

الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية
REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE
وزارة التعليم العالي و البحث العلمي
Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique

Université Mouloud MAMMARI de Tizi Ouzou

Faculté de Médecine –

Département de Pharmacie



جامعة مولود معمري بتيزي وزو

كلية الطب –

قسم الصيدلة

MEMOIRE DE FIN D'ETUDE

Déposé

Le 25/07/2021

En vue de l'obtention du Diplôme d'Etat de Docteur en Pharmacie

Thème

**MISE AU POINT ET VALIDATION D'UNE
MÉTHODE DE DOSAGE DE TRACES DE LA
REPAGLINIDE DANS LES EAUX DE RINÇAGE
PAR HPLC- APPLICATION A LA VALIDATION
DU NETTOYAGE DE LA VERRERIE DE
LABORATOIRE**

Réalisé par :

OUMELLAL MAISSA

BOUIRA SOUMIA

OUKACI DOUNIA

Composition du jury :

- | | | | |
|----------------------|----------|-------|-------------------|
| - Dr. H. BEN SI SAID | MAHU | UMMTO | President du jury |
| - Dr. M. BOURSOUTI | AHU | UMMTO | Examineur |
| - Pr. M. MAMOU | MCA | UMMTO | Promoteur |
| - Dr R. BRAHIMI | Résident | CHU | Co-promoteur |

Promotion 2020 -2021

REMERCIEMENTS

Nous remercions DIEU le tout puissant de nous avoir procuré courage, santé et volonté d'avancer dans la vie et briller dans les études.

Nous tenons à exprimer nos remerciements les plus vifs à notre encadreur **Pr. M. MAMOU**, nous avons eu le privilège de travailler parmi votre équipe et d'apprécier vos qualités et vos valeurs. Votre sérieux, votre compétence et votre sens du devoir nous ont énormément marqués. Veuillez trouver ici l'expression de notre respectueuse considération et notre profonde admiration pour toutes vos qualités scientifiques et humaines. Ce travail est pour nous l'occasion de vous témoigner notre profonde gratitude.

Nos profonds remerciements s'étendent également à notre Co-promoteur **Dr R. BRAHIMI** pour son aide, ses efforts, ses encouragements et le temps qu'il nous a consacré,

Nous tenons à remercier **Dr. BEN SI SAID et Dr. BOURSOUTI** pour l'intérêt qu'ils ont porté à notre étude et pour avoir fait l'honneur d'accepter de faire partie de notre jury et d'examiner notre travail.

Nous remercions enfin toute l'équipe du laboratoire de chimie analytique du département de pharmacie de la faculté de médecine de l'université MOULOUD MAMMARI de TIZI-OUZOU et particulièrement les résidents pour l'aide offerte et l'agréable ambiance de travail.

DEDICACES

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

A mes chers parents, source de ma motivation, je voudrais vous remercier pour votre amour et votre générosité. Ce modeste travail est le fruit des sacrifices que vous avez déployés pour mon instruction, ma réussite et mon bien-être, aucune dédicace ne saurait exprimer l'amour et le respect que j'ai toujours eu pour vous. Puisse dieu vous accorder santé, une longue et heureuse vie.

A ma sœur et mes frères, pour leurs appuis et leurs encouragements, aucune expression ne pourrait résumer ma reconnaissance et mon amour à votre égard

Que dieu vous protège et vous offre un avenir plein de succès, bonheur du monde.

A la mémoire de mes grands- parents, de ma tante et mon cousin.

Que le bon Dieu les accueille dans son vaste paradis.

A mes oncles K.D, K.Y, K.M et mes tantes K.F, K.F Merci d'être toujours là pour moi.

A mon grand-père K.A et ma grand- mère H.Z pour leurs prières et leur soutien sans faille.

A toute ma famille.

A mes collègues de mémoire Dounia et Maissa, je vous souhaite tout le bonheur du monde.

A mes amies avec lesquelles que j'ai partagé de bons moments. J'espère que les meilleurs sont encore à venir.

BOUIRA Soumia

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

A mes parents, aucune expression ne pourrait traduire tout l'amour que je porte à votre égard,
sans qui je ne serai pas où j'en suis aujourd'hui,

A mon frère, mi precioso, les mots ne peuvent résumer ma reconnaissance et mon amour à ton
égard,

Que Dieu vous prête tous, une longue vie, de bonheur, de santé et de prospérité,

A mes grands-parents, qui ne sont plus, que dieu bénisse vos âmes et les accueille dans son
vaste paradis,

A Maissa et Soumia, mes collègues de mémoire, c'était un véritable plaisir de partager ce
mémoire avec vous, je vous souhaite beaucoup de bonheur et de réussite,

A tous mes amis particulièrement D.M et M.K, avec lesquels j'ai partagé mes moments de
joie et de bonheur. À toutes ces années futures de partage,

A toute ma famille, à ma grand-mère maternelle, pour leur encouragement durant toute ma
scolarité,

A tout ceux que je n'ai pas cité.

OUKACI Dounia

C'est avec grand bonheur et une vive émotion que je dédie cet humble travail

A mes parents, qui ont toujours cru en moi, qui m'ont poussé à donner le meilleur de moi-même et m'ont soutenu au fil des années sans faillir. Je ne les remercierai jamais assez pour tout ce qu'ils m'ont apporté, je leur adresse ma plus grande gratitude et tout mon amour.

A mes deux chers frères que j'aime tant, pour leur appui et leurs encouragements.

A mes fidèles amis qui ont toujours su me remonter le moral et être présent quand il le fallait.

A mes deux collègues Dounia et Soumia avec qui on a traversé toutes les difficultés avec persévérance et bonne humeur.

Que Dieu vous prête tous, une longue vie de bonheur, de santé et de prospérité.

OUMELLAL Maissa

TABLE DES MATIERES

Remerciements	
Dédicace	
Table des matières.....	i
Liste des abréviations et des acronymes.....	v
Liste des tableaux.....	vii
Liste des figures.....	ix
Introduction.....	1
Objectifs.....	2

PARTIE BIBLIOGRAPHIQUE

Chapitre I : La qualité en industrie pharmaceutique

1. La notion de qualité en industrie pharmaceutique.....	3
2. Le management de la qualité.....	4
3. L'Assurance de la qualité.....	4
4. Le contrôle qualité.....	5
5. Cadre réglementaire en termes de qualité.....	5
5.1. Les normes ISO.....	5
5.2. Les normes ICH.....	6
5.3. Les Bonnes Pratiques de Fabrication BPF.....	7

Chapitre II : Répaglinide

1. Définition.....	8
2. Propriétés.....	8
2.1. Propriétés physicochimiques.....	8

2.2. Propriétés pharmacologiques.....	9
2.2.1. Propriétés pharmacocinétiques.....	9
2.2.2. Propriétés pharmacodynamiques.....	10
3. Mécanisme d'action.....	10
4. Posologie et indications thérapeutiques.....	11
4.1. Posologie.....	11
4.2. Indications.....	13
5. Surdosage.....	13
5.1. Symptômes.....	14
5.2. Conduite à tenir.....	14

Chapitre III : Validation des procédures analytiques

1. Définition et objectifs de la validation analytique.....	15
1.1. Définition.....	15
1.2. Objectifs de la validation analytique.....	16
2. Critères de validation.....	16
2.1. Définitions des critères de validation.....	17
2.2. Choix des critères de validation.....	19
2.3. Protocoles de validation.....	20
3. Etude statistique de la validation analytique.....	23
3.1. Spécificité.....	23
3.2. Fonction de réponse.....	24
3.3. Alignement des observations.....	25
3.4. Prédiction inverses.....	27
3.5. Calcul de la justesse et de la fidélité.....	28
3.5.1. Modèle.....	28
3.5.2. Justesse.....	30
3.5.3. Fidélité.....	30
3.6. Calcul de l'exactitude.....	30

3.6.1. Erreur totale et profil d'erreur totale.....	31
3.6.2. Calcul de l'intervalle de tolérance.....	32
3.6.3. Etablissement du profil d'exactitude.....	33
3.6.4. Choix de la fonction de réponse.....	33
3.7. Linéarité.....	34
3.8. Limites de quantifications.....	34
3.9. Stabilité des solutions.....	34

PARTIE EXPERIMENTALE

Introduction.....	35
1. Matériel et méthodes.....	35
1.1. Matériel.....	35
1.1.1. Matières premières et réactifs.....	35
1.1.2. Appareillage et équipement.....	36
1.1.3. Verrerie.....	36
1.1.4. Autres.....	37
1.2. Méthodes.....	37
1.2.1. Méthodologie de la validation analytique.....	37
1.2.2. Choix du Protocol de validation.....	37
1.2.3. Optimisation de la méthode de dosage.....	38
1.2.4. Conditions chromatographiques de la méthode de dosage après optimisation.....	39
1.2.5. Préparation des solutions.....	39
2. Résultats et discussion.....	42
2.1. Choix des limites d'acceptabilité (λ).....	42
2.2. Choix de la probabilité de confiance (β).....	42
2.3. Estimation de la limite de quantification (LQ) et de la limite de détection (LD) et définition de l'intervalle de dosage.....	42

2.4. Résultats.....	44
2.4.1. Spécificité.....	45
2.4.2. Fonction réponse.....	46
2.4.3. Alignement des réponses et prédictions inverses.....	53
2.4.4. Justesse.....	55
2.4.5. Fidélité.....	56
2.4.6. Exactitude.....	57
2.4.7. Erreur totale.....	58
2.4.8. Calcul des limites de tolérances.....	58
2.4.9. Etablissement du profil d'exactitude.....	59
2.4.10. Intervalle de dosage.....	60
2.4.11. Linéarité de la justesse.....	60
3.Synthèse des résultats.....	63
Conclusion générale.....	64
Références bibliographiques	
Annexes	
Résumé	

Liste des abréviations et des acronymes

AFNOR : Association Française de Normalisation ;

AMM : Autorisation de Mise sur le Marché ;

AQ : Assurance Qualité ;

ATP : Adénosine-Tri-Phosphate ;

BPF : Bonnes Pratiques de Fabrication ;

CAPA : Corrective and Preventive Actions ;

Cmax : Concentration maximale ;

CQ : Contrôle Qualité ;

CTD : Common Technical Document ;

C18: Octadecylsilyle ;

GMP: Good Manufacturing Practices;

HbA1c : Hémoglobine Glyquée ;

HEPT : Hauteur Equivalente A Un Plateau Théorique ;

HPLC : Chromatographie En Phase Liquide A Haute Performance ;

ICH Q10: International Council for Harmonisation Pharmaceutical Quality System;

ICH Q2: International Council for Harmonisation Validation of Analytical Procedures;

ICH Q9: International Council for Harmonisation Quality Risk Management;

ISO: International Organization for Standardization;

LD : Limite de Détection ;

LQ : Limite de Quantification ;

M: Masse molaire;

MSE: Mean Square for the Error;

MSM: Mean Square for the Model;

Neff : Nombre De Plateaux Effectifs ;

NF : Norme Française ;

Nth : Nombre De Plateaux Théoriques ;

OMS : Organisation Mondiale De La Santé ;

PDCA: Plan, Do, Check, Act;

SE : Standards d'Etalonnage ;

SFSTP : Société Française Des Sciences Et Techniques Pharmaceutiques ;

SV : Standards de Validation ;

Tmax : Temps maximal ;

USP : United States Pharmacopeia ;

UV : Ultraviolet.

V/V : Volume à volume.

Liste de tableaux

Tableau I : Propriétés physico-chimiques du répaglinide.....	8
Tableau II : Tableau résumant les doses de répaglinide recommandées pour chaque population.....	12
Tableau III : Définitions des critères de validation analytique.....	17
Tableau IV : Caractéristiques à valider en fonction de la procédure analytique.....	19
Tableau V : Choix du nombre de standards d'étalonnage et de validation en fonction du protocole choisi.....	23
Tableau VI : Exemples de fonctions de réponses.....	25
Tableau VII : Règles d'alignement pour différentes fonctions de réponses.....	26
Tableau VIII : Calcul des prédictions inverses pour différentes fonctions de réponses.....	27
Tableau IX : Calcul des prédictions inverses pour la droite ayant subi une transformation logarithmique ou racine carrée.....	28
Tableau X : Matières premières et réactifs utilisés.....	35
Tableau XI : Matériel du laboratoire de chimie analytique utilisé dans le présent travail.....	36
Tableau XII : Hauteur des pics de répaglinide en fonction de sa concentration.....	42
Tableau XIII : Gamme de concentration de l'intervalle de dosage.....	44
Tableau XIV : Aires de pic du répaglinide obtenus à partir des SE et SV.....	46
Tableau XV : Résultats obtenus pour la fonction $y = ax + b$	47
Tableau XVI : Résultats obtenus pour la fonction $y = ax$	48
Tableau XVII : Résultats obtenus pour la fonction $\sqrt{y} = f(\sqrt{x})$	49

Tableau XVIII : Résultats obtenus pour la fonction $\ln y = f(\ln x)$	50
Tableau XIX : Critères de choix de la fonction de réponse.....	52
Tableau XX : Prédiction inverses obtenus avec les SV.....	54
Tableau XXI : Calcul de la justesse pour chaque niveau des SV.....	55
Tableau XXII : Calcul de la fidélité pour chaque niveau des SV.....	56
Tableau XXIII : Résultats du calcul de l'exactitude.....	57
Tableau XXIV : Calcul de l'erreur total absolue et de l'erreur totale relative.....	58
Tableau XXV : Calcul des intervalles de tolérance par niveau de concentration.....	59
Tableau XXVI : Vérification de la linéarité.....	61
Tableau XXVII : Caractéristiques de la droite de régression linéaire – linéarité de la méthode.....	62

Liste de figures

Figure 1 : La roue de Deming.....	5
Figure 2 : mécanisme d'action des glinides.....	11
Figure 3 : Logigramme permettant de sélectionner un protocole de validation.....	21
Figure 4 : Etapes de préparation de la gamme d'étalonnage et de validation du répaglinide.....	41
Figure 5 : Droite de régression : Hauteur du pic de répaglinide en fonction de la concentration en $\mu\text{g/ml}$	43
Figure 6 : Chromatogrammes du paramètre spécificité.....	45
Figure 7 : Courbe d'étalonnage obtenue pour la fonction $y = ax + b$	48
Figure 8 : Courbe d'étalonnage obtenue pour la fonction $y = ax$	49
Figure 9 : Courbe d'étalonnage obtenue pour la fonction $\sqrt{y} = f(\sqrt{x})$	50
Figure 10 : Courbe d'étalonnage obtenue pour la fonction $\ln y = f(\ln x)$	51
Figure 11 : Profil d'exactitude en considérant la régression linéaire $y = ax + b$	59
Figure 12 : Droite de régression linéaire : Concentration prédites = f (concentrations introduites).....	62

INTRODUCTION

Introduction

La mise au point et la validation de méthodes d'analyse utilisées en contrôle qualité se trouvent être aujourd'hui un enjeu majeur pour les laboratoires pharmaceutiques et représentent un pilier de l'assurance qualité. Utilisées principalement pour le dosage des principes actifs, elles servent aussi au dosage de traces lors de la recherche d'éventuelles contaminations de produits ou dans un but de validation de nettoyage. La validation se trouve donc être une étape intermédiaire indispensable avant utilisation de toute méthode analytique. [1] [2]

Pour se faire, il existe plusieurs protocoles à suivre avec entre autres celui proposé par les guides de la SFSTP qui constituent une approche claire, simple et harmonisée de la validation, tout en appliquant les recommandations réglementaires.

La première partie de cette thèse se compose de trois chapitres abordant respectivement la qualité et les diverses notions qu'elle implique, le répaglinide en tant que principe actif étudié, ainsi que la validation analytique comme démarche décisionnelle. Puis vient la seconde partie de l'étude qui est dédiée à l'aspect pratique du travail fait, englobant les équipements, les méthodes utilisées, ainsi que la description du protocole expérimental suivi lors de la mise au point de la méthode de dosage du répaglinide à l'état de trace dans les eaux de rinçage par HPLC. Pour finir, les résultats obtenus au terme de ce travail sont discutés puis synthétisés par une conclusion confirmant la validité de la méthode.

Le présent travail a été réalisé au niveau du Laboratoire de Chimie Analytique du Département de Pharmacie de la Faculté de Médecine, Université Mouloud MAMMERRI de Tizi-Ouzou.

OBJECTIFS

Objectifs

L'objectif de ce présent travail est de mettre au point et de valider une méthode analytique de dosage du répaglinide à l'état de traces par Chromatographie Liquide à Haute performance en utilisant le profil d'exactitude comme outil de décision et cela dans un but ultérieur de validation de nettoyage de verrerie. Cet outil décisionnel est décrit dans le guide de validation élaboré par une commission de la Société Française des Sciences Techniques et Pharmaceutiques (SFSTP), publié dans la revue STP Pharma Pratique en Janvier 2006.

PARTIE BIBLIOGRAPHIQUE

Chapitre I : La qualité en industrie pharmaceutique

Ces dernières décennies, l'industrie pharmaceutique a connu de nombreux scandales sanitaires qui ont mené à un renforcement de la réglementation et des exigences requises pour produire et commercialiser un médicament. Pour cette raison, les laboratoires mettent aujourd'hui un point d'honneur à maîtriser et assurer la qualité par la mise en place de politiques de gestion de la qualité basées sur les contrôles, l'organisation et les moyens décrits notamment par les bonnes Pratiques de Fabrication (BPF) ou Good Manufacturing practices (GMP).

1. La notion de qualité en industrie pharmaceutique :

Selon l'AFNOR (ISO 8402), la qualité est « l'ensemble des propriétés et caractéristiques d'un produit ou d'un service qui lui confère l'aptitude à satisfaire des besoins exprimés ou implicites d'un client ou des utilisateurs ».[1]

La norme ISO précise également qu'il s'agit de « l'aptitude d'un produit ou d'un service à satisfaire les besoins des utilisateurs ».[1]

Dans le domaine pharmaceutique, cette notion de qualité implique l'ensemble des facteurs qui contribuent à la sécurité, l'efficacité et l'acceptabilité des médicaments. Toute entreprise pharmaceutique a donc l'obligation de concevoir et de mettre en œuvre une politique de qualité dont le but est de garantir que les médicaments fabriqués présentent les spécificités requises. Ainsi, un médicament doit être avant tout sans danger pour le patient, efficace et assurer le confort du malade lors de son administration.[1]

Ce système ainsi mis en place couvre toutes les phases de développement du médicament : de sa conception à sa commercialisation.

Le maintien de la qualité des produits pharmaceutiques exige, entre autres :

- L'assurance du parfait état de propreté du matériel susceptible d'être en contact avec les produits durant le cycle de production
- La prévention des contaminations croisées.

2. Le management de la qualité

La norme ISO 9000, définit le management de la qualité comme « un ensemble d'activités coordonnées pour orienter et contrôler un organisme en matière de qualité ».

Selon les Bonnes Pratiques de Fabrication BPF, « la gestion de la qualité est un large concept qui couvre tout ce qui peut, individuellement ou collectivement, influencer la qualité d'un produit. Elle représente l'ensemble des mesures prises pour s'assurer que les médicaments fabriqués sont de la qualité requise pour l'usage auquel ils sont destinés. ». [2]

Le management de la qualité est un système d'organisation de l'entreprise incluant la qualité comme entité entière, il se base sur un ensemble de directives nécessaires à la maîtrise et à l'amélioration des divers processus d'une organisation et dont le but principal est de garantir la qualité du produit et accroître la satisfaction des clients au travers notamment de l'instauration de relations bénéfiques entre la direction, le personnel et le client ainsi que autres parties concernées (fournisseurs, institutions..). [3]

3. L'Assurance Qualité (AQ)

Selon la norme ISO 9000 : 2000, l'assurance de la Qualité est définie comme la « partie du management de la qualité visant à donner confiance en ce que les exigences pour la qualité seront satisfaites ». [2]

Elle constitue donc une démarche visant à se rapprocher au maximum du zéro défaut par la mise en place d'actions préventives et correctives (CAPA).

L'amélioration de la qualité est communément décrite comme un processus suivant un cycle, illustré par la roue de Deming, ou cycle PDCA.

Par PDCA, on entend :

- **Plan** : préparer, planifier ;
- **Do** : développer, réaliser, mettre en œuvre ;
- **Check** : contrôler, vérifier ;
- **Act** : agir, ajuster, réagir. [4]

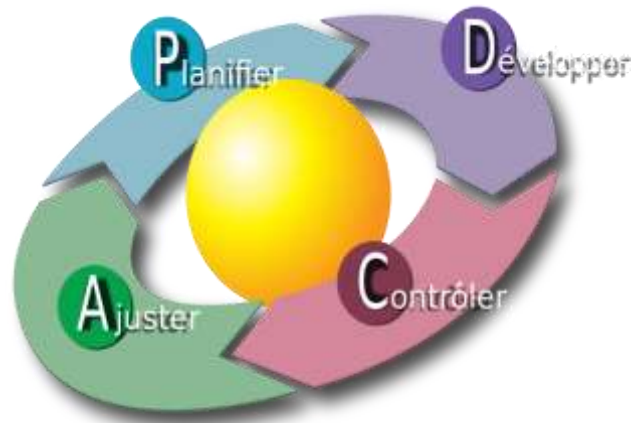


Figure 1 : La roue de Deming. [4]

4. Le Contrôle Qualité (CQ)

L'Organisation Mondiale de la Santé (OMS) définit le contrôle de la qualité, comme étant toute mesure prise incluant la mise au point de spécifications, l'échantillonnage, l'analyse, et le traitement des données analytiques, pour confirmer que les matières premières, les produits intermédiaires, les articles de conditionnement et le produit pharmaceutique sont conformes aux normes exigées.

Le contrôle qualité s'exerce à tous les stades des activités, il comprend le contrôle :

- Sur les matières premières et articles de conditionnement ;
- Sur le produit en cours de fabrication à différents stades de la fabrication ;
- Sur le produit fini par rapport aux spécifications déclarées dans le dossier d'AMM.

Afin de veiller à garantir l'objectivité du laboratoire de contrôle qualité, les fabricants se doivent de le séparer des autres départements et d'ainsi assurer l'indépendance de son personnel. [5]

5. Cadre réglementaire en termes de qualité

5.1. Les normes ISO

L'ISO (International Organization for Standardisation), en français, « Organisation Internationale de Normalisation » est une organisation non gouvernementale dont l'objectif

principal est de faciliter la coordination et l'unification internationale des normes industrielles. Les normes ISO sont élaborées par des comités techniques constitués d'experts appartenant aux secteurs industriels, techniques et économiques.

Dans le domaine de l'industrie pharmaceutique, les normes relatives aux bonnes pratiques de management de la qualité sont définies dans les séries ISO 9000 :2000 et ISO 9000 :2008. Il s'agit des normes ISO 9000, ISO 9001 et ISO 9004.

La norme ISO 9000 « Systèmes de management de la qualité - Principes essentiels et vocabulaire » définit les principes essentiels qui constituent la base du management de la qualité ainsi le vocabulaire utilisé dans toutes les normes de la famille ISO 9000.

La norme ISO 9001 « Système de management de la qualité - Exigences » : spécifie les exigences relatives à un système de management de la qualité auxquelles un organisme doit satisfaire afin d'améliorer la satisfaction des clients tout en fournissant des produits conformes à la réglementation en vigueur.

C'est un référentiel destiné à être utilisé pour une certification, aboutissant à un document certifiant que le système de management de la qualité d'un organisme est conforme à la norme.

La norme ISO 9004 « Systèmes de management de la qualité – Lignes directrices pour l'amélioration des performances » : cette norme porte sur l'amélioration continue des performances, elle donne des conseils plus étendus notamment sur l'efficacité et l'efficience d'un organisme, la satisfaction des clients et des autres parties intéressées mais ne constitue pas un cadre réglementaire pour la certification ou à des fins contractuelles. [2]

5.2. Les normes ICH

La Conférence internationale sur l'harmonisation des critères d'homologation des produits pharmaceutiques à l'usage de l'homme (ICH) est une structure internationale créée en 1990 par les autorités de réglementation pharmaceutique et les représentants pharmaceutiques de l'Union Européenne, du Japon et des Etats-Unis dans le but de définir les aspects techniques et scientifiques à appliquer pour l'enregistrement des médicaments. L'ICH est une initiative tripartite regroupant 17 pays à revenus élevés. A ce jour, elle a publié plus de 45 directives qui ont été élaborées par des groupes de spécialistes délégués par les autorités de réglementation pharmaceutique et par l'industrie pharmaceutique des pays membres de la Conférence.

La ligne directrice ICH Q10, plus précisément, propose un système de management permettant d'orienter et de contrôler une société pharmaceutique en matière de qualité. Il

introduit de façon formelle l'amélioration continue, l'engagement de la direction, la maîtrise des modifications, la maîtrise de la connaissance, et la gestion de la qualité.

L'ICH Q10 décrit les quatre éléments du système qualité :

- Performance des processus et système de suivi de la qualité du produit ;
- Actions correctives et actions préventives (CAPA) ;
- Système de gestion des changements ;
- Revue de direction de la performance des processus et de la qualité des produits. [6]

L'ICH Q9 « Quality Risk Management » décrit un modèle de gestion des risques liés à la qualité.

Quant à l'ICH Q8 « Pharmaceutical development », c'est une ligne directrice qui propose une description de la partie 3.2.P.2 (Développement Pharmaceutique) du Common Technical Document (CTD) en identifiant toutes les informations nécessaires afin de démontrer la connaissance des facteurs ayant un impact sur la qualité du produit. [7]

5.3. Les Bonnes Pratiques de fabrication BPF

Afin de garantir un produit de qualité, les établissements autorisés doivent produire des médicaments selon les bonnes Pratiques de Fabrication (BPF). Les BPF sont la traduction de leur équivalent américain, les Good Manufacturing Practice (GMP).

Elles donnent les directives à suivre pour garantir la qualité du produit.

Constitué de 9 chapitres, le texte des BPF est opposable et rassemble toutes les exigences qui doivent être appliquées par les industries pharmaceutiques :

- Gestion de la qualité ;
- Personnel ;
- Locaux et matériels ;
- Documentation ;
- Production ;
- Contrôle de la qualité ;
- Activités externalisées ;
- Réclamations et rappels de médicament ;
- Auto-inspections. [3]

Chapitre II : Répaglinide

1. Définition

Le répaglinide appartient à la famille des « glinides », qui sont des anti-diabétiques oraux apparentés aux sulfamides hypoglycémiant, utilisés dans la prise en charge du diabète de type 2.

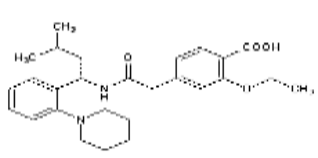
Leur action rapide abaisse fortement la glycémie en stimulant la sécrétion d'insuline par le pancréas et sont notamment efficaces dans la régulation des pics glycémiques prandiaux (liés aux repas).[8]

2. Propriétés

2.1. Propriétés physico-chimiques

Les propriétés physico-chimiques du répaglinide sont décrites dans le tableau I :

Tableau I : Propriétés physico-chimiques du répaglinide.[9]

Dénomination commune	Répaglinide
Nom chimique	Acide(+)-2-éthoxy- α [[<i>(S)</i> - α -isobutyl-o-piperidinobenzyl]carbamoyl]-p-toluique
Formule moléculaire	C ₂₇ H ₃₆ N ₂ O ₄ [10]
Masse moléculaire	452,6 g/mol
Formule développée [11]	
Aspect	Poudre de couleur blanche à blanc cassé.
Solubilité	Il est pratiquement insoluble dans l'eau, facilement soluble dans le méthanol et facilement soluble dans le chloroforme.
Ph	Le pH du répaglinide se situe entre 5,0 et 7,0.
Point de fusion	Il se situe entre 132 et 136 °C.
pKa	Ses valeurs de pKa sont les suivantes : pKa ₁ = 3,9 et pKa ₂ = 6,1. [9]

2.2. Propriétés pharmacologiques

2.2.1. Propriétés pharmacocinétiques

Absorption

Après son administration par voie orale, le répaglinide est rapidement et complètement absorbé au niveau du tractus gastro-intestinal.

La concentration plasmatique maximale (C_{max}) est atteinte en moins d'une heure (T_{max}) puis il est rapidement éliminé avec une demi-vie approximative d'une heure

L'administration concomitante de la nourriture avec le répaglinide diminue la disponibilité de ce dernier. [12]

Distribution

La pharmacocinétique du répaglinide est caractérisée par un faible volume de distribution, de 30 litres (en accord avec la distribution dans les liquides intracellulaires). Chez l'homme, le répaglinide se lie fortement aux protéines plasmatiques (plus de 98 %). [12]

Métabolisme

Après une administration orale ou IV, le répaglinide est complètement métabolisé par bio-transformation oxydative et par conjugaison directe avec de l'acide glucuronique.

Les métabolites principaux sont un acide dicarboxylique oxydé (M2), l'amine aromatique (M1) et l'acyl-glucuronide (M7).

Il a été démontré que le système enzymatique du cytochrome P-450, notamment le 2C8 et le 3A4, intervient dans la N-désalkylation du répaglinide en M2 et l'oxydation subséquente en M1. Les métabolites ne contribuent pas à l'effet hypoglycémiant du répaglinide. [12]

Élimination

Le répaglinide est éliminé en 4 à 6 heures du sang. La demi-vie d'élimination plasmatique est de 1 heure environ. Ses métabolites sont principalement excrétés par la bile. Une fraction très réduite (moins de 8 %) de la dose administrée apparaît dans les urines, principalement sous forme de métabolites. Moins de 1 % du médicament précurseur est retrouvé dans les fèces. [12]

2.2.2. Propriétés pharmacodynamiques

Les principaux effets pharmacodynamiques sont :

- Effet hypoglycémiant ; [13]
- Baisse l'HbA1c (l'hémoglobine glyquée) ; [13]
- Pas de données sur la réduction des événements cliniques (microvasculaires, macrovasculaire ou survie) ; [13]
- Doute sur une faible augmentation des accidents coronariens consécutifs à cette classe thérapeutique ; [8]
- Chez des patients diabétiques de type 2, la réponse insulinothèque à un repas survient 30 minutes après la prise orale d'une dose de répaglinide. [13]

3. Mécanisme d'action

Le répaglinide est un sécrétagogue oral. Il agit en stimulant la sécrétion d'insuline par les cellules β -pancréatiques (sécrétagogue) en inhibant des canaux potassiques au niveau de ces dernières. [6] Cette action est tributaire des cellules bêta fonctionnelles des îlots pancréatiques. La libération d'insuline est un effet gluco-dépendant, qui diminue de pair avec la glycémie. [14]

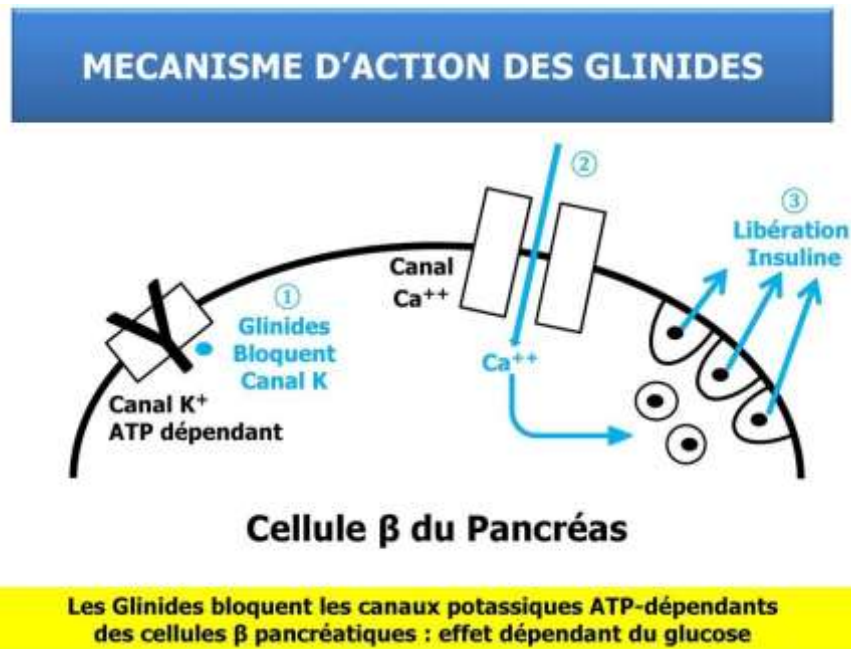


Figure 2 : Mécanisme d'action des glinides. [15]

Le répaglinide ferme les canaux potassiques ATP-dépendants de la membrane des cellules β via une protéine cible différente des autres sécrétagogues. Ce blocage des canaux potassiques dépolarise les cellules bêta, ce qui entraîne une ouverture des canaux calciques. L'afflux de calcium qui en résulte provoque la sécrétion d'insuline. [9] [14]

4. Posologie et indications thérapeutiques

4.1. Posologie

Le répaglinide est commercialisé sous différents dosages : comprimés de 0.5 mg, 1 mg et 2 mg. [14]

Il doit être administré avant les repas et sa posologie adaptée individuellement afin d'optimiser le contrôle glycémique (le taux d'hémoglobine glyquée est ainsi un bon indicateur de contrôle de la réponse du patient au traitement).

L'administration à court terme de répaglinide peut se révéler suffisante en cas de déséquilibre glycémique transitoire chez les diabétiques de type 2 habituellement bien contrôlés par le régime alimentaire.

Les doses de répaglinide recommandées pour chaque population sont résumées dans le tableau II suivant :

Tableau II : Tableau résumant les doses de répaglinide recommandées pour chaque population.[13]

<p>Population normale</p>	<p>Dose initiale</p> <p>La dose initiale recommandée est de 0,5 mg. Une période d'une à deux semaines doit être respectée avant de procéder à l'adaptation éventuelle des doses (déterminée par la réponse glycémique).</p> <p>Pour les patients antérieurement traités par un autre médicament antidiabétique oral, la dose initiale recommandée est de 1 mg.</p> <p>Dose d'entretien</p> <p>La dose unitaire maximale recommandée est de 4 mg, à prendre aux principaux repas.</p> <p>La dose journalière totale maximale ne doit pas excéder 16 mg.</p>
<p>Populations particulières</p>	<p>Patients âgés</p> <p>Aucune étude clinique n'a été réalisée chez les patients de plus de 75 ans.</p> <p>Insuffisants rénaux</p> <p>L'excrétion du répaglinide n'est pas affectée en cas d'altération de la fonction rénale.</p> <p>Comme la sensibilité à l'insuline est par ailleurs augmentée chez les patients diabétiques atteints d'insuffisance rénale, il est conseillé d'être prudent lors de l'adaptation des doses chez ces patients.</p> <p>Insuffisants hépatiques</p> <p>Aucune étude clinique n'a été réalisée chez les patients souffrant d'une insuffisance hépatique.</p> <p>Patients affaiblis ou dénutris</p>

<p>La posologie initiale et d'entretien doit être minimale et prudemment adaptée afin d'éviter les hypoglycémies.</p> <p>Patients prenant d'autres médicaments antidiabétiques oraux</p> <p>Aucun rapport de posologie précis n'existe entre le répaglinide et les autres médicaments antidiabétiques oraux lors du changement de traitement. La dose initiale maximale recommandée chez les patients passant à un traitement par répaglinide est de 1 mg.</p> <p>Le répaglinide peut être administré en association avec la metformine, lorsque cette dernière seule est insuffisante pour contrôler suffisamment la glycémie. Dans ce cas, la dose initiale de répaglinide est de 0,5 mg, l'adaptation de la dose s'effectue en fonction de la réponse glycémique, comme lors de la monothérapie.</p> <p>Population pédiatrique</p> <p>La sécurité et l'efficacité du répaglinide chez les enfants de moins de 18 ans n'ont pas été établies.</p>

4.2. Indications

- Le répaglinide est utilisé dans la prise en charge du diabète de type 2, lorsque les mesures hygiéno-diététiques (régime alimentaire, activité physique, perte de poids) sont insuffisantes pour contrôler la glycémie.
- Il est également utilisé en association avec la metformine, lorsque la prise de cet anti-diabétique ne suffit pas à réguler la glycémie. [16]

5. Surdosage

Le répaglinide a été administré avec une augmentation hebdomadaire des doses de 4 à 20 mg quatre fois par jour sur une période de 6 semaines. Aucun problème de sécurité ne s'est posé. Lors de cette étude, l'hypoglycémie était prévenue par augmentation de l'apport calorique. [13]

5.1. Symptômes

Un surdosage relatif peut se traduire par un effet hypoglycémiant exagéré avec apparition de symptômes d'hypoglycémie (vertiges, transpiration, tremblements, maux de tête...). [13]

5.2. Conduite à tenir

En cas de survenue de tels symptômes, le patient doit être traité en prenant des glucides par voie orale. Des hypoglycémies plus sévères avec convulsion, perte de connaissance ou coma doivent être traitées par administration intraveineuse de glucose. [13]

Chapitre III : Validation des procédures analytiques

La validation des procédures analytiques est une composante importante de l'assurance qualité en entreprise pharmaceutique, son rôle étant de garantir la fiabilité et l'acceptabilité des méthodes utilisées au sein de celle-ci.

Étant l'étape ultime avant la mise en exploitation d'une méthode analytique, la validation est une source de préoccupation majeure pour les analystes et les entreprises du médicament. Pour cette raison la commission de la SFSTP fournit aujourd'hui un ensemble de guides les aidant concrètement, en proposant une approche claire, simple et harmonisée de la validation et cela tout en appliquant les recommandations réglementaires. [17]

1. Définition et objectifs de la validation analytique

1.1. Définition

On peut définir la validation analytique comme la démarche visant à établir l'acceptabilité ou non d'une procédure analytique pour une application donnée, notamment en s'appuyant sur un profil d'exactitude basé sur la notion d'erreur totale comme préconisé par les guides de la SFSTP. [17]

Selon la norme NF en ISO / CEI 17025, la validation analytique est définie comme la « confirmation par examen et l'apport de preuves objectives du fait que les exigences particulières en vue d'une utilisation prévue déterminée sont remplies ». [18]

Le laboratoire d'analyse doit opérer une validation ou une revalidation dans les cas suivants :

- Toute méthode qu'il conçoit et / ou qu'il développe ;
- Toute méthode normalisée, modifiée ou employée en dehors de son domaine d'application prévu ;
- En cas de changement du procédé de synthèse ou de la composition du médicament. [19]

1.2. Objectifs de la validation analytique

L'utilisation de toute méthode analytique vise de façon générale à pouvoir quantifier le plus exactement possible chacune des quantités inconnues que l'on cherche à déterminer. En d'autres termes, les résultats fournis par la méthode doivent être tels que la différence, entre la valeur obtenue et la « vraie valeur » inconnue de l'échantillon, soit la plus petite possible.

En partant de ce principe, une méthode ne pouvant pas être absolument exacte, le rôle de la validation est donc de permettre aux laboratoires et aux autorités compétentes d'appréhender l'erreur totale et de minimiser le risque tant au niveau du producteur que du futur consommateur, cela en garantissant que la procédure validée fournira des valeurs suffisamment proches de la « vraie valeur » ou du moins comprise dans une limite acceptable.

A la lumière de ces objectifs, deux notions peuvent être dégagées :

- « suffisamment proche », signifiant que le résultat obtenu en routine sera à moins d'un pourcentage x de sa « vraie valeur » inconnue, le x étant définie selon une limite d'acceptation préétablie.
- « garanties », signifiant qu'il est très probable que les résultats de mesure obtenus en routine soient suffisamment proches de la vraie valeur inconnue. [17]

2. Critères de validation

Un ensemble de critères de validation sont couramment utilisés dans les laboratoires d'analyse et dont la nécessité de l'étude a fait l'objet d'un large consensus. Ces critères sont les suivants :

- spécificité-sélectivité ;
- fonction de réponse (courbe d'étalonnage) ;
- linéarité ;
- fidélité (répétabilité et fidélité intermédiaire) ;
- justesse ;
- exactitude ;
- limite de détection (LD) ;

- limite de quantification (LQ) ;
- intervalle de dosage ;
- sensibilité ;
- stabilité de l'analyte.

2.1. Définitions des critères de validation

Les définitions retenues dans ce manuscrit sont celles décrites dans le guide de validation de la SFSTP (démarche harmonisée). Le tableau III reprend les définitions des critères de validation analytique.

Tableau III : Définitions des critères de validation analytique. [17]

Critères :	Définitions :
Spécificité/ Sélectivité	« La spécificité d'une procédure analytique est sa capacité à établir de manière univoque l'existence de la substance à analyser en présence d'autres composants potentiellement présents ». Très souvent, la spécificité/sélectivité se fonde sur une absence d'interférences. Elle peut être démontrée par différents moyens. C'est ainsi qu'elle peut être inhérente à la technique (par exemple : identification par spectrométrie infrarouge ou spectrométrie de masse), elle peut être obtenue par séparation préalable (par exemple : chromatographie).
Fonction de réponse	« La fonction de réponse d'une procédure d'analyse traduit, à l'intérieur de l'intervalle de dosage, la relation existante entre la réponse (signal) et la concentration (quantité) en substance à examiner dans l'échantillon. La fonction de réponse monotone la plus simple qui exprime cette relation est appelée courbe d'étalonnage ».
Linéarité	« La linéarité d'une procédure d'analyse est sa capacité à l'intérieur d'un certain intervalle de dosage d'obtenir des résultats directement proportionnels à la quantité (exemple : concentration) en analyte dans l'échantillon ».
Justesse (biais)	« La justesse exprime l'étroitesse de l'accord entre la valeur moyenne obtenue à partir d'une série de résultats d'essais et une valeur qui est acceptée soit comme une valeur conventionnellement vraie, soit comme une valeur de référence acceptée ».

Fidélité	Répétabilité	« Conditions où les résultats d'essai indépendants sont obtenus par la même méthode sur des échantillons d'essai identiques dans le même laboratoire, par le même opérateur, utilisant le même équipement et pendant un court intervalle de temps ».
	Fidélité intermédiaire	« Conditions où les résultats d'essai indépendants sont obtenus par la même méthode sur des échantillons d'essai identiques dans le même laboratoire, avec différents opérateurs et utilisant des équipements différents et pendant un intervalle de temps donné ».
	Reproductibilité	« Conditions où les résultats d'essai sont obtenus par la même méthode sur des échantillons d'essais identiques dans différents laboratoires, avec différents opérateurs et utilisant des équipements différents ».
Exactitude		« L'exactitude exprime l'étroitesse de l'accord entre le résultat d'essai et la valeur de référence acceptée, aussi appelée « valeur conventionnellement vraie ». L'étroitesse de l'accord ainsi observée est la résultante de la somme des erreurs systématique et aléatoire, en d'autres termes l'erreur totale liée au résultat. Par conséquent, l'exactitude est l'expression de la somme de la justesse et de la fidélité.
Limite de détection		« La limite de détection d'une procédure d'analyse est la plus petite quantité de l'analyte dans un échantillon pouvant être détectée, mais non quantifiée comme une valeur exacte dans les conditions expérimentales décrites de la procédure ».
Limite de quantification		« La limite de quantification est la plus petite quantité de l'analyte dans un échantillon pouvant être dosée dans les conditions expérimentales décrites avec une exactitude définie ».
Intervalle de dosage		« L'intervalle de dosage d'une procédure d'analyse est la région entre les niveaux supérieur et inférieur (ces valeurs incluses) pour laquelle il a été démontré que la procédure est appropriée quant à son exactitude (justesse + fidélité) et sa linéarité, en utilisant la méthode décrite ».

Sensibilité	« La sensibilité d'une procédure d'analyse peut être définie comme étant le rapport de la variation de la réponse de la méthode d'analyse à la variation de la quantité d'analyte ».
Stabilité	<p>La stabilité de la substance à analyser doit être confirmée au terme de la validation de la procédure de dosage puisqu'elle conditionne la validité des autres critères. Le contrôle de la stabilité s'effectue le plus souvent, en fonction de l'intervalle de dosage.</p> <p>La stabilité est évaluée sur la base minimale de trois échantillons par mesure dans des conditions de conservation variées, telles que la lumière, l'obscurité, la température, le pH, etc...</p> <p>L'application, l'acceptabilité et l'interprétation des normes de stabilité restent à ce jour propres à chaque laboratoire.</p>

2.2. Choix des critères de validation

Les critères à valider dépendent de la nature de la méthode analytique utilisée. Le tableau IV résume les caractéristiques (de bases) requises au minimum pour une validation complète de la méthode. Cependant d'autres critères peuvent être exigés selon les référentiels du domaine concerné.

Tableau IV : Caractéristiques à valider en fonction de la procédure analytique [19]

Type d'analyse Caractéristique	Identification	Impuretés		Dosage Dissolution (mesure seulement) Teneur/activité
		Quantitat.	Teneur limite	
Exactitude	-	+	-	+
Précision	-	+	-	+
- Répétabilité	-			
- Précision Interméd	-	+(1)	-	+(1)
Spécificité (2)	+	+	+	+
Limite de détection	-	-(3)	+	-
Limite de dosage	-	+	-	-
Linéarité	-	+	-	+
Intervalle de dosage	-	+	-	+

- : Caractéristique qui n'est normalement pas évaluée.

+ : Caractéristique normalement évaluée.

(1) Si la reproductibilité est évaluée, il n'est pas nécessaire de déterminer la précision intermédiaire.

(2) Si la méthode est insuffisamment spécifique, cette déficience peut être compensée par la spécificité d'une ou de plusieurs autres épreuves complémentaires auxquelles l'échantillon est soumis.

(3) Parfois nécessaire.

2.3. Protocoles de validation

Le guide de la SFSTP propose plusieurs protocoles de validation. Le choix de la démarche se fait en fonction des contraintes ou des spécificités liées à la procédure de dosage.

Une bonne connaissance des performances de la méthode (limite de dosage, intervalle de dosage...) permettra de s'interroger directement sur la présence ou l'absence d'un effet matrice.

Dans le cas contraire, une prévalidation sera nécessaire.

Le logigramme de la figure 3 suivante représente la démarche proposée par le guide :

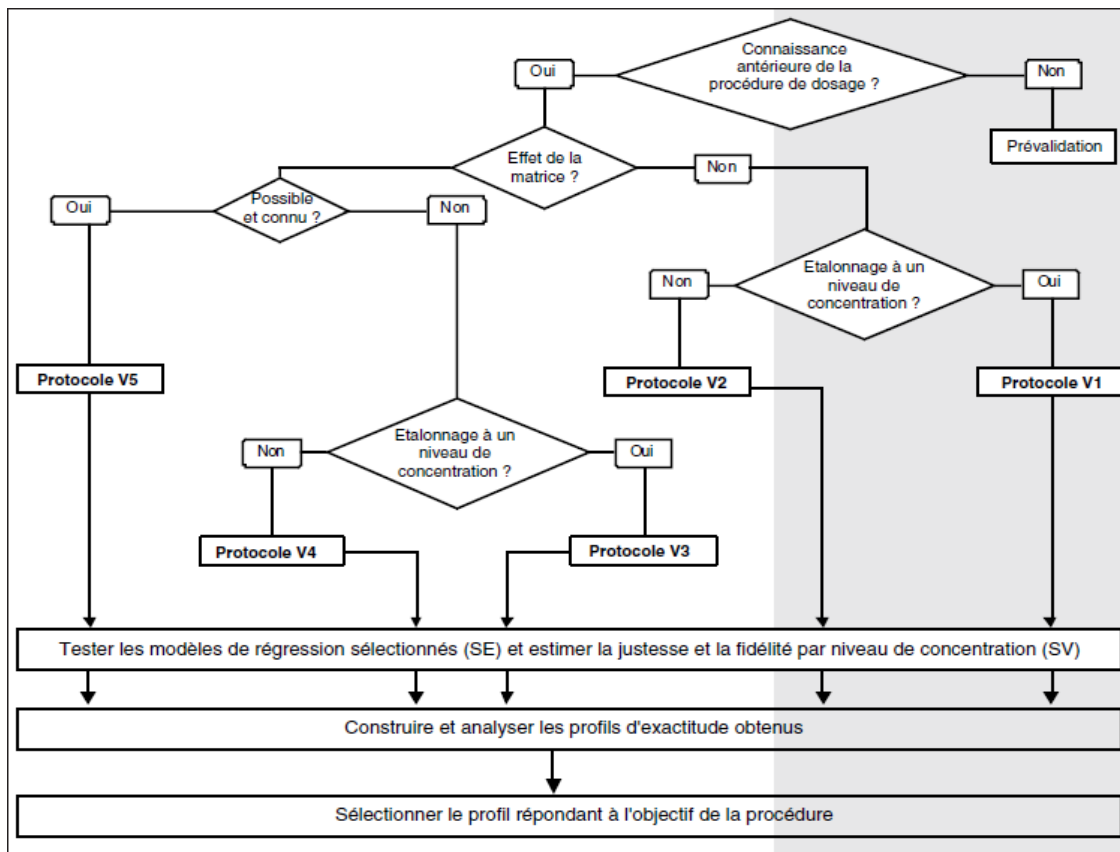


Figure 3 : Logigramme permettant de sélectionner un protocole de validation.

SE : standard d'étalonnage.

SV : standard de validation.

La phase de validation doit faire l'objet d'un rapport détaillé, les procédures devant être minutieusement décrites sous forme de mode opératoire standardisé. L'objectif de cette phase étant de :

- Démontrer la spécificité (sélectivité) ;
- Valider la fonction de réponse (ou modèle d'étalonnage utilisé en routine) ;
- Estimer la fidélité (répétabilité et fidélité intermédiaire) ;
- Estimer la justesse ;
- Estimer l'exactitude ;
- Valider les seuils de quantification ;

- Valider l'intervalle de dosage ;
- Vérifier la linéarité de la procédure analytique. [17]

A cette fin, deux gammes de solution sont à préparer :

Les standards d'étalonnage (SE) : Solutions de concentrations connues, préparées à partir de la substance à doser dans un milieu renfermant ou pas la matrice et ce, en fonction de l'absence ou la présence de cet effet matrice. Ces solutions **servent à tester les différentes fonctions de réponse** : Signal de l'équipement en fonction de la concentration (quantité) de la substance. [18]

Les standards de validation (SV) : solutions de concentrations connues, préparées obligatoirement avec la matrice car ils doivent simuler au mieux les futurs échantillons que la procédure analytique aura à quantifier. Elles ont pour but la **détermination de l'erreur totale de chaque niveau de concentration, le calcul de l'intervalle de tolérance et l'établissement le profil d'exactitude avec la détermination des limites inférieures et supérieures de quantification** (intervalle de dosage). [18]

Le tableau V présente les types de standards (SE et SV), les niveaux de concentration à utiliser en fonction du protocole de validation choisi, ainsi que le nombre total d'essais à réaliser pour valider la procédure analytique concernée :

Tableau V : Choix du nombre de standards d'étalonnage et de validation en fonction du protocole choisi. [18]

Standards	Niv. de conc.	Protocole				
		V1	V2	V3	V4	V5
SE. Etalonnage sans la matrice	Bas		2		2	
	Médian	2	2 ⁽²⁾	2	2 ⁽²⁾	
	Haut	2 ⁽¹⁾	2	2 ⁽¹⁾	2	
SE. Etalonnage avec la matrice	Bas				2	2
	Médian			2	2 ⁽²⁾	2 ⁽²⁾
	Haut Addit.			2 ⁽¹⁾	2	2 ⁽³⁾
SV. Validation avec la matrice	Bas	3	3	3	3	3
	Médian	3	3	3	3	3
	Haut	3	3	3	3	3
Nbre minimum séries		3	3	3	3	3
Nbre total essais (min.)		33	45	39	63	45

Note : Il est à souligner que dans le cas de la validation analytique des méthodes de dosage de traces de contaminants dans le cadre de la validation du nettoyage, une démarche allégée peut-être observée, elle consiste essentiellement à démontrer la spécificité de la méthode vis-à-vis des outils de nettoyage et de prélèvement ainsi que des surfaces à nettoyer et de calculer les limites de détection et de quantification qui doivent être inférieures aux limites d'acceptation (exprimées en unités de concentration). [17]

3. Etude statistique de la validation analytique

3.1. Spécificité

La spécificité peut être démontrée de deux manières :

- Soit par comparaison des réponses instrumentales obtenues à partir des solutions de placebo, de standard d'étalonnage et de standard de validation. La réponse de la solution placebo doit

être statistiquement nulle, celles des solutions standards (SE et SV) doivent être statistiquement comparables.

- Soit par comparaison de la droite de régression linéaire (réponse ; concentrations) obtenue à partir des standards de validation (avec matrice) avec celle obtenue à partir des standards d'étalonnage.

La comparaison des droites est basée sur le test t de Student selon une stratégie statistique qui permet la recherche d'effet matrice et/ou des erreurs systématiques en vérifiant la spécificité de la méthode.[18]

3.2. Fonction de réponse

Une fois les expériences réalisées et les données collectées, il convient tout d'abord de déterminer, sur la base des standards d'étalonnage (SE), la relation entre la réponse (signal ou réponse de l'instrument) Y et la quantité (concentration) X. Cette relation se caractérise à l'aide d'une fonction f qui doit être strictement monotone (strictement croissante ou décroissante) sur l'intervalle de dosage envisagé :

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

Où ε est l'erreur associée à la fonction de réponse f appelée communément erreur résiduelle. Il faut donc ajuster la fonction de réponse, c'est à- dire évaluer les paramètres du modèle, de manière que l'erreur résiduelle soit minimisée.

Différentes fonctions de réponse peuvent être envisagées lors de la validation de la méthode, comme illustré au tableau VI. Le choix dépend du type de méthode (méthode physicochimique, bio analytique, immuno-dosage, etc.). [20]

Tableau VI : Exemples de fonctions de réponses. [20]

Type	Equation	Paramètres/Parameters	Linéaire/Linear
Droite passant par l'origine/ Straight line through	$Y = \beta X$	β	oui/yes
Droite/Straight line	$Y = \alpha + \beta X$	α, β	oui/yes
Fonction quadratique/ Quadratic function	$Y = \alpha + \beta X + \gamma X^2$	α, β, γ	oui/yes
Fonction logistique à 4 paramètres/4-parameter logistic function	$Y = \alpha + \frac{\delta - \alpha}{1 + \left(\frac{X}{\gamma}\right)^\beta}$	$\alpha, \beta, \gamma, \delta$	non/no
Fonction logistique à 5 paramètres/5-parameter logistic function	$Y = \alpha + \frac{\delta - \alpha}{\left[1 + \left(\frac{X}{\gamma}\right)^\beta\right]^\psi}$	$\alpha, \beta, \gamma, \delta, \psi$	non/no

Très vraisemblablement, la plupart des méthodes physicochimiques auront recours à la droite (passant par 0 ou non). Pour les méthodes bio-analytiques, la fonction quadratique pourra être envisagée dans certains cas. Dans le cas d'un immuno-dosage, le choix se portera sur les fonctions logistiques à 4 ou 5 paramètres.

Des transformations mathématiques sont également envisageables. Par exemple, le logarithme népérien ou la racine carrée pourrait être appliqué à la concentration X ainsi qu'à la réponse Y. Il est cependant recommandé de n'appliquer ce type de transformation qu'avec les modèles linéaires du tableau VI.

3.3. Alignement des observations

Si, pour un niveau de concentration, les quantités introduites ne sont pas identiques pour toutes les séries (souvent pour de raisons de pesées qui doivent être indépendantes), il est indispensable de procéder à un alignement sur la concentration moyenne dès lors

qu'un calcul de variance doit être effectué (estimation de la répétabilité et de la fidélité intermédiaire).

Cela consiste à transformer les réponses observées ($y_{ijk} \rightarrow y_{ijk,c}$) afin de les aligner sur cette concentration moyenne. Cet alignement s'effectue par interpolation en ajoutant à la réponse observée la différence entre la valeur de la fonction de réponse considérée à la concentration moyenne et la valeur de cette fonction à la concentration introduite.

En validation, l'alignement s'applique aux réponses obtenues avec les échantillons de validation en utilisant les équations ou fonction de réponses obtenues avec les standards d'étalonnage. Ainsi l'alignement des n_{ij} répétitions du niveau de concentration j de la série i s'effectue comme suit :

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

Où : \bar{x}_{ij} : Moyenne des concentrations introduites du niveau j de la série i .

x_{ik} : Concentration introduite du niveau j de la série i répétition k .

Les différentes fonctions de réponse sont résumées dans le tableau VII suivant :

Tableau VII : Règles d'alignement pour différentes fonctions de réponses.
[20]

Fonction de réponse/Response function	Règle d'alignement/alignment rule
Droite passant par l'origine/Straight line through the origin	$y_{ijk,c} = y_{ijk} + \hat{\beta}_i [\bar{x}_{ij} - x_{ijk}]$
Droite/Straight line	$y_{ijk,c} = y_{ijk} + \hat{\beta}_i [\bar{x}_{ij} - x_{ijk}]$
Fonction quadratique/Quadratic function	$y_{ijk,c} = y_{ijk} + \hat{\beta}_i [\bar{x}_{ij} - x_{ijk}] + \hat{\gamma}_i [\bar{x}_{ij}^2 - x_{ijk}^2]$
Logistique à 4 paramètres/4-parameter logistic	$y_{ijk,c} = y_{ijk} + (\hat{\delta}_i - \hat{\alpha}_i) \left(\frac{1}{1 + \left(\frac{\hat{\gamma}_i}{\bar{x}_{ij}}\right)^{\hat{\beta}_i}} - \frac{1}{1 + \left(\frac{\hat{\gamma}_i}{x_{ijk}}\right)^{\hat{\beta}_i}} \right)$

3.4. Prédiction inverses

Après avoir choisi le modèle mathématique adéquat des concentrations en retour avec la fonction de réponse sont calculées.

Les prédictions inverses pour les différents modèles de régression s’obtiennent comme suit dans le tableau VIII :

Tableau VIII : Calcul des prédictions inverses pour différentes fonctions de réponses. [20]

Fonction de réponse/ Response function	Concentration calculée/ concentration calculated
Droite passant par l'origine/ Straight line through the origin	$x_{ijk,calc} = \frac{y_{ijk}}{\hat{\beta}_i}$
Droite/Straight line	$x_{ijk,calc} = \frac{y_{ijk} - \hat{\alpha}_i}{\hat{\beta}_i}$
Fonction quadratique/ Quadratic function	$x_{ijk,calc} = \frac{-\hat{\beta}_i + \sqrt{\hat{\beta}_i^2 - 4\hat{\gamma}_i(\hat{\alpha}_i - y_{ijk})}}{2\hat{\gamma}_i}$
Logistique à 4 paramètres/ 4-parameter logistic	$x_{ijk,calc} = \hat{\gamma}_i \left(\frac{\hat{\delta}_i - \hat{\alpha}_i}{y_{ijk} - \hat{\alpha}_i} - 1 \right)^{\frac{1}{\hat{\beta}_i}}$
Logistique à 5 paramètres/ 5-parameter logistic	$x_{ijk,calc} = \hat{\gamma}_i \left(\left(\frac{\hat{\delta}_i - \hat{\alpha}_i}{y_{ijk} - \hat{\alpha}_i} \right)^{\frac{1}{\hat{\psi}_i}} - 1 \right)^{\frac{1}{\hat{\beta}_i}}$

Si les observations ont été alignées, il faut remplacer les yijk par yijk,c dans le tableau précédent. [20]

Si une transformation a été utilisée il ne faut pas oublier d’effectuer la transformation inverse après ce calcul en retour (tableau IX). Par exemple, après une transformation

logarithmique ou racine carrée de la droite les concentrations calculées se font de la manière suivante :

Tableau IX : Calcul des prédictions inverses pour la droite ayant subi une transformation logarithmique ou racine carrée. [20]

Fonction de réponse/ Response function	Concentration calculée (logarithme)/ calculated concentration (logarithm)	Concentration calculée (racine carrée)/ calculated concentration (square root)
Droite/Straight line	$x_{ijk,calc} = e^{\frac{\ln(y_{ijk}) - \hat{a}_i}{\hat{b}_i}}$	$x_{ijk,calc} = \left(\frac{\sqrt{y_{ijk}} - \hat{a}_i}{\hat{b}_i} \right)^2$

3.5. Calcul de la justesse et de la fidélité

3.5.1. Modèle

La justesse d'une méthode analytique exprime l'étroitesse de l'accord entre la moyenne des résultats d'essai avec la méthode et la valeur de référence acceptée, aussi appelée valeur conventionnellement vraie. [20]

L'estimation de la justesse et de la fidélité de la méthode s'effectue avec les concentrations calculées provenant des standards de validation en phase de validation. Cette estimation est réalisée à chacun des j niveaux de concentration considérés à l'aide du modèle statistique suivant :

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

Où

- X_{ijk} est la k-ième concentration calculée du niveau j de la i-ème série.
- μ_j est la moyenne des concentrations calculées du niveau de concentration j.
- α_{ij} est au niveau j l'écart entre la moyenne de la i-ème série et la moyenne μ_j ; α_{ij} est considéré comme une variable aléatoire ayant une distribution normale de moyenne 0 et de variance $\sigma_{B,j}^2$.
- ε_{ijk} est l'erreur expérimentale, considérée comme une variable aléatoire ayant une distribution normale de moyenne 0 et de variance $\sigma_{W,j}^2$.

L'erreur expérimentale est supposée indépendante de la série.

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

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

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

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

Où :

MSM_j et MSE_j : maximum des vraisemblances pour chaque niveau de concentration j.

$\bar{x}_{ij,calc}$: moyenne des concentrations calculées du niveau j de la série i.

$\bar{x}_{j,calc}$: moyenne des concentrations calculées du niveau j.

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

n : nombre de répétitions.

p : nombre de série.

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

Si $MSE_j < MSM_j$ alors :

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

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

Sinon :

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

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

3.5.2. Justesse

La justesse (ou le biais) de la méthode au niveau de concentration est obtenue en calculant la différence entre la moyenne arithmétique des concentrations introduites et la moyenne des concentrations calculées. [20]

Le biais peut s'exprimer en termes absolu, relatif ou de recouvrement par rapport aux quantités introduites, comme suit :

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

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

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

Où :

$\hat{\mu}_j$: moyenne des concentrations calculées du niveau j.

\bar{x}_j : moyenne des concentrations introduites du niveau j.

3.5.3. Fidélité

L'estimation de la variance intra-série donne une estimation de la variance de répétabilité tandis que la somme des estimations des variances intra et inter-série donne une estimation de la variance de fidélité intermédiaire : [20]

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

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

3.6. Calcul de l'exactitude

L'exactitude d'un résultat exprime l'étroitesse de l'accord entre le résultat d'essai et la valeur de référence acceptée, elle est donnée pour chaque mesure :

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

Avec X : le résultat d'essai

μ : la valeur de référence acceptée

- Pour chaque modèle et chaque observation, l'exactitude relative est calculée comme suit :

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

- Le calcul de l'erreur maximale relative pour chaque modèle sur l'ensemble des séries permet de choisir la fonction de réponse qui donne les résultats les plus exacts. [20]

3.6.1. Erreur totale et profil d'erreur totale

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

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

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

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

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

Cette erreur totale, comme indiqué ci-dessus, est la somme de la justesse (biais) et de la fidélité. [20]

3.6.2. Calcul de l'intervalle de tolérance

Ce qui est important en validation, ce n'est pas la validité des résultats obtenus avec l'Erreur Totale, mais plutôt la garantie ou une représentation de ce que la même procédure analytique pourra donner comme résultats dans le futur, C'est le rôle de l'intervalle de Tolérance. [20]

L'estimation des paramètres de justesse et de fidélité $u_j, \hat{\sigma}_{B,j}, \hat{\sigma}_{r,j}$ pour chaque niveau de concentration j est une étape intermédiaire, elle a pour but de permettre d'estimer la proportion attendue d'observation dans les limites d'acceptation prédéfinie $[-\lambda, +\lambda]$.

L'intervalle de tolérance est calculé pour chaque niveau de concentration envisagé avec les standards de validation. Il représente le pourcentage des résultats dont la différence entre la valeur déterminée X et la valeur vraie V est inférieure, en valeur absolue à λ . [20]

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

$$E \hat{\mu}_M \hat{\sigma}_M \{P_x [\hat{\mu}_M - k \hat{\sigma}_M < x < \hat{\mu}_M + k \hat{\sigma}_M \mid \hat{\mu}_M, \hat{\sigma}_M]\}$$

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

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

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

$$v = \frac{(R + 1)^2}{\frac{\left(R + \frac{1}{n}\right)^2}{P - 1} + \frac{1 - \frac{1}{n}}{P_n}}$$

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

Avec :

n : nombre de répétitions ;

p : nombre de séries ;

v : degré de liberté ;

β : (β – expectation tolerance interval) ;

Q_t : quantile β de la distribution t de Student à ν degrés de liberté.

Le même intervalle en échelle relative devient :

$$\left[\text{biais } (\%)_J - Q_t \left(\nu; \frac{1+\beta}{2} \right) \sqrt{1 + \frac{1}{P_n B_j^2}} \text{ CV}_{F,I,j} ; \text{biais } (\%)_J + Q_t \left(\nu; \frac{1+\beta}{2} \right) \sqrt{1 + \frac{1}{P_n B_j^2}} \text{ CV}_{F,I,j} \right]$$

3.6.3. Etablissement du profil d'exactitude

Le profil d'exactitude est obtenu en reliant entre elles les bornes supérieures puis les bornes inférieures de l'intervalle de tolérance.

$$L_j = \text{biais } (\%)_j - Q_t \left(\nu; \frac{1+\beta}{2} \right) \sqrt{1 + \frac{1}{P_n B_j^2}} \text{ CV}_{F,I,j}$$

$$U_j = \text{biais } (\%)_j + Q_t \left(\nu; \frac{1+\beta}{2} \right) \sqrt{1 + \frac{1}{P_n B_j^2}} \text{ CV}_{F,I,j}$$

Si cet intervalle de tolérance est totalement inclus dans les limites $[-\lambda, +\lambda]$, alors la proportion attendue de résultats dans les limites d'acceptation sera supérieure ou égale à β . [20]

3.6.4. Choix de la fonction de réponse

Le profil d'exactitude permet de retenir les fonctions de réponse dont l'intervalle de tolérance est inclus dans les limites d'acceptation choisies. De plus, la fonction de réponse la plus simple est choisie (Exemple : fonction linéaire simple ou passant par zéro). [18]

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

3.7. La linéarité

La linéarité d'une procédure d'analyse est sa capacité à l'intérieur d'un certain intervalle de dosage d'obtenir des résultats directement proportionnels à la quantité (ex : concentration) en analyte dans l'échantillon. Rappelons que l'exigence de linéarité s'applique aux résultats (concentration calculée = f (concentration introduite)), pas aux réponses (signal = f (concentration introduite)). [20]

3.8. Limites de quantifications

Les limites de quantifications représentent les valeurs extrêmes qui peuvent être quantifiées avec une exactitude définie. Elles sont obtenues par intersection entre le profil d'exactitude et les limites d'acceptation définissant les limites de quantification basse et haute de la procédure. Entre ces deux limites, il y a bien sûr l'intervalle de dosage. [20]

3.9. Stabilité des solutions

La stabilité des solutions ne fait pas partie des critères de validation, cependant il est nécessaire de l'évaluer durant la phase de validation car elle permet de définir les conditions et la durée de stabilité des différentes solutions analysées.

Les solutions concernées par l'étude sont ;

- Solution standard : SE 100 %.
- Solution échantillon : SV 100%.

La durée de l'étude est de 3 à 7 jours, elle correspond à la durée moyenne d'une validation analytique. Cette étude se fait dans différentes conditions, sans être exhaustive, voici des exemples des conditions qui peuvent être appliquées pour une analyse HPLC

- Stabilité dans le passeur échantillon.
- Stabilité à température ambiante.
- Stabilité au réfrigérateur (2 – 8 °C) dans les conditions de congélation. [20]

PARTIE EXPERIMENTALE

Partie expérimentale

L'objectif du présent travail est de mettre au point et valider une méthode de dosage du répaglinide à l'état de traces dans les eaux de rinçage par Chromatographie Liquide Haute performance (HPLC).

Cette étude a été réalisée au sein du laboratoire de chimie analytique du Département de pharmacie de Tizi-Ouzou, et cela conformément au protocole de validation analytique décrit dans le guide de validation élaboré par la commission de la Société Française des Sciences et Techniques Pharmaceutique (SFSTP) publié dans la revue STP pharma pratique en janvier 2006.

1. Matériel et méthodes

1.1. Matériel

1.1.1. Matières premières et réactifs

Tableau X : Matières premières et réactifs utilisés

Matières premières et réactifs	Spécification
Solution de répaglinide	C = 800 ug /ml fournie par le laboratoire Aldaph spa NOVONORDISK
Eau pure	/
Méthanol LiChrosolv grade HPLC	M= 32.04 g/mol, Pureté > 99.9%
Acétonitrile Honeywell Riedel-de Haen grade HPLC	M= 41.05 g/mol, Pureté > 99.9%
Acide chlorhydrique BIOCHEM Chemopharma	M= 36.46 g/mol, Pureté= [35% ; 38%]
Acide phosphorique Honeywell Fluka	M= 98 g/mol, Pureté= [85% ; 88%]
Dihydrogénophosphate d'ammonium NH₄H₂PO₄ BIOCHEM Chemopharma	M= 115.03 g/mol, Pureté= [98% ; 101%]

Partie expérimentale

1.1.2. Appareillage et équipement

Tableau XI : Matériel du laboratoire de chimie analytique utilisé dans le présent travail.

Désignation		Spécification	Usage
Appareil HPLC (SHIMADZU LC20)	Pompe	LC 20 AT	Analyse des solutions et obtention des chromatogrammes
	Injecteur automatique	SIL 20 A	
	Contrôleur	CBM- 20	
	Compartiment de la colonne	CTO-20 A	
	Colonne	C18 (15cm, 4.6mm, 5 μ m)	
	Détecteur	Détecteur spectrophotométrique UV visible SPD-20AV	
	Logiciel d'exploitation	LC-solution	
Purificateur de l'eau		Human power I	Purification de l'eau
pH-mètre		METLER TOLEDO AG	Mesure du Ph
Bain ultrason : sonicateur		Advantage-LAB	Dissolution
Agitateur magnétique		STUART	Homogénéisation des solutions
Balance de précision		OHAUS PIONEER PA213	Pesée
Etuve		MEMMERT	Séchage

1.1.3. Verrerie

- Bêchers ;
- Fioles jaugées de 20 ml, 500 ml et 1000 ml ;
- Pipettes jaugées de 1 ml, 5 ml, 10 ml ;
- Eprovettes graduées ;
- Verre de montre ;

Partie expérimentale

- Entonnoir.

1.1.4. Autres

- Spatule ;
- Pissettes à eau ;
- Poires ;
- Barreaux magnétiques ;
- Compte-gouttes.

1.2. Méthodes

1.2.1. Méthodologie de la validation analytique

Ce présent travail est basé sur les recommandations du guide de la commission SFSTP publiées en 2003 complétées en 2006 qui propose un protocole expérimental harmonisé en distinguant notamment les règles de diagnostic et les règles de décision. Ces dernières reposent sur l'utilisation du profil d'exactitude, basé sur la notion d'erreur totale (biais + écart type), permettant de simplifier l'approche de la validation d'une procédure analytique tout en contrôlant le risque associé à son utilisation.

1.2.2. Choix du Protocol de validation

Selon le logigramme de la figure 03 mentionné à la page 21 et compte tenu de l'absence de l'effet matrice démontré à la suite de la comparaison des chromatogrammes du blanc et du standard, le protocole choisi est le V2 qui consiste à préparer ;

Trois séries du standard d'étalonnage (SE) : Chaque série comporte 5 niveaux de concentration avec deux répétitions par niveau.

Trois séries du standard de validation (SV) : Chaque série comporte 5 niveaux de concentration avec trois répétitions par niveau.

Partie expérimentale

1.2.3. Optimisation de la méthode de dosage

A partir des données de la monographie du répaglinide fournies par l'USP, nous avons optimisé un processus analytique pour le dosage du répaglinide à l'état de traces par HPLC-UV/Visible et cela après plusieurs essais et modifications. Le détail de cette optimisation est présenté dans ce qui suit.

Étape 1 : application de la procédure analytique de l'USP.

- **Solutions**

Tampon pH=4 : 2g/l de dihydrogénophosphate d'ammonium, ajusté à pH=4.

Tampon pH=2.5 : 2g/l de dihydrogénophosphate d'ammonium, ajusté à pH=2.5.

Diluant : méthanol + tampon (pH= 4) (7:3).

Phase mobile : méthanol + tampon (pH= 2.5) (7:3).

- **Conditions chromatographiques**

-Colonne :

Longueur : 15 cm.

Diamètre : 4,6 mm.

Taille des particules : 5 µm.

Phase stationnaire : Gel de silice octadecylsilyle (C18).

-Température : 40°C.

-Système de détection : Spectrophotomètre UV-Visible ; longueur d'onde $\lambda = 245$ nm.

-Volume injecté : 20 µl.

- Débit : 1 ml/min.

- **Résultats**

À la suite de ce premier essai, nous avons obtenu les résultats suivants :

- Un Temps de rétention de 10 min ;

- Une discordance entre les aires des pics de la gamme étalon et celles de la gamme de validation.

Partie expérimentale

Étape 2 : Optimisation de la méthode

- Afin de réduire le temps de rétention, on a procédé à la modification de la phase mobile par l'ajout d'une proportion d'acétonitrile dans le but d'obtenir une phase plus apolaire et à l'augmentation de débit en passant de 1 ml/min à 1.2 ml/min.
- Pour résoudre le problème de discordance des résultats entre les SE et les SV, on a fait le choix de changer la composition du diluant en substituant de tampon pH=4 par une solution d'HCl 2.10^{-3} M.

- **Résultats post-optimisation**

Après adoption des modifications, on a obtenu un temps de rétention plus court, avoisinant les 8 minutes ainsi que la correction de la discordance précédemment évoquée.

1.2.4. Conditions chromatographiques de la méthode de dosage après optimisation

-Colonne :

Longueur : 15 cm.

Diamètre : 4,6 mm.

Taille des particules : 5 μ m.

Phase stationnaire : Gel de silice octadecylsilyle (C18).

-Détection : Spectrophotomètre UV-Visible : longueur d'onde $\lambda = 245$ nm.

-Volume injecté : 20 μ l.

-Débit : 1,2 ml/min.

-Température : 40°C.

1.2.5. Préparation des solutions

- **Préparation de la solution tampon pH 2,5 :** Peser 1 g de Dihydrogénophosphate d'ammonium $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$ dans une fiole de 500 ml, compléter au trait de jauge avec de l'eau pure. Ajuster le pH à 2,5 avec de l'acide phosphorique dilué.

Partie expérimentale

- **Préparation de la phase mobile :** Méthanol/Tampon pH = 2,5/Acétonitrile (50/ 30/ 20 V/V/V).
- **Préparation de la solution HCl 2.10^{-3} M :** Dans une fiole jaugée de 500 ml, on dépose 1 ml de la solution mère HCl 12.06 M qu'on complète avec de l'eau pure jusqu'au trait de jauge, on obtient alors une solution HCl $2,4.10^{-2}$ M, à laquelle on fait une dilution de 50/500 (1/10) pour obtenir la concentration finale de $2,4.10^{-3}$ M.
- **Préparation du diluant (HCl Méthanolique 10^{-3} M) :** Méthanol / HCL 2.10^{-3} M (50/50 Volume/Volume).
- **Préparation du diluant + matrice :** HCl Méthanolique/ Eau pure (50/50 Volume/Volume).
- **Préparation de la solution mère (10 μ g/ml) :** Dans une fiole de 20 ml, on dépose 1ml de la solution stock (800 μ g/ml) et on complète au trait de jauge avec de l'eau pure. On obtient ainsi une solution à 40 μ g/ml (dilution 1/20).
A partir de cette dernière, on prend 5 ml qu'on dépose dans une fiole de 20 ml puis on complète au trait de jauge avec de l'eau pure. On obtient donc une solution de 10 μ g/ml (dilution $\frac{1}{4}$).
- **Préparation du standard étalon et du standard de validation :**
Chaque jour, pendant 03 jours, 05 niveaux de concentration sont préparés à raison de 02 répétitions pour le standard étalon et 03 répétitions pour le standard de validation.

Solution standard 400% : Dans une fiole de 20 ml, on dépose 5 ml de la solution mère (10 μ g/ml) et on complète au trait de jauge (diluant pour le standard étalon et diluant + matrice pour le standard de validation).

On obtient ainsi une dilution $\frac{1}{4}$.

Solution standard 200% : Dans une fiole de 20 ml, on dépose 10 ml de la solution standard 400% (2.5 μ g/ml) et on complète au trait de jauge (diluant pour le standard étalon et diluant + matrice pour le standard de validation).

Partie expérimentale

On obtient ainsi une dilution $\frac{1}{2}$.

Solution standard 100% : Dans une fiole de 20 ml, on dépose 10 ml de la solution standard 200% ($1.25 \mu\text{g/ml}$) et on complète au trait de jauge (diluant pour le standard étalon et diluant + matrice pour le standard de validation).

On obtient ainsi une dilution $\frac{1}{2}$.

Solution standard 50% : Dans une fiole de 20 ml, on dépose 10 ml de la solution standard 100% ($0.625 \mu\text{g/ml}$) et on complète au trait de jauge (diluant pour le standard étalon et diluant + matrice pour le standard de validation).

On obtient ainsi une dilution $\frac{1}{2}$.

Solution standard 25% : Dans une fiole de 20 ml, on dépose 10 ml de la solution standard 50% ($0.3125 \mu\text{g/ml}$) et on complète au trait de jauge (diluant pour le standard étalon et diluant + matrice pour le standard de validation).

On obtient ainsi une dilution $\frac{1}{2}$.

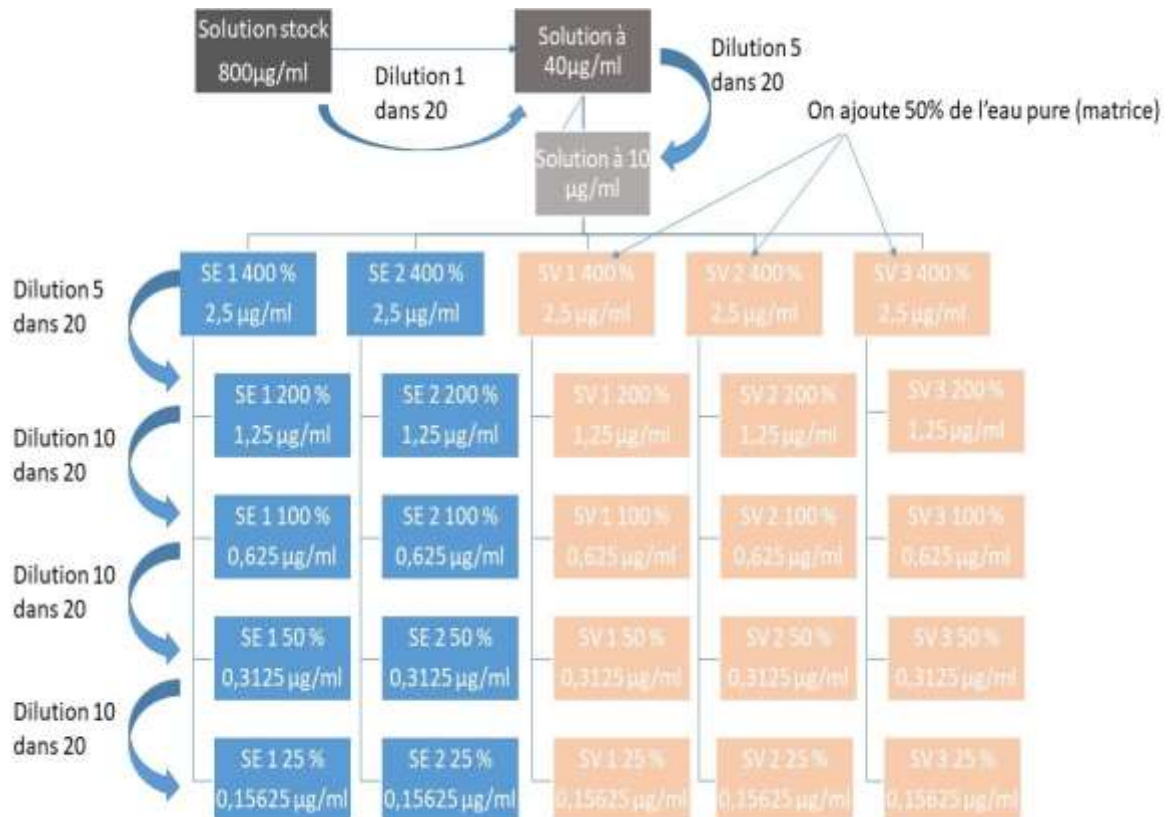


Figure 4 : Etapes de préparation de la gamme d'étalonnage et de validation du ropinirole.

Partie expérimentale

2. Résultats et discussion

2.1. Choix des limites d'acceptabilité (λ)

S'agissant d'un dosage à l'état de traces (concentrations très faibles), la limite d'acceptabilité λ est retenue à $\pm 5\%$.

2.2. Choix de la probabilité de confiance (β)

$\beta = 95\%$, ceci signifie que dans l'application en routine de la méthode, plus de 95% des résultats futurs seront compris dans l'intervalle d'acceptabilité $\pm 5\%$.

2.3. Estimation de la limite de quantification (LQ) et de la limite de détection (LD) et définition de l'intervalle de dosage

La LQ et la LD sont déterminées à partir de la gamme d'étalonnage, en traçant la droite de régression : Hauteur du pic de répaglinide en fonction de sa concentration à partir des données du tableau XII.

Tableau XII : Hauteur des pics de répaglinide en fonction de sa concentration.

Dosage du répaglinide par HPLC	
C en $\mu\text{g/ml}$	Hauteur du pic
2,5	3676
2,5	3661
2,5	3668
5	7620
5	7588
5	7592
10	15243
10	15224
10	15204
20	30505
20	30507
20	29602
40	59582
40	59628
40	59529
80	126782
80	126779
80	126885

Partie expérimentale

L'équation de la droite $y = a x + b$ est définie, avec :

y : Hauteur de pic du répaglinide.

x : Concentration du répaglinide en $\mu\text{g/ml}$.

La LQ et la LD sont ensuite calculées selon les deux formules données par le guide ICH Q2(R1), suivantes :

$$LQ = \frac{10\sigma_b}{a}$$

$$LD = \frac{3.3\sigma_b}{a}$$

a : étant la pente de la droite.

σ_b : l'erreur de l'ordonnée à l'origine

La droite de régression obtenue est représentée dans la figure 5 suivante :

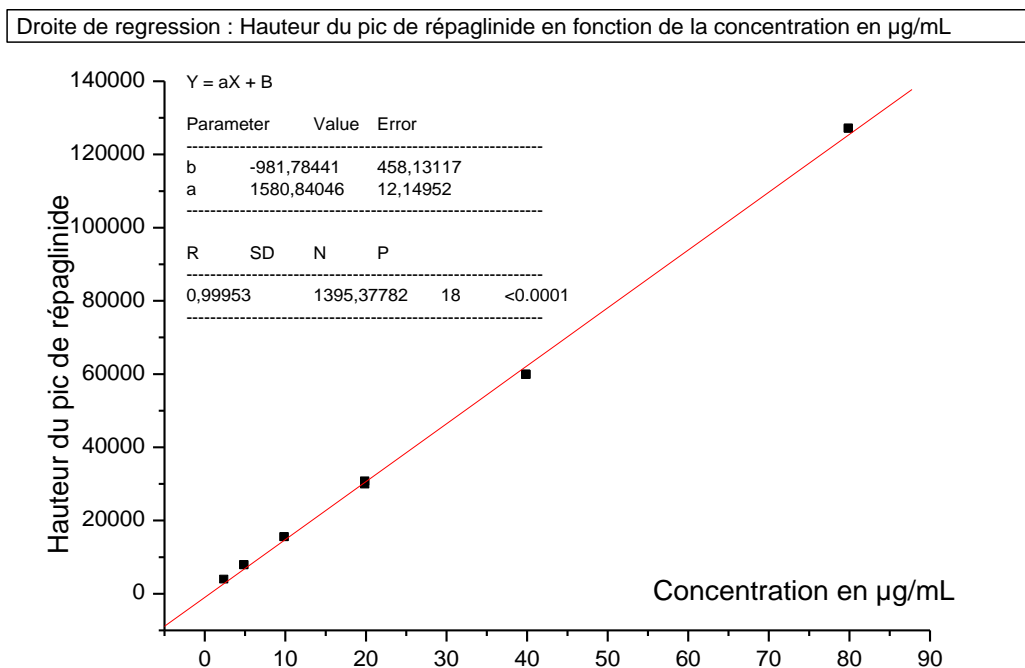


Figure 5 : Droite de régression : Hauteur du pic de répaglinide en fonction de la concentration en $\mu\text{g/ml}$.

Partie expérimentale

- **Estimation des limites de détection et de quantification**

$$LD = \frac{3.3\sigma_b}{a} = 3.3 \times 458,13 / 1580,84 = 0,956 \mu\text{g/ml.}$$

$$LQ = \frac{10\sigma_b}{a} = 10 \times 458,13 / 1580,84 = 2,9 \mu\text{g/ml.}$$

- **Intervalle de dosage pour l'étape de validation**

Pour des raisons de dilution liées à la solution de travail (dernière concentration de la gamme d'essai est de 2,5 $\mu\text{g/ml}$) nous avons volontairement abaissé la limite de détection de la méthode à 0,625 $\mu\text{g/ml}$ (soit une dilution $\frac{1}{4}$ de la solution à 2,5 $\mu\text{g/ml}$).

La limite de détection estimée pour notre étape de mise au point est de 0,625 $\mu\text{g/ml}$ qui correspondra une concentration cible de 100% pour l'étape de validation du répaglinide à l'état de traces.

La gamme de concentration est définie sur un intervalle large de concentration allant de 25% à 400% de la concentration cible comme suit dans le tableau XIII :

Tableau XIII : Gamme de concentration de l'intervalle de dosage.

[C] en %	25	50	100	200	400
[C] en $\mu\text{g/mL}$	0,15625	0,3125	0,625	1,25	2,5

2.4. Résultats

La technique de dosage utilisé dans notre travail est la Chromatographie Liquide à Haute Performance « HPLC » (Annexe I).

- **Préparation de la feuille de calcul**

En utilisant le logiciel Excel de Microsoft office 2019 enregistré, installé sur le système d'exploitation Windows 10 authentique.

L'ensemble des équations rentrant dans l'étude statistique de la validation et la construction du profil d'exactitude sont introduites dans un tableur, pour avoir les résultats complets en tableaux et en graphes si nécessaires juste en introduisant les données brutes en termes de prises d'essais et de leurs réponses instrumentales

Partie expérimentale

2.4.1. Spécificité

L'évaluation de la spécificité est faite par la comparaison du chromatogramme d'un SE et un SV d'un même niveau de concentration (niveau 100%) ainsi que celui de la solution placebo et diluant non chargé de PA sont présentés dans la figure 6.

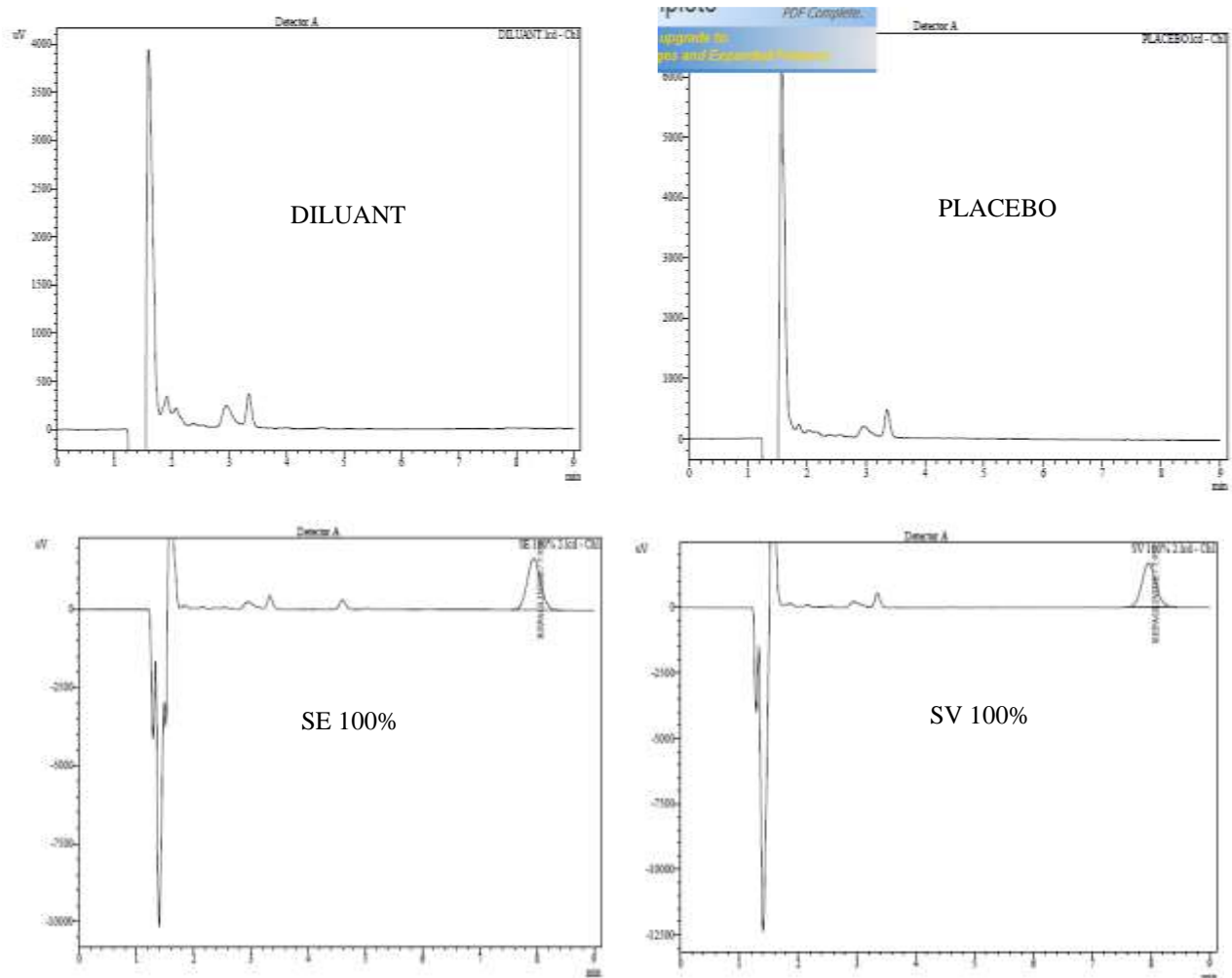


Figure 6 : Chromatogrammes du paramètre spécificité.

Partie expérimentale

Discussion

- Sur les chromatogrammes obtenus à partir des SE et SV 100%, présence d'un pic de Répaglinide à un temps de rétention de 7,96 mn.
- Sur les chromatogrammes obtenus à partir des solutions placebo et diluant non chargés, absence du pic de Répaglinide à un temps de rétention de 7,96 mn. Ce qui témoigne de l'absence d'interférence du placebo et du diluant dans le dosage du Répaglinide par HPLC.

La méthode est jugée spécifique.

2.4.2. Fonction réponse

Les aires du pic du Répaglinide obtenus pour chacune des solutions analysées (SE et SV) sont présentées dans le tableau XIV.

Tableau XIV : Aires de pic du répaglinide obtenus à partir des SE et SV.

Standard d'étalonnage (SE)							
Niv de Conc	Répétitions	Série 1		Série 2		Série 3	
		Concentration en %	Aire du pic du répaglinide	Concentration en %	Aire du pic du répaglinide	Concentration en %	Aire du pic du répaglinide
1	1	25	7088	25	6558	25	7097
	2	25	7073	25	6720	25	6644
2	1	50	14432	50	13437	50	13965
	2	50	14361	50	13208	50	13449
3	1	100	29102	100	27548	100	27642
	2	100	28860	100	26774	100	27161
4	1	200	58698	200	55163	200	54811
	2	200	58098	200	53920	200	54167
5	1	400	118040	400	109806	400	110300
	2	400	116935	400	107937	400	109199
Standard de validation (SV)							
Niv de Conc	Répétitions	Série 1		Série 2		Série 3	
		Concentration en %	Aire du pic du répaglinide	Concentration en %	Aire du pic du répaglinide	Concentration en %	Aire du pic du Répaglinide

Partie expérimentale

1	1	25	7138	25	6700	25	6831
	2	25	7190	25	6673	25	6876
	3	25	7122	25	6868	25	6815
2	1	50	14625	50	13381	50	13552
	2	50	14520	50	13603	50	13721
	3	50	14434	50	13716	50	13893
3	1	100	29592	100	26478	100	27309
	2	100	29783	100	26577	100	27315
	3	100	28837	100	27170	100	27105
4	1	200	59455	200	53133	200	54422
	2	200	59441	200	53173	200	55052
	3	200	58306	200	54070	200	54805
5	1	400	118798	400	106161	400	109495
	2	400	115242	400	106599	400	109269
	3	400	117024	400	107228	400	109293

Après l'essai de plusieurs fonctions de réponse, les résultats obtenus sont présentés dans les tableaux XV, XVI, XVII, XVIII et les figures 7, 8 ? 9 et 10. Le choix de la fonction de réponse est documenté dans le tableau XIX.

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

Fonction réponse : Modèle $y = ax + b$							
Niv de Conc	Répétitions	Série 1		Série 2		Série 3	
		Concentration en %	Aire du pic du répaglinide	Concentration en %	Aire du pic du répaglinie	Concentration en %	Aire du pic du Répaglinide
1	1	25	7088	25	6558	25	7097
	2	25	7073	25	6720	25	6644
2	1	50	14432	50	13437	50	13965
	2	50	14361	50	13208	50	13449
3	1	100	29102	100	27548	100	27642
	2	100	28860	100	26774	100	27161
4	1	200	58698	200	55163	200	54811
	2	200	58098	200	53920	200	54167
5	1	400	118040	400	109806	400	110300
	2	400	116935	400	107937	400	109199
Pente		294,5		272,8		274,2	
Ordonnée à l'origine		-375,1		-179,7		-58,4	

Partie expérimentale

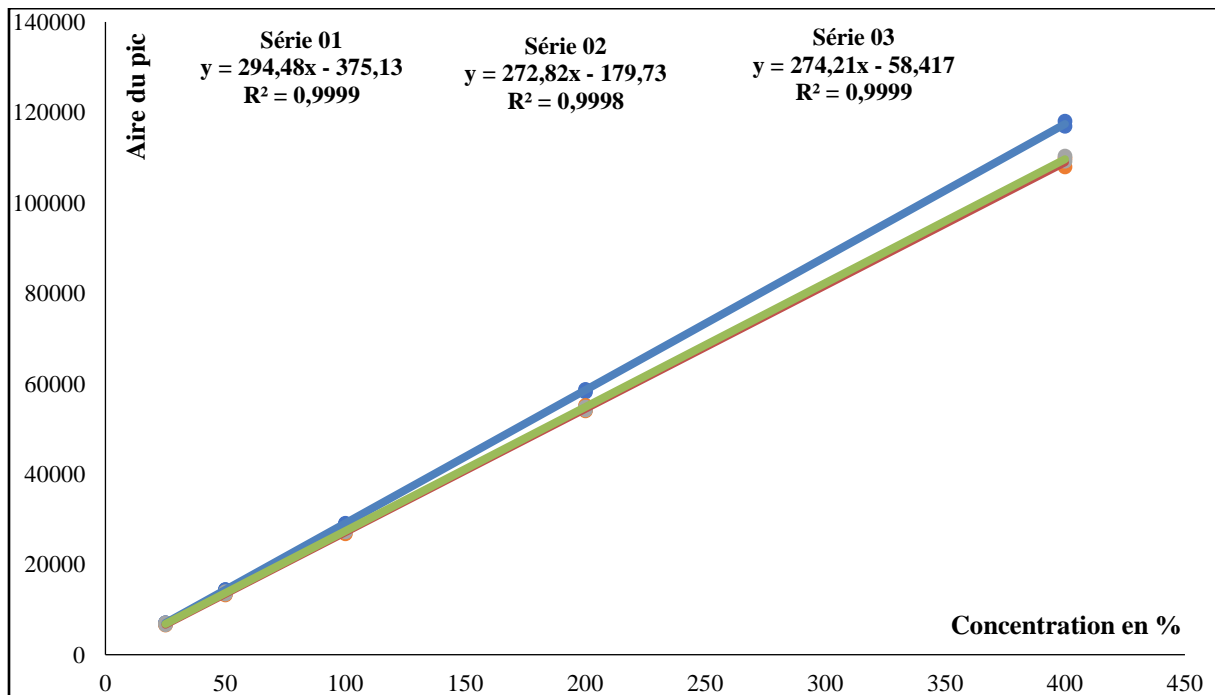


Figure 7 : Courbe d'étalonnage obtenue pour la fonction $y = ax + b$.

Tableau XVI : Résultats obtenus pour la fonction $y = ax$.

Fonction réponse : Modèle $y = ax$							
Niv de Conc	Répétitions	Série 1		Série 2		Série 3	
		Concentration en %	Aire du pic du répaglinide	Concentration en %	Aire du pic du répaglinide	Concentration en %	Aire du pic du répaglinide
1	1	25	7088	25	6558	25	7097
	2	25	7073	25	6720	25	6644
2	1	50	14432	50	13437	50	13965
	2	50	14361	50	13208	50	13449
3	1	100	29102	100	27548	100	27642
	2	100	28860	100	26774	100	27161
4	1	200	58698	200	55163	200	54811
	2	200	58098	200	53920	200	54167
5	1	400	118040	400	109806	400	110300
	2	400	116935	400	107937	400	109199
Pente		293,1		272,2		274,0	
Ordonnée à l'origine		0,0		0,0		0,0	

Partie expérimentale

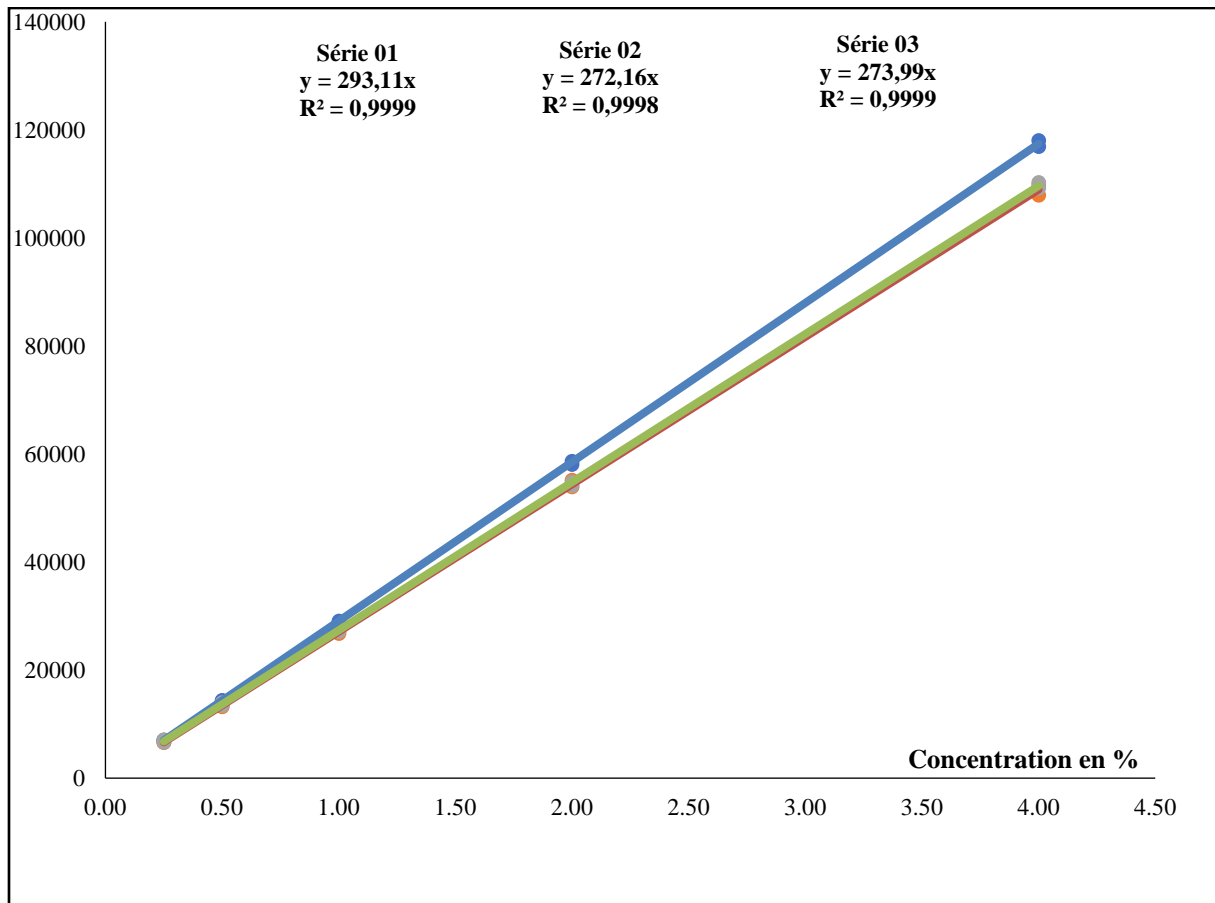


Figure 8 : Courbe d'étalonnage obtenue pour la fonction $y = ax$.

Tableau XVII : Résultats obtenus pour la fonction $\sqrt{y} = f(\sqrt{x})$.

Fonction réponse : Modèle $\sqrt{y} = f(\sqrt{x})$							
Niv de Conc	Répétitions	Série 1		Série 2		Série 3	
		Concentration en %	Aire du pic du répaglinide	Concentration en %	Aire du pic du répaglinie	Concentration en %	Aire du pic du répaglinide
1	1	5,0000	84,1903	5,0000	80,9815	5,0000	84,2437
	2	5,0000	84,1011	5,0000	81,9756	5,0000	81,5107
2	1	7,0711	120,1333	7,0711	115,9181	7,0711	118,1736
	2	7,0711	119,8374	7,0711	114,9261	7,0711	115,9698
3	1	10,0000	170,5931	10,0000	165,9759	10,0000	166,2588
	2	10,0000	169,8823	10,0000	163,6276	10,0000	164,8059
4	1	14,1421	242,2767	14,1421	234,8680	14,1421	234,1175
	2	14,1421	241,0353	14,1421	232,2068	14,1421	232,7381
5	1	20,0000	343,5695	20,0000	331,3699	20,0000	332,1144
	2	20,0000	341,9576	20,0000	328,5377	20,0000	330,4527
Pente		17,2361		16,5839		16,5475	
Ordonnée à l'origine		-2,0214		-1,4076		0,0005	

Partie expérimentale

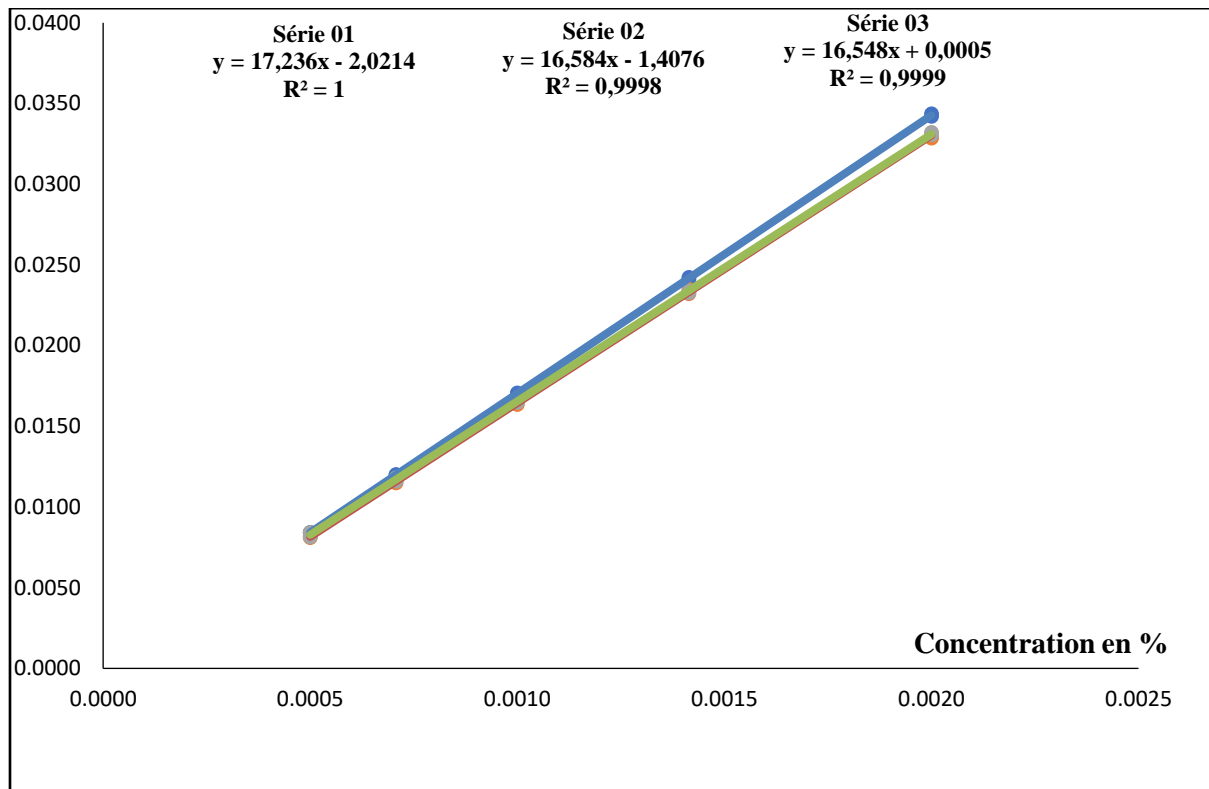


Figure 9 : Courbe d'étalonnage obtenue pour la fonction $\sqrt{y} = f(\sqrt{x})$.

Tableau XVIII : Résultats obtenus pour la fonction $\ln y = f(\ln x)$.

Fonction réponse : Modèle $\ln y = f(\ln x)$							
Niv de Conc	Répétitions	Série 1		Série 2		Série 3	
		Concentration en %	Aire du pic du répaglinide	Concentration en %	Aire du pic du répaglinie	Concentration en %	Aire du pic du Répaglinide
1	1	3,22	8,87	3,22	8,79	3,22	8,87
	2	3,22	8,86	3,22	8,81	3,22	8,80
2	1	3,91	9,58	3,91	9,51	3,91	9,54
	2	3,91	9,57	3,91	9,49	3,91	9,51
3	1	4,61	10,28	4,61	10,22	4,61	10,23
	2	4,61	10,27	4,61	10,20	4,61	10,21
4	1	5,30	10,98	5,30	10,92	5,30	10,91
	2	5,30	10,97	5,30	10,90	5,30	10,90
5	1	5,99	11,68	5,99	11,61	5,99	11,61
	2	5,99	11,67	5,99	11,59	5,99	11,60
Pente		1,0		1,0		1,0	
Ordonnée à l'origine		5,6		5,5		5,6	

Partie expérimentale

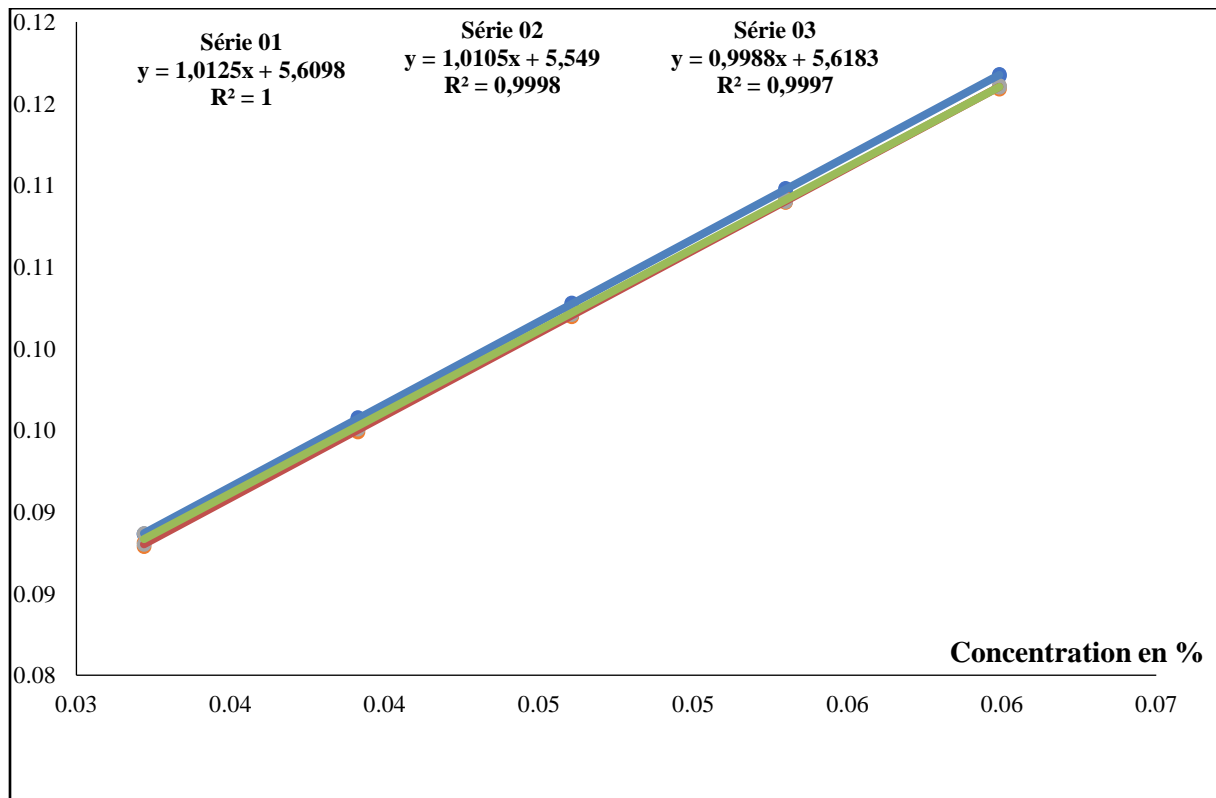


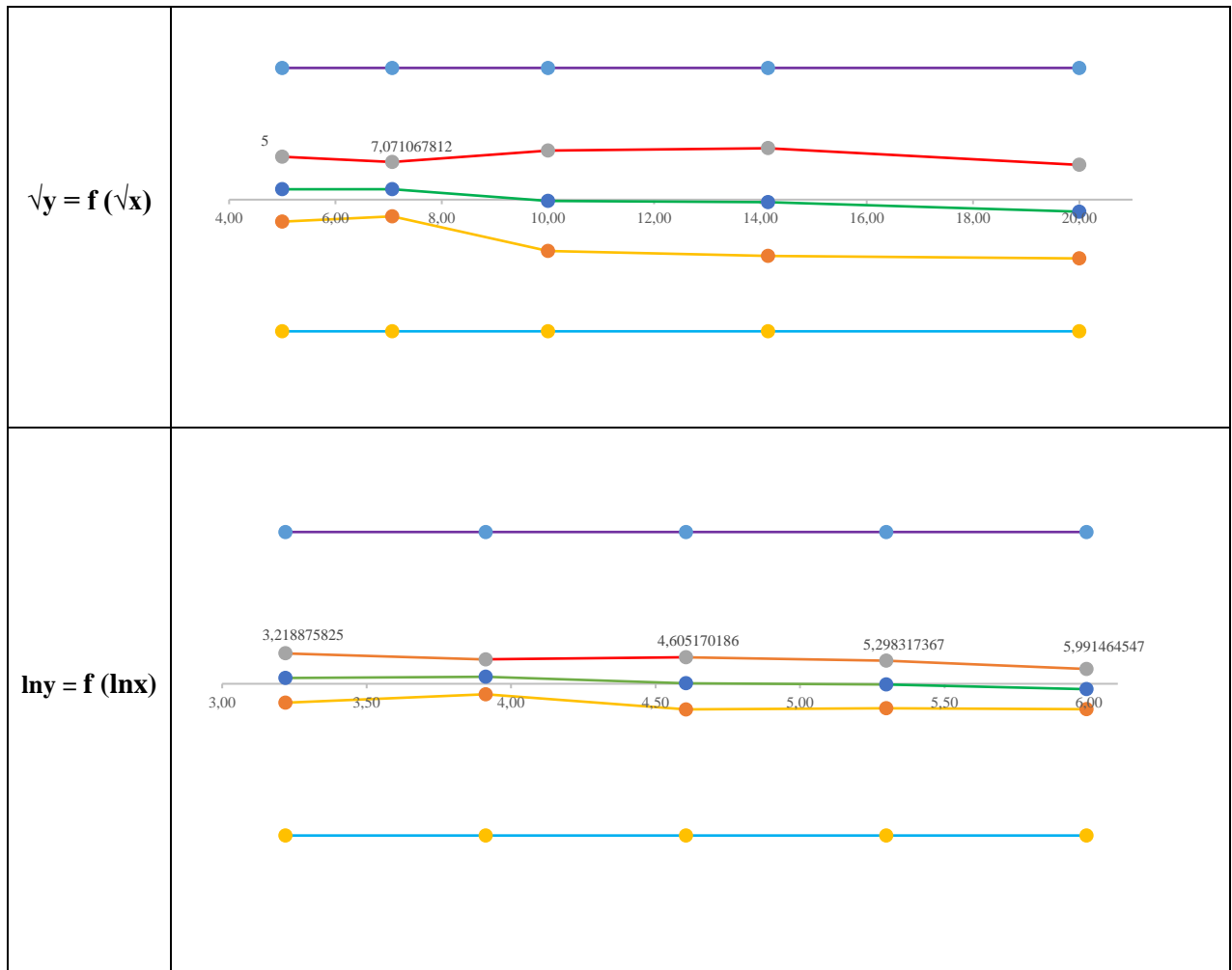
Figure 10 : Courbe d'étalonnage obtenue pour la fonction $\ln y = f(\ln x)$.

Critères de choix de la fonction de réponse

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

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

Partie expérimentale



Discussion

Le choix de la fonction de réponse porte sur le modèle mathématique correspondant à l'intervalle de mesure le plus large, contenu dans l'intervalle d'acceptabilité.

D'après le tableau XIX, les quatre fonctions testées ont le même intervalle de mesure. Compte tenu de sa simplicité d'application en routine, le modèle linéaire simple $y = ax+b$ est retenu comme fonction de réponse dans notre étude.

2.4.3. Alignement des réponses et prédictions inverses

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

Partie expérimentale

Le calcul des concentrations prédites dites en retour est basé sur le modèle d'étalonnage choisi : ce sont les concentrations que peut nous fournir la méthode pour un échantillon inconnu.

Les concentrations inverses prédites des standards de validation sont calculées en utilisant la fonction inverse du modèle d'étalonnage sont représentées dans les tableaux XX ci-dessous :

Tableau XX: Prédictions inverses obtenus avec les SV.

Niv de Conc	Répétitions	Moyenne des concentrations théoriques	Réponses alignées	Prédictions inverses	Réponses alignées	Prédictions inverses	Réponses alignées	Prédictions inverses	Moyenne des concentrations prédites
1	1	25,00	7138	25,51	6700	25,22	6831	25,12	25,368
	2		7190	25,69	6673	25,12	6876	25,29	
	3		7122	25,46	6868	25,83	6815	25,07	
2	1	50,00	14625	50,94	13381	49,71	13552	49,64	50,415
	2		14520	50,58	13603	50,52	13721	50,25	
	3		14434	50,29	13716	50,93	13893	50,88	
3	1	100,00	2959	101,76	26478	97,71	27309	99,81	99,790
	2		29783	102,41	26577	98,08	27315	99,83	
	3		28837	99,20	27170	100,25	27105	99,06	
4	1	200,00	59455	203,17	53133	195,41	54422	198,68	199,461
	2		59441	203,13	53173	195,56	55052	200,98	
	3		58306	199,27	54070	198,85	54805	200,08	
5	1	400,00	118798	404,70	106161	389,79	109495	399,53	396,432
	2		115242	392,62	106599	391,39	109269	398,71	
	3		117024	398,67	107228	393,70	109293	398,79	

Partie expérimentale

2.4.4. Justesse

La justesse fournit une indication sur les erreurs systématiques de la procédure analytique, elle est exprimée en biais absolu, biais relatif ou en taux de recouvrement pour chaque niveau de concentration théorique des standards de validation comme indiqué dans le tableau XXI suivant :

Tableau XXI : Calcul de la justesse pour chaque niveau des SV.

Niv de Conc	Moyenne des concentrations théoriques	Moyenne des concentrations prédites	Biais absolu	Biais relatif	% de Recouvrement
1	25,00	25,368	0,368	1,472	101,472
2	50,00	50,415	0,415	0,830	100,830
3	100,00	99,790	-0,210	-0,210	99,790
4	200,00	199,461	-0,539	-0,270	99,730
5	400,00	396,432	-3,568	-0,892	99,108

Discussion

L'accord entre la valeur de la concentration moyenne prédite obtenue à partir des trois séries de validation et la valeur de la moyenne des concentrations théoriques considérée comme étant la valeur de référence est assez étroit pour tous les niveaux en tenant compte que les biais relatifs

Partie expérimentale

de ces derniers sont inférieurs à 1%, exception faite pour le premier niveau qui a un biais relatif de 1,472%.

Donc la méthode est juste.

2.4.5. Fidélité

La fidélité fournit une indication sur les erreurs dues au hasard. Elle a été estimée en calculant la répétabilité (MSM) et la fidélité intermédiaire (MSE) à chaque niveau de concentration utilisé en validation.

Elle est exprimée en écarts types relativisés et en coefficients de variation suite à l'étude de la variance du modèle choisi qui a donné les résultats suivants dans le tableau XXII suivant :

Tableau XXII : Calcul de la fidélité pour chaque niveau des SV.

Niv de Conc	MSM	MSE ₁	MSE ₂	ET répétabilité $\sigma_{w,j}$	ET intersérie $\sigma_{B,j}$	ET de la FI	CV répétabilité	CV de la FI
1	0,117	0,059	0,074	0,243	0,139	0,281	0,974	1,122
2	0,092	0,294	0,244	0,494	0,000	0,494	0,987	0,987
3	4,604	1,652	2,390	1,285	0,992	1,624	1,285	1,624
4	21,135	3,375	7,815	1,837	2,433	3,049	0,919	1,524
5	52,087	13,508	23,153	3,675	3,586	5,135	0,919	1,284
Norme : CV < 5%								

Discussion

La dispersion des prédictions inverses des concentrations des trois séries de validation est assez étroite pour tous les niveaux de concentration, du fait que les coefficients de variance de la répétabilité et de la fidélité intermédiaire de tous les niveaux est inférieur à 5 %.

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

Cependant ces estimations de la fidélité et de la justesse ne sont pas une fin en soi, ils sont une étape intermédiaire obligatoire pour pouvoir évaluer si la procédure analytique va pouvoir ou non quantifier avec une exactitude suffisante chacune des quantités inconnues, en d'autres termes, elles ne renseignent pas sur la qualité des résultats et ne permettent pas de prendre une décision sur la validité de la méthode.

Partie expérimentale

2.4.6. Exactitude

Le tableau XXIII élucide pour chaque concentration des standards de validation son exactitude relative pour chaque niveau de concentration théorique :

Tableau XXIII : Résultats du calcul de l'exactitude.

Niv de Conc	Répétitions	Exactitude			Exactitude Relative (%)		
		Série 1	Série 2	Série 3	Série 1	Série 2	Série 3
1	1	0,51	0,22	0,12	2,05	0,87	0,50
	2	0,69	0,12	0,29	2,76	0,47	1,16
	3	0,46	0,83	0,07	1,84	3,33	0,27
2	1	0,94	-0,29	-0,36	1,88	-0,59	-0,73
	2	0,58	0,52	0,25	1,16	1,04	0,50
	3	0,29	0,93	0,88	0,58	1,87	1,76
3	1	1,76	-2,29	-0,19	1,76	-2,29	-0,19
	2	2,41	-1,92	-0,17	2,41	-1,92	-0,17
	3	-0,80	0,25	-0,94	-0,80	0,25	-0,94
4	1	3,17	-4,59	-1,32	1,59	-2,29	-0,66
	2	3,13	-4,44	0,98	1,56	-2,22	0,49
	3	-0,73	-1,15	0,08	-0,36	-0,58	0,04
5	1	4,70	-10,21	-0,47	1,17	-2,55	-0,12
	2	-7,38	-8,61	-1,29	-1,85	-2,15	-0,32
	3	-1,33	-6,30	-1,21	-0,33	-1,58	-0,30

Partie expérimentale

2.4.7. Erreur totale

Le tableau XXIV représente le calcul de l'erreur totale absolue et relative pour chaque niveau de concentration théorique :

Tableau XXIV : Calcul de l'erreur total absolue et de l'erreur totale relative.

Niv de Conc	Justesse (Biais absolu)	Fidélité Intermédiaire	Erreur Totale Absolue	Biais relatif	CV Fidélité Intermédiaire	Erreur Totale Relative
1	0,368	0,281	0,649	1,472	1,122	2,594
2	0,415	0,494	0,909	0,830	0,987	1,818
3	-0,210	1,624	1,834	-0,210	1,624	1,834
4	-0,539	3,049	3,588	-0,270	1,524	1,794
5	-3,568	5,135	8,703	-0,892	1,284	2,176

Discussion

Selon les résultats de l'erreur totale montrés dans le tableau XXIV, on juge que tous les niveaux de concentration sont inclus dans l'intervalle d'acceptabilité.

2.4.8. Calcul des limites de tolérances

Les limites inférieure et supérieure de l'intervalle de tolérance sont calculées pour tous les niveaux de concentration avec une probabilité β de 95%.

Partie expérimentale

Les résultats des calculs sont résumés dans le tableau XXV :

Tableau XXV : Calcul des intervalles de tolérance par niveau de concentration.

Moyenne des concentrations introduites	Biais relatif	Limite de tolérance inférieure	Limite de tolérance supérieure
25,00	1,472	-0,882	3,826
50,00	0,830	-1,141	2,802
100,00	-0,210	-3,785	3,365
200,00	-0,270	-4,285	3,746
400,00	-0,892	-3,914	2,130

2.4.9. Etablissement du profil d'exactitude :

Le profil d'exactitude correspondant au modèle $ax + b$ est présenté dans la figure 11 dans laquelle l'axe horizontal représente les concentrations allant de 25 à 400 % et l'axe vertical le biais relatif représente le profil d'exactitude :

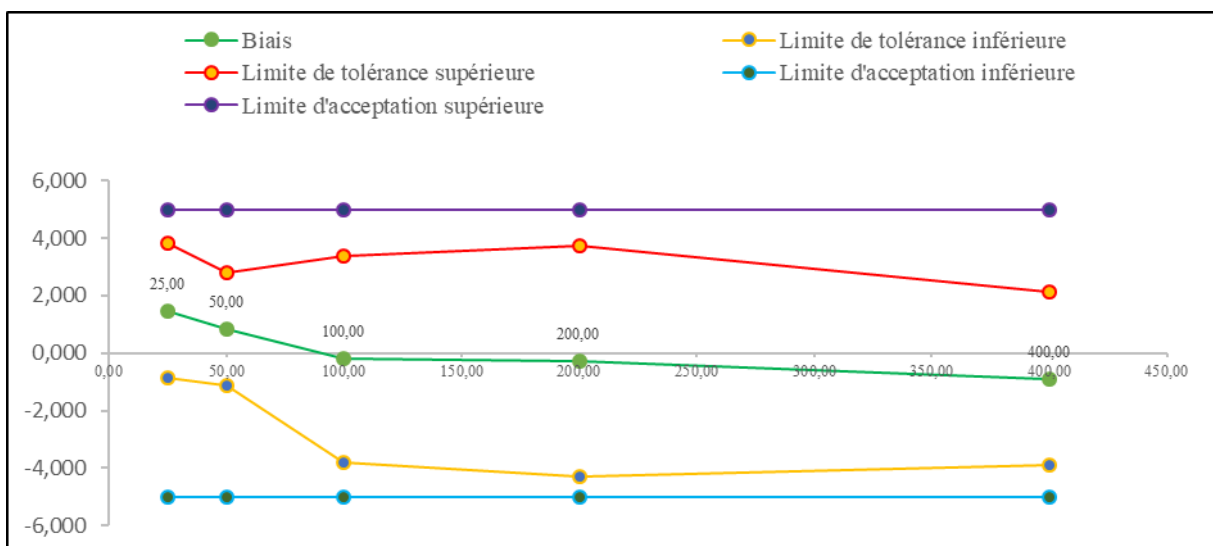


Figure 11 : Profil d'exactitude en considérant la régression linéaire $y = ax + b$.

Partie expérimentale

Discussion

Le profil d'exactitude de la figure 10 montre que la méthode peut être validée sur la totalité du domaine de concentrations 25% à 400% pour une limite d'acceptation de $\pm 5\%$.

Cela signifie que la méthode est capable de produire une proportion de 95% des résultats acceptables et seulement 5% des futures mesures d'échantillons inconnus peuvent avoir des résultats non fiables.

On peut donc conclure à la capacité de la méthode à quantifier exactement le répaglinide dans les eaux de rinçage sur le domaine de validité ainsi défini.

2.4.10. Intervalle de dosage

Le profil d'exactitude est contenu dans les limites d'acceptabilité $\pm 5\%$, les limites inférieure et supérieure de quantification sont définies comme suit :

- Limite inférieure de quantification = 25 % soit une concentration de 0.15625 $\mu\text{g/ml}$.
- Limite supérieure de quantification = 400 % soit une concentration de 2.5 $\mu\text{g/ml}$.

L'intervalle de dosage de la méthode de dosage du Répaglinide est de [25 % - 400 %] correspondant à un intervalle de concentrations de [0.15625 $\mu\text{g/ml}$; 2.5 $\mu\text{g/ml}$].

2.4.11. Linéarité de la justesse

Au sens de la SFSTP 2006, la linéarité de la méthode est sa capacité de fournir des résultats (concentration prédite ou calculée) proportionnels à la concentration (introduite) de la substance analysée.

Partie expérimentale

Les données de la droite de régression linéaire : Concentrations prédites en fonction des concentrations introduites sont présentées dans le tableau XXVI.

Tableau XXVI : Vérification de la linéarité.

Niv de Conc	Série	Concentration introduite	Concentration prédite
25%	1	25,00	25,51
	2	25,00	25,22
	3	25,00	25,12
50%	1	50,00	50,94
	2	50,00	49,71
	3	50,00	49,64
100%	1	100,00	101,76
	2	100,00	97,71
	3	100,00	99,81
200%	1	200,00	203,17
	2	200,00	195,41
	3	200,00	198,68
400%	1	400,00	404,70
	2	400,00	389,79
	3	400,00	399,53

Partie expérimentale

La linéarité est évaluée en représentant graphiquement la fonction : **concentrations prédites = f (concentrations introduites)** pour les trois séries de validation et la courbe est représentée dans la figure 12 :

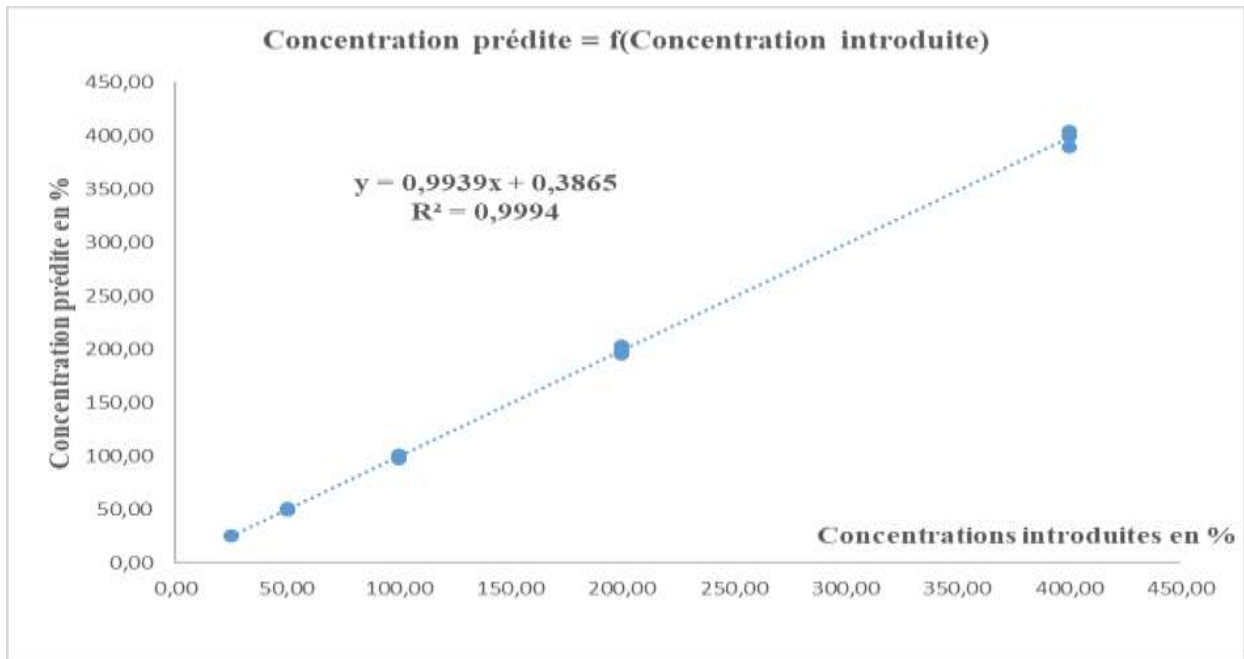


Figure 12 : Droite de régression linéaire : Concentration prédites = f (concentrations introduites).

Les caractéristiques de cette droite de régression sont présentées dans le tableau XXVII suivant :

Tableau XXVII : Caractéristiques de la droite de régression linéaire – linéarité de la méthode.

Paramètre	Pente	Ordonnée à l'origine
Valeur	$a = 0,9939$	$b = 0,3865$
Erreur-type	$\sigma_a = 0,006524$	$\sigma_b = 1,3470$
Test de student	Comparaison de la pente avec 1	Comparaison de l'ordonnée à l'origine avec 0
	t calculé = $a / \sigma_a = 0,93$	t calculé = $b / \sigma_b = 0,29$
	$t^\circ (0,05 ; 13) = 2,16$	$t^\circ (0,05 ; 13) = 2,16$
	Condition : t calculé < t°	Condition : t calculé < t°
	Différence non significative	Différence non significative

Partie expérimentale

Discussion

La méthode est linéaire dans l'intervalle de concentration de 0.15625 µg/ml – 2.5µg/ml avec une droite : Concentration prédite = 0,9939 Concentration introduite + 0,3865 et une régression satisfaisante (coefficient de corrélation $R^2 = 0,9994$).

- Une pente significativement différente de zéro donc la régression est significative entre la variable expliquée (concentration prédite) et variable explicative (concentration introduite). De plus elle est comparable à 1 au risque de 5% ;
- Une ordonnée à l'origine comparable à zéro au risque de 5%.

Sur ce, on conclut que la linéarité de la méthode de dosage est validée.

3. Synthèse des résultats

La méthode de dosage du Répaglinide à l'état de traces par HPLC développée dans le présent travail s'est révélée concluante et valide dans l'intervalle de dosage [0.15625µg/ml ; 2.5µg/ml] au risque de 5%.

CONCLUSION GÉNÉRALE

Conclusion générale

La validation des procédures analytiques est aujourd'hui un principe accepté et utilisé dans tous les domaines d'activités et générateurs de résultats de mesures. Elle se trouve d'ailleurs être indispensable aux industries pour garantir la fiabilité des contrôles et assurer la qualité. Dans cette optique de contrôle, le but de notre étude a été de mettre au point et de valider une méthode de dosage du répaglinide à l'état de traces dans les eaux de rinçage par HPLC à détection spectrophotométrique dans l'UV en utilisant le profil d'exactitude et l'intervalle de tolérance comme outils de décision de la validation.

A cet effet, nous avons effectué un plan d'étalonnage pour générer un modèle pour chaque série qui permet de relier la réponse analytique (la surface du pic) à la concentration introduite. Ensuite, nous avons réalisé un plan de validation pour pouvoir estimer le biais et la fidélité de la méthode. Cela nous a mené à constater la justesse de la méthode avec un biais relatif inférieur à 1,472%, ainsi que de conclure à la fiabilité de cette dernière au travers les coefficients de variations de répétabilité et de fidélité intermédiaire qui se sont avérés inférieurs à 5%. Enfin, l'établissement des intervalles de tolérance appariés à des limites d'acceptation nous a permis de tracer un profil d'exactitude caractérisant la validité de la méthode dans l'intervalle de concentration étudié [0,15625 ; 2.5] $\mu\text{g/ml}$, avec une proportion $\beta=95\%$ de mesures dans les limites d'acceptations ($\pm 5\%$).

Nous convenons donc que les résultats obtenus dans cette étude ont répondu à toutes les exigences et performances spécifiques élaborées dans cette approche harmonisée ; ce qui atteste de la validité de la méthode utilisée et de son aptitude à être appliquée en routine par les laboratoires de contrôle qualité pour le dosage du répaglinide à l'état de traces dans les eaux de rinçage.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

Références bibliographiques

1. AFNOR, NF EN ISO 8402, Vocabulaire - Qualité et Management. BEGRIFFE. (EUROPAEISCHE NORM EN ISO 8402). Juillet 1995.
2. ISO 9000, Systèmes de management de la qualité — Principes essentiels et vocabulaire, 2000.
3. Djandjinou m, Thèse pour le diplôme d'état de docteur en pharmacie : Validation du nettoyage : enjeux et mise en place. France, université de Lille 2 ; Faculté des sciences pharmaceutique et biologique de Lille. 21 juin 2012 ;
4. La Roue De Deming Ou Méthode PDCA, Un Outil D'amélioration, Juin 4, 2021
Disponible sur le site : <https://www.agiretentreprendre.fr/roue-deming/> ;
5. Panzu Mavwanda G, Thèse pour le diplôme d'état de docteur en pharmacie : Contribution à l'étude de la qualité des comprimés d'Artésunate en coblister douze mois après la péremption. Congo, université de Kinshasa, 2008 ;
Disponible sur le site : <https://www.memoireonline.com/> ;
6. ICH Q10, Pharmaceutical Quality System, ICH Harmonised Tripartite Guideline, Current Step 4 version, dated 04 June 2008;
7. ICH Q8(R2), Pharmaceutical Development, ICH Harmonised Tripartite Guideline, Current Step 4 version, dated August 2009;
8. Fiche de renseignements sur les glinides, pharmacomédicale.org, site du collège national de Pharmacologie Médicale. 26 juillet 2018 ;
Disponible sur le site : <https://pharmacomedicale.org/medicaments/par-specialites/item/glinides>
9. Monographie de GlucoNorm® (comprimés de répaglinide : 0,5 mg, 1 mg et 2 mg), Antidiabétique oral, Novo Nordisk Canada, numéro de contrôle : 182759, date de révision : 15 juin 2015 ;
10. Repaglinide Tablets, USP 39, Official Monographs / Repaglinide 5681, Official from December 1, The United States Pharmacopeial Convention. 2016;
11. Image représentant la formule développée du répaglinide,
Disponible sur le site : <https://www.drugfuture.com/chemdata/repaglinide.html> ;

Références bibliographiques

12. Résumé des caractéristiques du produit : Répaglinide Arrow lab, 2mg, comprimé, Agence nationale de sécurité du médicament et des produits de santé - Mis à jour le : 20/08/2020.
Disponible sur le site : <https://base-donnees-publique.medicaments.gouv.fr/affichageDoc.php?specid=65926444&typedoc=R#RcpPropPharmacocinetiques>
13. Résumé des caractéristiques du produit : Répaglinide Sandoz, 2mg, comprimé, Agence nationale de sécurité du médicament et des produits de santé - Mis à jour le : 26/10/2018.
Disponible sur le site : <https://base-donnees-publique.medicaments.gouv.fr/affichageDoc.php?specid=66700754&typedoc=R> ;
14. Fiche de renseignement de la substance active : Répaglinide, vidal - Mis à jour le 16/01/2013.
Disponible sur le site : <https://www.vidal.fr/medicaments/substances/repaglinide-18716.html> ;
15. Pharmacologie Médicale Toulouse Actualités en Pharmacologie Clinique Professeur Jean-Louis MONTASTRUC Membre de l'Académie Nationale de Médecine Service de Pharmacologie Médicale et Clinique Pharmacopôle Midi-Pyrénées Centre Midi-Pyrénées de PharmacoVigilance, de Pharmacoépidémiologie et d'Informations sur le Médicament, Inserm U 1027 CHU, Faculté de Médecine Toulouse, France, 2014-2015.
Disponible sur le site : <https://docplayer.fr/9104109-Actualites-2014-2015-en-pharmacologie-clinique.html> ;
16. Fiche de renseignement de la substance active : Répaglinide, gamme de médicament Novonorm, vidal - Mis à jour le : Jeudi 20 mai 2021.
Disponible sur le site : <https://www.vidal.fr/medicaments/gammes/novonorm-16641.html> ;
17. P. Hubert, J.J. Nguyen-Huu, B. Boulanger, E. Chapuzet, N. Cohen, P.A. Compagnon et al, Validation des procédures analytiques quantitatives, Harmonisation des démarches, Partie I, Commission SFSTP, STP Pharma Pratiques - volume 13 - N° 3 - mai/juin 2003;
18. Mamou m, Thèse de doctorat en sciences médicales : Stratégies de validation de nettoyage en industrie pharmaceutique : nouvelles recommandations et applications aux équipements de fabrication dans un site multiproduits, Algérie, université Mouloud Mammeri de tizi Ouzou. 8 juillet 2018 ;

Références bibliographiques

19. ICH Q2 (R1), Validation of analytical procedures text and methodology, ICH Harmonised Tripartite Guideline, Current Step 4 version, Parent Guideline dated 27 October 1994 (Complementary Guideline on Methodology dated 6 November 1996 incorporated in November 2005);
20. P. Hubert, J.J. Nguyen-Huu, B. Boulanger, E. Chapuzet, N. Cohen, P.A. Compagnon et al, Validation des procédures analytiques quantitatives : Harmonisation des démarches, Partie II – Statistiques, Commission SFSTP, STP Pharma Pratiques - volume 16 - N° 1 - janvier/février 2006 ;
21. HPLC Principe et appareillage. 2010.Extract of Biotechnologie & Biologie et Physiopathologie humaine - Académie de Rouen, publié le mercredi 20 janvier 2010. Disponible sur le site : http://biotech.spip.ac-rouen.fr/IMG/article_PDF/HPLC-Principe-et-appareillage_a9.pdf ;
22. Figure représentant un schéma des principaux modules d'une chaîne HPLC.

Disponible sur le site : <https://chimieanalytique.com/chromatographie-liquide-haute-performance-hplc/> .

ANNEXES

Annexe I : Chromatographie Liquide à Haute Performance « HPLC »

Introduction

La chromatographie est une méthode physique qui permet la séparation ou la purification d'un ou de plusieurs composés d'un mélange en vue de leur identification et de leur quantification. Il existe trois types de chromatographie : chromatographie en phase gazeuse, chromatographie sur couche mince et chromatographie en phase liquide.

La chromatographie en phase liquide a permis de réaliser des analyses qui n'étaient auparavant pas possible avec les techniques sur couche mince ou en phase gazeuse.

La chromatographie liquide haute performance (HPLC) est l'une des techniques les plus employées dans les laboratoires d'analyse chimiques. Elle permet l'identification, la séparation et le dosage de composés chimiques dans un mélange. Sa grande précision permet la recherche de traces et il est possible de la coupler à un spectromètre de masse.

1. Principe

La chromatographie liquide haute performance est une méthode d'analyse physicochimique qui sépare les constituants d'un mélange par entraînement au moyen d'une phase mobile liquide le long d'une phase stationnaire, grâce à la répartition sélective des solutés entre ces deux phases.

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

La phase mobile poussée par une pompe sous haute pression, parcourt le système chromatographique.

Le mélange à analyser est injecté puis transporté au travers du système chromatographique.

Les composés en solution se répartissent alors suivant leur affinité entre la phase mobile et la phase stationnaire.

En sortie de colonne grâce à un détecteur approprié les différents solutés sont caractérisés par un pic. L'ensemble des pics enregistrés est appelé chromatogramme. [21]

2. Appareillage

Une installation HPLC comporte divers modules : un réservoir à solvant contenant la phase mobile, un système de pompage permettant d'effectuer des éluions graduées, un injecteur, une colonne, un détecteur et un système d'acquisition des données.

Ces modules sont reliés entre eux par l'intermédiaire de canalisations de très faible diamètre interne (0.1mm) pour permettre l'écoulement de la phase mobile. Elles peuvent être en acier inoxydable ou en PEEK (polyether-etherketone). [21]

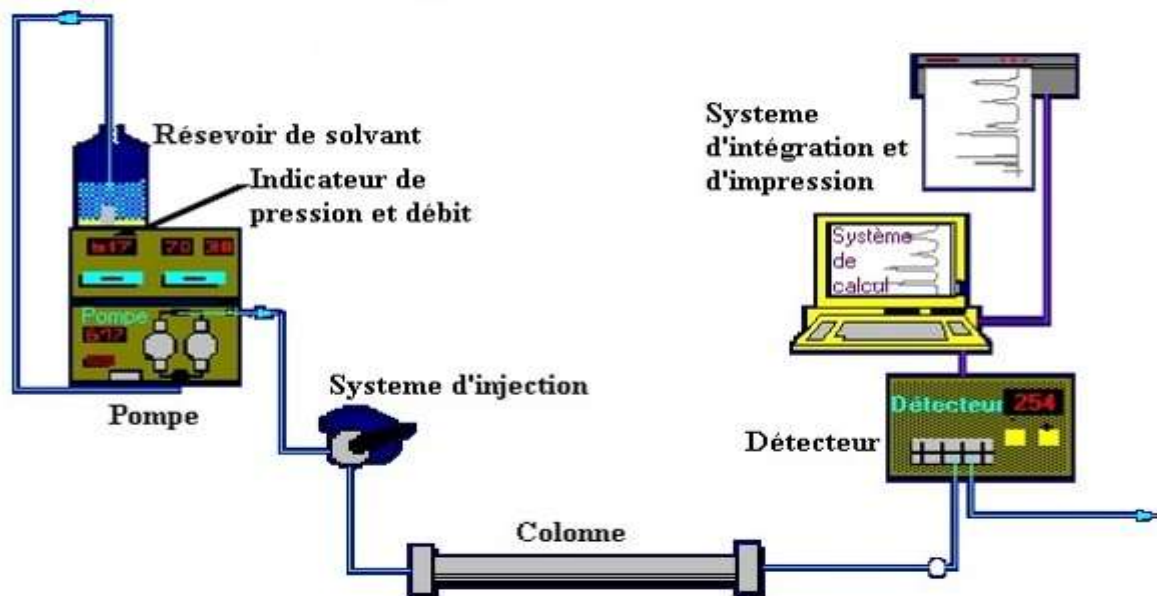


Figure 13 : Schéma des principaux modules d'une chaîne HPLC [22]

2.1. Réservoir de la phase mobile (éluant)

C'est un flacon en verre ou acier inoxydable d'un volume de 0.5 à 2L dans lequel plonge un tube avec une extrémité filtrante (éliminer les poussières), il est parfois muni d'un système de dégazage (barbotage de gaz inerte). [21]

2.2. Pompe

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

- débit : 0,01 à 10 ml/min
- stabilité < 1% (<0,2% pour des chromatographies d'exclusion diffusion)
- pression maximale > 350 bars

Certaines sont pilotées par informatique (bien utile lors de l'utilisation de gradient d'élution. [21])

2.3. Injecteur

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

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

Le remplissage de la boucle d'injection se fait à l'aide d'une seringue. [21]

2.4. Colonne

En mode analytique, les colonnes en inox ont généralement un diamètre interne de 4,6mm. La longueur est de 5, 10, 15, ou 25cm. Le remplissage (en silice, silice greffée ou particules polymériques) a une granulométrie de 3, 5, ou 10 μ m. Le diamètre interne d'une colonne est usuellement de 4 ou 4,6 mm. Si des substances pures doivent être collectées en fin de chromatogramme des colonnes de gros diamètre seront nécessaires. [21]



Figure 14 : Colonnes d'appareil d'HPLC [22]

2.5. Détecteurs

Le détecteur suit en continu l'apparition des solutés. Pour détecter, on utilise différents phénomènes physico-chimiques. Le signal obtenu est enregistré en fonction du temps.

Le détecteur le plus utilisé en HPLC est un spectrophotomètre d'absorption UV-visible (190-600 nm) relié à la sortie de colonne.

Il existe d'autres détecteurs :

- Réfractomètre différentiel
- UV à barrette de diodes
- Electrochimique
- Fluorimétrie...

Ainsi que différents types de couplage :

- Spectrométrie infrarouge
- Spectrométrie de masse
- Résonance Magnétique Nucléaire... [21]

2.6. Intégrateur

Il s'agit d'un petit ordinateur qui récupère les données issues du détecteur, trace les chromatogrammes et intègre la surface des pics.

La chromatographie est une méthode de séparation utilisée en vue d'un dosage.

Une intégration consiste à mesurer la surface sous un pic mais avant tout chercher à séparer correctement les pics avant de les intégrer.

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

- la largeur attendue des pics
- le seuil d'intégration (sensibilité)

La largeur de pic est à peu près prévisible en fonction de la technique d'analyse et des conditions opératoires. Elle détermine la fréquence d'échantillonnage du signal. Le pic est alors découpé en tranches. Le seuil d'intégration est la valeur du signal à partir de laquelle le calculateur repère un début de pic. [21]

3. Application de la chromatographie liquide haute performance à l'analyse

Les applications sont innombrables. La méthode permet de séparer des composés de masses molaires variables (de 100 à 200), de nature chimique différentes et même des isomères.

L'HPLC est un très bon complément de la chromatographie en phase gazeuse pour :

- Les substances peu volatiles : molécules de masse molaire > 300 ;
- Substances thermolabiles : comme le médicament issu de la biotechnologie ou les composés d'origine biologique ;
- Les substances ionisées.

L'HPLC couvre tous les domaines d'application. Citons dans les domaines de l'agroalimentaire et de la pharmacie. [21]

1.1. Analyse des chromatogrammes

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

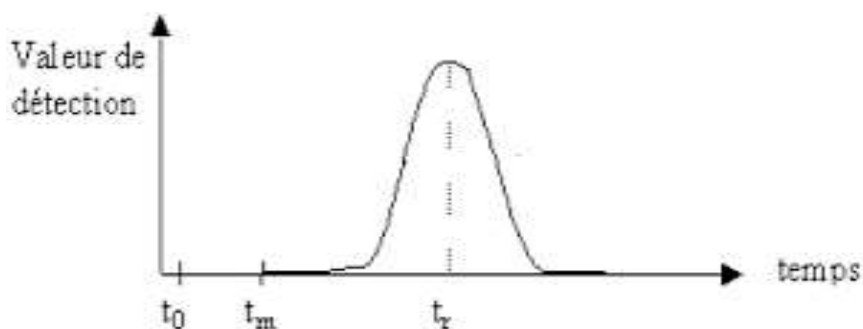


Figure 15 : Chromatogramme

- t_0 : est le temps du début de l'injection ; [21]

- t_m : temps mort ; temps mis par un composé non retenu par la phase stationnaire pour traverser la colonne (temps passé dans la phase mobile) ;
- t_r : temps de rétention ; temps mis par un soluté pour traverser la colonne. C'est le temps passé dans la phase stationnaire et dans le volume mort de la colonne. Ce temps est caractéristique d'un soluté dans des conditions d'analyse données. La surface du pic est en fonction de la quantité du constituant dont il est la trace ;
- t_r' : temps de rétention réduit ; temps passé par un soluté dans la phase stationnaire, soit :

$$t_r' = t_r - t_m$$

- $\omega_{1/2}$: la largeur du pic ; mesurée à mi-hauteur : exprimée en unité de temps ;
- La largeur du pic à la base exprimée en unité de temps : déterminée par l'intersection des tangentes au point d'inflexion à la courbe gaussienne et de la ligne de base ;
- h : la hauteur du pic ;
- Ecart type relatif des aires du pic :

$$\sigma = \frac{1}{16} \sum (y_i - Y')^2$$

Avec : y_i est l'air du pic pour l'injection i donné par l'intégration du pic.

$Y' = 1/16 (y_1 + y_2 + \dots + y_6)$ la moyenne des aires du pic.

On peut calculer l'écart type relatif en pourcentage :

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

1.2. Analyse qualitative

- **Coefficient de partage K** : (dans le cas de chromatographie de partage)

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

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

Ce coefficient est en fonction de trois types d'affinité :

- Celle entre le soluté et la phase mobile ;
- Celle entre le soluté et la phase stationnaire ;
- Celle entre les phases mobile et stationnaire. [21]

- **Le facteur de capacité K'** (ou facteur de rétention)

C'est le rapport entre la quantité du soluté dans la phase stationnaire et la quantité de soluté dans la phase mobile.

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

V_s : volume de la phase stationnaire

V_m : volume de la phase mobile ou volume mort

K' : est aussi déterminé expérimentalement par le rapport de temps de rétention réduit sur le temps mort :

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

1.2.1. Notion d'efficacité ou performances d'une colonne

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

- **Le nombre de plateaux théoriques N_{th}** : contenus dans la colonne (nombre des opérations que subit le soluté pour traverser la colonne chromatographique). Plus N est grande plus la colonne est efficace elle est traduite par la finesse des pics obtenus. Sa détermination est réalisée pour chaque composé par la relation suivante :

$$N_{th} = 5.54 \left(\frac{t_r}{w_{1/2}} \right)^2 = 16 \left(\frac{t_r}{w} \right)^2$$

t_r : temps de rétention ;

$w_{1/2}$: largeur du pic à mi-hauteur ;

w : largeur du pic à la base ;

Remarque

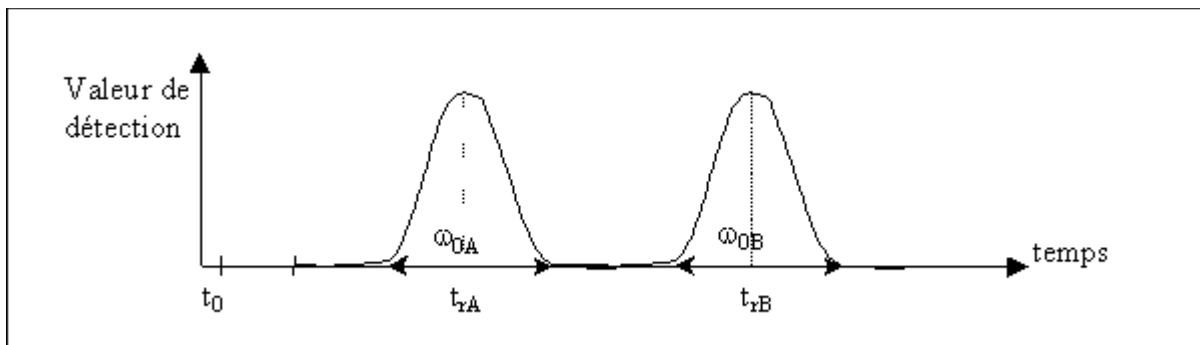
N_{th} est très utilisé en HPLC. Pourtant il serait plus judicieux d'utiliser N_{eff} (nombre de plateaux effectifs) puisqu'il dépend vraiment du temps passé dans la phase stationnaire.

$$N_{eff} = 5.54 \left(\frac{t_r - t_m}{w_{1/2}} \right)^2$$

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

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

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



L : Longueur de la colonne

N_{th} : Nombre de plateaux théoriques

3. 4. Qualité de la séparation : La séparation entre les pics chromatographiques se base sur plusieurs critères :

- **La sélectivité (α)** : entre 2 pics A et B

Elle mesure la capacité de la colonne à séparer les maximums des pics. Plus elle est supérieure à 1, plus les temps de rétention sont éloignés.

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

$$\alpha = \frac{t'_{rB}}{t'_{rA}}$$

En pratique α toujours ≥ 1 car on choisit $t'_{rB} > t'_{rA}$

$\alpha = 1$ pas de séparation

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

α est toujours supérieur 1 car on choisit ($t'_{rB} > t'_{rA}$). Par convention, on choisit toujours les pics pour que l'on ait un α supérieur à 1.

- **La résolution (R)**

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

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

$R < 1$: mauvaise résolution ;

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

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

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

3.5. Notion de pression :

A l'intérieur d'une colonne la phase mobile frotte sur les parois de la colonne mais aussi sur les particules de phase stationnaire. Ces frottements définissent la résistance à l'écoulement.

Les particules de phase stationnaire sont sphériques. Si l'on divise leur diamètre par 10, on diminue leur surface d'un facteur 100 et leur volume d'un facteur 1000. On peut donc placer dans la colonne 1000 fois plus de particules et donc augmenté de 10 fois la surface en contact avec la phase mobile. La résistance à l'écoulement est donc augmentée.

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

En HPLC on travaille, en tête de colonne, à des pressions entre 20 et 150 bars. [21]

Annexe II : Table des tests statistiques de la validation (test t de Student)

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

Test t de Student

La comparaison des droites est basée sur le test t de Student selon une stratégie statistique qui permet la recherche d'effet matrice et/ou de l'erreur systématique en vérifiant la spécificité de la méthode pour le dosage du principe actif seul et aussi pour la forme reconstituée

Si les pentes du standard E et du standard V sont comparables, leur différence ne doit pas être différente de zéro.

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

$$t \text{ calculé} = \frac{a_1 - a_2}{\sqrt{\sigma_{\alpha_1}^2 + \sigma_{\alpha_2}^2}}$$

Le t calculé est comparé à la valeur t° ($\alpha ; n_1 + n_2 - 4$) lue sur la table de Student.

Si $t \text{ calculé} < t^\circ$: les pentes sont comparables donc absence d'effet matrice la méthode est spécifique.

Avec :

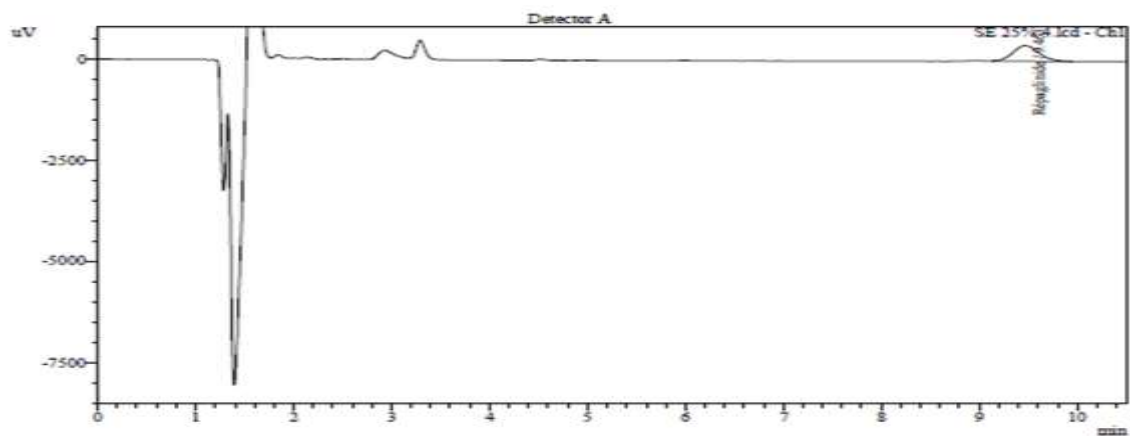
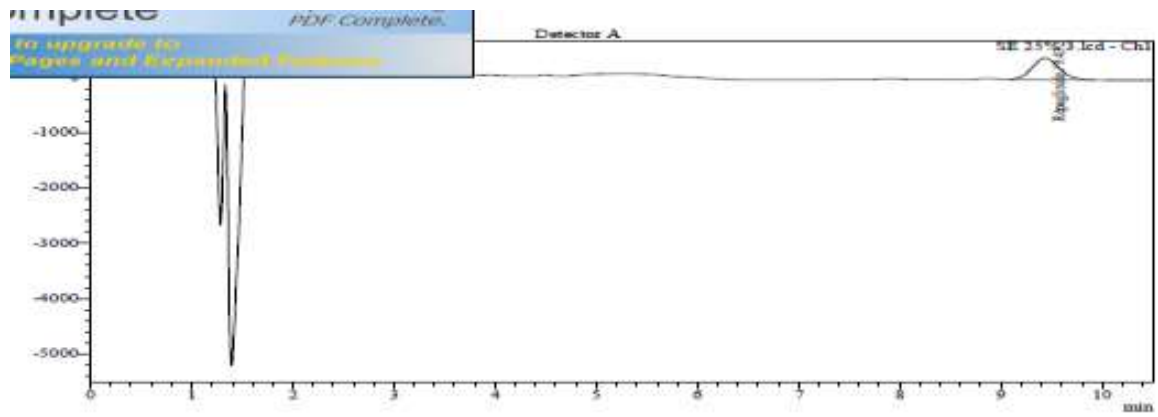
- α_1 et α_2 : pentes respectives des droites de régression D1 (obtenue à partir de la gamme standard E) et D2 (obtenue à partir de la gamme standard V).
- $\sigma_{\alpha_1}^2$ et $\sigma_{\alpha_2}^2$: variances perspectives des pentes α_1 et α_2 .
- α : risque accepté (5%).
- n_1 et n_2 : nombre d'échantillons réalisés pour la gamme standard E et la gamme standard V
- $n_1 + n_2 - 4$: degré de liberté (ddl).

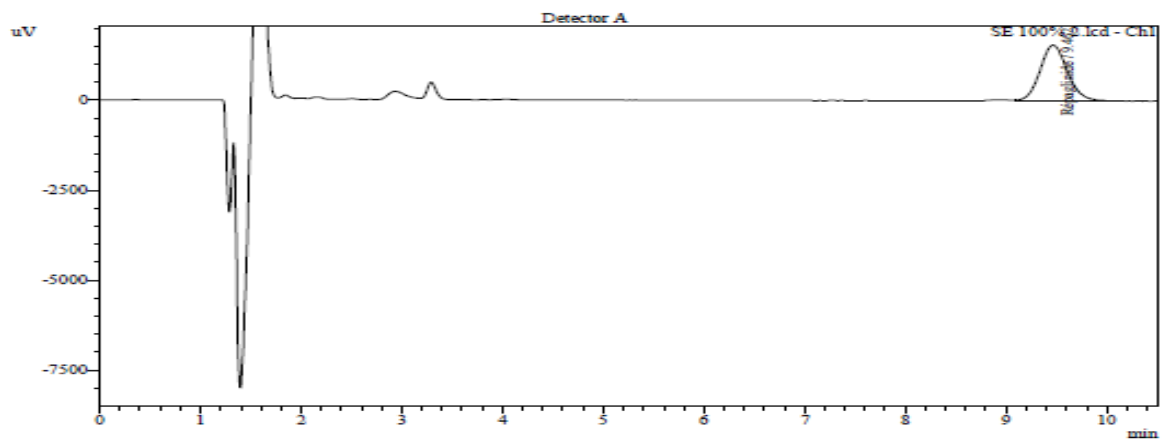
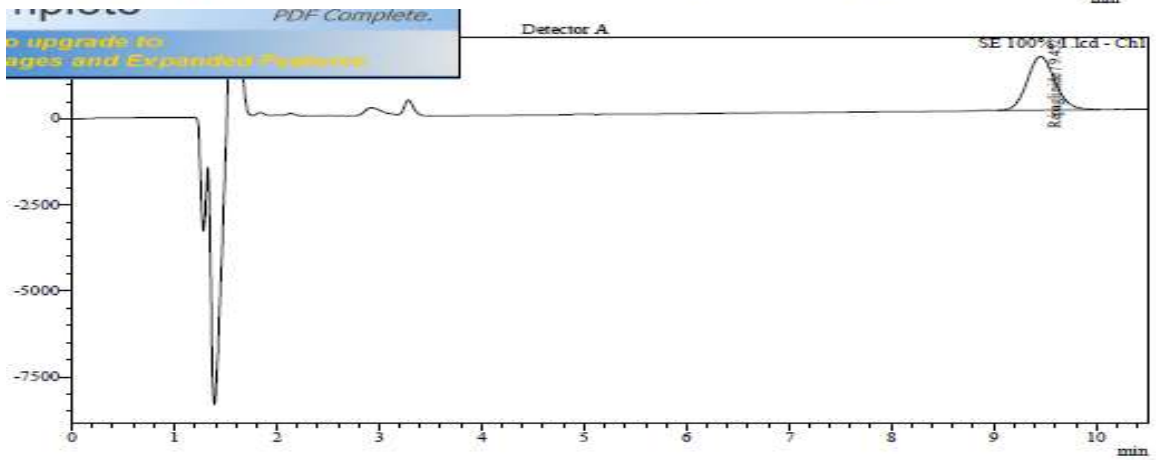
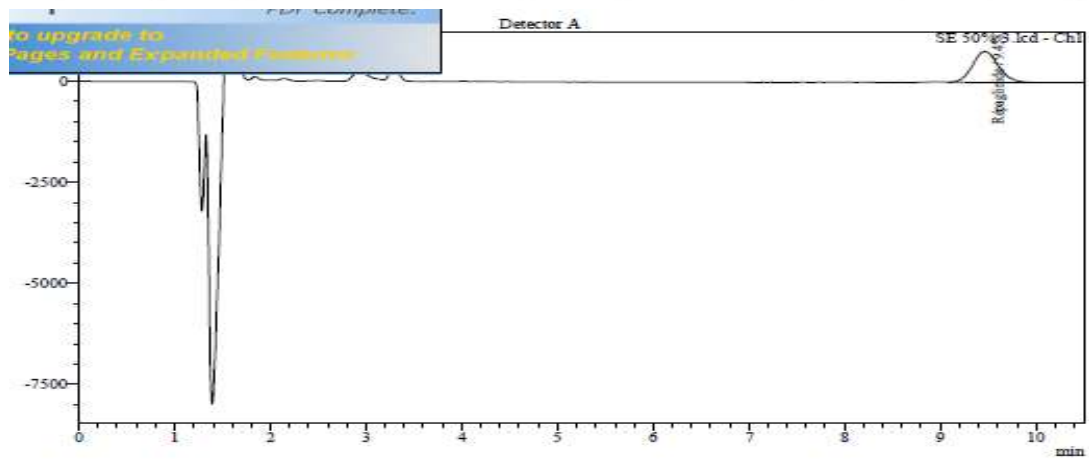
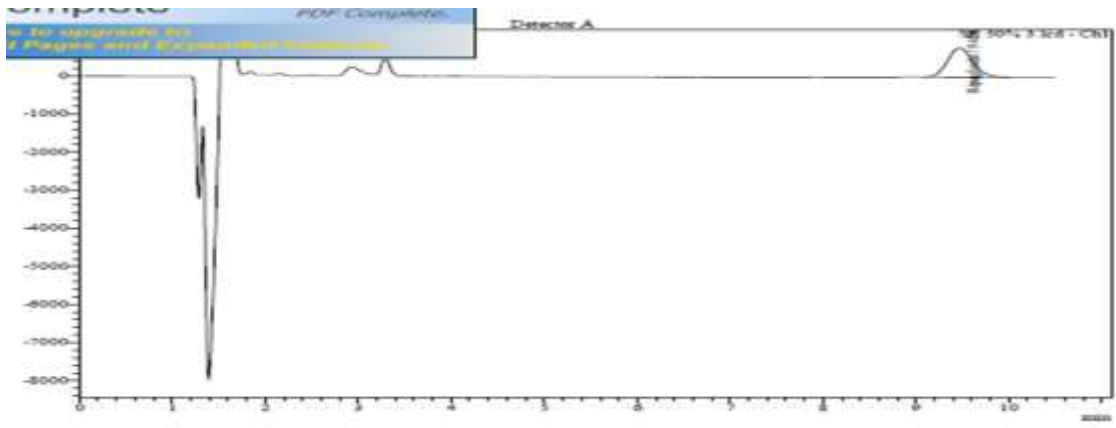
Annexe III : Chromatogrammes

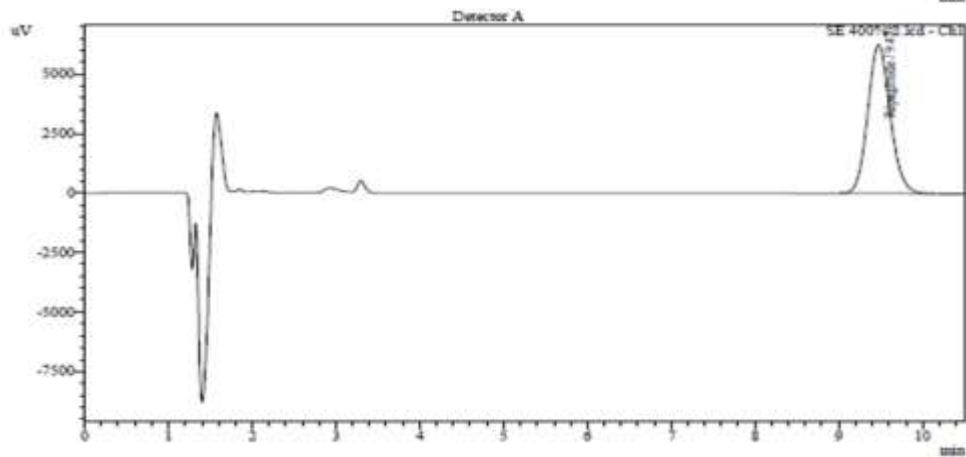
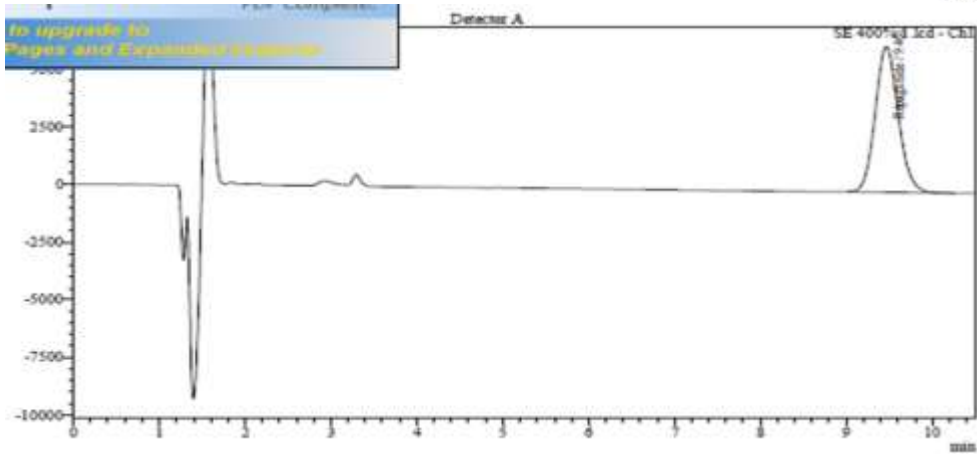
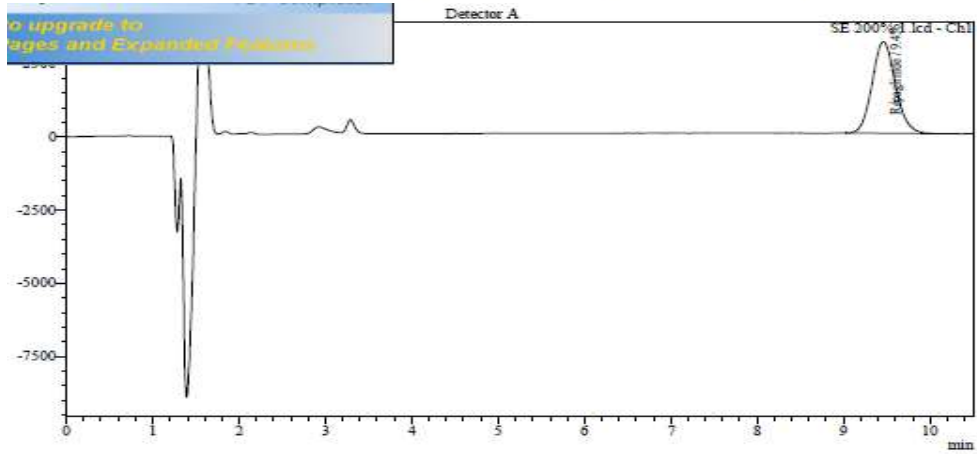
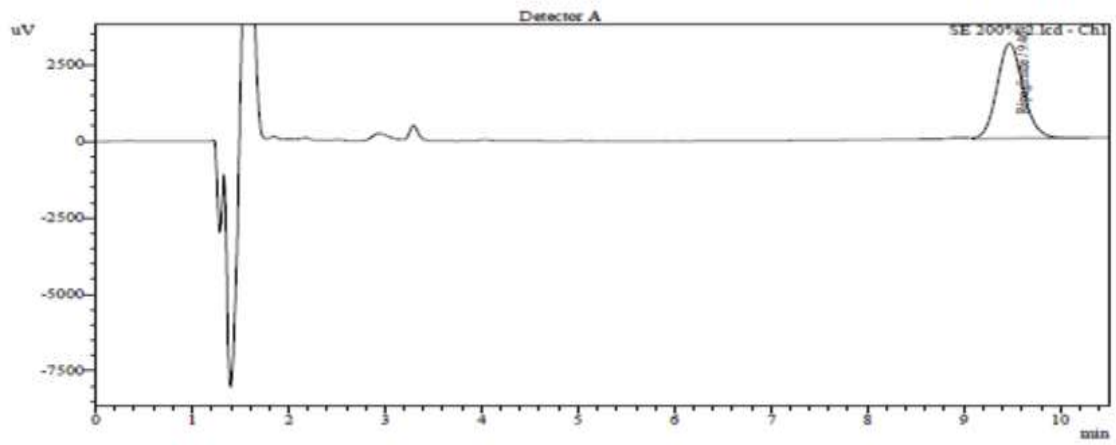
SERIE 1

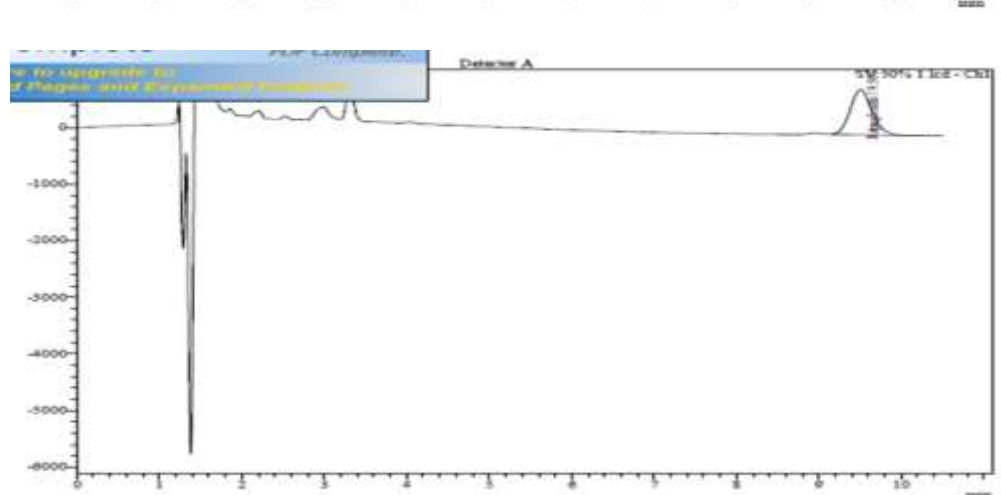
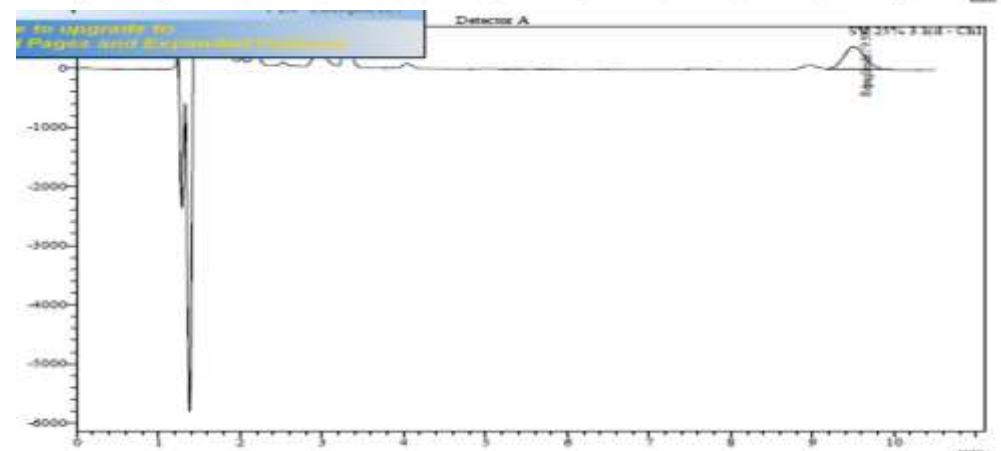
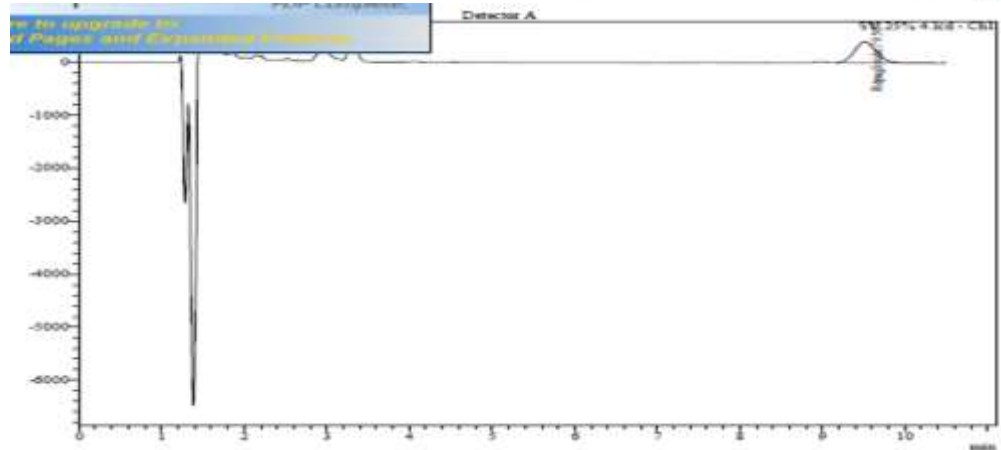
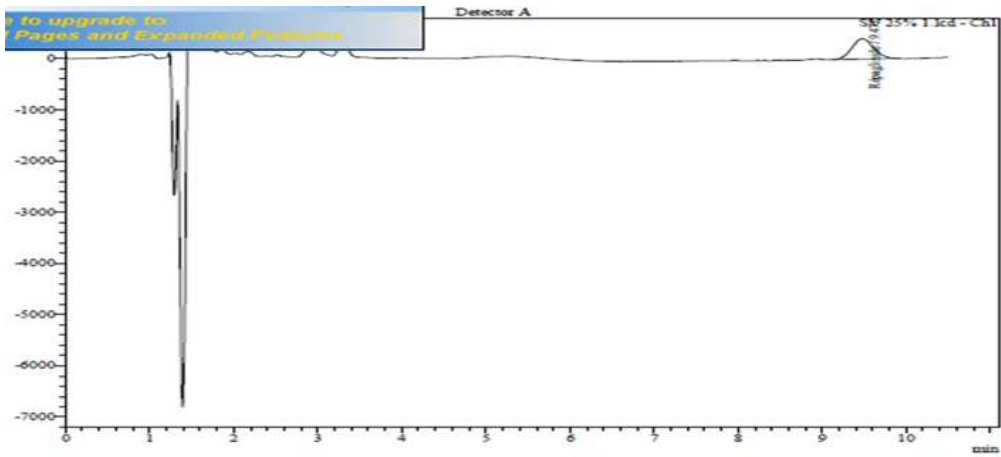
Sample Information

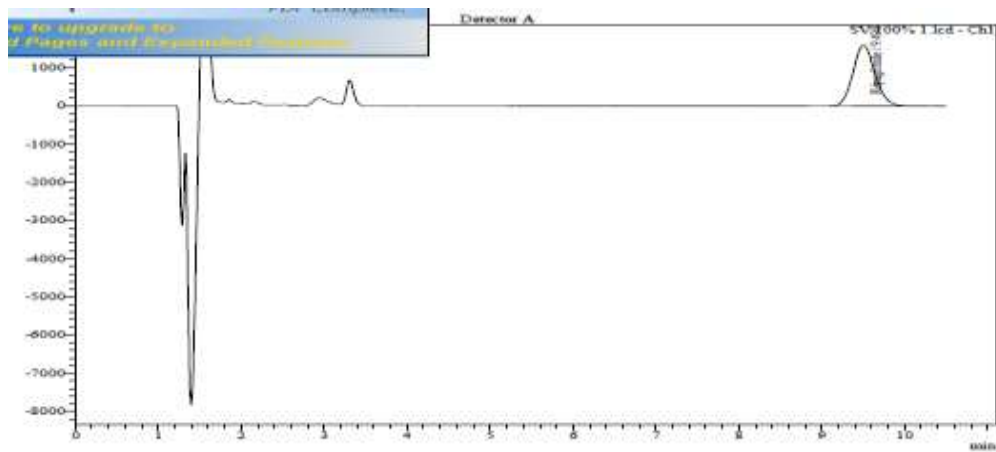
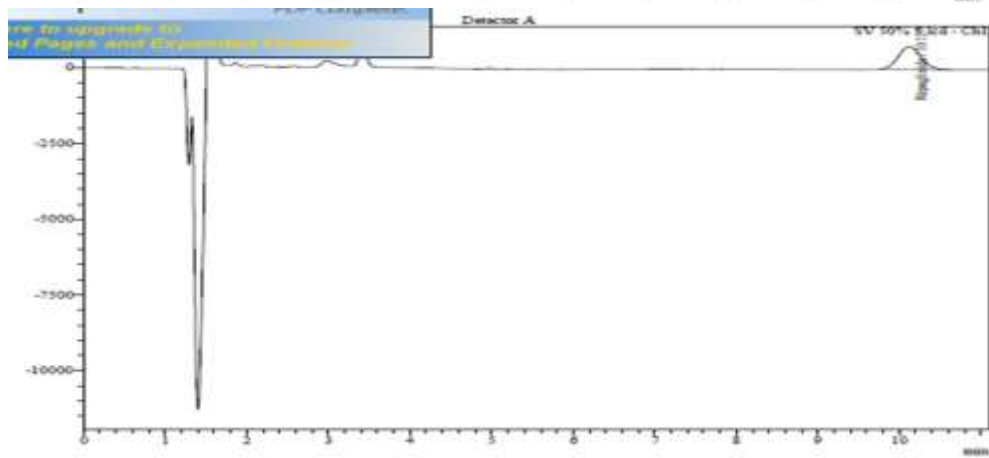
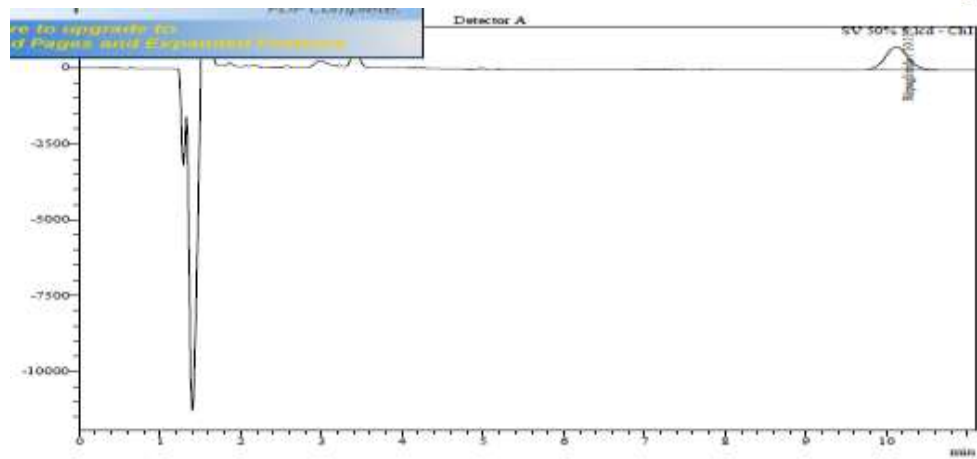
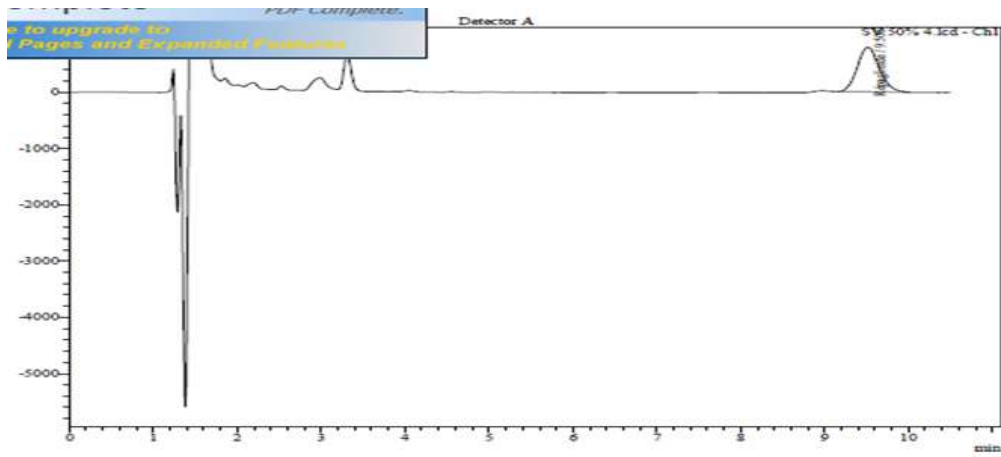
Acquired by : Admin
Sample Name : SE 25% 1
Sample ID : SE
Tray# : 1L
Vial# : 61
Injection Volume : 50 µL
Data Filename : SE 25% 1.kd
Method Filename : répaglinide.lcm
Batch Filename : répaglinide série 05.lcb
Report Filename : Default.lcr
Date Acquired : 01/01/2006 01:02:21
Data Processed : 01/01/2006 01:14:26

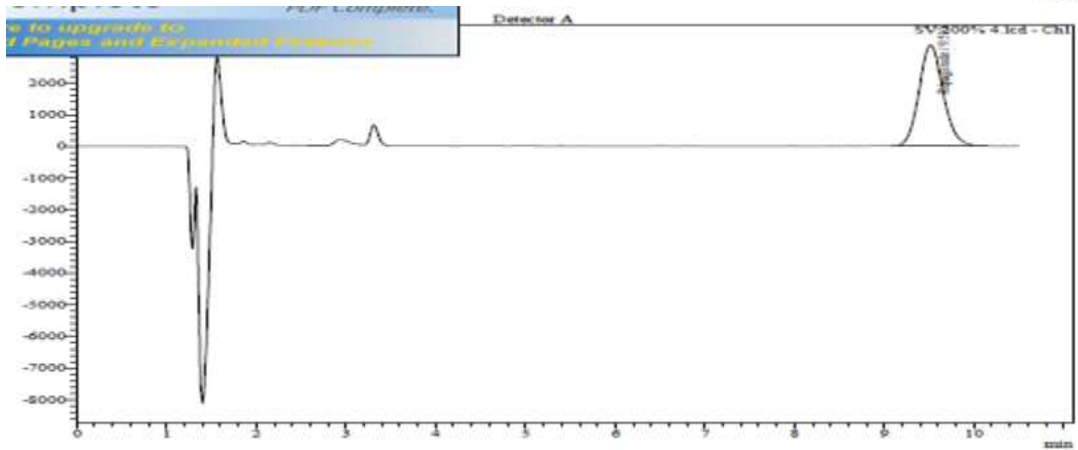
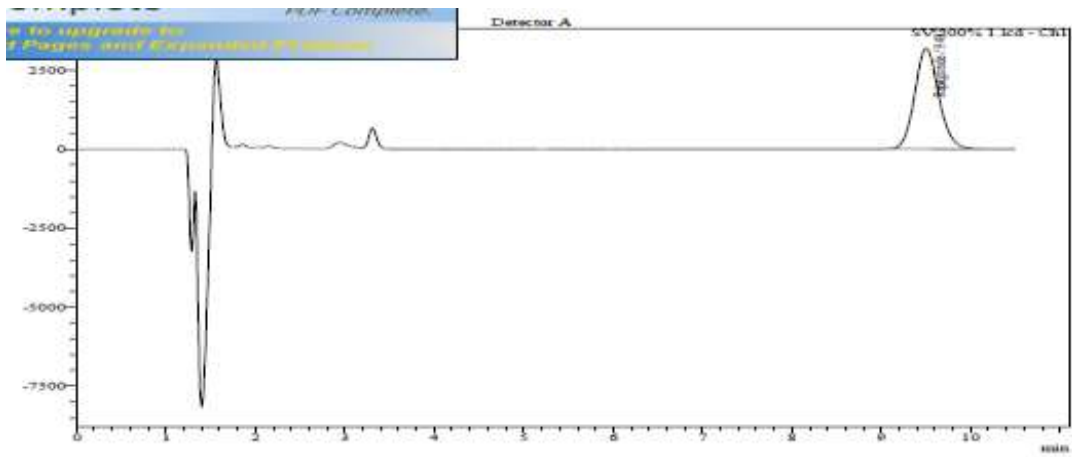
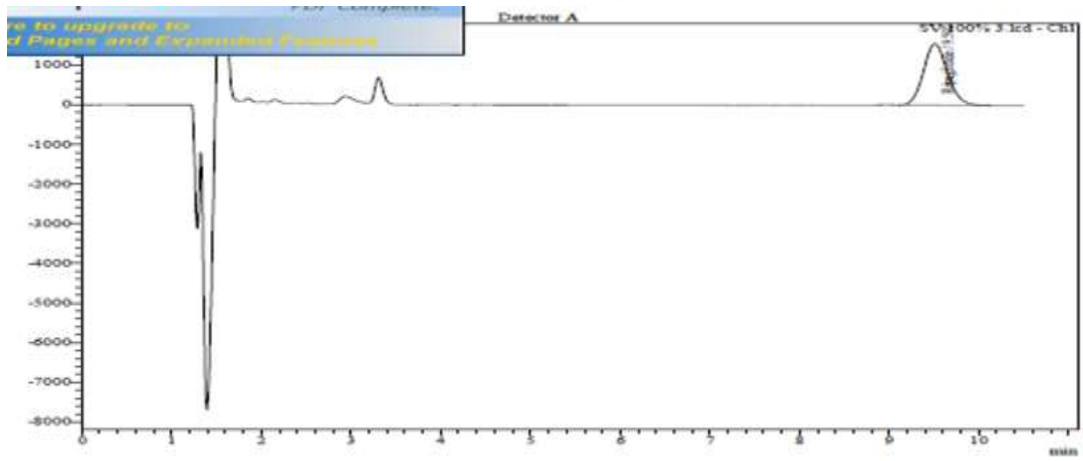
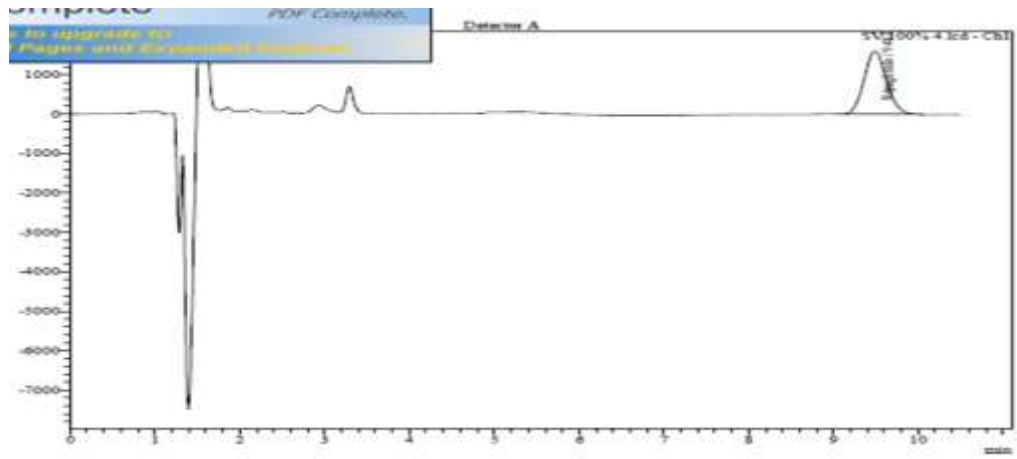


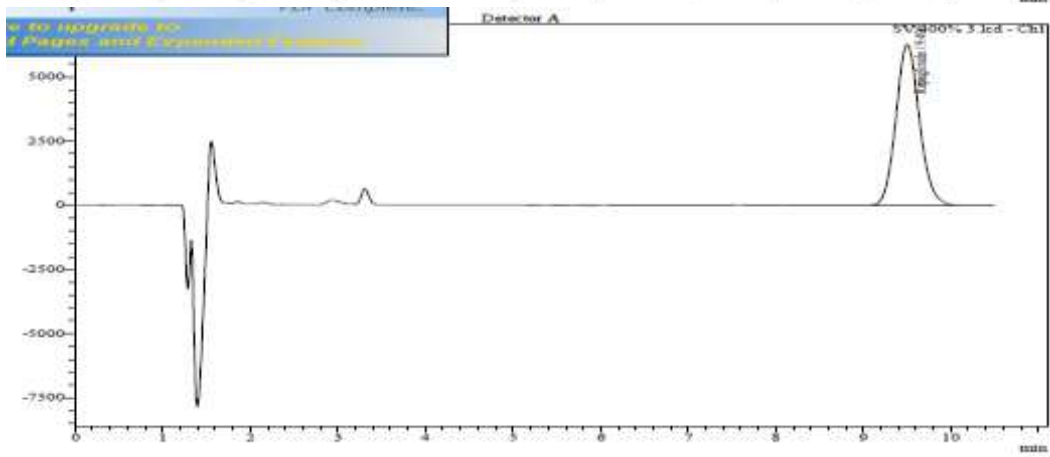
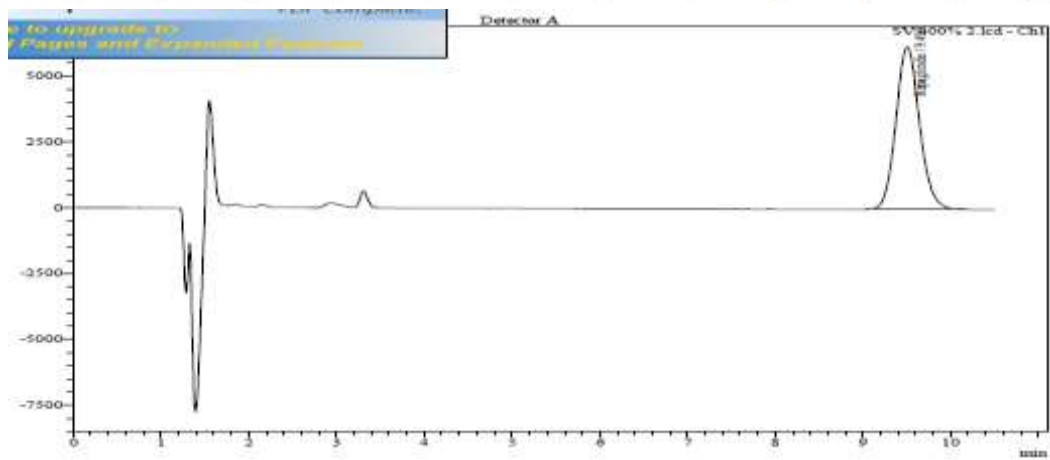
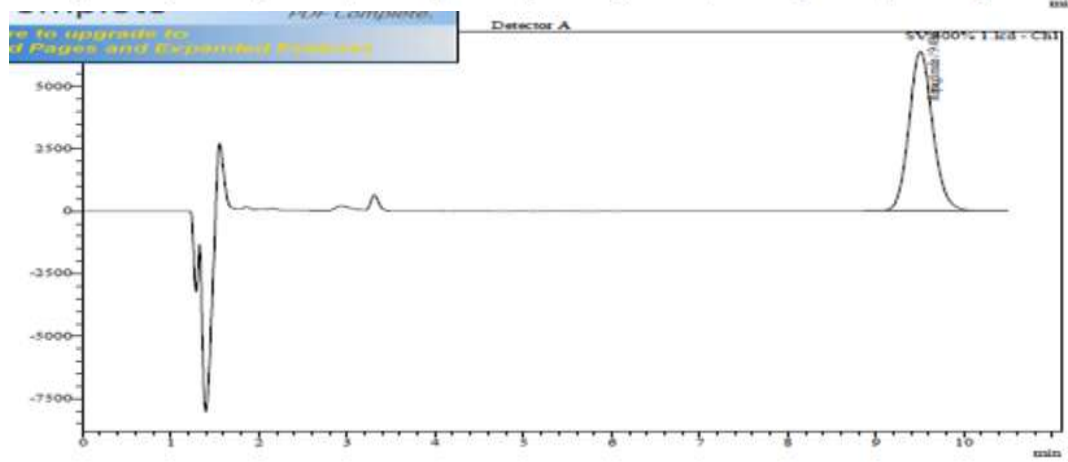
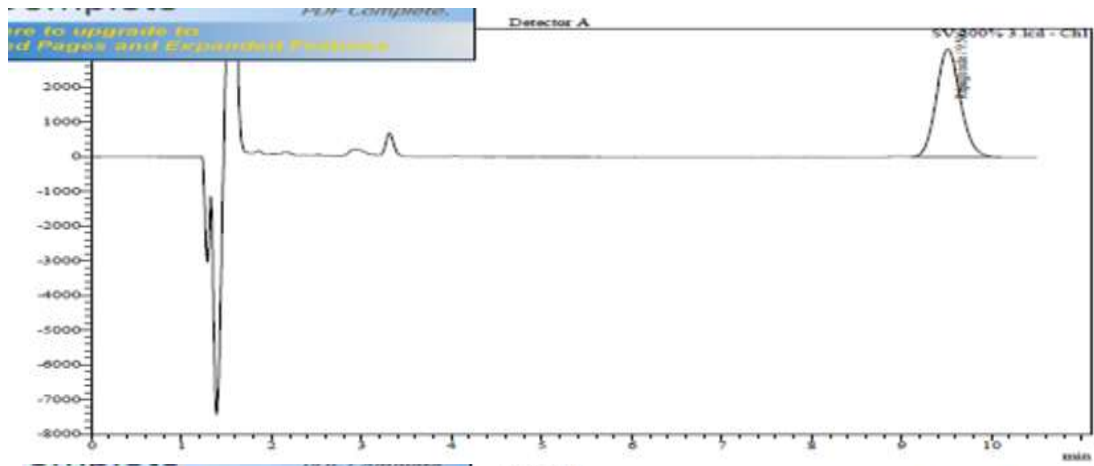




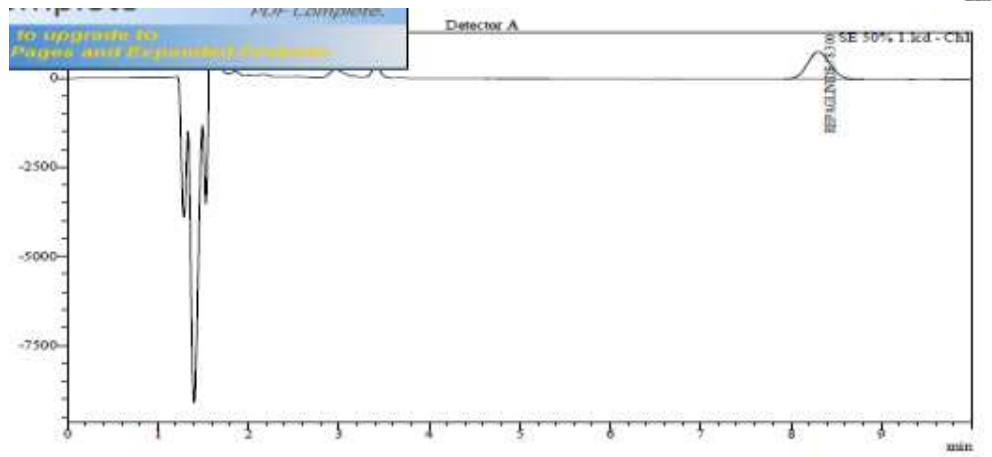
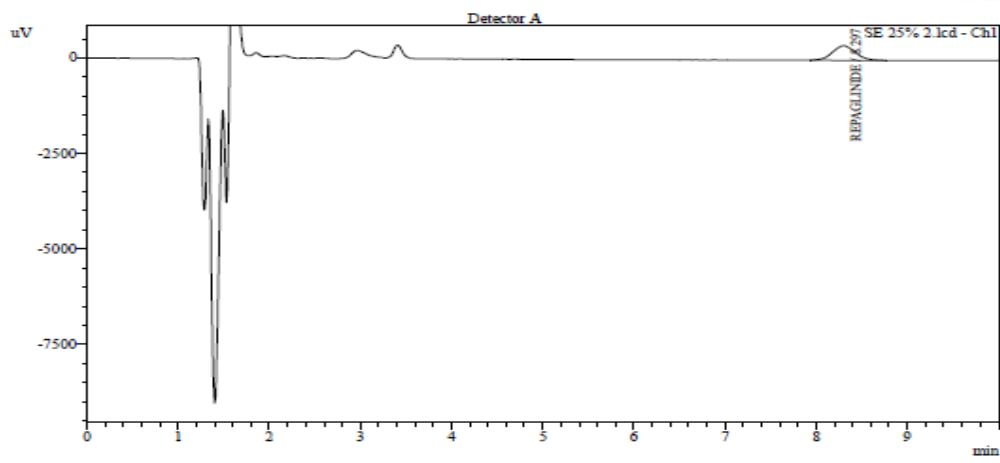
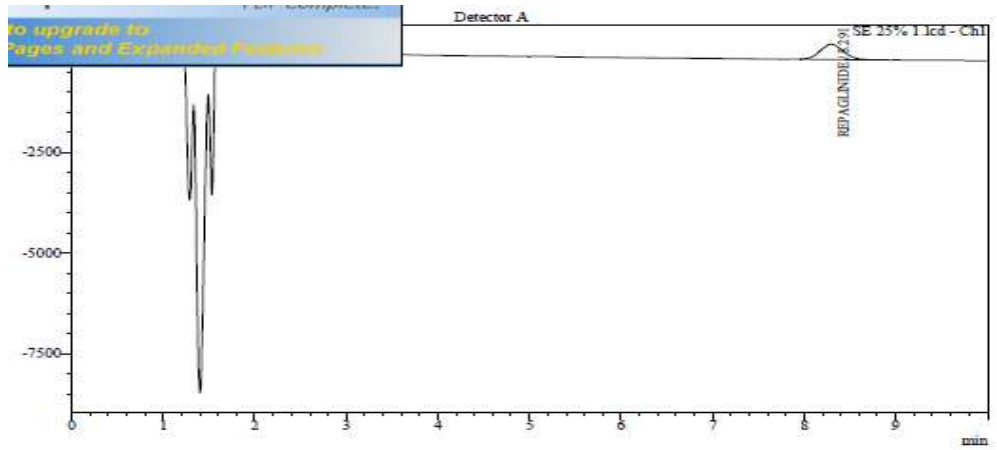


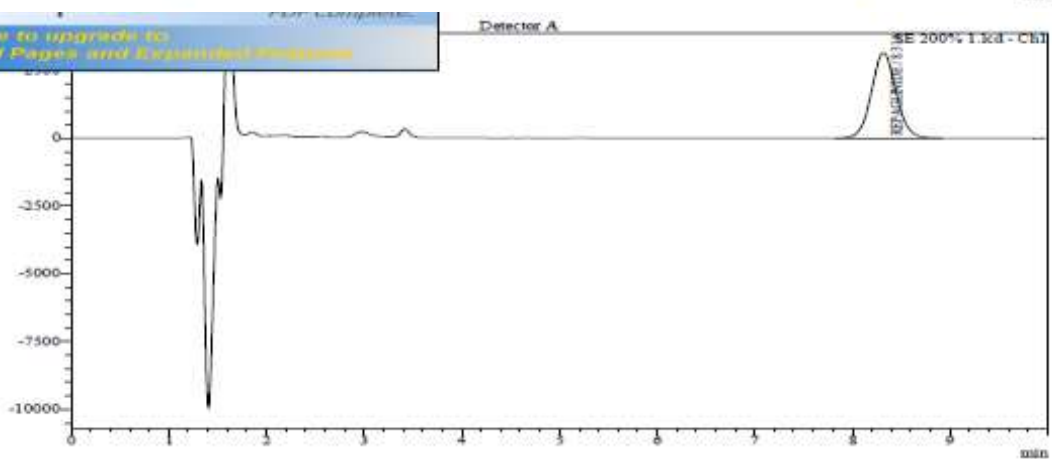
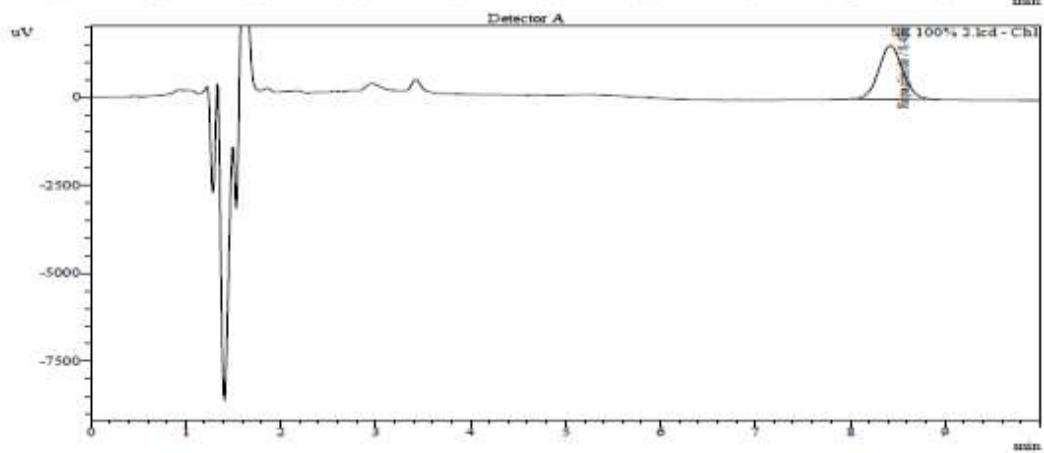
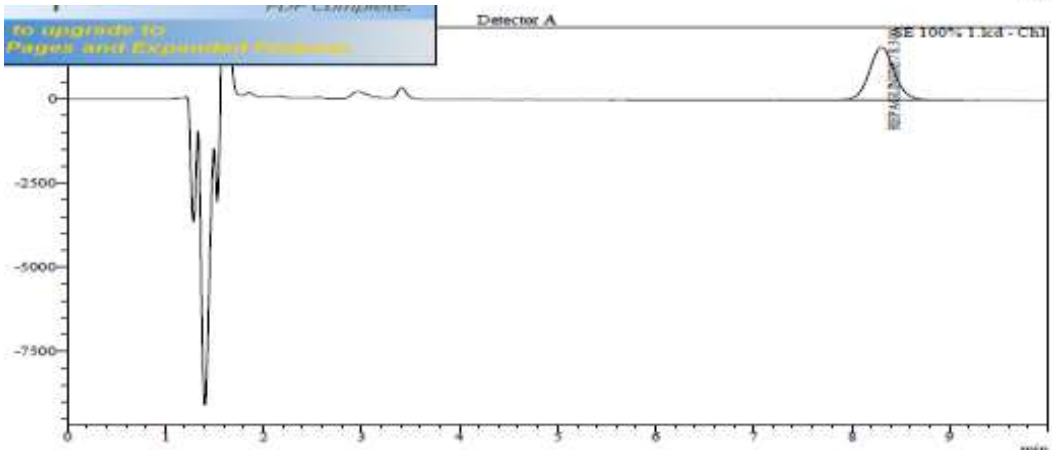
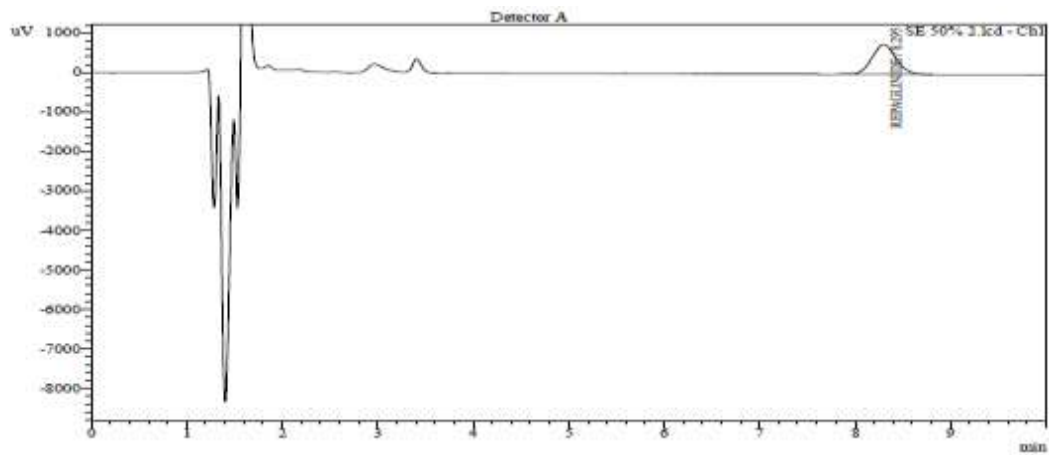


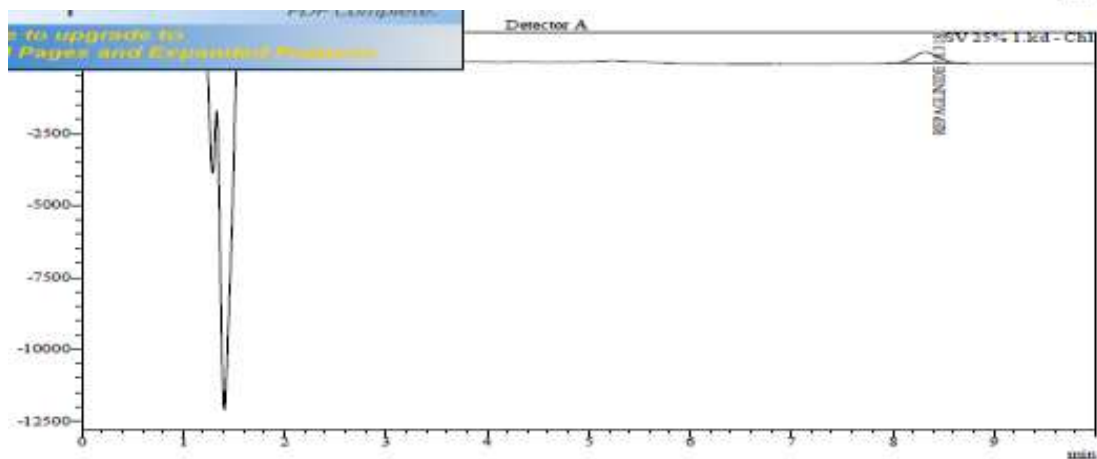
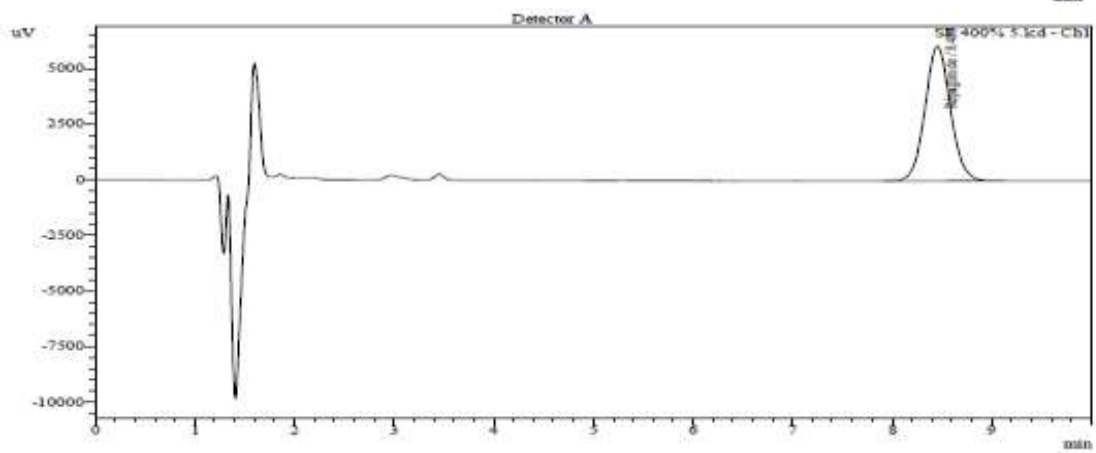
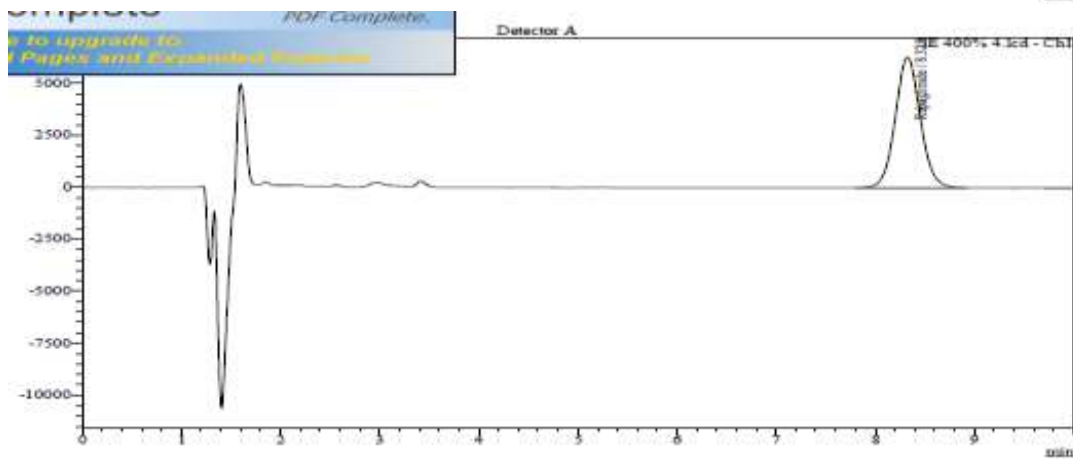
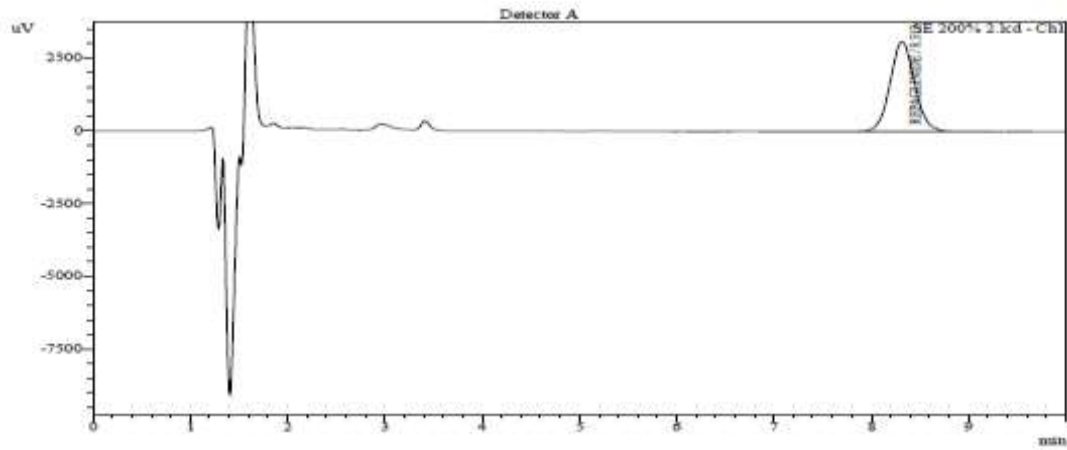


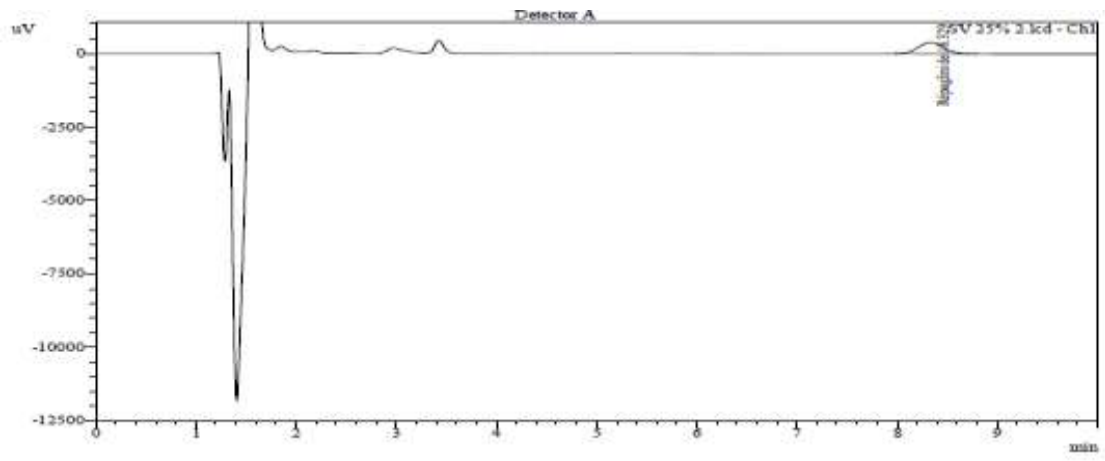


SERIE 2

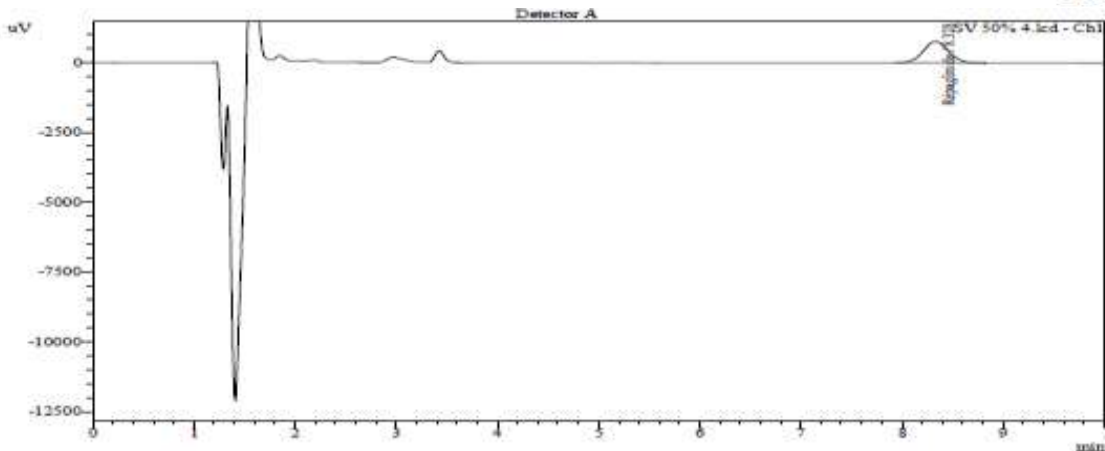
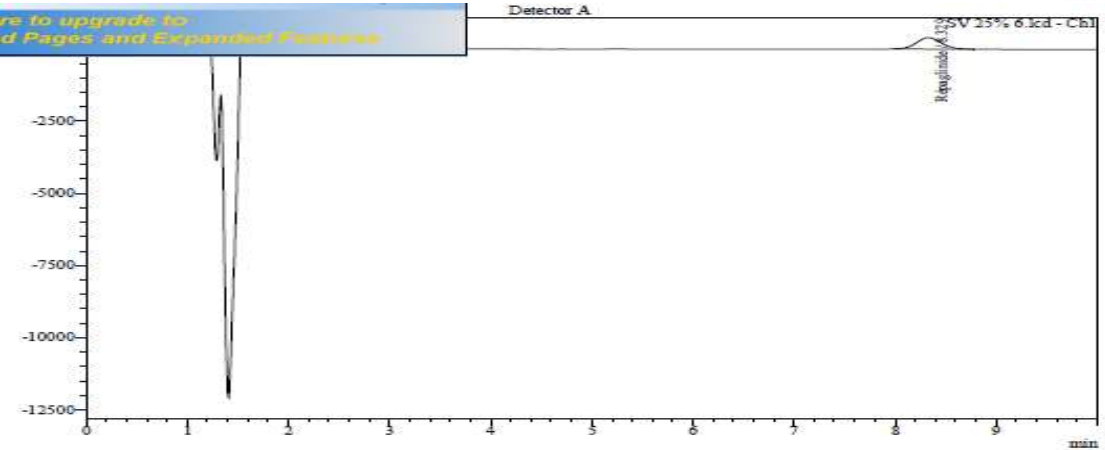




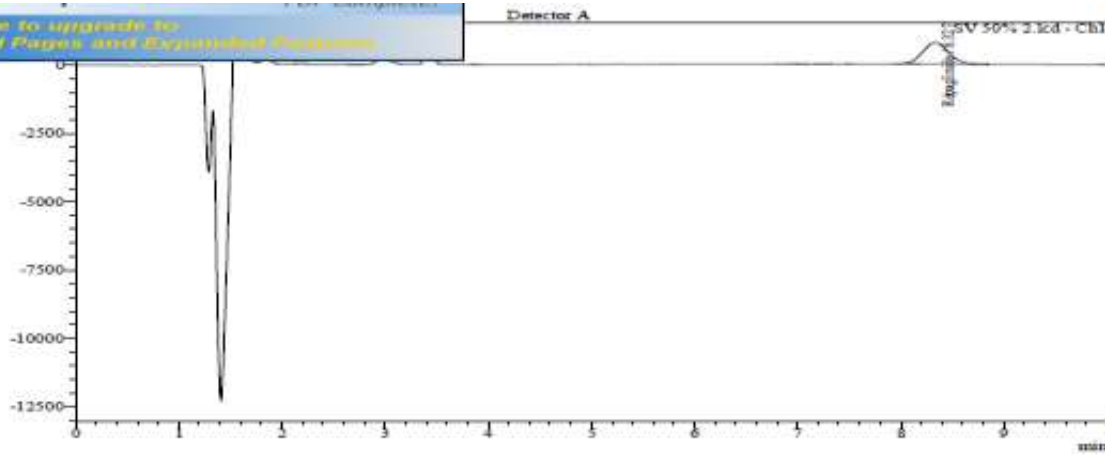


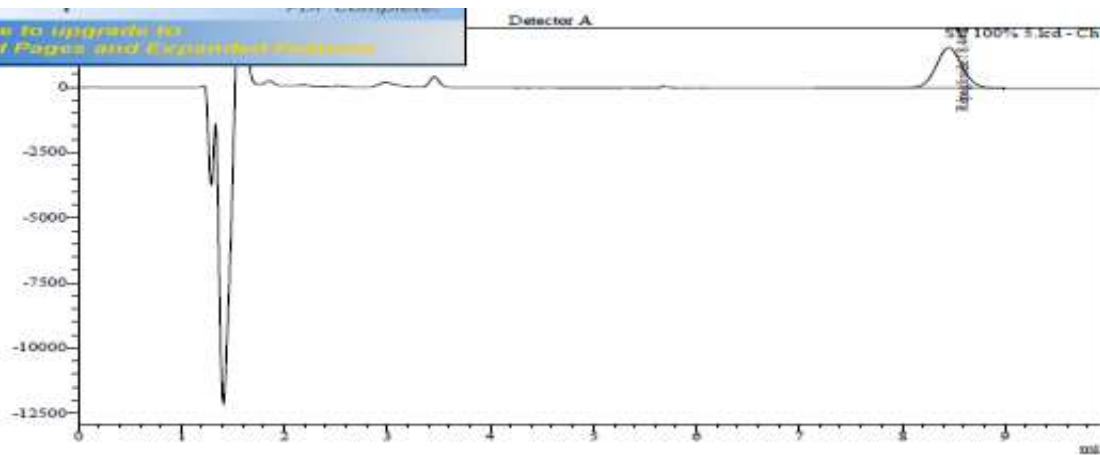
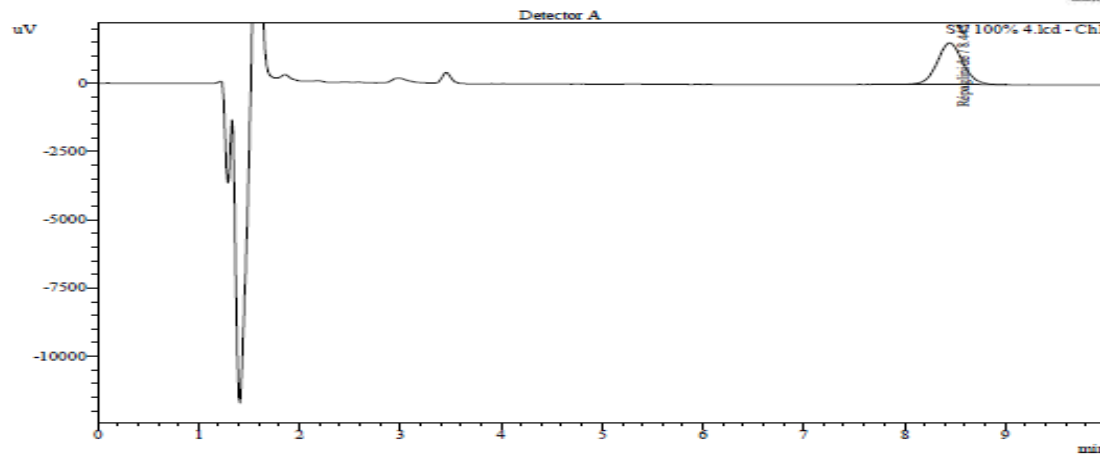
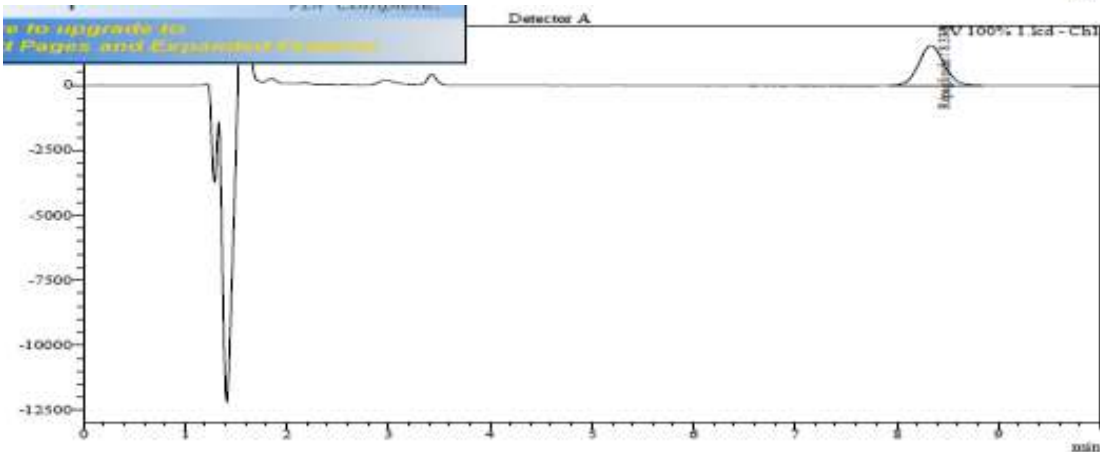
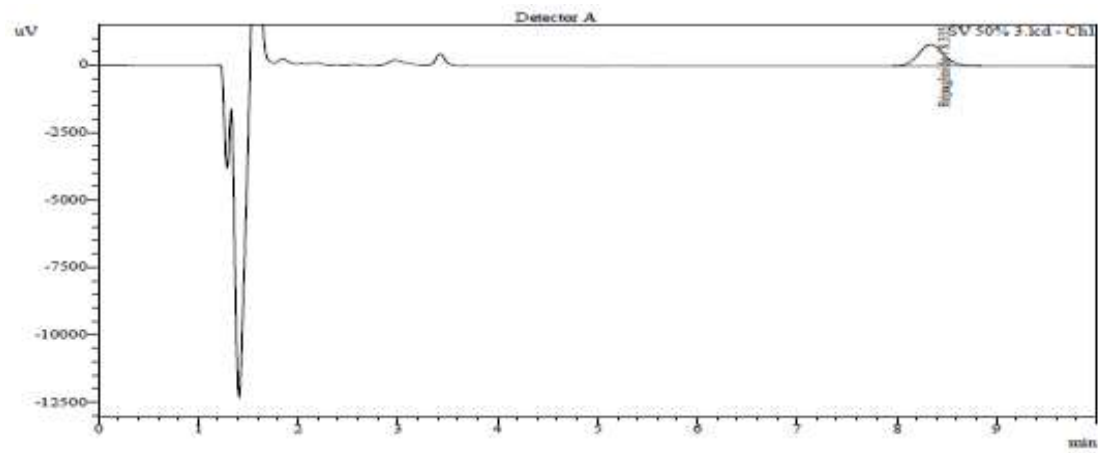


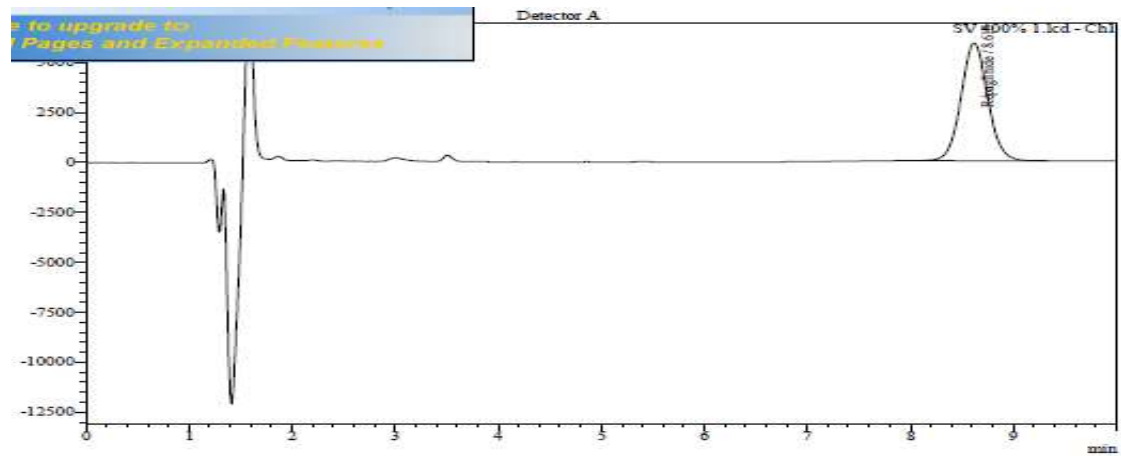
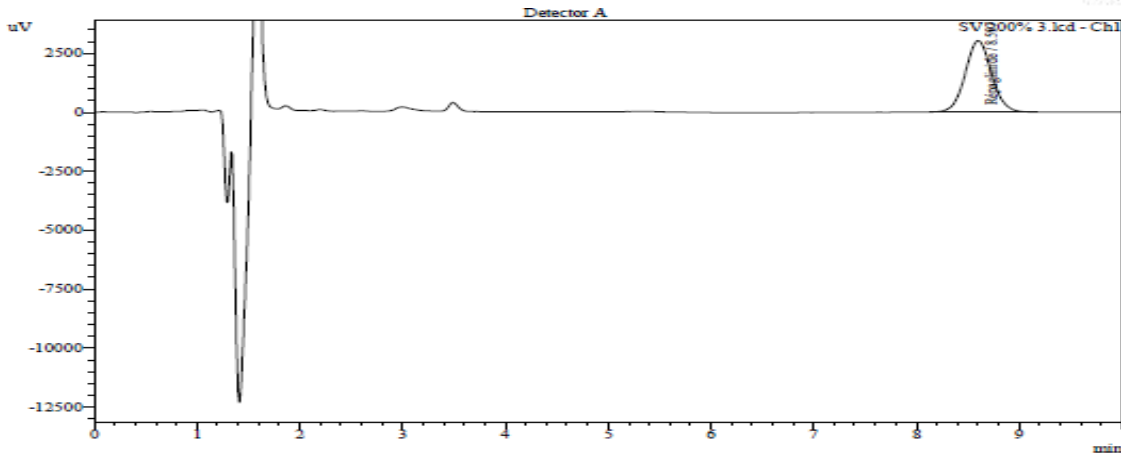
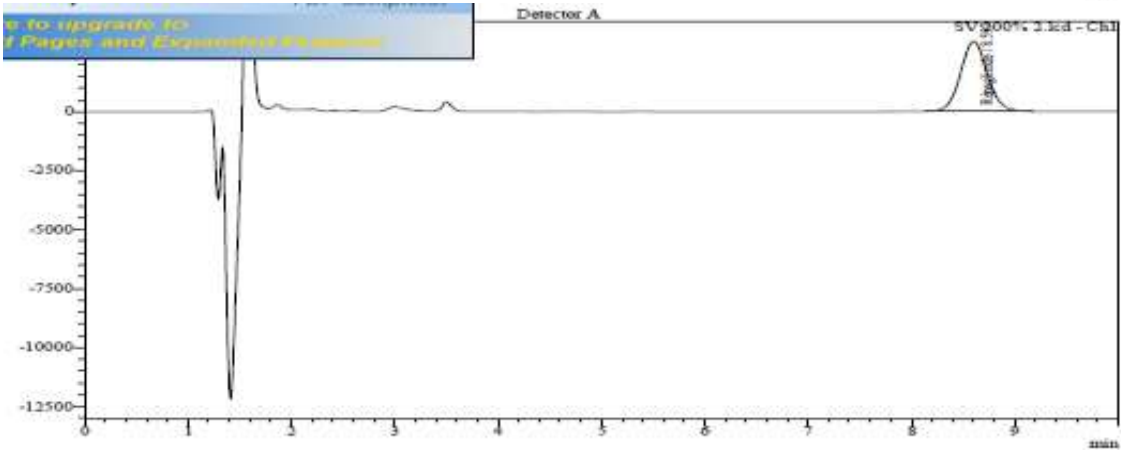
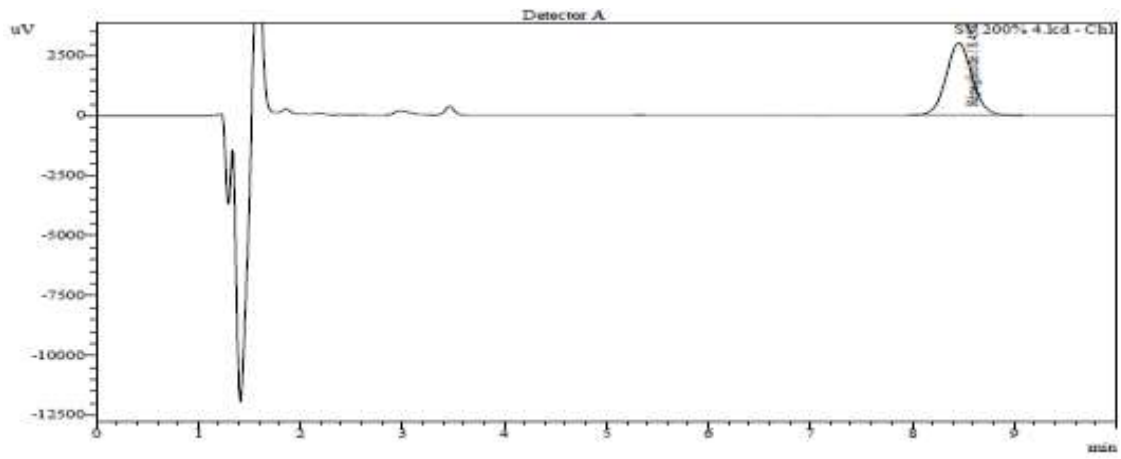
Click here to upgrade to 12 Pages and Expanded Features

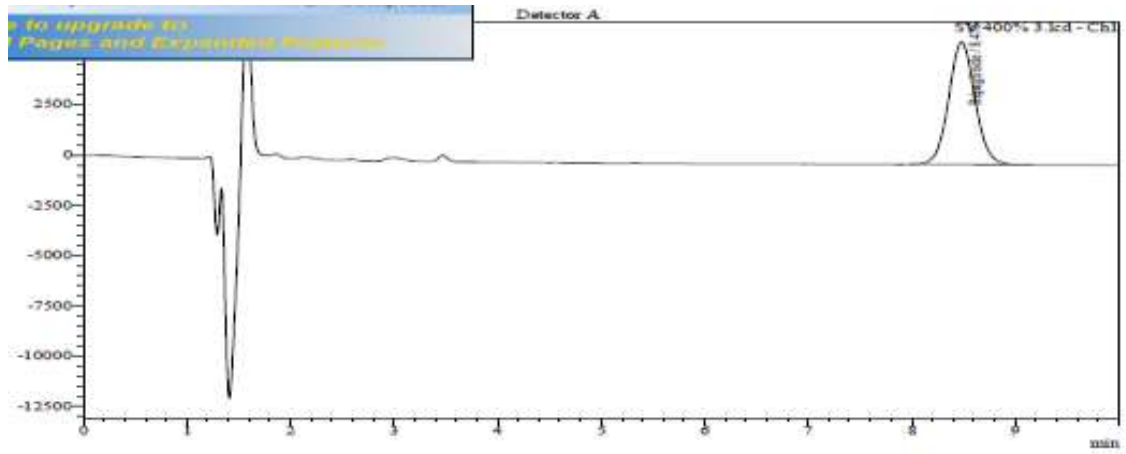
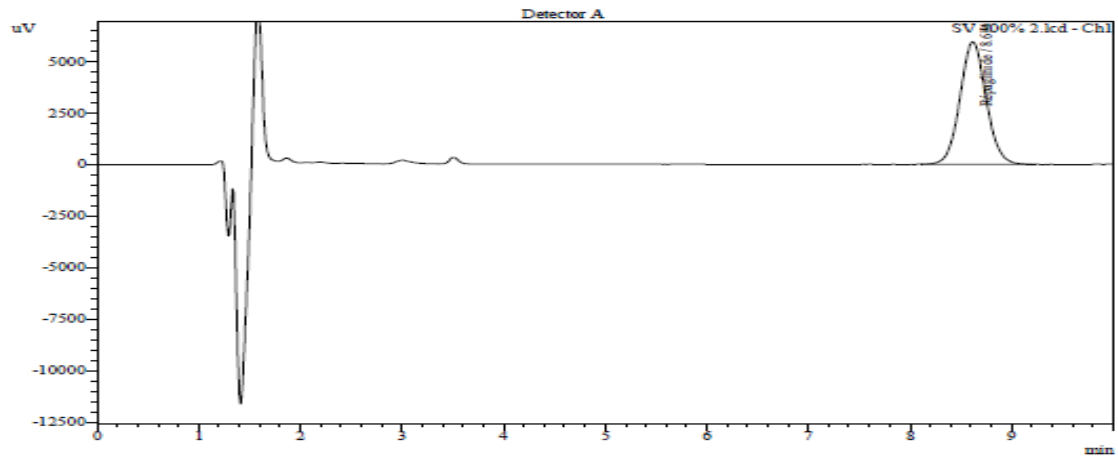


Click here to upgrade to 12 Pages and Expanded Features

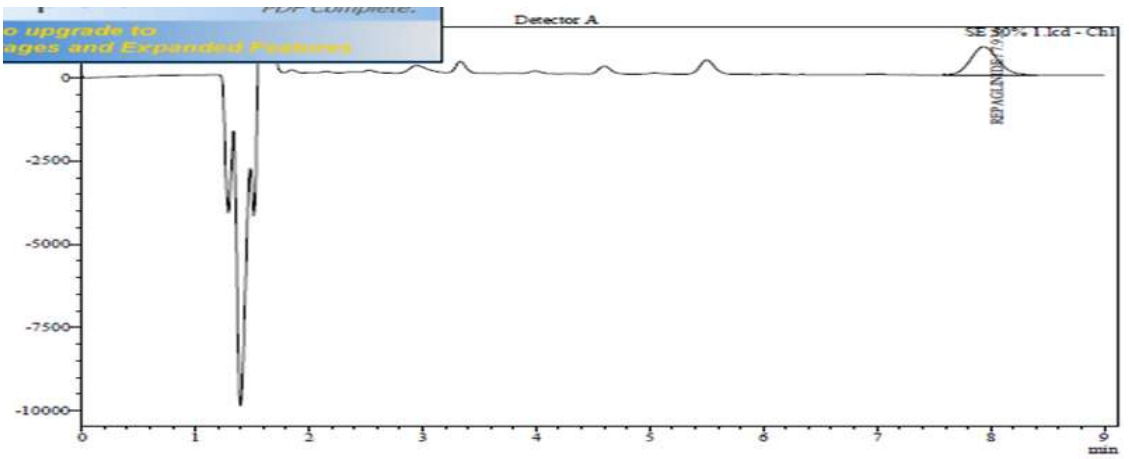
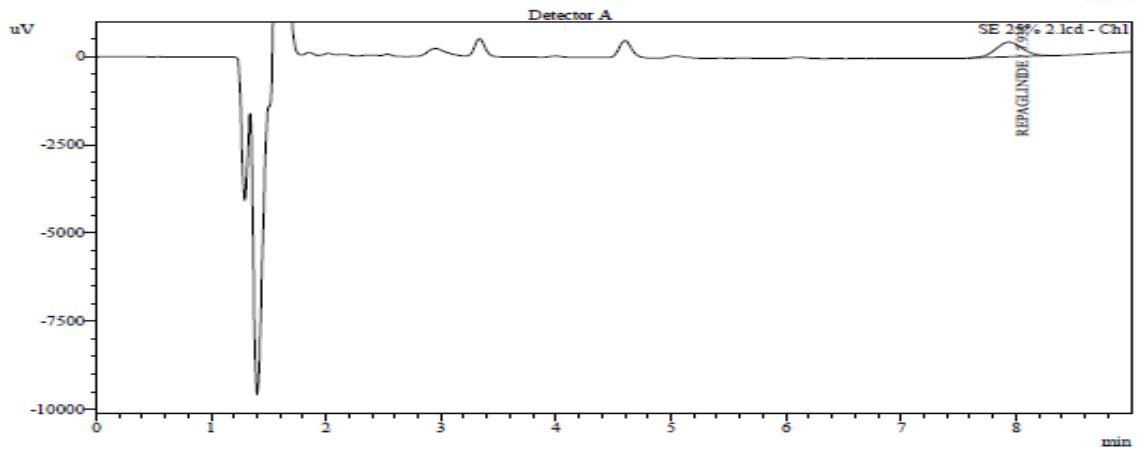
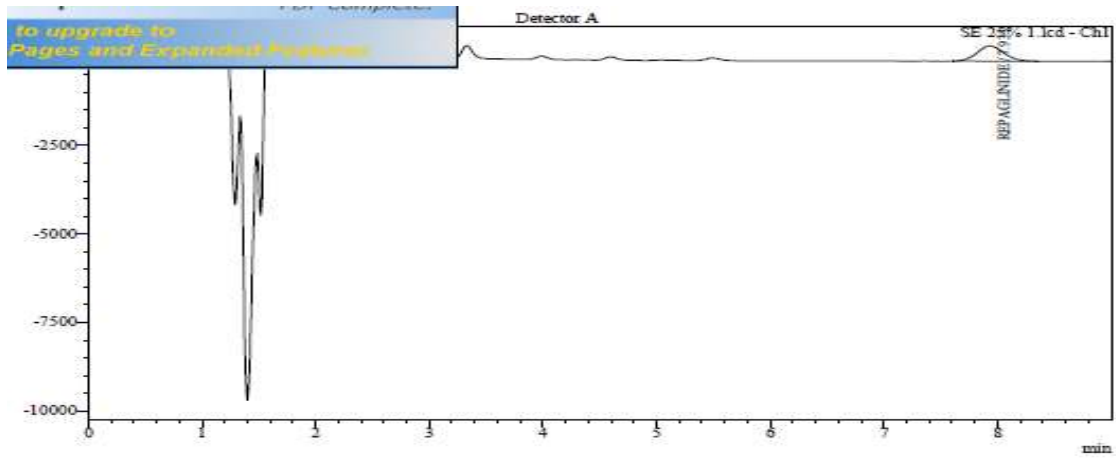


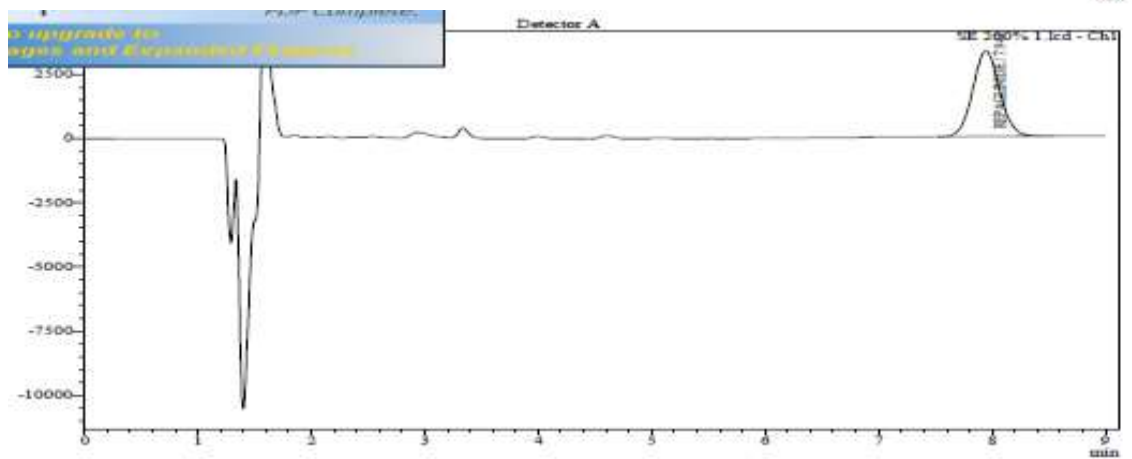
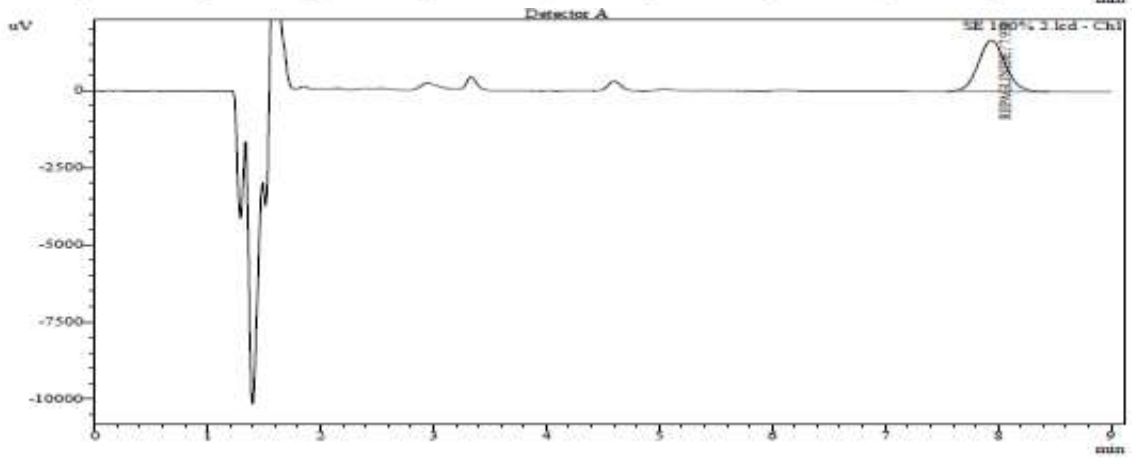
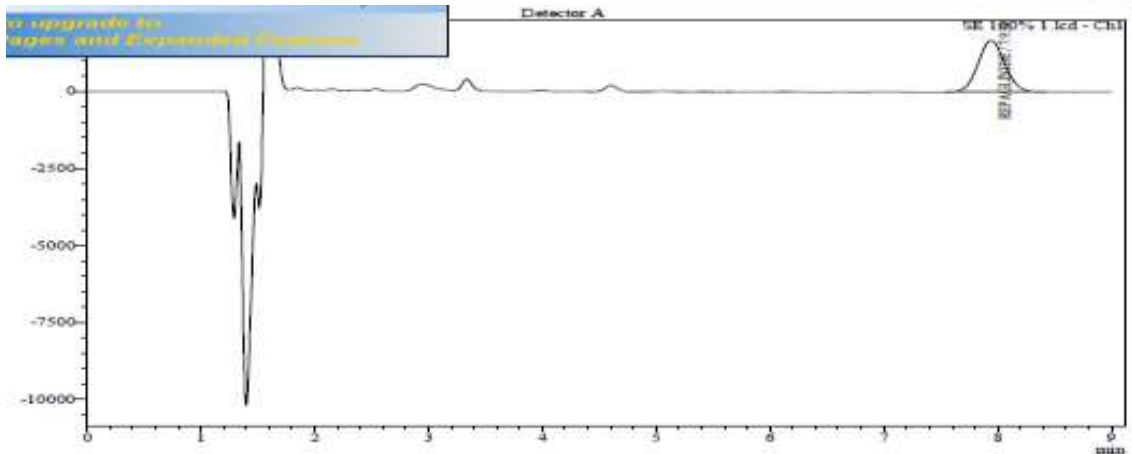
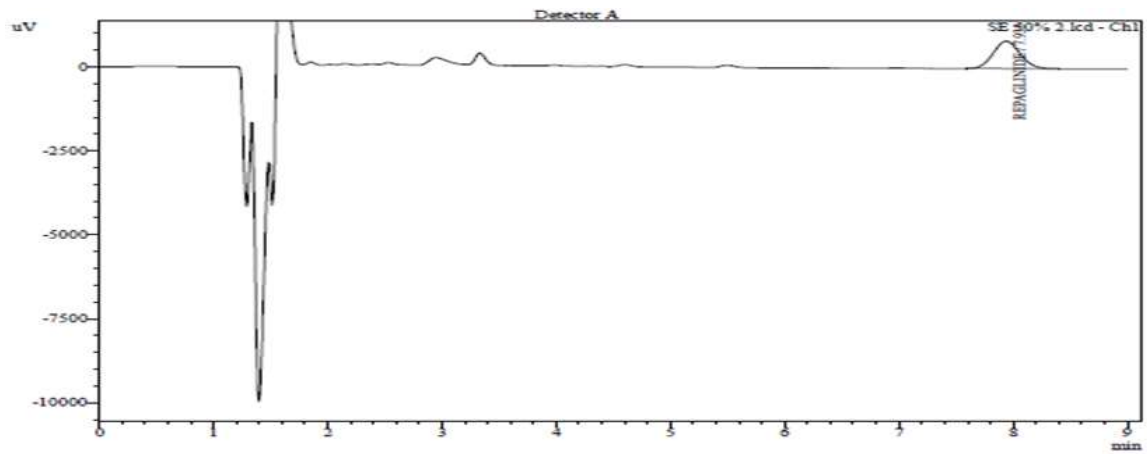


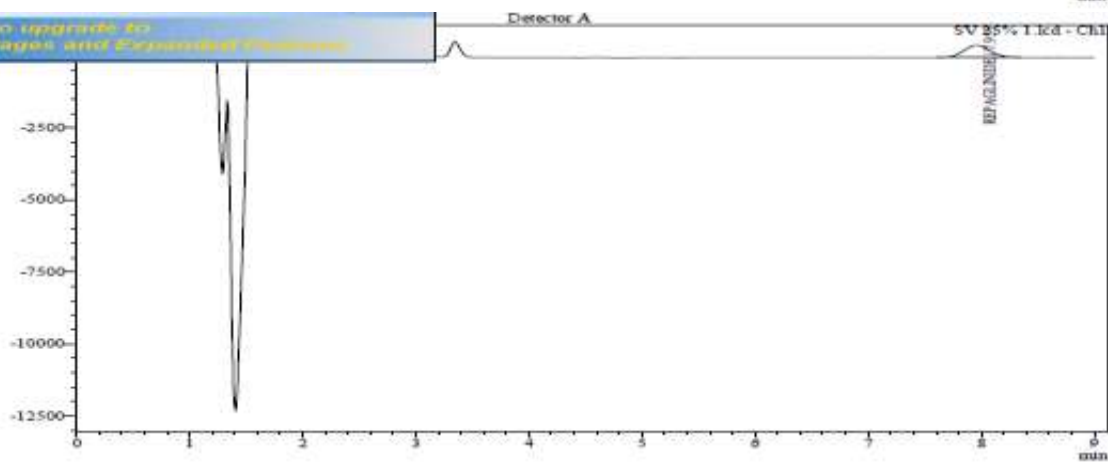
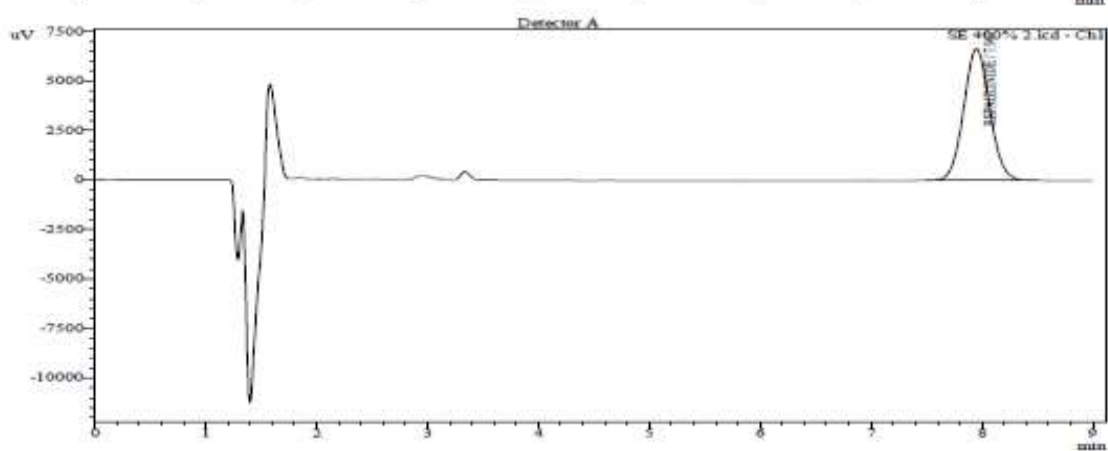
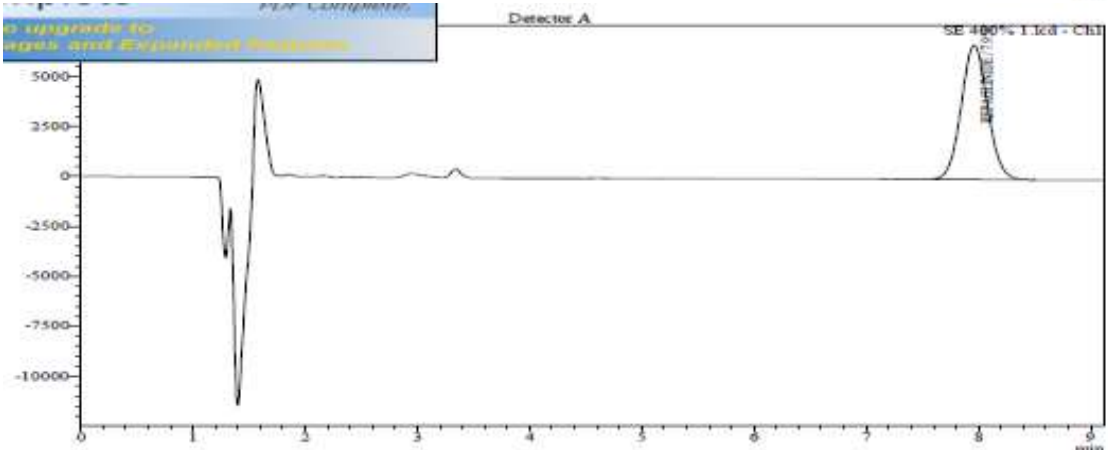
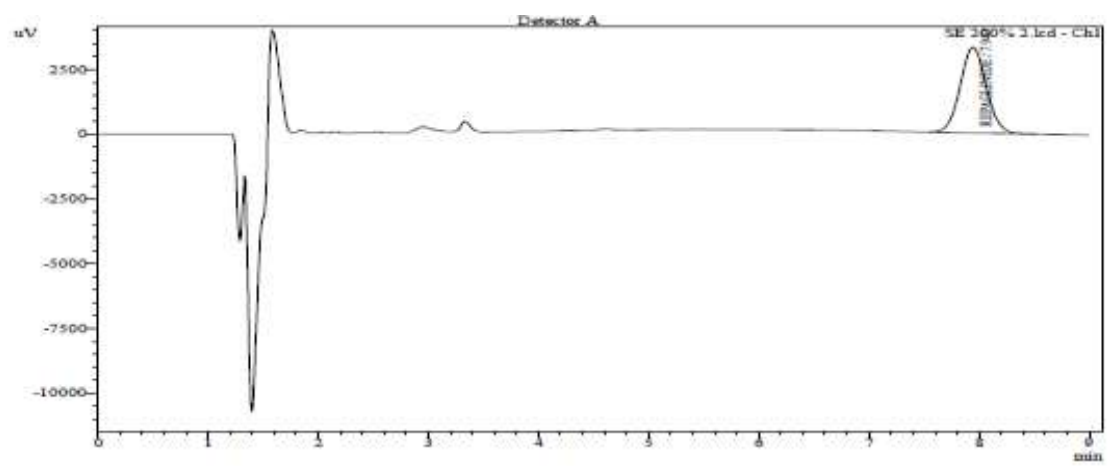




SERIE 3

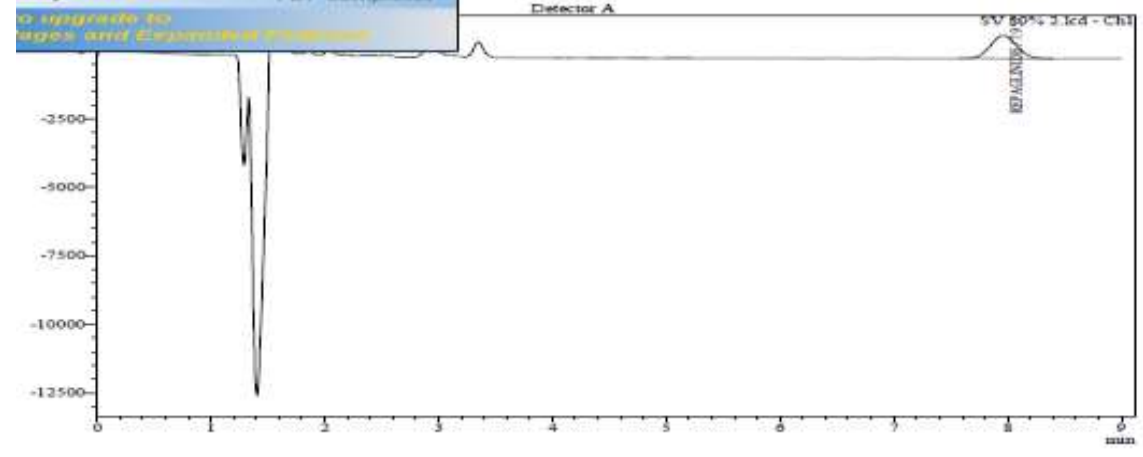
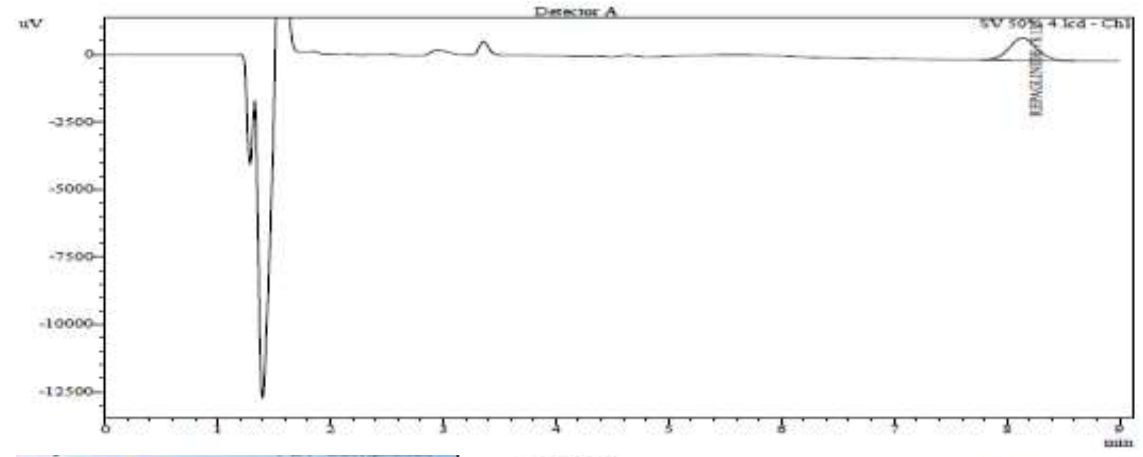
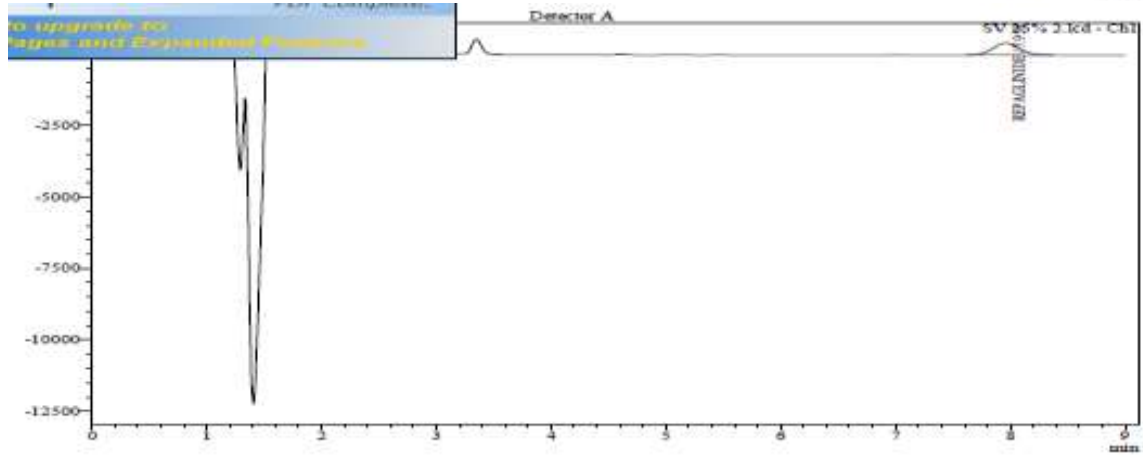
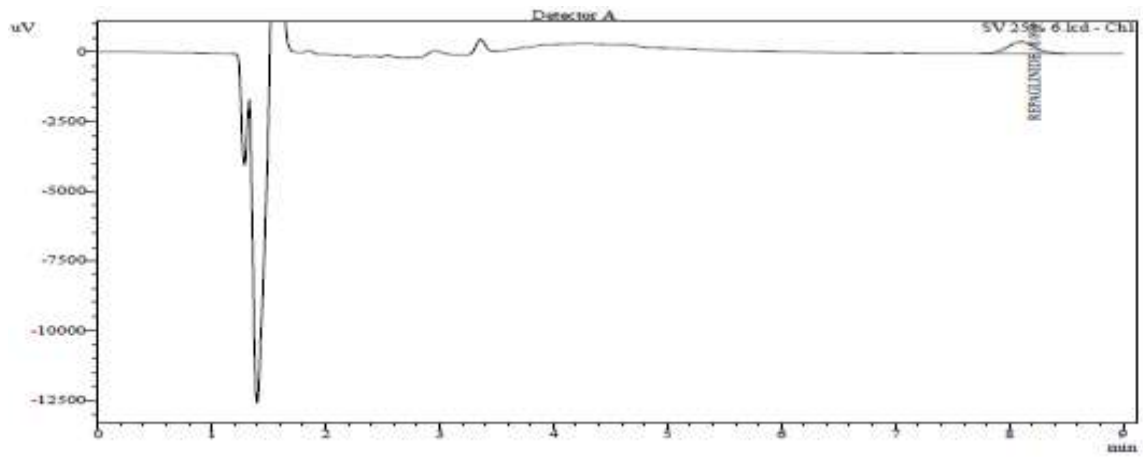


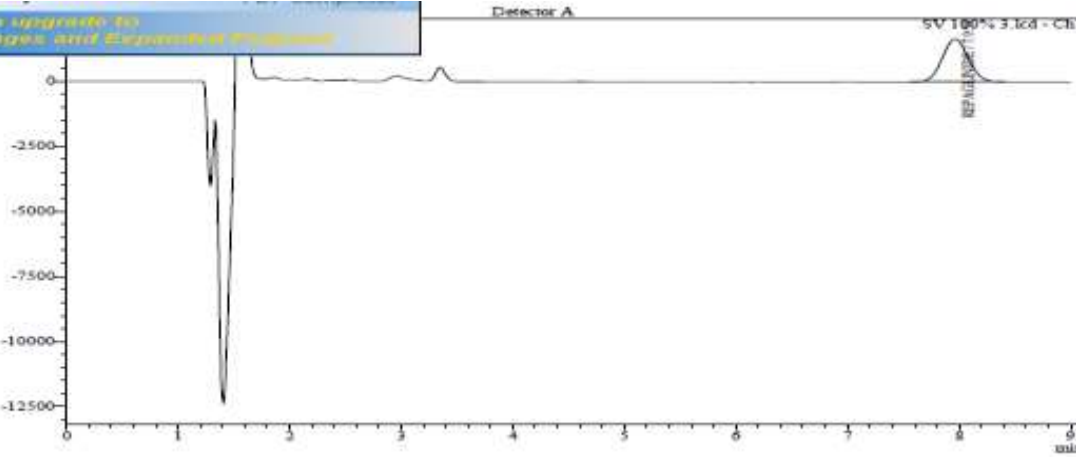
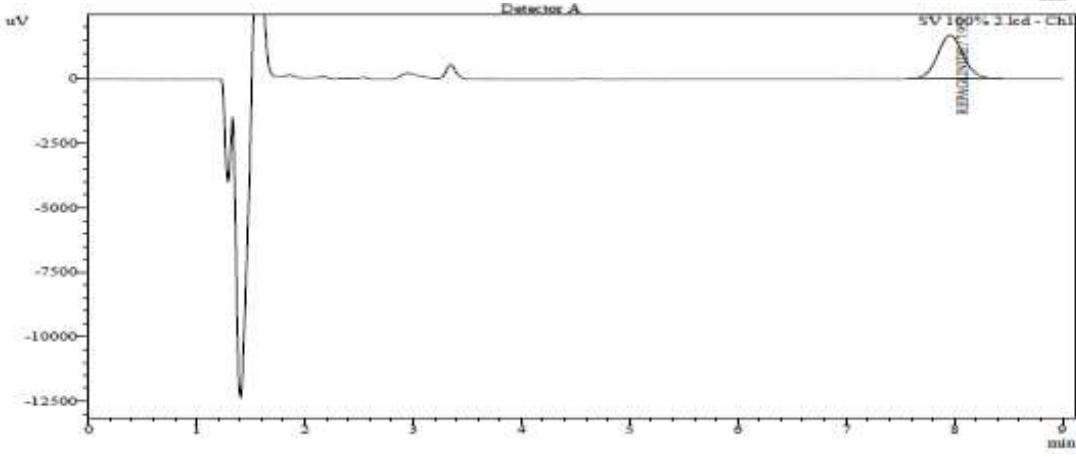
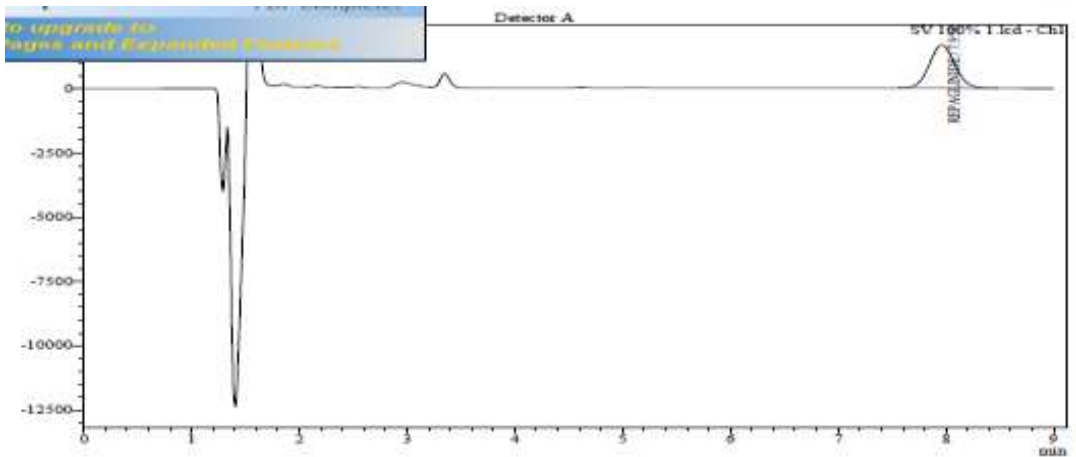
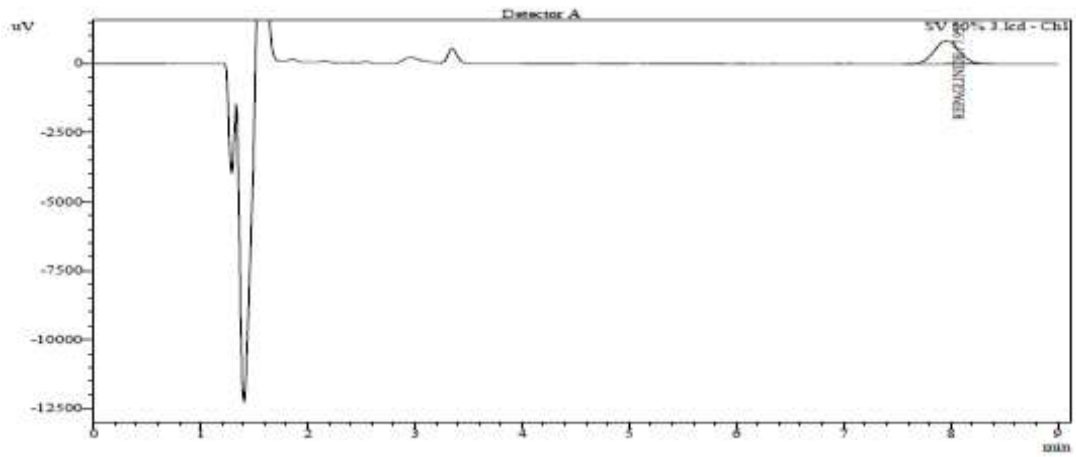


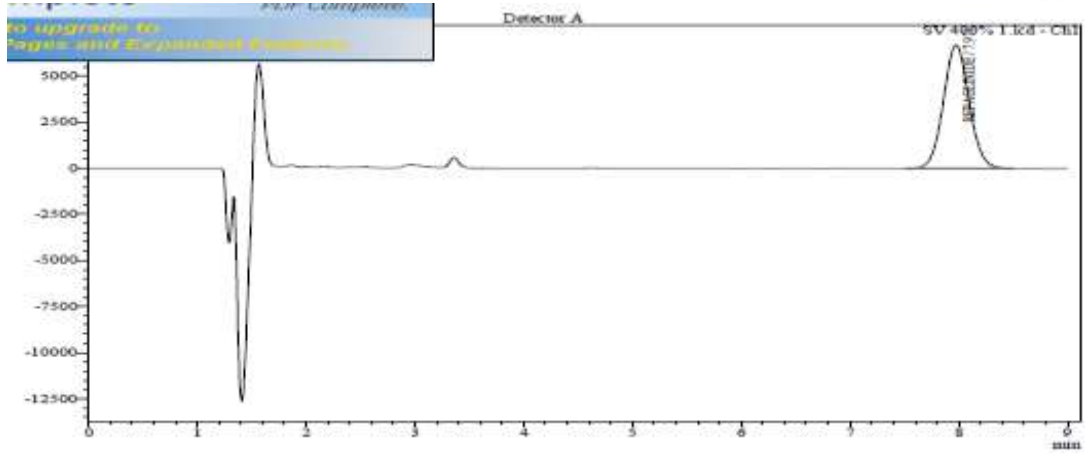
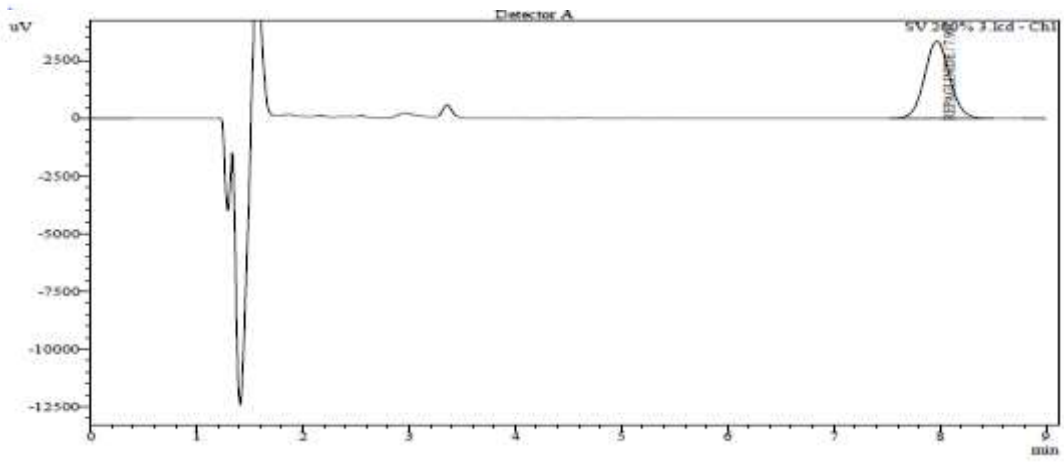
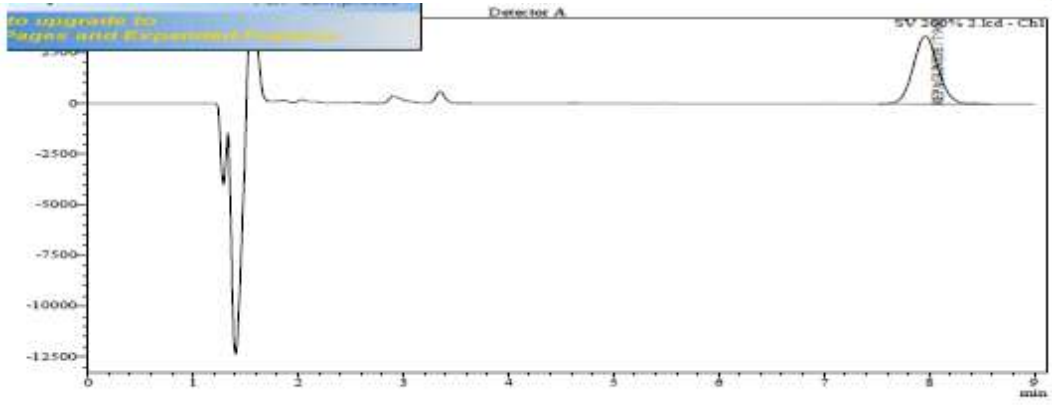
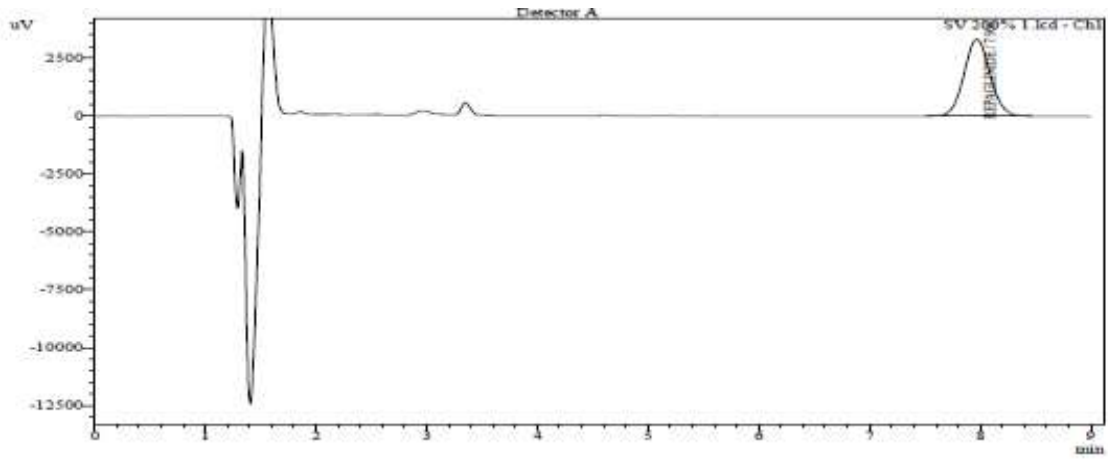


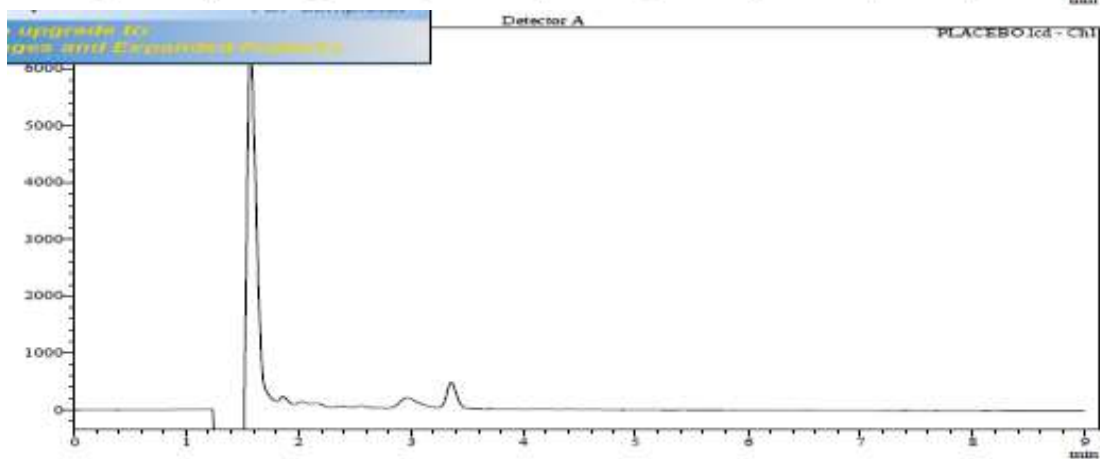
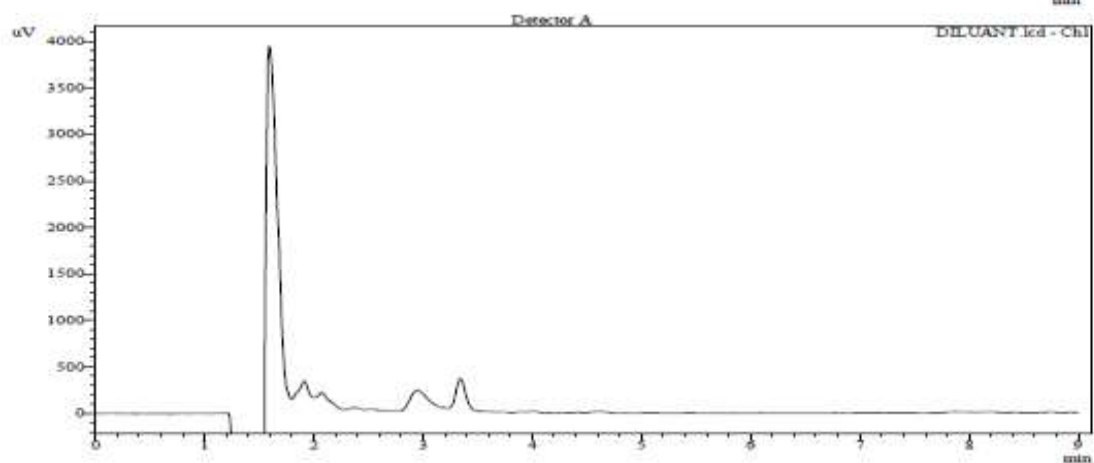
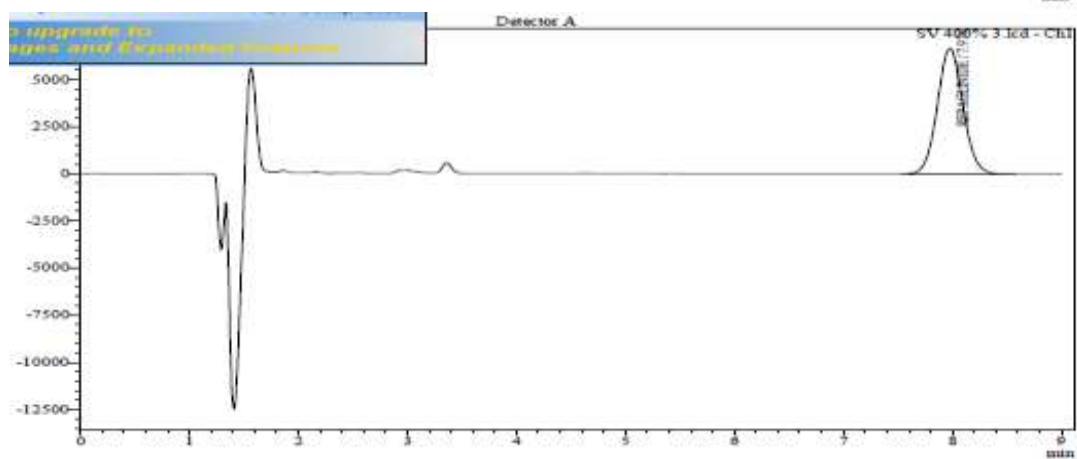
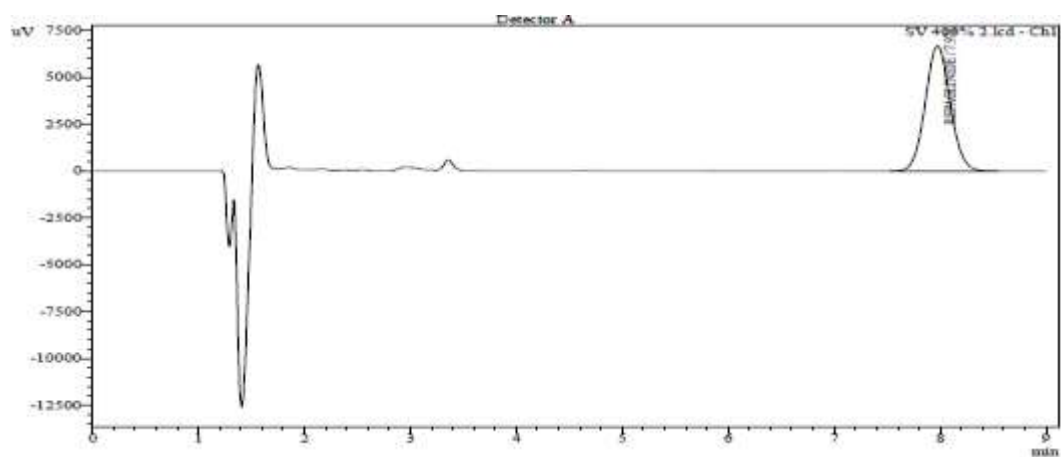
is upgrade to ages and Expanded Systems

is upgrade to ages and Expanded Systems









Résumé

Le contrôle qualité en industrie pharmaceutique est une composante phare de l'assurance qualité et une exigence réglementaire à laquelle doivent répondre tous les laboratoires Pharmaceutiques. Pour ce faire, ces derniers ont recourt à des méthodes analytiques qui doivent être validées.

Le but du présent travail est de valider une méthode de dosage du répaglinide à l'état de traces dans une matrice (eau pure) par Chromatographie Liquide à Haute Performance en s'appuyant sur le profil d'exactitude et l'intervalle de tolérance comme outils de décision de validation ; démarche harmonisée proposée par une commission SFSTP publiée en 2006 dans la revue pharmaceutique STP Pharma Pratique.

Dans un premier temps, on a abordé dans l'étude bibliographique la qualité en industrie pharmaceutique puis on a mis en lumière les caractéristiques et les spécificités du principe actif étudié (répaglinide) et enfin l'approche adoptée au cours de la validation de la méthode d'analyse.

Dans la partie pratique, on a été capable d'établir que la technique développée s'est avérée spécifique, linéaire, sensible et exacte dans l'intervalle [0.15625µg/ml ; 2.5µg/ml] avec un risque d'avoir au maximum 5% des mesures en dehors des limites d'acceptations fixées à [-5% ; +5%]. Cela atteste donc de la validité de la méthode utilisée et son aptitude à être appliquée en routine par les laboratoires de contrôle qualité pour le dosage du répaglinide à l'état de traces dans un but de validation du nettoyage de la verrerie.

Mots clés : Répaglinide, traces, validation analytique, SFSTP, profil d'exactitude, HPLC.

Abstract

Quality control in the pharmaceutical industry is a key component of quality assurance and a regulatory requirement for all pharmaceutical laboratories. To do this, they use analytical methods that must be validated.

The aim of the present work is to validate a method for the determination of trace amounts of repaglinide in a matrix (pure water) by High Performance Liquid Chromatography using the accuracy profile and the tolerance interval as validation decision tools; a harmonized approach proposed by an SFSTP commission published in 2006 in the pharmaceutical journal STP Pharma Pratique.

In the first part, the bibliographical study dealt with quality in the pharmaceutical industry, then the characteristics and specificities of the studied active ingredient (repaglinide) were highlighted and finally the approach adopted during the validation of the analytical method.

In the practical part, we were able to establish that the developed technique proved to be specific, linear, sensitive and accurate in the interval [0.15625µg/ml; 2.5µg/ml] with a risk of having at most 5% of the measurements outside the limits of acceptability fixed at [-5%; +5%]. This attests to the validity of the method used and its suitability for routine application by quality control laboratories for the determination of trace amounts of repaglinide for the purpose of validating glassware cleaning.

Key words: Repaglinide, traces, analytical validation, SFSTP, accuracy profile, HPLC.