Technometrics 26 (1984) 251.**

**[43] Ph. Hubert, J.-J. Nguyen-Huu, B. Boulanger, E. Chapuzet, P. Chiap, N. Cohen, P.-A. Compagnon, W. Dewe, M. Feinberg, M. Lallier, M. Laurentie, N. Mercier, G. Muzard, C. Nivet, L. Valat, J. Pharm. Biomed. Anal. 36 (2004) 579–586**

**[44] Dejaegher a, M. Jimidar b, M. De Smetb, P. Cockaerts b, J. Smeyers-Verbeke a, Y. Vander Heyden. Improving method capability of a drug substance HPLC assay ,Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis 42 (2006). Belgium**

**[45] Bernd Renger. System performance and variability of chromatographic techniques used in pharmaceutical quality control. Journal of Chromatography B (2000). Germany**

**[46]: Columns: Clarke's Analysis of Drugs and Poisons 3rd Edition.**

**[47]: HPLC Principe et appareillage- Ressources pédagogiques - Biotechnologie & Biologie et Physiopathologie humaine -Académie de Rouen**

**[48]: Latifa BEN SAAD, Etude de la separation des fluoroquinolones par l'HPLC : Application à l'étude de leur dégradation par rayonnement gamma. Thèse présentée pour l'obtention du mastère en chimie analytique. Université Tunis El Manar. Faculté des sciences de Tunis, 19/12/2013.**

**[49]: Skoog, D.; Holler, F.; Crouch, S. Principles of Instrumental Analysis 2007**

**[50]: Swadesh, J.K. HPLC: Practical and Industrial Applications 2001**

- 
- [51]: Waters Corporation: History of Chromatography (accessed March 3, 2008)
- [52]: J.Dgraeve, F.Berthou, Méthodes chromatographiques, 2ème édition, (1986), p392
- [53]: Université de Sherbrooke TECHNIQUES: Principes de la chromatographie
- [54] : R.A.Day et A.L.Underwood, Quantitative Analysis, Prentice Hall 1991
- [55] FDA,Center for Drug Evaluation and Resaerch (CDER), Reviewer Gudiance Validation of Chromatographic Methods November 2014
- [56]: Adaptée de C.et A. Jardy, Chromatographie en phase liquide, théorie des méthodes de séparation, 4ème édition, (2004), p25
- [57] : G.Mahuzier et M.Hamon, 1990, Abrégés de chimie analytique,Masson Méthodes De Separation, 2EME Edition

## **ANNEXE I**

## 1. Introduction

La Chromatographie Liquide à Haute Performance (HPLC) ou simplement La *chromatographie* en phase *liquide* est une technique séparative utilisée en analyse quantitative, qualitative des composés solubles dans un solvant liquide, principalement employée dans le domaine de la chimie analytique comme outil scientifique majeur et peut être aussi préparative permettant la récupération des composés [46].

## 2. Historique

Aux prémices, cette technique fut utilisée comme méthode séparative de pigments colorés par Mikhail S. Tswett pour purifier des mélanges de pigments de plantes d'où l'étymologie du nom **chromatographie** : chroma=couleur graphie=écriture.

Kuhn et Elederer ont introduit cette technique en pratique dans les laboratoires à partir de 1930-31, en Allemagne. Depuis, de nombreuses découvertes concernant différentes disciplines ont été menées grâce à la chromatographie en phase liquide sur colonne. Reichstein introduit cette technique pour séparer des substances incolores en 1938.

Depuis 1969, les techniques modernes d' HPLC sont devenues disponibles; ces dernières n'étaient pas largement utilisées dans l'industrie pharmaceutique, et ce jusqu'à plusieurs années plus tard. Cependant, dès que les systèmes HPLC capables d'une analyse quantitative sont devenus disponibles dans le commerce, leur utilité dans l'analyse pharmaceutique a été pleinement agréée [46] [47] [48] [49] [51].

## 3. Principe

Le principe de la technique analytique HPLC repose sur les différences d'affinité des composés du mélange avec la phase mobile et la phase stationnaire améliorées par leur miniaturisation de façon très élaborée. Ces phases non miscibles, constituées de la réunion de microparticules sphériques dont le diamètre est compris entre 2 et 5 micromètres ou de matériaux monolithiques poreux conduisent à une perte de charge importante dans la colonne. Il faut donc exercer sur la phase mobile une forte pression pour obtenir un débit convenable. La particularité de la HPLC est de faire intervenir des mécanismes d'échange soluté/phase mobile/phase stationnaire basés sur les coefficients d'adsorption ou de partage. En sortie de colonne grâce à un détecteur les analytes sont caractérisés par un pic appelé chromatogramme qui traduit la variation du soluté dans l'éluant en fonction du temps [46].

## 4. Appareillage

Une installation de HPLC comporte divers modules spécialisés, ces derniers 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. Elles peuvent être en acier inoxydable ou en PEEK® (ou polyether-etherketone), un polymère souple et coloré qui résiste aux solvants usuels, même sous des pressions élevées (350 bars) [47].

Le Schéma suivant présente une vue d'ensemble de la HPLC :

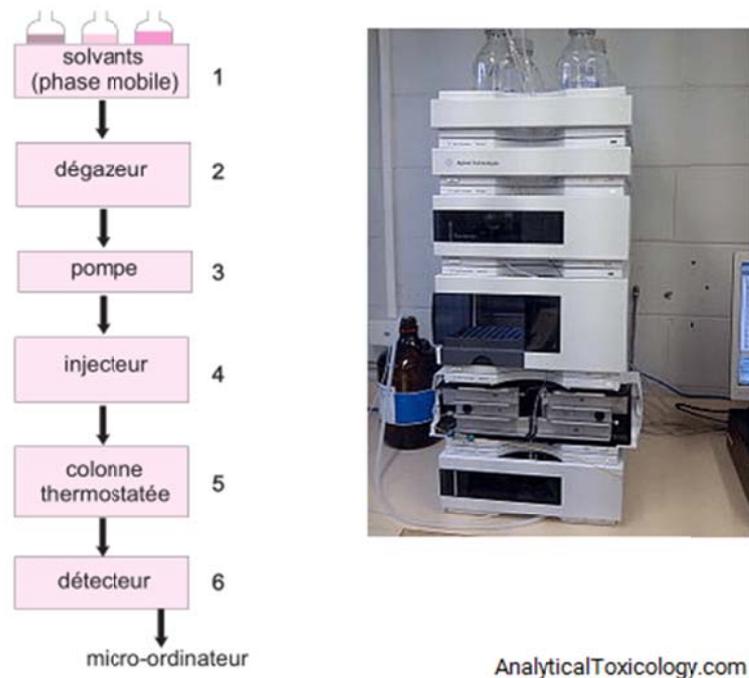


Figure 16 : Les Modules de la HPLC [47]

### 4.1. Pompe et gradients d'éluion

#### 4.1.1 Pompes pour éluants

Toute installation d'HPLC comporte au moins une pompe pour forcer le passage de la phase mobile à travers la colonne dont le remplissage est très compact. Il en résulte une pression importante au niveau de l'injecteur. Celle-ci peut atteindre 20 000 kPa (200 bars) selon le débit imposé à la phase mobile ou sa viscosité ainsi que selon la nature de la phase stationnaire.

On utilise des pompes conçues pour maintenir un débit non pulsé et stable, même si la composition de la phase mobile varie.

Elle doit fournir la phase mobile à un débit constant à une certaine pression pour atteindre la colonne. Elle permet de travailler soit :

. En mode isocratique, c'est à dire avec 100% d'un même éluant tout au long de l'analyse.

. En mode gradient, c'est à dire avec une variation des constituants du mélange d'éluant. [47]

#### 4.1.2. Le réservoir de la phase mobile

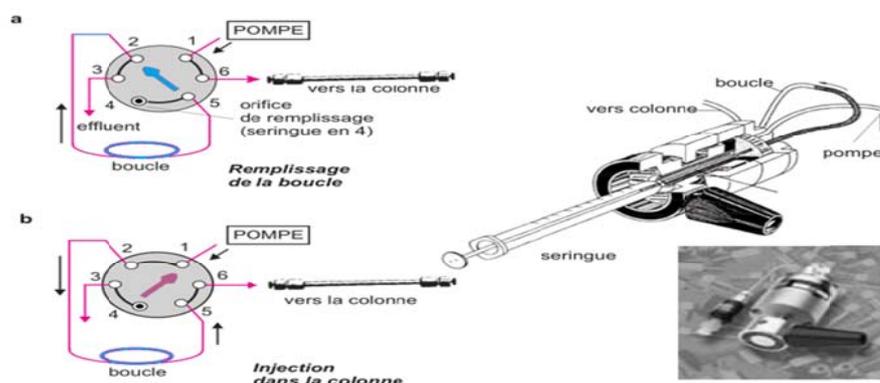
Il contient la phase mobile en quantité suffisante. Plusieurs flacons d'éluant (solvants de polarités différentes) sont disponibles pour pouvoir réaliser des gradients d'élution (mélange de plusieurs solvants à des concentrations variables) à l'aide de la pompe qui réalise le mélange demandé [47].

#### 4.2. Injecteur

L'injection d'un volume précis de l'échantillon en tête de colonne doit se faire en un temps bref afin de perturber le moins possible le régime de circulation de la phase mobile qui doit être stable de la colonne au détecteur. On utilise pour ce faire, une vanne haute pression à plusieurs voies, manuelle ou motorisée dans le cas des injecteurs automatiques, placée juste avant la colonne. Il s'agit d'une pièce de précision qui doit résister à des pressions pouvant dépasser 30 000 kPa. Elle fonctionne en deux temps :

- Dans la position chargement, où seule la communication entre pompe et colonne est assurée, l'échantillon est introduit à pression atmosphérique à l'aide d'une seringue dans un petit volume tubulaire appelé boucle
- Dans la position injection, l'échantillon est inséré dans le flux de phase mobile par rotation de 60° d'un levier qui permet d'inverser le sens de circulation dans la boucle. Une bonne reproductibilité des volumes n'est atteinte que si la boucle a été totalement remplie par l'échantillon. Le volume prélevé avec la seringue est donc toujours largement supérieur à celui de la boucle.

Des tubes en acier inoxydable, en Téflon, en PEEK ou en silice fondue permettent de relier la ou les pompes à l'injecteur chromatographique [41].

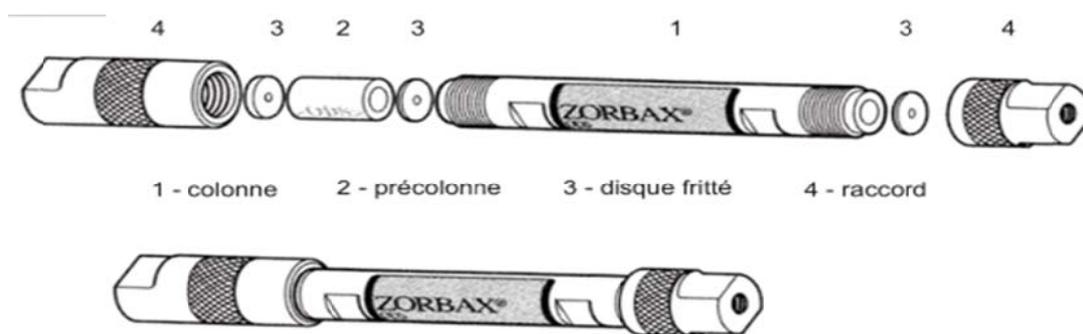


**Figure 17 : Injection avec une boucle. a) Remplissage de la boucle. b) injection dans la colonne. Vanne modèle 7125. Les vannes sont motorisables [41]**

### 4.3. Colonnes

La colonne se présente comme un tube, le plus souvent en acier, dont la longueur et le diamètre présentent des différences selon les modèles. Les colonnes « standard » dont le diamètre interne (DI) est d'environ 4,5 mm et la longueur de 10 cm, sont de plus en plus supplantées par des colonnes de plus faibles diamètres, baptisées narrow-bore (DI 2-4 mm), micro-bore (DI 1-2 mm), capillaires remplies (DI 0,1-1 mm). Ces modèles sont apparus suite à l'évolution des phases stationnaires customisées.

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. On augmente ainsi la durée de vie de la colonne principale en préservant ses performances [41].



**Figure 18 : Colonne standard et précolonne de HPLC [41]**

### 4.4. Le détecteur

Le détecteur est relié à la sortie de la colonne. Les solutés en sortie de la colonne chromatographique sont en solution très diluée dans une phase éluant dont la nature et la composition varient d'une analyse à l'autre, de ce fait un détecteur est nécessaire puisqu'il permet de suivre en continu la séparation et de mesurer la concentration des solutés. Le choix d'un détecteur dépend à la fois des caractéristiques physiques des composés à séparer et des conditions opératoires. Le détecteur suit l'apparition des analytes. Le signal obtenu est enregistré en fonction du temps. Il existe différents types de détecteurs :

- Détecteur UV-visible
- Réfractomètre
- Détecteur à fluorescence
- Détecteur à barrette de diodes (DAD)

### 4.5. Le Dégazeur

Le Dégazeur est un composant permet de retirer l'oxygène présent dans le(s) solvant(s) afin d'éviter d'endommager les échantillons ou la phase stationnaire. Deux types de dégazeurs sont utilisés en HPLC :

Dégazeur à gaz inerte : On fait barboter un gaz inerte dans la PM (Phase Mobile) pour retirer le gaz dissous dans le liquide. L'hélium est le gaz inerte le plus utilisé pour cette application.

Dégazeur par vide : Cette méthode consiste à descendre en pression dans une enceinte où se trouve le solvant à l'aide d'une pompe à vide primaire, et ainsi séparer le gaz dissous dans le fluide. Elle est bien plus efficace, ne requiert plus de gaz inerte, et remplace de plus en plus l'ancienne technique dans le domaine de l'analyse HPLC. La pression dans l'enceinte est de l'ordre du millibar [41].

#### **4.6. L'enregistreur**

L'enregistreur reçoit un signal électrique proportionnel à la concentration de l'analyte qui traverse le détecteur. Ce signal est traité, amplifié puis utilisé pour tracer le chromatogramme. Pour qu'un pic soit exploitable, on considère généralement que le rapport signal / bruit doit être au moins de trois.

### **5. Polarité et chromatographie**

#### **5.1. Phase mobile**

Une phase mobile liquide est appelée éluant. C'est elle qui fait migrer les composés, son choix est donc important. Il faut que le soluté soit soluble dans l'éluant. Il est possible de faire des mélanges de solvants pour changer sa polarité [46].

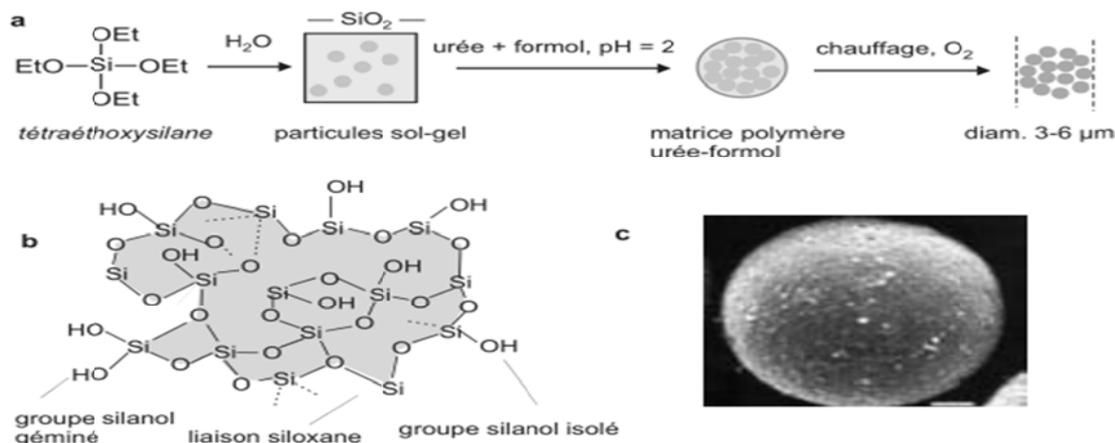
#### **5.2. Phases stationnaires**

La recherche d'une bonne résolution chromatographique a conduit à la création de phases stationnaires de nature et de structures variées. Pour raccourcir les temps d'analyse, il faut tenter d'accélérer dans la colonne les transferts entre les phases mobiles et fixe [41].

##### **5.2.1. Phase stationnaire normale**

Actuellement, le gel de silice tient une place prépondérante pour la confection des phases stationnaires. Ce matériau de base est un solide amorphe ayant pour formule de composition  $\text{SiO}_2 \cdot (\text{H}_2\text{O})_n$  (avec  $n$  très proche de 0). Il est tout à fait différent de la silice naturelle cristalline ( $\text{SiO}_2$ ) qui n'est qu'un précurseur très éloigné de sa préparation. Cette dernière fait appel à des procédés de polymérisation sol-gel d'un tétraalcoxysilane (ex. tétraéthoxy-silane) au sein d'un liquide, sous l'effet d'une hydrolyse catalysée.

Ces groupements sont responsables des propriétés catalytiques acides de ce matériau très polaire car  $\text{Si-OH}$  a un  $\text{pK}$  de 10, comparable à celui du phénol. Leur concentration peut être établie par RMN du  $^{29}\text{Si}$  ou par analyse centésimale du carbone pour les phases greffées [41].



**Figure 19 : Le gel de silice pour chromatographie. a) préparation de grains sphériques de gel de silice via un sol-gel. b) représentation du réseau, correspondant à un maillage tridimensionnel. c) image d'une particule sphérique de gel de silice issus d'un assemblage compact de sphères submicroniques. [41]**

### 5.3. Phase stationnaire inversée

Bien qu'ayant une capacité d'adsorption élevée, le gel de silice décrit précédemment n'est plus utilisé tel quel en chromatographie analytique. Hydrophile par nature, ses caractéristiques évoluent au cours du temps, entraînant un manque de reproductibilité des séparations.

Pour diminuer sa polarité jugée excessive dans de nombreux cas on le rend essentiellement hydrophobe. Les modifications classiques mettent à profit la réactivité des fonctions silanols présentes en surface pour fixer des molécules organiques par des liaisons covalentes. Le gel de silice ainsi modifié devient assimilable à un liquide immobilisé, la séparation mettant en jeu les coefficients de partage et non plus les coefficients d'adsorption. Ces phases greffées, dont la polarité peut être ajustée avec précision, sont à l'origine de la chromatographie de partage à polarité de phase inversée, utilisée dans quasiment toutes les séparations [41].

Ces modifications de la surface du gel conduisent à deux types de phases :

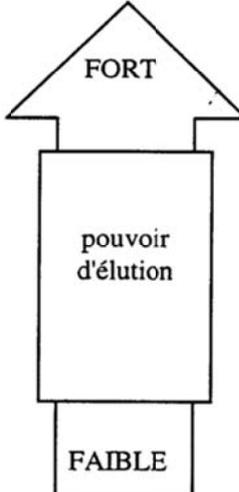
### 5.4. Polarité des solvants

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

- Si la phase stationnaire est polaire, on utilisera une phase mobile peu polaire, la chromatographie est dite dans ce cas en phase normale.
- Si la phase stationnaire est très peu polaire, on choisira une phase mobile polaire, c'est la chromatographie en phase inverse.

La polarité de la phase mobile augmente par l'ajout d'un solvant organique tel que le méthanol ou l'acétonitrile qui sont principalement utilisés pour l'analyse par la HPLC [47].

Ainsi, le pouvoir d'éluion de la phase mobile est résumé dans le schéma suivant:

phase polaire normale	solvants classes par polarité croissante	phase à polarité inversée
	hexane toluène trichlorométhane dichlorométhane éther acétate d'éthyle acétonitrile méthanol eau	

## 6. SPECIFICATIONS TECHNIQUES

- Volume d'injection d'échantillon : 1 à 100  $\mu$ l.
- Température du compartiment colonne : 5-110 ° C.
- Gamme de pH : 1 - 12.5.
- Détection : UV / Vis (190 à 800 nm), Fluorescence, ELSD [48].

## 7. POINTS FORTS

- sépare efficacement les molécules de structure similaire.

- Résultats quantitatifs précis et hautement reproductibles.
- Applicabilité à divers analytes.
- Haute sensibilité.
- Essais hautement reproductibles.
- UPLC : analyse plus rapide avec une résolution améliorée [48].

## 8. LIMITES

- Les composés doivent être solubles dans les solvants courants tels que l'eau, les alcools et l'acétonitrile.
- La pression de la pompe est limitée à 40 MPa (HPLC) et 100 MPa (UPLC).
- Impossible de séparer les ions inorganiques.
- Absence de détecteur universel idéal.
- Les solvants non polaires agressifs ne sont pas compatibles avec l'instrument [48].

## 9. L'Utilisation de la HPLC dans l'industrie pharmaceutique

La HPLC occupe une place importante dans l'industrie pharmaceutique. Elle s'avère être un instrument d'analyse important pour satisfaire les niveaux de qualité exigés par la réglementation concernant les matières premières et produits finis pharmaceutiques. Elle est utilisée dans le dosage et la séparation d'analytes de masse élevés dont la volatilité est très faible. Sa sélectivité très adaptable au dosage des analytes en choisissant la colonne et la composition de l'éluant justifie son utilisation à grande échelle [51].

## 10. Renseignements apportée par la réponse instrumentale de la HPLC

La réponse instrumentale est un diagramme qu'on nomme chromatogramme, qui se présente sous la forme d'un pic dont la hauteur devrait idéalement dépendre de la concentration du composant particulier, ce tracé bidimensionnel, indique l'évolution du signal du détecteur sur l'axe des ordonnées (proportionnel à la concentration en soluté) en fonction du temps d'éluion sur l'axe des abscisses (plus rarement du volume d'éluion). Par ailleurs, le chromatogramme comporte plusieurs informations utiles à l'analyse :

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

**t<sub>m</sub>** : Le temps mort : est le temps mis par un composé non retenu par la phase stationnaire pour traverser la colonne (temps passé dans la phase mobile)

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

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

$t'_r$  ou  $t_s$  ; Le temps de rétention réduit : est le temps passé par un soluté dans la phase stationnaire, soit :  $t'_r = t_s = t_r - t_m$

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

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

$h$  : La hauteur du pic [52].

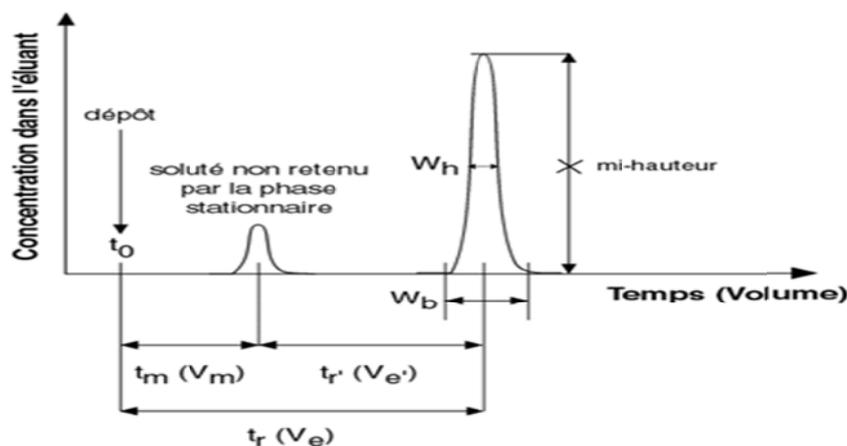


Figure 20 : Renseignements d'un chromatogramme [52]

## 10.1. Grandeurs de rétentions

### 10.1.2. Coefficient de partage

Toutes les séparations chromatographiques sont basées sur les différences de répartition des solutés entre la phase mobile et la phase stationnaire. La constante d'équilibre  $K_C$  de cette réaction est appelée **coefficient de distribution**, ou **coefficient de partage**, et est définie par la relation [53].

$$K = (a_A)_S / (a_A)_M = c_S / c_M$$

Où  $(a_A)_S$  est l'activité du soluté A dans la phase stationnaire et  $(a_A)_M$  son activité dans la phase mobile. On remplace souvent  $(a_A)_S$  par  $c_S$  la concentration analytique molaire dans la phase stationnaire, et  $(a_A)_M$  par  $c_M$ , la concentration analytique molaire dans la phase mobile. Idéalement, le coefficient de distribution est constant sur un grand domaine de concentrations en soluté, en d'autres termes,  $c_S$  est directement proportionnel à  $c_M$  [54].

### 10.1.2. Le temps de rétention $t_r$

C'est le temps qui s'écoule entre l'injection de l'échantillon et l'apparition d'un pic de soluté sur le détecteur d'une colonne chromatographique. Il est exprimé en minutes. C'est une grandeur caractéristique d'un analyte dans des conditions opératoires données. Il est utilisé pour identifier les composés dans un chromatogramme. Il varie en fonction du débit de la phase mobile et de leur composition, de la température d'élution et de la nature de colonne utilisée [53].

### 10.1.3. Le temps mort $t_m$

C'est le temps écoulé pour qu'un composé non retenu traverse la colonne ; il est noté  $t_m$  ou  $t_0$  et exprimé en minutes [54].

$$t_m = t_0 = L/V$$

Avec :

**L** : la longueur de la colonne.

**V** : la vitesse de la phase mobile.

### 10.1.4. Le volume de rétention

Le volume de rétention  $V_R$  d'un composé correspond au volume de la phase mobile qui s'est écoulé entre l'instant de l'injection et celui correspondant au maximum du pic sur le chromatogramme. Ce volume est caractéristique d'un seul composé dans des conditions opératoires données. Si le débit **D** est stationnaire [54].

$$V_R = t_R \cdot D$$

### 10.1.5. Le volume mort

Le volume mort  $V_m$  de la colonne correspond au volume interstitiel accessible, en d'autres termes le volume de la phase mobile. L'injecteur et le détecteur ont des volumes morts qui entrent en ligne de compte dans le volume de rétention total. On l'exprime en fonction de  $t_M$  et du débit **D** [53].

$$V_M = t_M \cdot D$$

### 10.1.6. Le facteur de rétention

Le facteur de rétention  $k$  est un paramètre expérimental important qui permet de comparer les vitesses de progressions des solutés dans les colonnes. Pour le soluté A, le facteur de rétention  $k_A$  est définie par :

$$k_A = K_A V_S / V_M$$

Ce dernier représente l'affinité d'un composé vis-à-vis de la phase stationnaire. Il est indépendant du débit de la phase mobile et des dimensions de la colonne [54], s'il y a une fuite de phase mobile avant la colonne, pour deux analyses identiques, dans les mêmes conditions opératoire, on obtient deux valeurs de temps de rétention identiques et deux valeurs de  $k'$  différentes. S'il y a des problèmes au niveau de la phase mobile ou phase stationnaire. On a deux valeurs de  $t_r$  et deux valeurs de  $k'$  différentes. L'équation peut être reformulée en :

$$k_A = (t_R - t_M) / t_M = t_R / t_M - t_S / t_M$$

Si un facteur de rétention est beaucoup plus petit que 1, le soluté sort de la colonne après un temps très proche du temps mort. Si le facteur de rétention est supérieur à environ 20 ou 30, les durées d'élution deviennent exagérément longues. Les séparations s'effectuent de manière optimale lorsque les facteurs de rétention des solutés d'un mélange sont de l'ordre de 1 à 5 [54].

### 10.2. Evaluation de l'efficacité d'une colonne

L'efficacité d'une colonne chromatographique s'évalue généralement à partir deux termes connexes : la hauteur équivalente à un plateau théorique  $H$  et nombre de plateaux théoriques  $N$ . Ces deux grandeurs sont liées par l'équation de Knox en HPLC [53].

$$N = L / H$$

Où  $L$  est la longueur de la colonne (généralement en cm).

Plus la hauteur du plateau  $H$  est faible, plus la colonne est efficace.

L'efficacité d'une colonne dépend de trois facteurs principaux :

- De sa géométrie : plus une colonne sera longue et plus elle sera efficace.

- De son garnissage : plus les particules de silice seront fines et plus la colonne sera efficace.
- Du débit de l'éluant : Il existe un débit optimal d'utilisation d'une colonne pour son efficacité est la plus grande.

Le nombre de plateaux théoriques,  $N$ , et la hauteur équivalente à un plateau théorique,  $H$ , sont largement utilisés dans la littérature et par les fabricants d'appareils pour évaluer les performances d'une colonne. Si les pics sont symétriques et gaussiens, le nombre de plateaux théoriques sera calculé selon cette équation :

$$N = 16(t_R/\omega)^2$$

Si les pics sont non symétriques

$$N = 5.54(t_R/\delta)^2$$

Pour conclure l'efficacité de la colonne dépend du débit donc de la phase mobile, et de la qualité (remplissage) de la phase stationnaire [54].

### 10.3. La sélectivité

Le facteur de séparation entre deux solutés désigné par  $\alpha$ , il permet de comparer deux solutés repérés sur un même chromatogramme.  $\alpha=1$

$$\alpha = t'_{R2}/t'_{R1} \text{ avec } t'_{R2} > t'_{R1}$$

On peut déduire que le facteur de sélectivité est égal au rapport des facteurs de rétention de la colonne pour les deux composés [53].

$$\alpha = k_2/k_1$$

Plus  $k$  est grand, plus le composé est adsorbé fortement dans la phase stationnaire et plus la rétention est grande et inversement.

$\alpha=1$  lorsqu'il n'y a pas une séparation entre les deux signaux consécutifs [54].

### 10.4. La Résolution :

On utilise le facteur de résolution  $R_s$  afin de mieux apprécier la qualité de la séparation entre deux constituants d'un mélange, autrement dit c'est une mesure de la qualité d'une séparation de point de vue chevauchement de deux signaux consécutifs. La résolution est calculée ainsi  $R_s = 2(t_{R2} - t_{R1}) / (\omega_1 + \omega_2)$  [53].

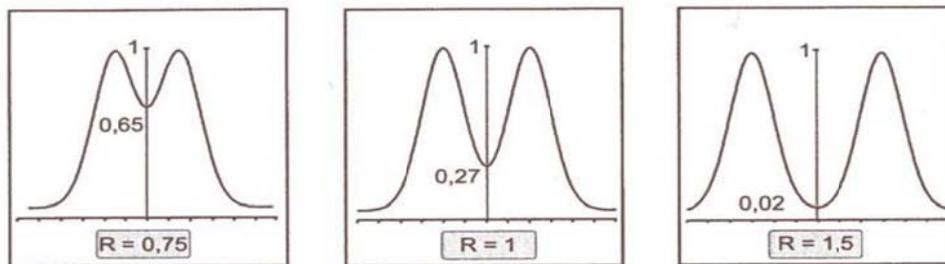


Figure 21 : Facteur de résolution [53].

Avec :

Si  $R_s < 1$  : une mauvaise résolution ; Si  $1 < R_s < 1,5$  : une résolution acceptable

Si  $R_s \geq 1,6$  : une bonne résolution ; Si  $1,4 < R_s < 1,6$  : une résolution optimale

Deux caractéristiques déterminent le degré de recouvrement des pics : [53][56]

. La distance séparant les sommets de deux pics mesurée par les temps de rétention  $t_{r2}$  et  $t_{r1}$

. La largeur des pics à la base  $\omega_{1/2(1)}$  et  $\omega_{1/2(2)}$ . Une séparation est bonne lorsque les pics de chacun des produits sont distincts.

### 10.5. Analyse quantitative

L'aire des pics est proportionnelle à la quantité de produit analysé. Dans la pratique, on injecte les composés en solution et on préfère utiliser des concentrations plutôt que les masses. Il y a une proportionnalité entre la masse injectée et la concentration du soluté, à condition de toujours injecter le même volume de solution [55]

On écrira :  $A = K_C \cdot C$

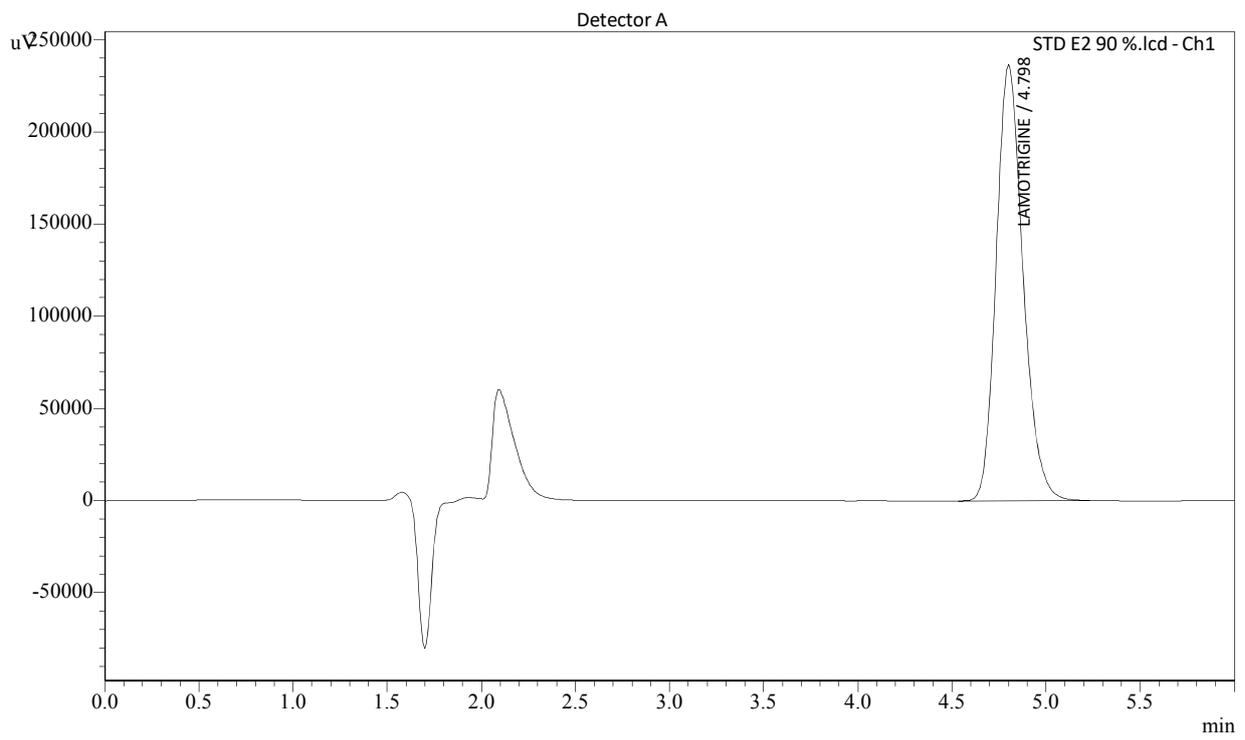
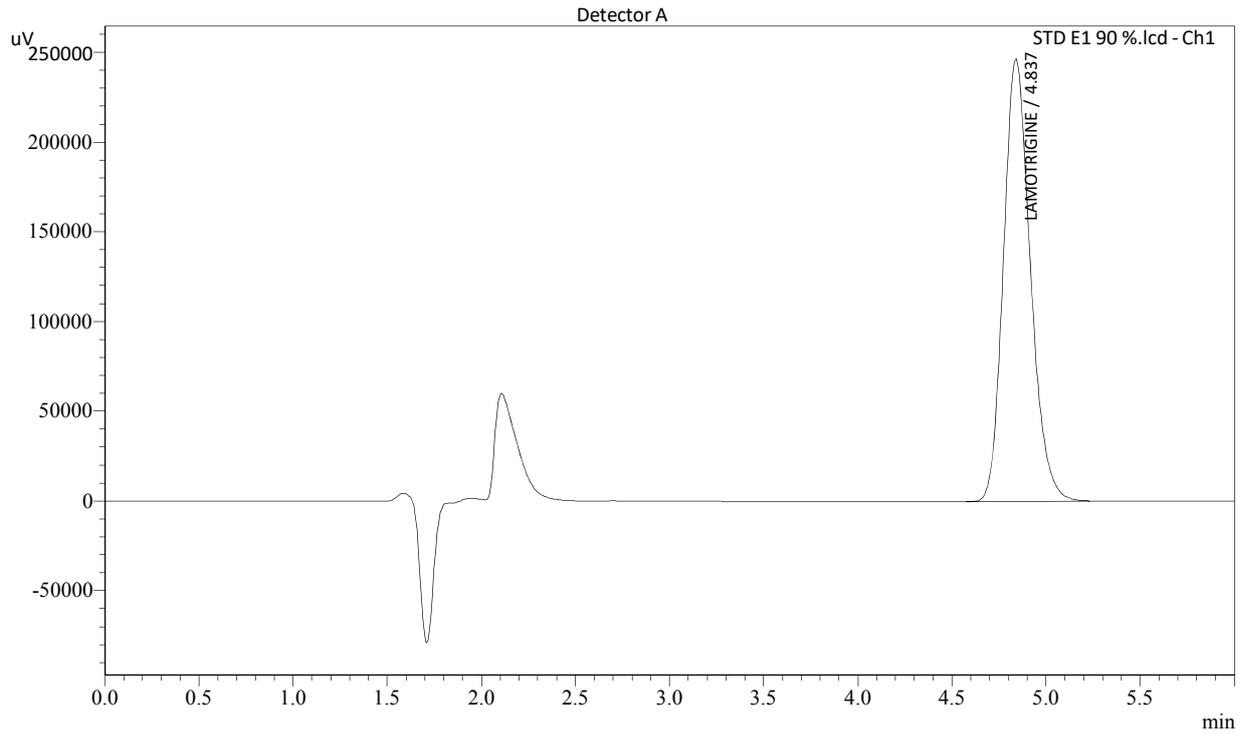
Avec :

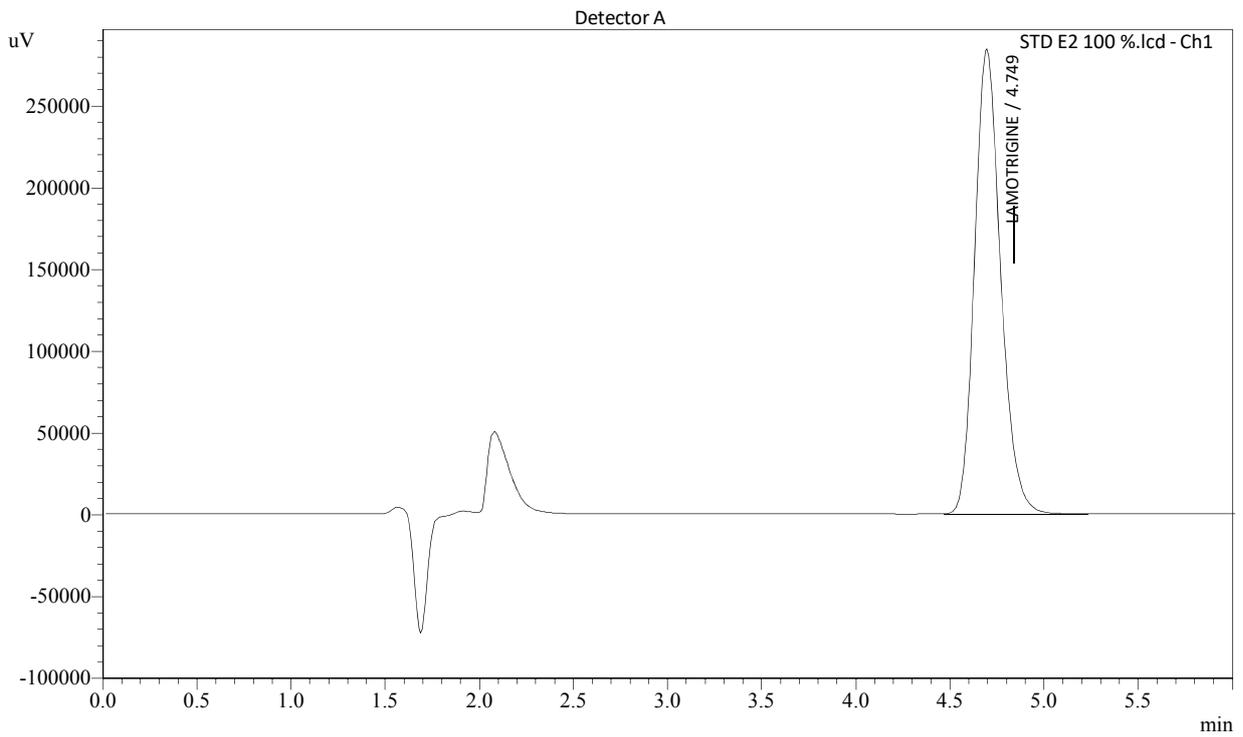
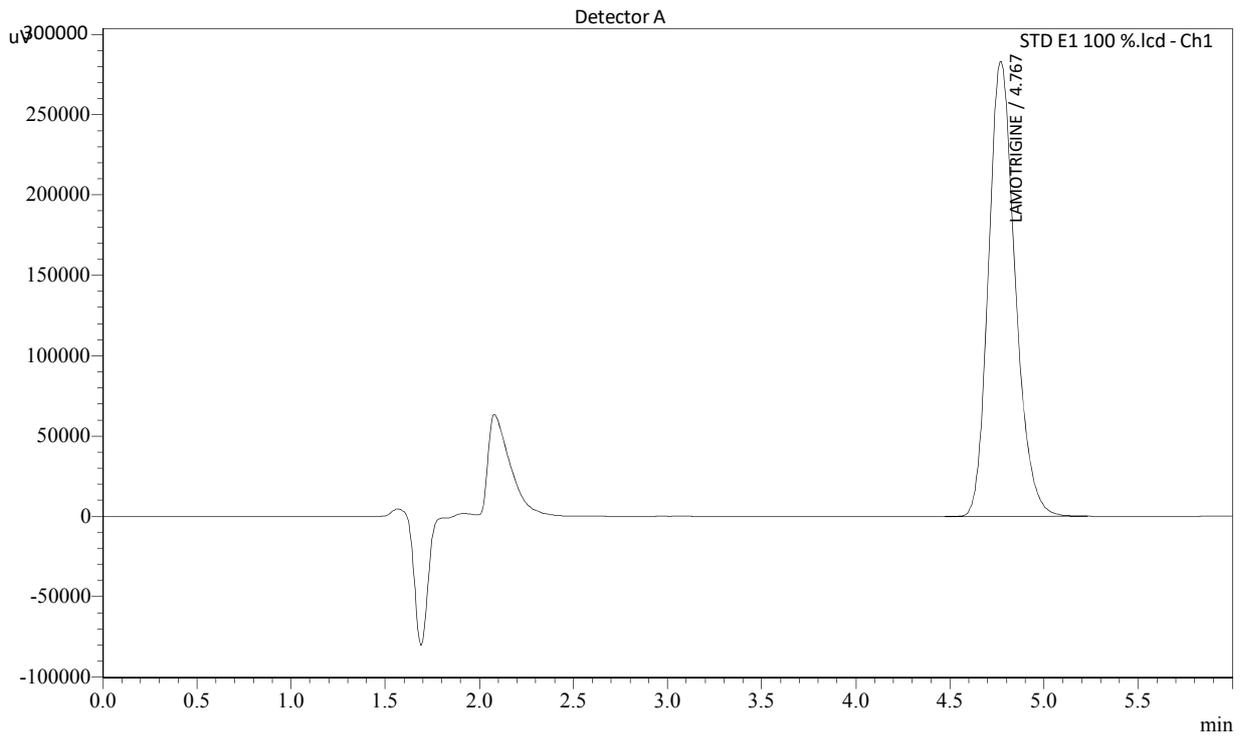
$A$  = air du pic.

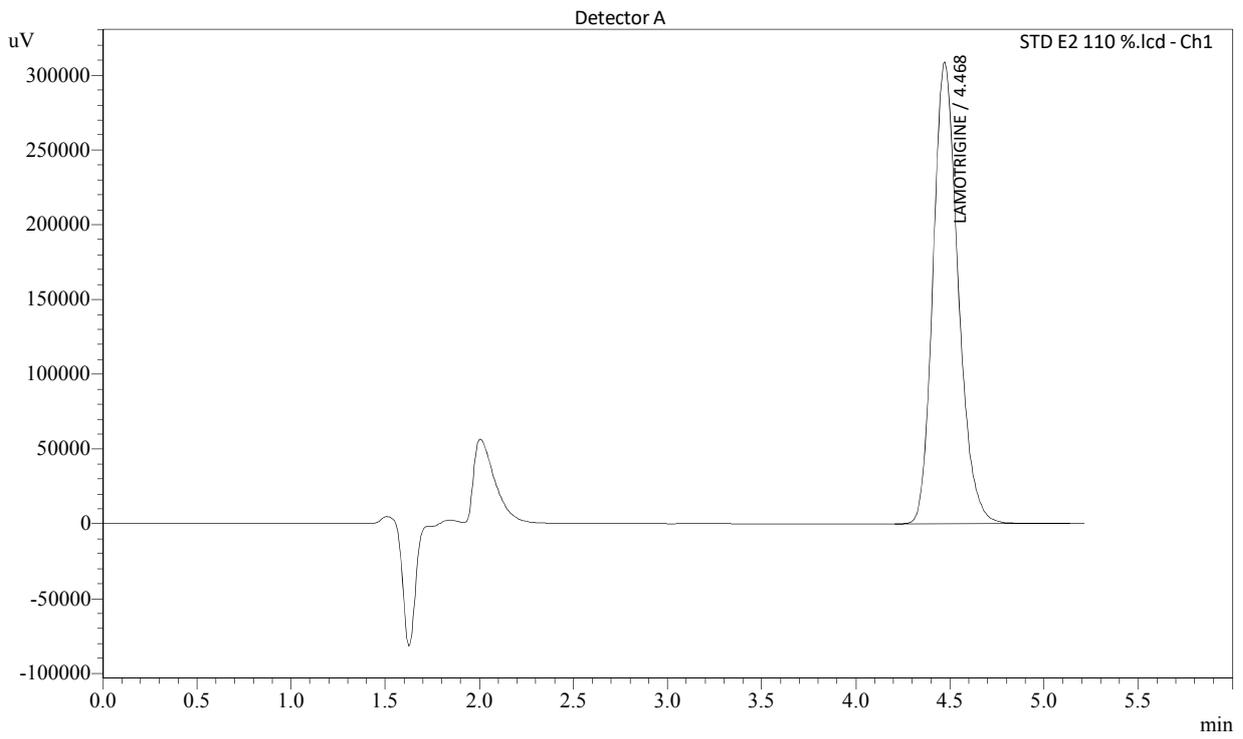
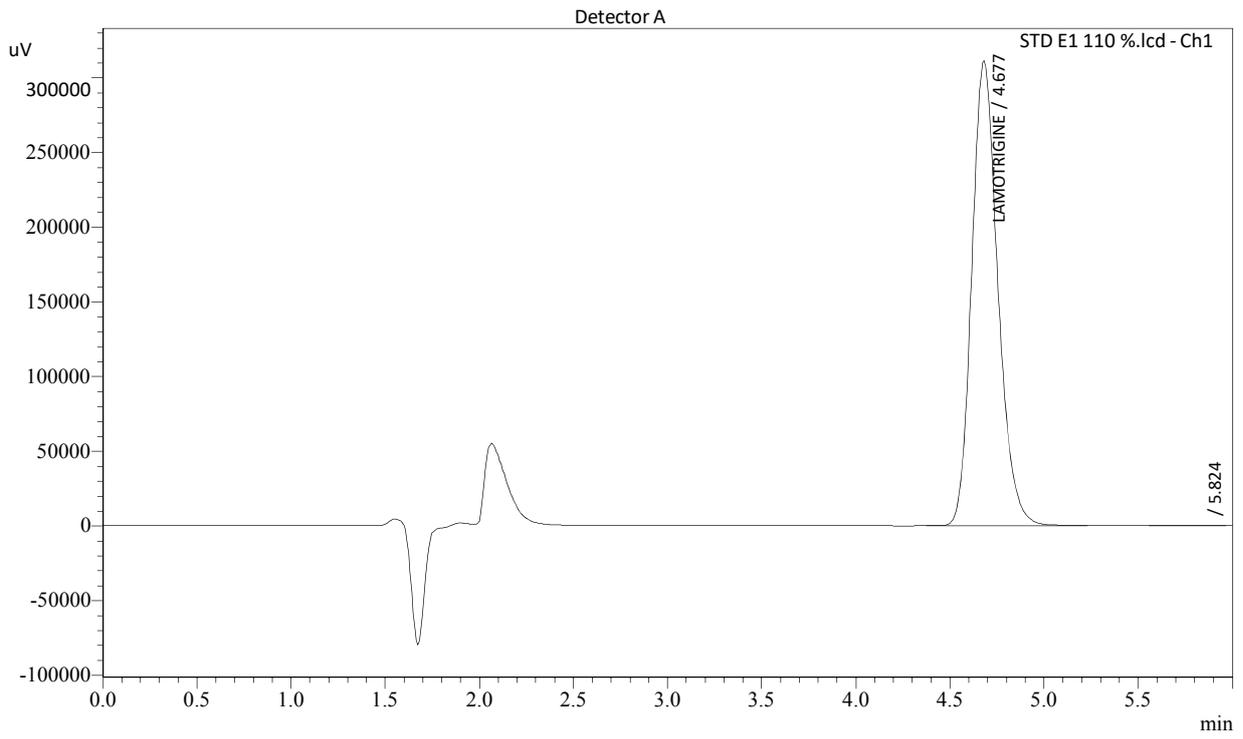
$K_C$  = coefficient de réponse du détecteur

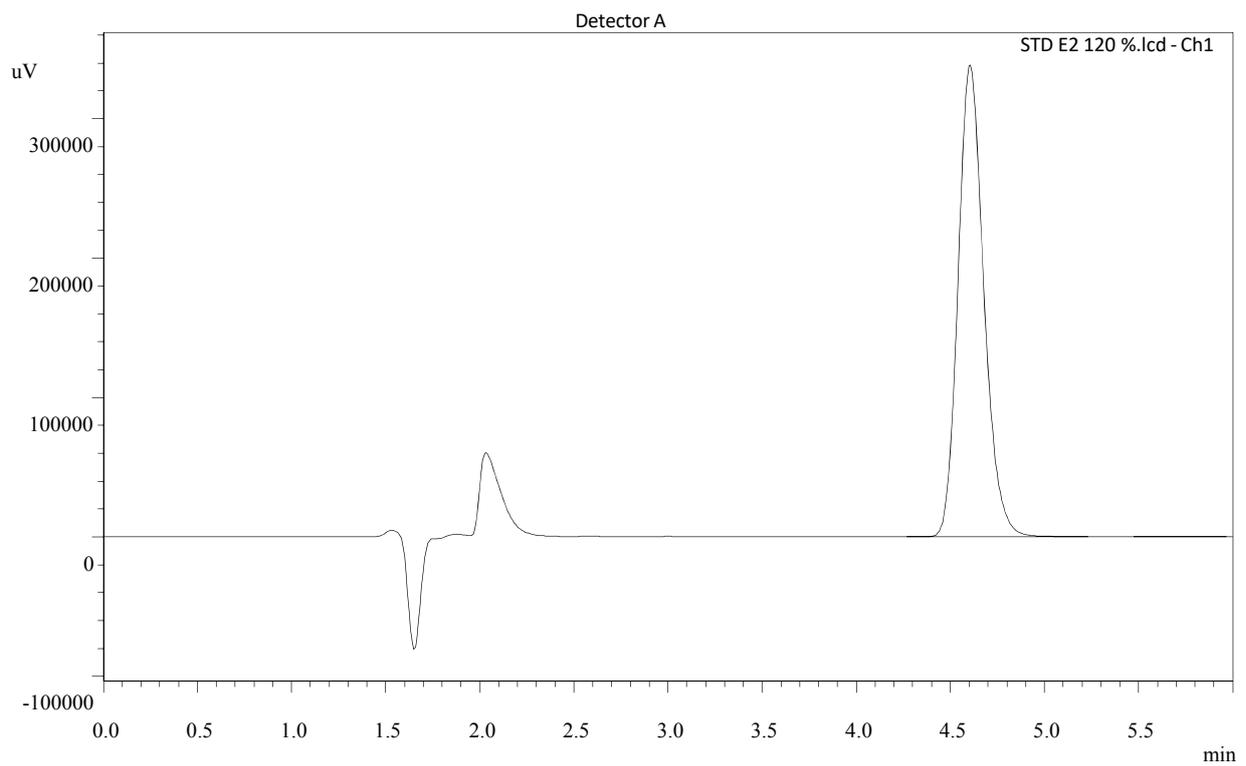
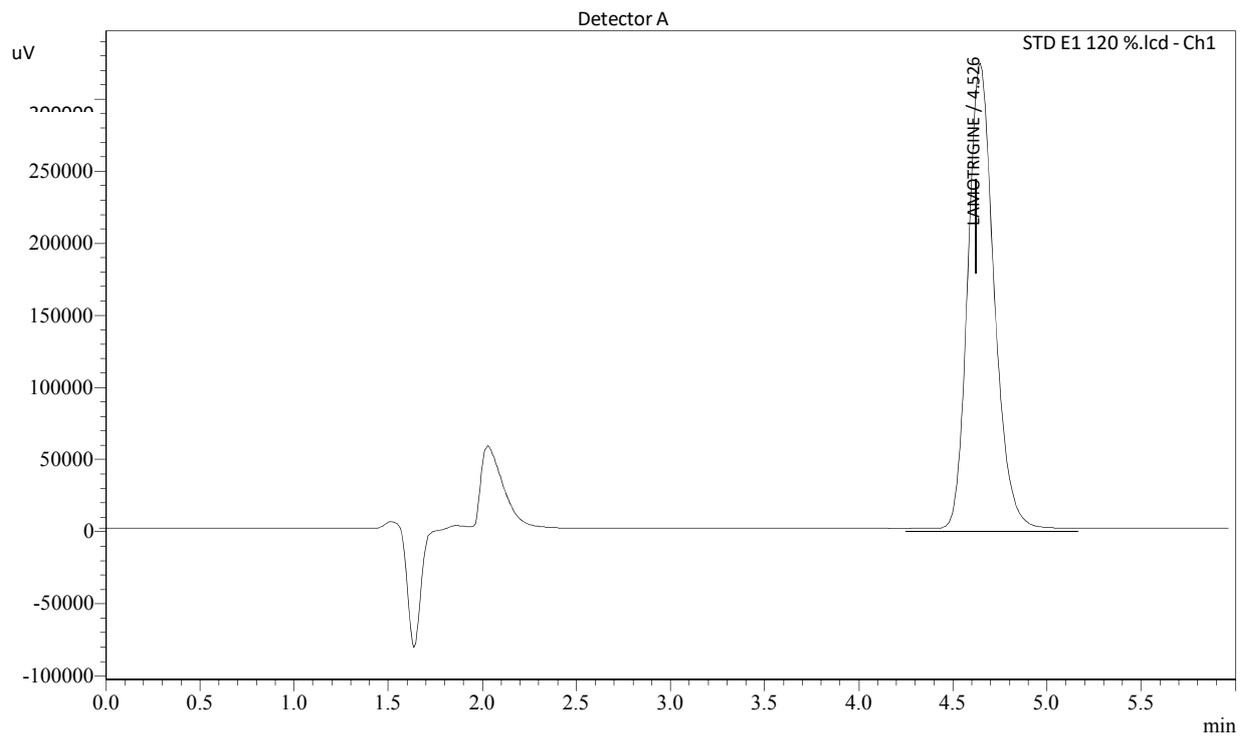
$C$  = concentration du composé injecté

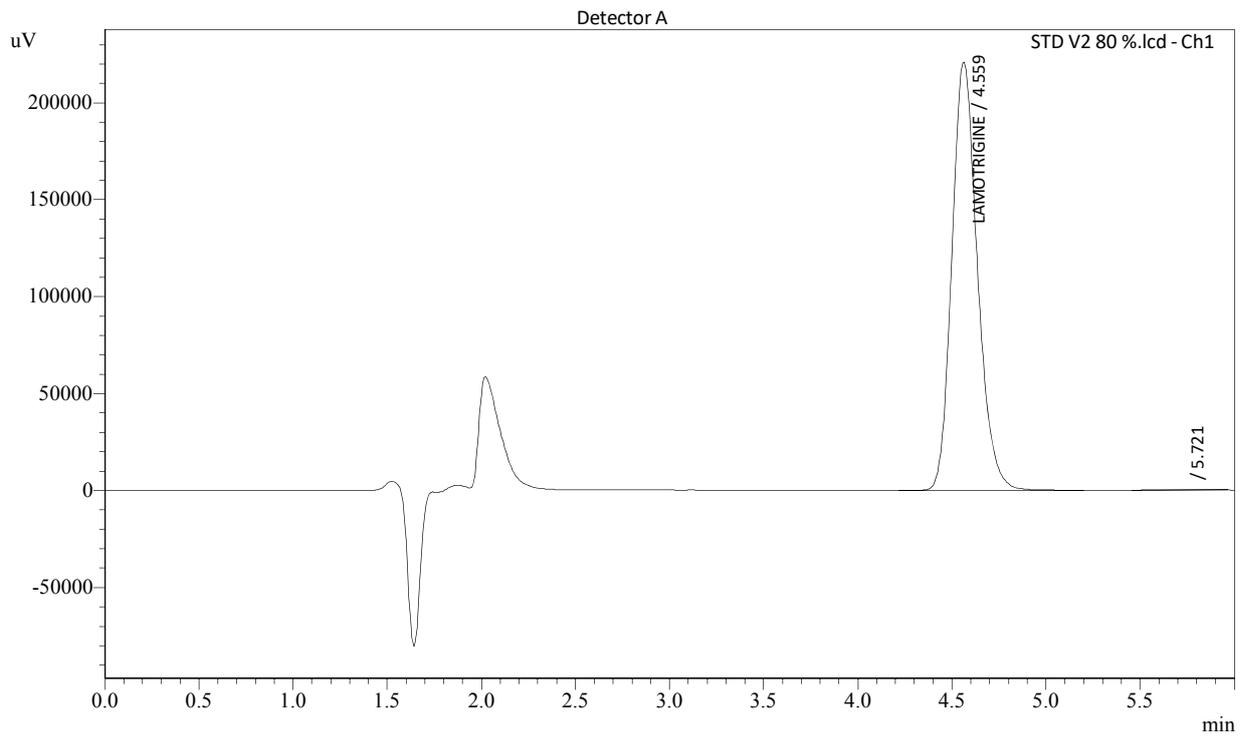
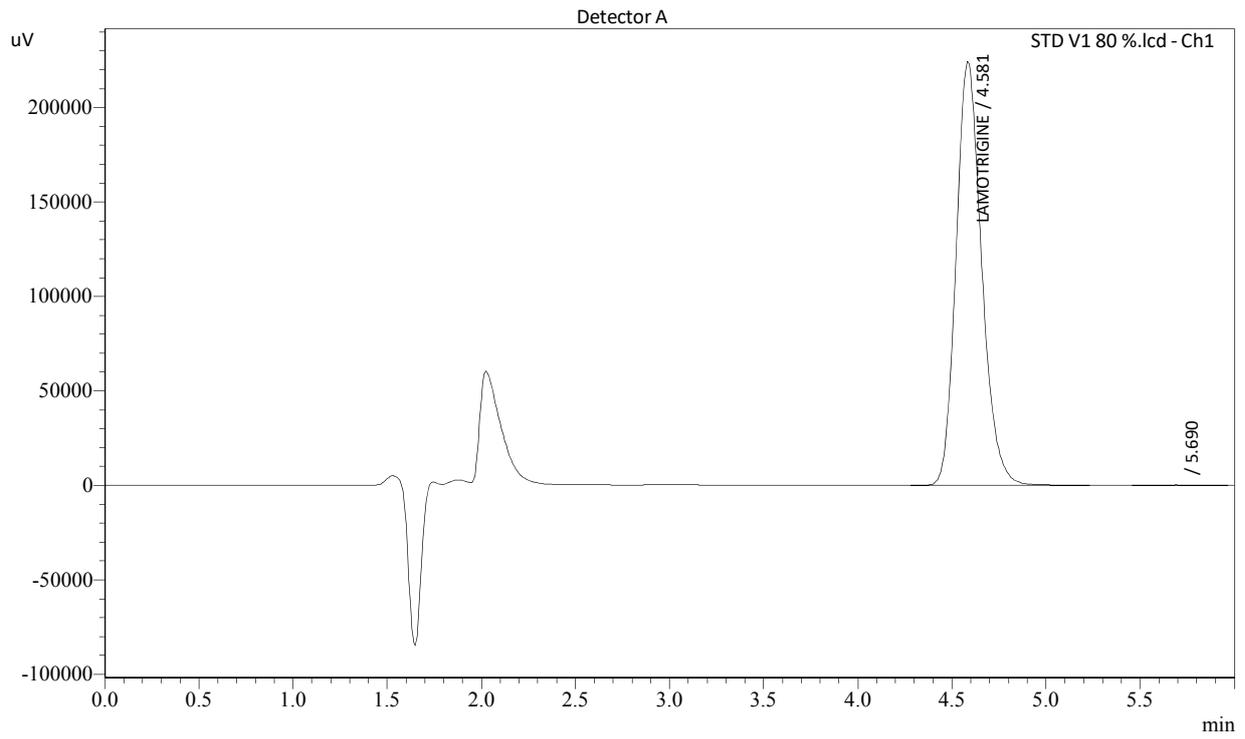
## **ANNEXE II**

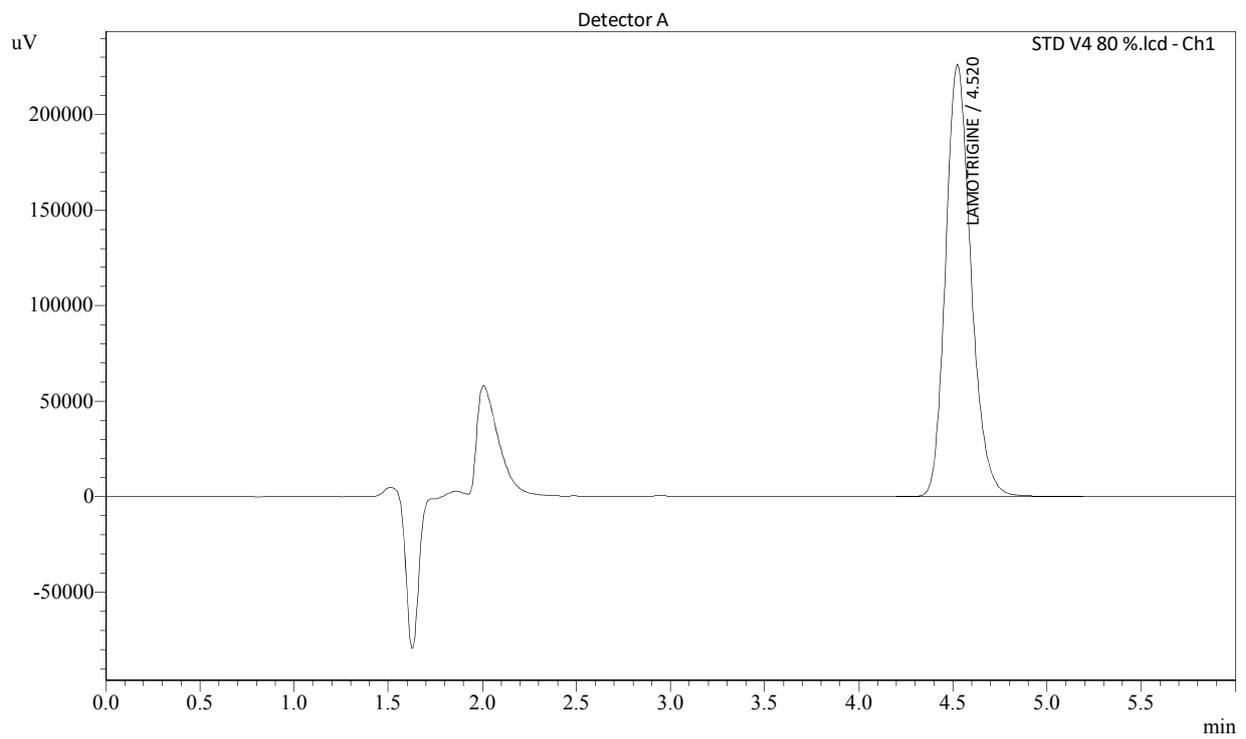
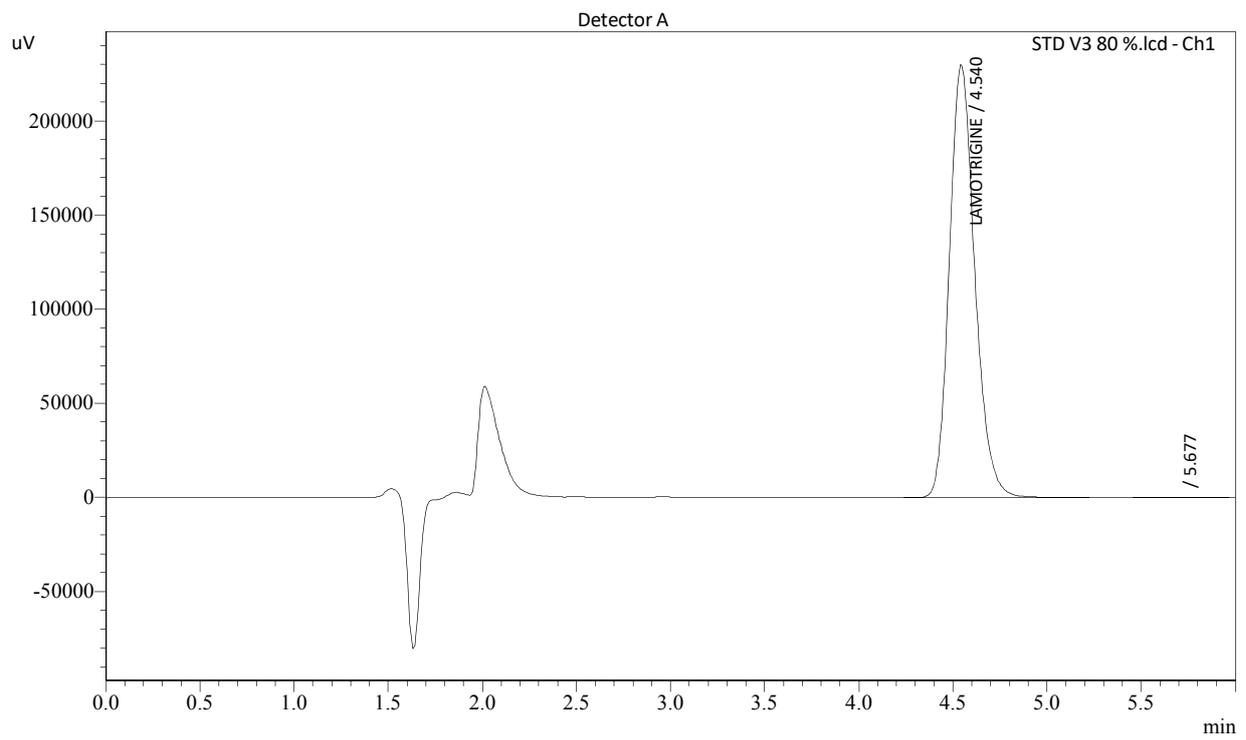


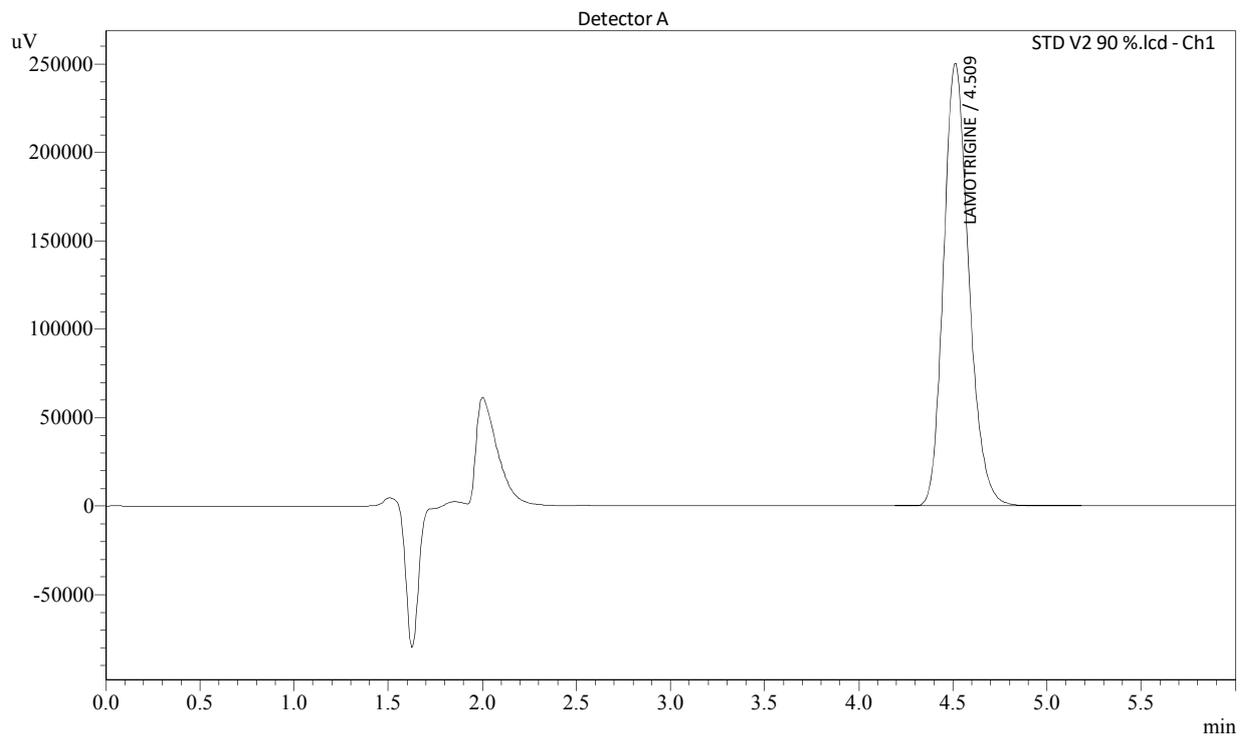
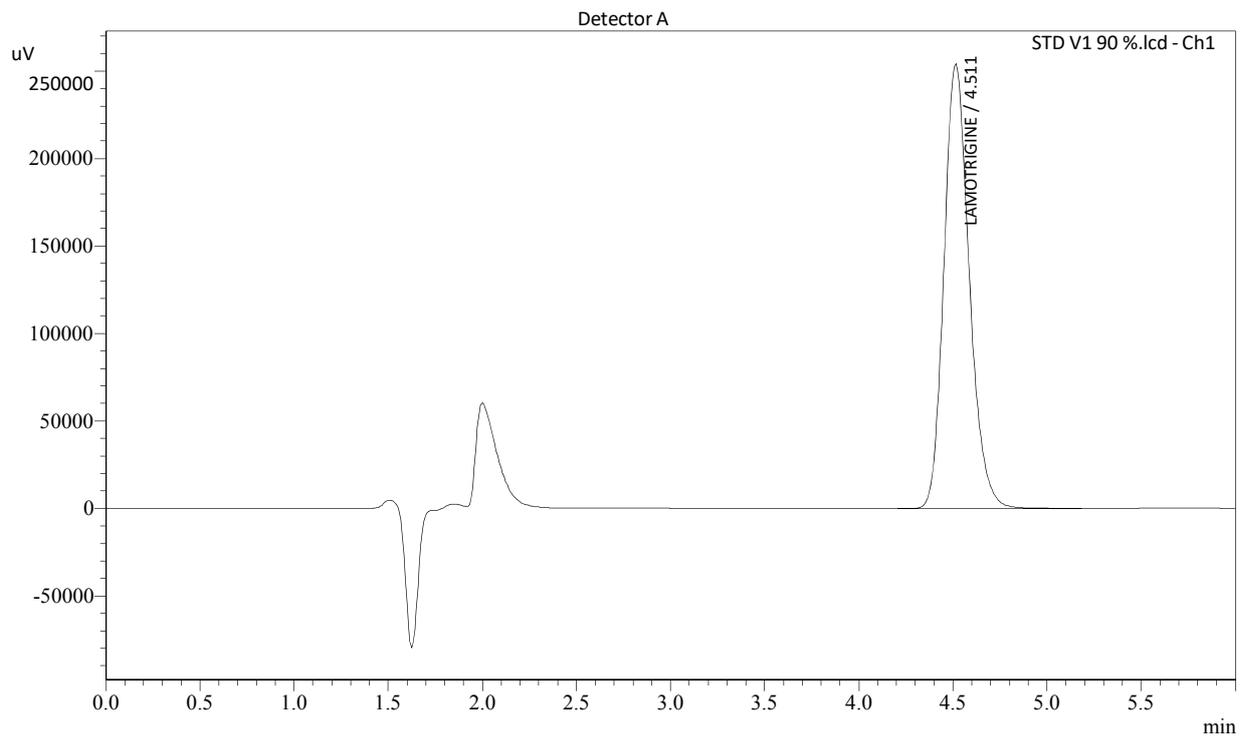


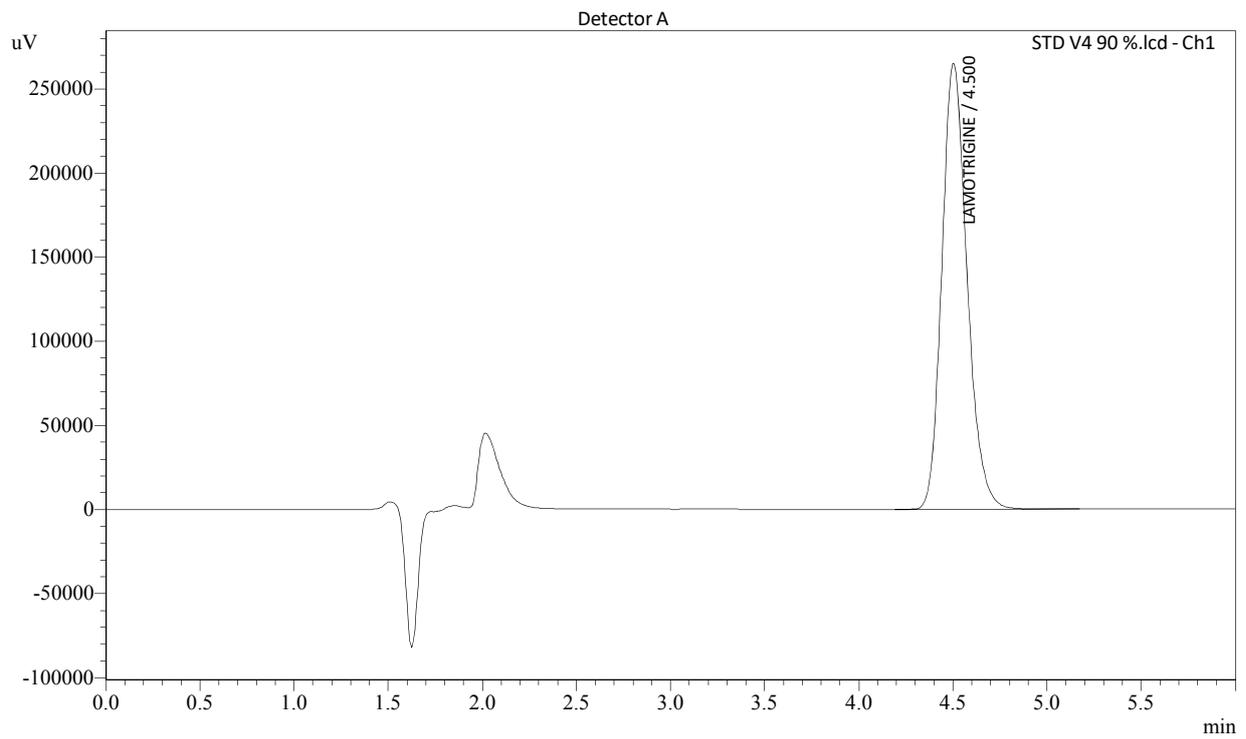
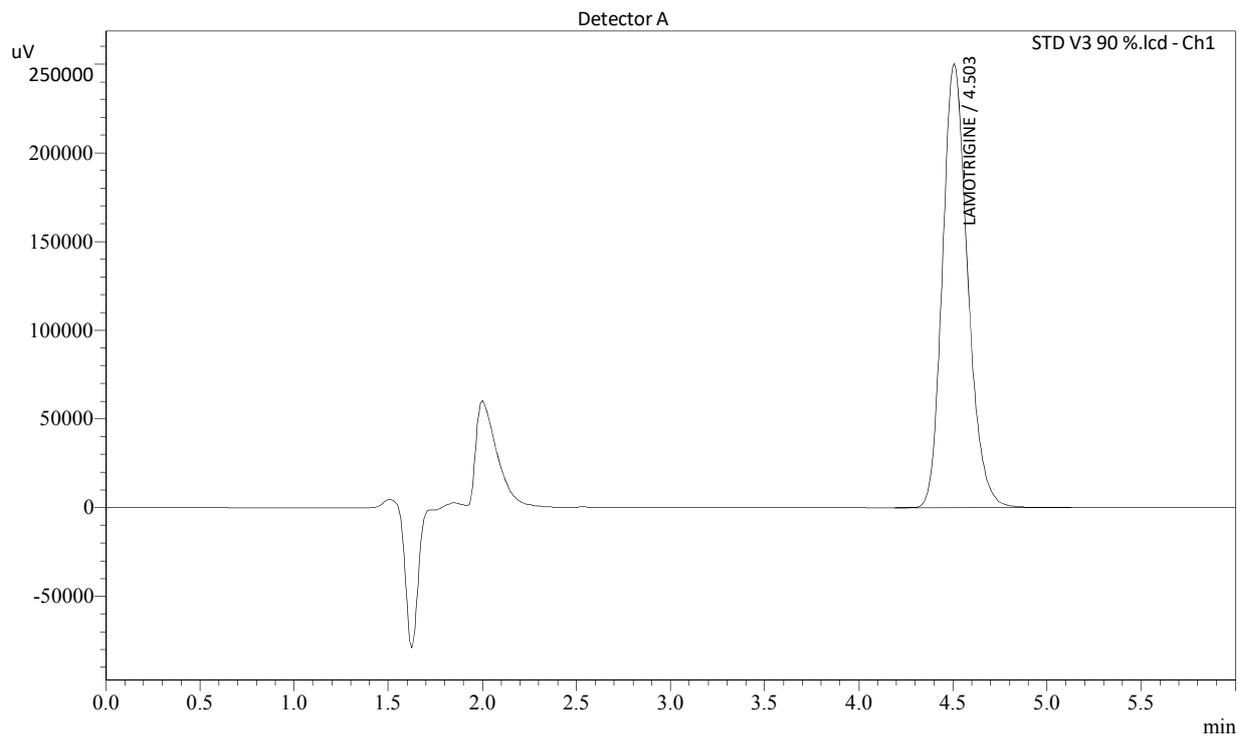


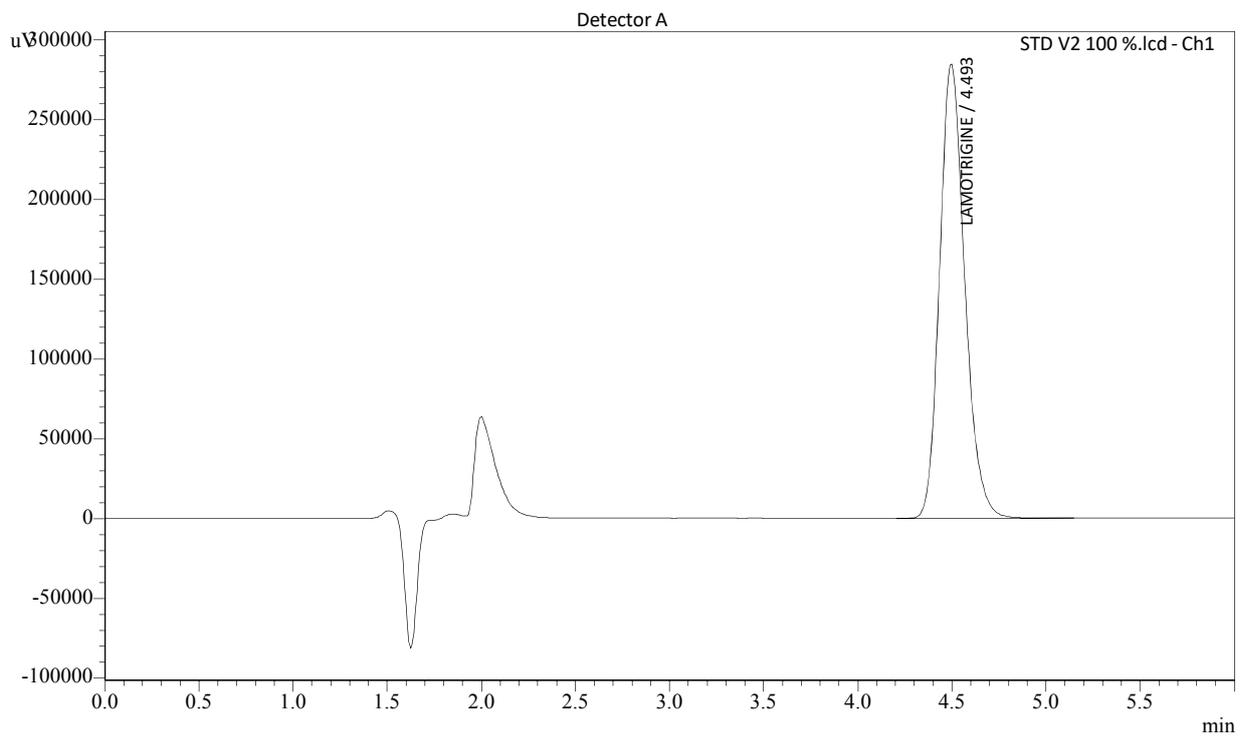
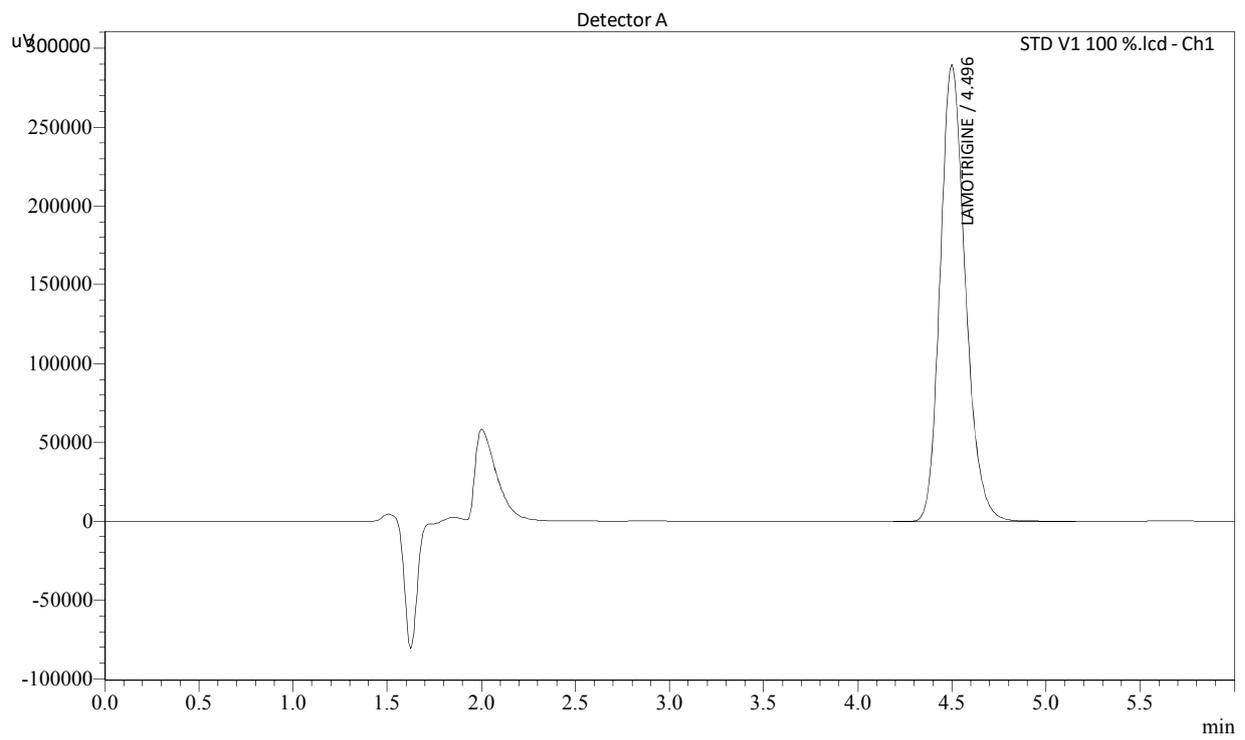


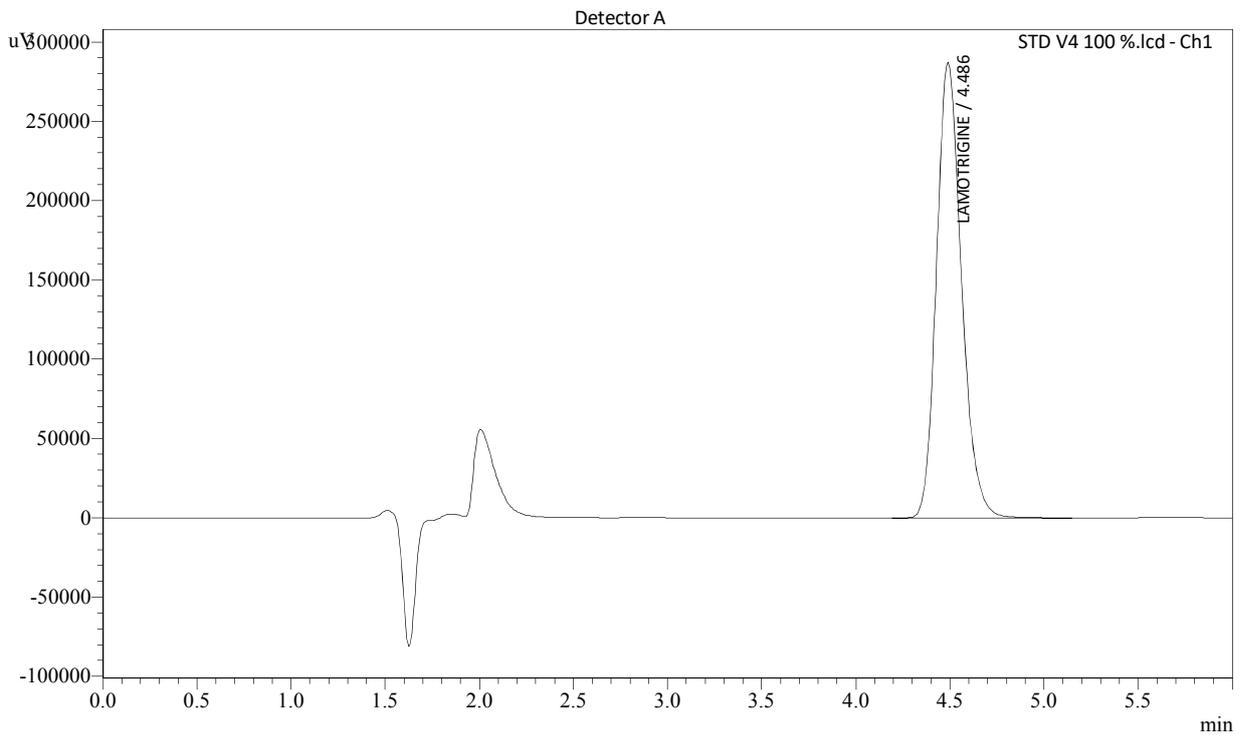
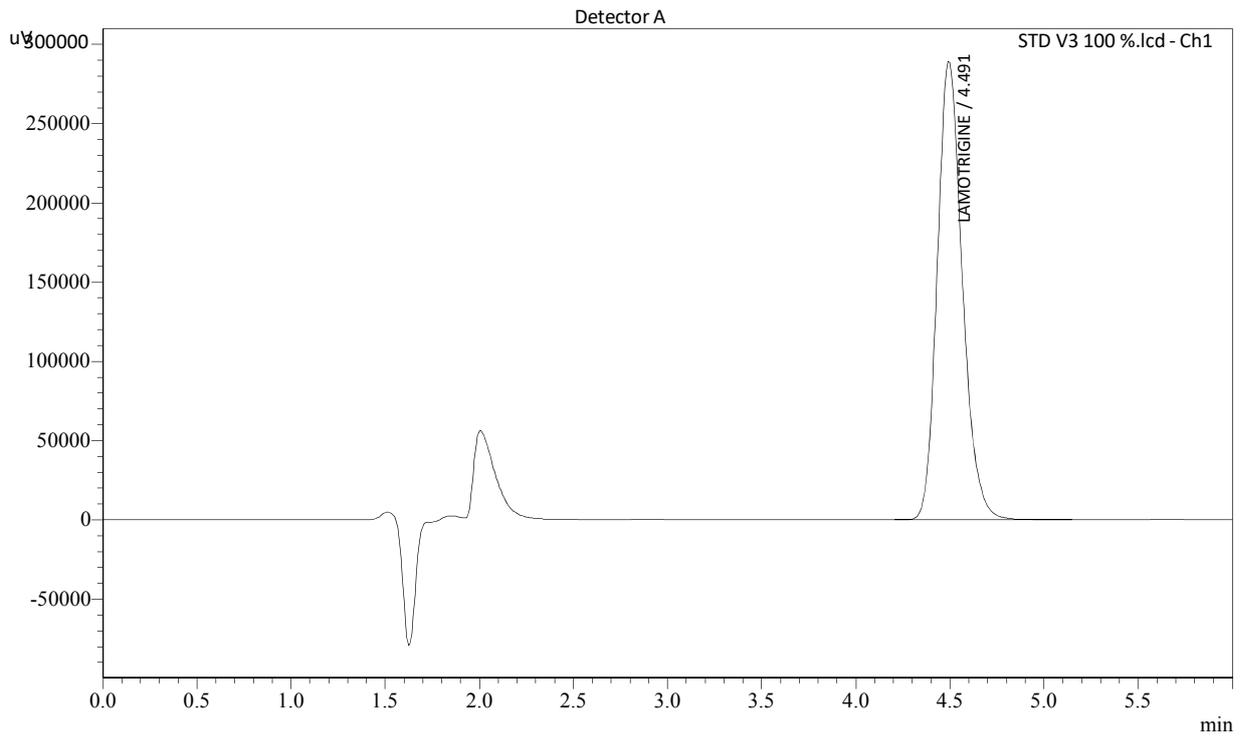


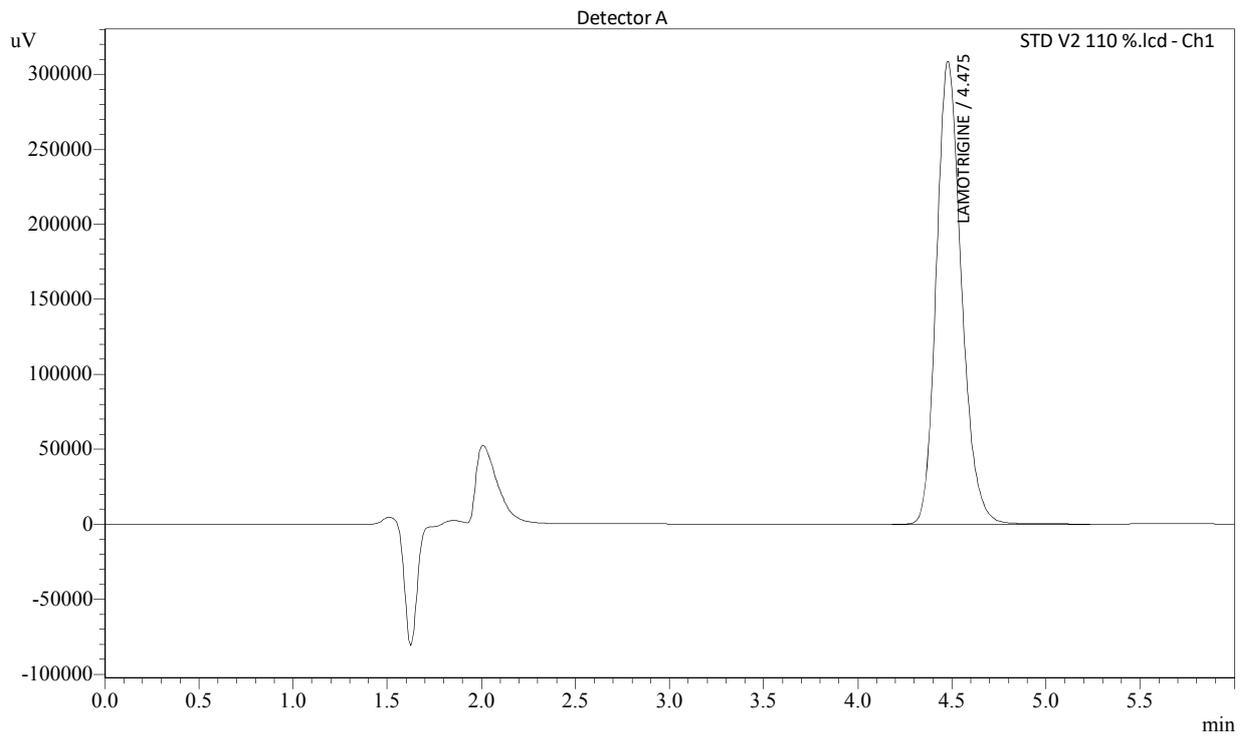
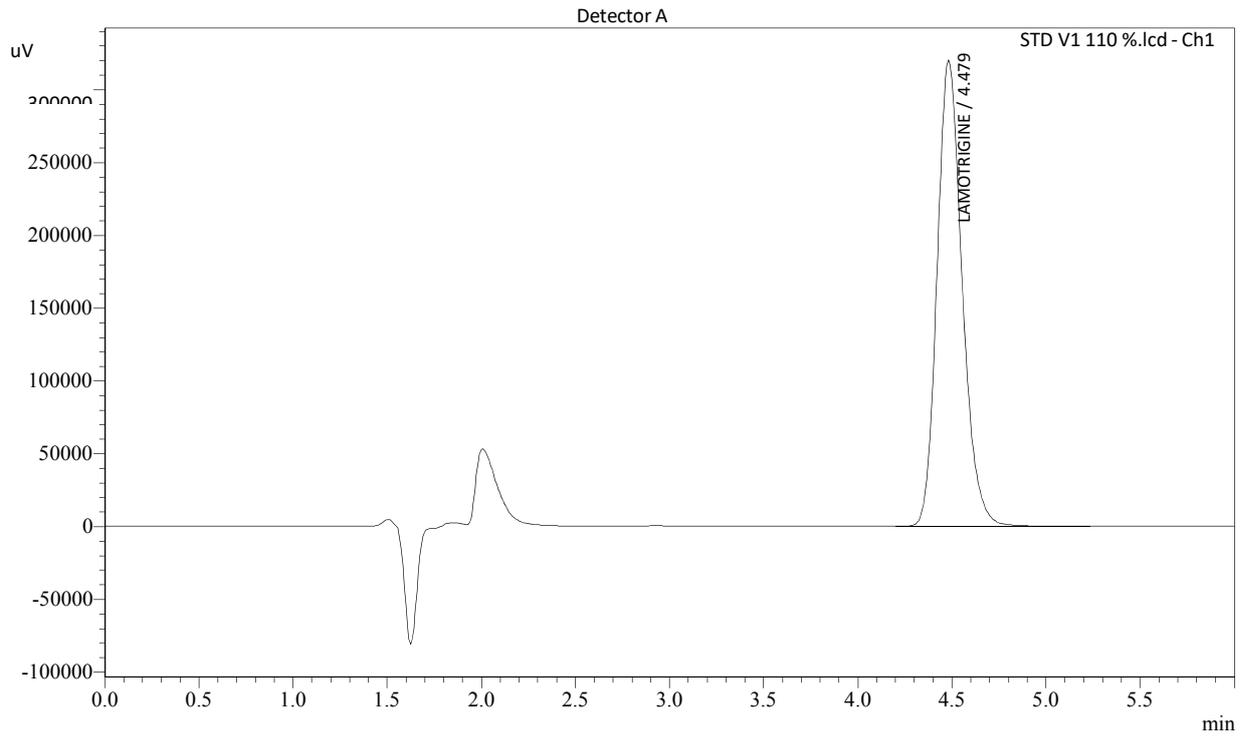


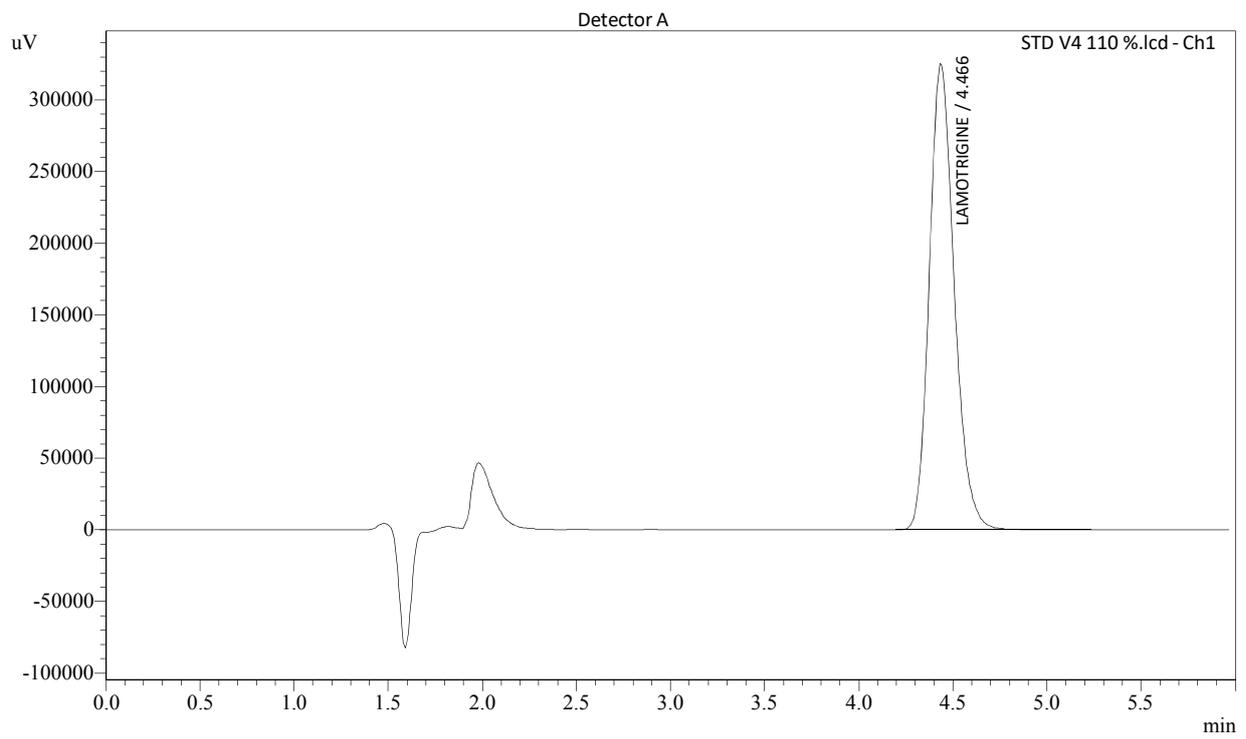
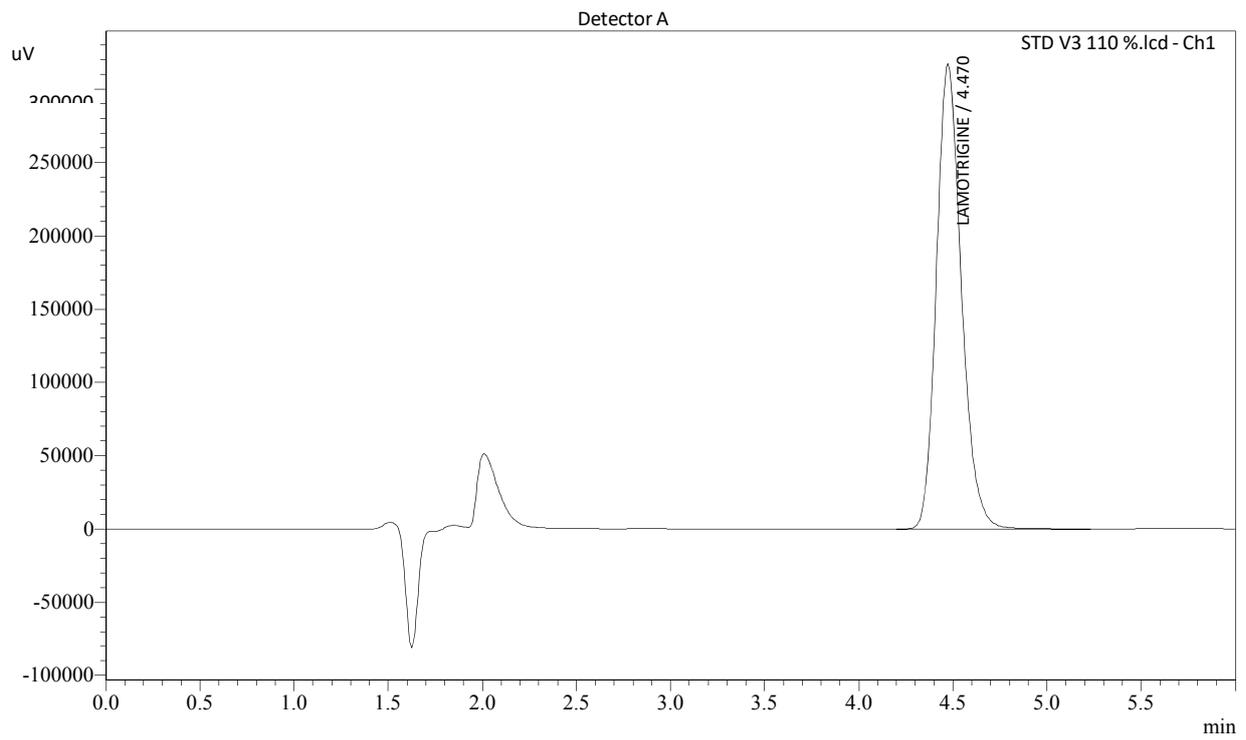


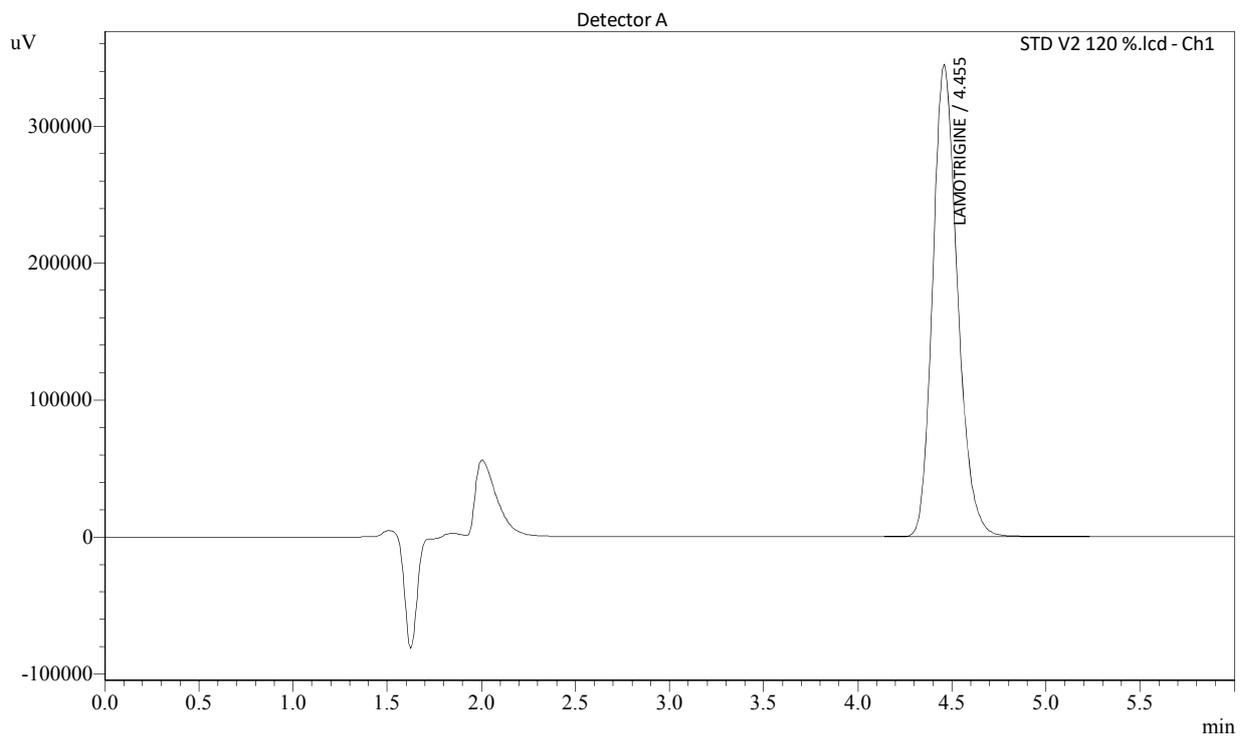
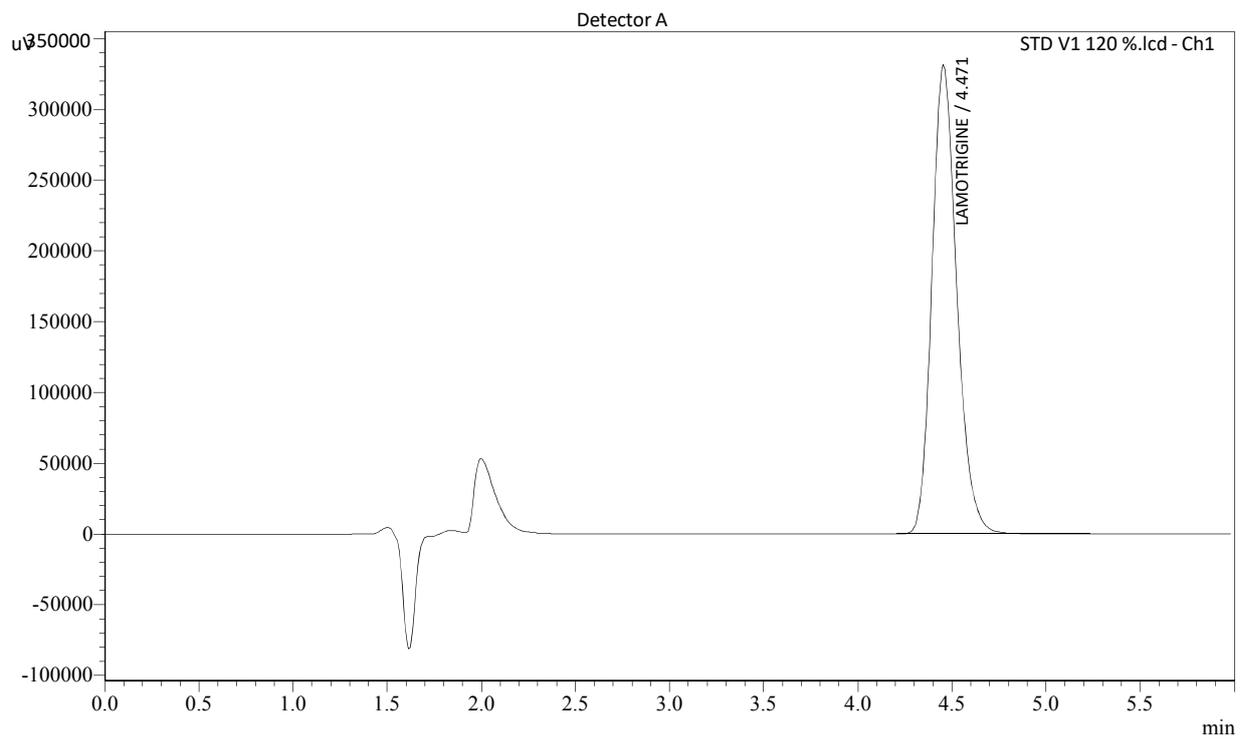


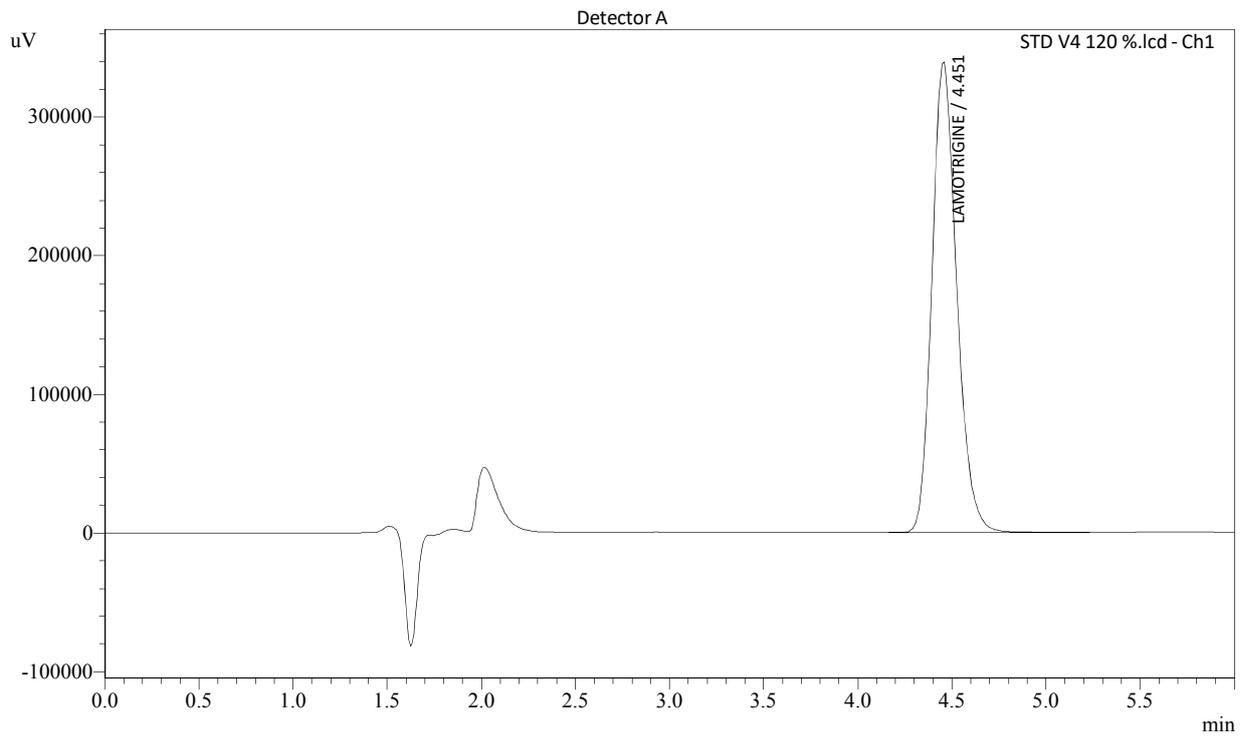
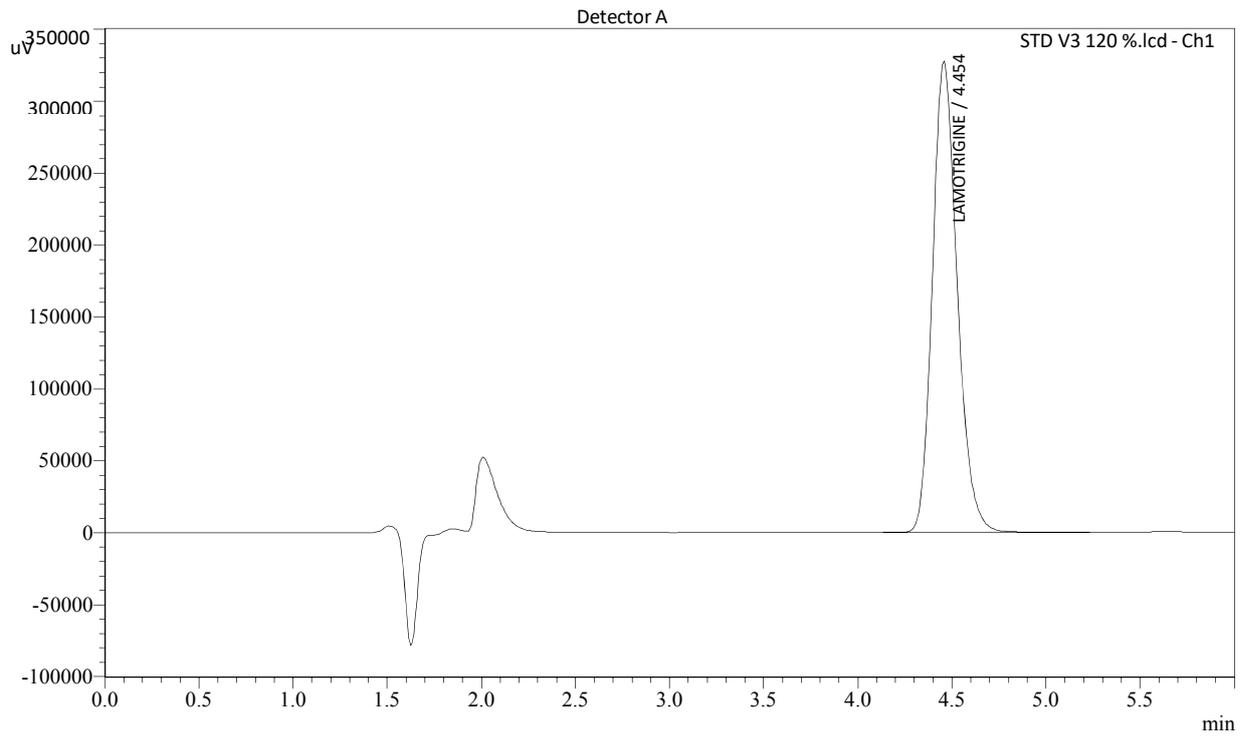




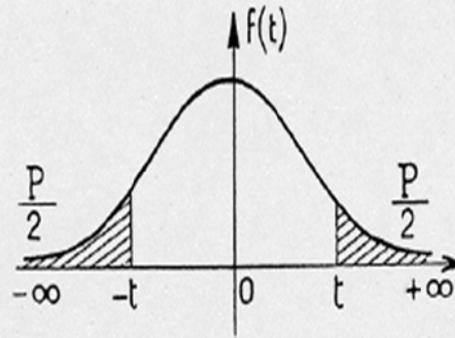








## **ANNEXE III**



$\frac{P}{v}$	0,90	0,80	0,70	0,60	0,50	0,40	0,30	0,20	0,10	0,05	0,02	0,01	0,001
1	0,158	0,325	0,510	0,727	1,000	1,376	1,963	3,078	6,314	12,706	31,821	63,657	636,619
2	0,142	0,289	0,445	0,617	0,816	1,061	1,386	1,886	2,920	4,303	6,965	9,925	31,598
3	0,137	0,277	0,424	0,584	0,785	0,978	1,250	1,638	2,353	3,182	4,541	5,841	12,929
4	0,134	0,271	0,414	0,569	0,741	0,941	1,190	1,533	2,132	2,776	3,747	4,604	8,611
5	0,132	0,267	0,408	0,559	0,727	0,920	1,156	1,476	2,015	2,571	3,365	4,032	6,869
6	0,131	0,265	0,404	0,553	0,718	0,906	1,134	1,440	1,943	2,447	3,143	3,707	5,959
7	0,130	0,263	0,402	0,549	0,711	0,896	1,119	1,415	1,895	2,365	2,998	3,499	5,408
8	0,130	0,262	0,399	0,546	0,706	0,889	1,108	1,397	1,860	2,306	2,896	3,355	5,041
9	0,129	0,261	0,398	0,543	0,703	0,883	1,100	1,383	1,833	2,262	2,821	3,250	4,781
10	0,129	0,260	0,397	0,542	0,700	0,879	1,093	1,372	1,812	2,228	2,764	3,169	4,587
11	0,129	0,260	0,396	0,540	0,697	0,876	1,088	1,363	1,796	2,201	2,718	3,106	4,437
12	0,128	0,259	0,395	0,539	0,695	0,873	1,083	1,356	1,782	2,179	2,681	3,055	4,318
13	0,128	0,259	0,394	0,538	0,694	0,870	1,079	1,350	1,771	2,160	2,650	3,012	4,221
14	0,128	0,258	0,393	0,537	0,692	0,868	1,076	1,345	1,761	2,145	2,624	2,977	4,140
15	0,128	0,258	0,393	0,536	0,691	0,866	1,074	1,341	1,753	2,131	2,602	2,947	4,073
16	0,128	0,258	0,392	0,535	0,690	0,865	1,071	1,337	1,746	2,120	2,583	2,921	4,015
17	0,128	0,257	0,392	0,534	0,689	0,863	1,069	1,333	1,740	2,110	2,567	2,898	3,965
18	0,127	0,257	0,392	0,534	0,688	0,862	1,067	1,330	1,734	2,101	2,552	2,878	3,922
19	0,127	0,257	0,391	0,533	0,688	0,861	1,066	1,328	1,729	2,093	2,539	2,861	3,883
20	0,127	0,257	0,391	0,533	0,687	0,860	1,064	1,325	1,725	2,086	2,528	2,845	3,850
21	0,127	0,257	0,391	0,532	0,686	0,859	1,063	1,323	1,721	2,080	2,518	2,831	3,819
22	0,127	0,256	0,390	0,532	0,686	0,858	1,061	1,321	1,717	2,074	2,508	2,819	3,792
23	0,127	0,256	0,390	0,532	0,685	0,858	1,060	1,319	1,714	2,069	2,500	2,807	3,767
24	0,127	0,256	0,390	0,531	0,685	0,857	1,059	1,318	1,711	2,064	2,492	2,797	3,745
25	0,127	0,256	0,390	0,531	0,684	0,856	1,058	1,316	1,708	2,060	2,485	2,787	3,725
26	0,127	0,256	0,390	0,531	0,684	0,856	1,058	1,315	1,706	2,056	2,479	2,779	3,707
27	0,127	0,256	0,389	0,531	0,684	0,855	1,057	1,314	1,703	2,052	2,473	2,771	3,690
28	0,127	0,256	0,389	0,530	0,683	0,855	1,056	1,313	1,701	2,048	2,467	2,763	3,674
29	0,127	0,256	0,389	0,530	0,683	0,854	1,055	1,311	1,699	2,045	2,462	2,756	3,659
30	0,127	0,256	0,389	0,530	0,683	0,854	1,055	1,310	1,697	2,042	2,457	2,750	3,646
40	0,126	0,255	0,388	0,529	0,681	0,851	1,050	1,303	1,684	2,021	2,423	2,704	3,551
80	0,126	0,254	0,387	0,527	0,679	0,848	1,046	1,296	1,671	2,000	2,390	2,660	3,460
120	0,126	0,254	0,386	0,526	0,677	0,845	1,041	1,289	1,658	1,980	2,358	2,617	3,373
$\infty$	0,126	0,253	0,385	0,524	0,674	0,842	1,036	1,282	1,645	1,960	2,326	2,576	3,291

## Résumé

Ce travail expérimental mené au Laboratoire de Chimie Analytique de l'Université Mouloud Mammeri de Tizi-Ouzou s'inscrit dans le domaine du Contrôle Qualité Pharmaceutique. Son objectif principal est de valider une méthode de dosage de la Lamotrigine dans des comprimés de 50 mg par chromatographie liquide haute performance. L'indice de capacité Cpk-tol est utilisé comme outil d'aide à la décision ainsi que l'estimateur de proportion de résultats non conformes ( $\pi_{\text{Cpk-tol}}$ ).

La sélectivité de la méthode analytique est évaluée au préalable. Elle est suivie de l'évaluation de la fidélité et de la justesse de cette dernière à partir des standards d'étalonnage et standards de validation. Ces derniers sont utilisés pour estimer les paramètres statistiques des différents modèles d'étalonnage. Ces paramètres ont servi de base au calcul des indices de capabilité Cpk-tol et de la probabilité d'occurrence de résultats non conformes ( $\pi_{\text{Cpk-tol}}$ ) pour chaque modèle d'étalonnage.

Cette expérience a satisfait tous les critères de l'approche capabilité et compte tenu du haut niveau de fiabilité et de précision des résultats obtenus, elle a clairement démontré la validité de la méthode utilisée. Cette dernière a été évaluée dans des intervalles de tolérance incluant des limites de spécification ( $\pm 5\%$ ) et un degré de confiance  $\beta=99,73\%$ . Il s'ensuit que la méthode de dosage est valide et adaptée pour analyser la Lamotrigine dans des comprimés de 50 mg.

**Mots clés :** Lamotrigine, HPLC, validation analytique, FDA, SFSTP, Capabilité

## Abstract

This experimental work undertaken in the Laboratory of Analytical Chemistry of University Mouloud Mammeri of Tizi-Ouzou falls within the field of Pharmaceutical Quality Control. Its major purpose is to validate a method for the dosage of Lamotrigine in 50 mg tablets by high performance liquid chromatography. To this end, the Capability index Cpk-tol is used as a decision-making tool as well as the estimator of proportion of non-conforming results ( $\pi_{\text{Cpk-tol}}$ ).

The selectivity of the analytical method is assessed beforehand. It is followed up by the evaluation of the precision and trueness of the method through the deployment of the calibration and standard series. The latter is used for estimating the statistical parameters for the different calibration models. These parameters have served as the basis for the calculation of Cpk-tol and  $\pi_{\text{Cpk-tol}}$  for each and every calibration model.

This experiment has met all the criteria within the capability approach and given the high level of dependability and accuracy of the results, it has demonstrated clearly the validity of the method that is employed. The latter was assessed within tolerance intervals including specification limits ( $\pm 5\%$ ), a confidence probability  $\beta=99.73\%$ . It follows that the dosage method is valid and suitable to analyze Lamotrigine in 50mg tablets.

**Key words:** Lamotrigine, HPLC, analytical validation, FDA, SFSTP, Capability.