

N° d'ordre :

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

UNIVERSITE MOULOU D MAMMERI DE TIZI-OUZOU

FACULTE DES SCIENCES

DEPARTEMENT DE CHIMIE



DOMAINE : SCIENCES DE LA MATIERE
FILIERE : CHIMIE

MEMOIRE DE MASTER

SPECIALITE : CHIMIE PHARMACEUTIQUE

THEME

**Mise au point et validation d'une méthode de dosage simultané
de deux antidiabétiques oraux : Metformine et Sitagliptine par
HPLC. Application du protocole SFSTP 2006**

*Présenté par : MOUMOU
BRAIK*

*Fariza
Nabila*

Soutenu publiquement, le 11 / 07 / 2018 devant le Jury composé de :

<i>Mme HIKEM-OUKACHA DJAMILA</i>	<i>MCA</i>	<i>UMMTO</i>	<i>PRESIDENTE</i>
<i>Dr .MAMOU MARZOUK</i>	<i>MCB</i>	<i>UMMTO</i>	<i>ENCADREUR</i>
<i>Dr. BOURSOUTI MOURAD</i>	<i>RESIDENT</i>	<i>UMMTO</i>	<i>Co-ENCADREUR</i>
<i>Mme. BELMAHDI LILA</i>	<i>MCB</i>	<i>UMMTO</i>	<i>EXAMINATRICE</i>

Remerciements

*Au terme de ce modeste travail, nous tenons à remercier le **BON DIEU** de nous avoir donné la force et la patience d'achever cette étude.*

*Nous tenons à exprimer notre profonde gratitude et nos sincères remerciements à **Dr Mamou Marzouk**, maitre-assistant en chimie analytique qui nous a fait l'honneur de proposer le thème de ce présent mémoire et d'accepter d'encadrer nos travaux tout au long de notre stage malgré ses lourdes et multiples obligations. On tient également à le remercier pour tout le temps qu'il nous a consacré, ses directives précieuses, pour la qualité de son suivi durant toute la période de notre stage, sa gentillesse et surtout de nous avoir bien accueilli au sein de son laboratoire de chimie analytique du département de pharmacie de la faculté de médecine de l'UMMTO.*

*Nous tenons à remercier **Mme Ayati**, notre professeur à l'UMMTO département de Chimie, pour son soutien, son écoute et de nous avoir guidé afin de bien accomplir notre étude. Merci d'avoir été toujours là pour nous.*

*On remercie également **Dr BOURSOUTI. M**, notre co-promoteur et résident en chimie analytique de nous avoir concilié en nous consacrant une partie de son temps et sa contribution qui nous a permis d'accomplir notre modeste travail.*

Nos vifs remerciements vont également aux membres du jury pour l'intérêt qu'ils ont porté à notre travail et pour avoir fait l'honneur d'accepter de faire partie de notre jury et d'examiner notre travail,

*On remercie vivement **Mme HIKAM** d'avoir accepté de présider le jury, on remercie également **Mme BELMAHDI** d'avoir accepté d'examiner notre travail.*

*On remercie également **ALDAPH-NOVONORDISK** ainsi que **BIOPHARM** qui ont eu l'amabilité et la gentillesse de nous procurer les matières premières afin d'accomplir notre travail.*

Enfin, on voudrait remercier tout particulièrement nos familles pour leurs encouragements et soutien.

Dédicaces

Je dédie ce modeste travail à :

A mes parents. Aucun hommage ne pourrait être à la hauteur de l'amour qu'ils me portent et qui ne cesse de me combler. Que dieu leur procure bonne santé et longue vie.

A mes sœurs : Sabrina, Lilya, Kenza et Chanez qui m'ont aidé dans les moments les plus difficiles, je vous aime

A mes nièces et mon neveu : Lyna, Céline, et Yani qui ont égayé ma vie, je vous aime

A mon fiancé Mounir, qui m'a soutenu tout au long de mes études, à ma belle-famille Ait Kaci, la famille Braik, la Famille Badsy, et à Dr Taléb pour son aide et son grand soutien

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

NABILA

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

A mes parents sans qui rien n'aurait commencé;

*Votre amour, votre éducation et votre soutien m'ont aidé à grandir et m'ont
construite. Je vous en suis reconnaissante;*

*Tous les mots du monde ne sauraient exprimer l'immense amour que je vous
porte, ni la profonde gratitude que je vous témoigne pour tous les efforts et les
sacrifices que vous n'avez jamais cessé de consentir pour mon instruction et
mon bien-être. C'est à travers vos encouragements que j'en suis arrivée là, et
c'est à travers vos critiques que je me suis réalisée. J'espère avoir répondu aux
espoirs que vous avez fondés en moi et réalisé aujourd'hui l'un de vos rêves ;*

*A mon unique frère Yacine et à ma unique sœur Marina que j'aime tant, que
dieu puisse exaucer tous leurs vœux dans la vie.*

*A toi mon regretté grand père, malgré ton affection incomparable, le monde a
été jaloux de toi, tu as semé ce que tu ne devais pas récolter alors que tu
m'encourageais que j'aie plus loin que possible dans mes études mais de qui le
sort m'a séparé de toi avant même mon premier couronnement universitaire
que ton âme repose en paix et que dieu t'accueille dans son vaste paradis.*

*A mon futur mari Mohand chérif, toi qui a donné sens à ma vie, merci d'être
toujours là pour moi et faire de moi ta moitié et ta priorité;*

*A toute ma très chère grande famille Moumou, à ma grand-mère, à toutes mes
tantes, à tous mes oncles,*

*A mon binôme Nabila et à toute sa famille Braik et à toute personne qui m'a
soutenu et participé à la réalisation de ce travail MERCI.*

FARIZA

Table des matières

Introduction	1
Objectif	3

Partie Théorique.

Chapitre 1 : Généralités

1. Généralités sur le diabète	4
1.1. Définition du diabète	4
1.2. Types de diabète.....	4
1.3. Les antidiabétiques oraux	4
2. Généralités sur les comprimés.....	5
2.1. Définition des comprimés	5
2.2. Classification des comprimés.....	5
2.2.1. Comprimés à libération conventionnelle.....	5
2.2.2. Comprimés à libération modifiée	6
2.2.3. Comprimés à utiliser dans la cavité buccale	6
2.3. Voie d'administration.....	7

Chapitre 2 : les antidiabétiques oraux : Metformine et Sitagliptine

1. Chlorhydrate de Metformine	8
1.1. Propriétés physicochimiques.....	8
1.2. Pharmacocinétique	8
1.3. Pharmacodynamie	9
1.4. Toxicité.....	9
1.5. Indications thérapeutique et posologie	9
2. Phosphate de Sitagliptine	9
2.1. Propriétés physicochimiques.....	10
2.2. Pharmacocinétique	10
2.3. Pharmacodynamie	11
2.4. Toxicité.....	11
2.5. Indications thérapeutiques, Posologie	11
3. Association metformine- sitagliptine	11
3.1. Mode d'action	12
3.2. Indications et utilisations cliniques	12

Chapitre 3 : validation analytique

1. Définition de la validation.....	13
2. Objectifs de la validation.....	13
3. Contextes réglementaires	14
4. Critères de validation	14
4.1. Spécificité-sélectivité	15
4.2. Fonction de réponse (courbe d'étalonnage)	15
4.3. Linéarité (des résultats d'essai)	15
4.4. Justesse (biais)	15
4.5. Fidélité.....	15
4.6. Exactitude.....	16
4.7. Limite de détection.....	16
4.8. Limite de quantification	16
4.9. Intervalle de dosage.....	16
4.10. Robustesse.....	16
5. Cycle de vie de méthode	16
6. Protocoles en phase de Prévalidation	17
7. Protocole en phase de validation.....	17
8. Etudes statistiques de la validation analytique.....	19
8.1. Spécificité.....	19
8.2. Fonction de réponse	19
8.3. Alignement des observations	20
8.4. Prédiction inverses.....	21
8.5. La justesse	22
8.6. Fidélité.....	23
8.7. Calcul de l'exactitude.....	23
8.7.1 .Erreur totale et profil d'erreur totale	23
8.7.2. Calcul de l'intervalle de tolérance.....	24
8.7.3. Profil d'exactitude et décision.....	25
8.8. Linéarité	25
8.9. Limites de quantification.....	26
8.10. Robustesse.....	26

Partie pratique

1. Matériels.....	30
1.1. Appareillage	30
1.2. Verrerie et autres	31
1.3. Matières premières et réactifs	31
2. Méthodes	31
2.1. Choix du Protocole de validation.....	31
2.2. Préparation des solutions.....	32
2.3. Les conditions expérimentales	35
2.4. Préparation de la feuille de calcul	35
1. Résultats	36
1.1. Résultats de l'étape de la mise au point	36
1.2. Résultats de l'étape de validation.....	36
1.2.1. Spécificité.....	36
1.2.2. Fonction de réponse	39
1.2.2.1. Critères de choix de la fonction de réponse	40
1.2.3. Alignement des observations (réponses)	43
1.2.4. Prédications inverses.....	44
1.2.5. Justesse.....	45
1.2.6. Calcul de la fidélité.....	46
1.2.7. Exactitude.....	47
1.2.8. Calcul des limites de tolérances	49
1.2.9. Profil d'exactitude	49
1.2.10. Linéarité de la justesse	50
1.2.11. Robustesse.....	54
2. Discussion	56
2.1. Discussion de l'étape de la mise au point	56
2.2. Discussion de l'étape de validation.....	56
2.2.1 .Spécificité.....	56
2.2.2. Fonction de réponse	57
2.2.3. Critères de performance de la fonction de réponse choisie.....	57
2.2.4 .Justesse.....	57
2.2.5. Fidélité.....	57
2.2.6. Critères de décision sur la validité de la méthode.....	57

2.2.6.1. L'erreur totale.....	57
2.2.6.2. Le profil d'exactitude	58
2.2.6.3. Intervalle de dosage.....	58
2.2.6.4 .Linéarité	58
2.2.6.5. Robustesse.....	59
Conclusion.....	59
Conclusion générale	60

Références bibliographiques.

Annexes.

Résumé.

Liste des tableaux

Tableau I : Propriétés physico-chimiques du chlorhydrate de Metformine	8
Tableau II : Propriétés physico-chimiques du phosphate de sitagliptine	10
Tableau III : Choix du nombre de standards d'étalonnage et de validation en fonction du protocole choisi	19
Tableau IV : Exemples de fonction de réponses	20
Tableau V : Règles d'alignement pour différentes fonctions de réponses.....	21
Tableau VI : Calcul des prédictions inverses pour différentes fonctions de réponses.....	22
Tableau VII : Plan factoriel 2^2	27
Tableau VIII : Plan factoriel 2^3	28
Tableau IX : Matériels du laboratoire de chimie analytique utilisés	30
Tableau X : Verreries et autres matériels utilisés	31
Tableau XI : les matières premières utilisé.....	31
Tableau XII : Préparation de la solution A (chlorhydrate de metformine)	32
Tableau XIII : Préparation de la solution B (phosphate de sitagliptine).....	32
Tableau XIV : Préparation des SE.....	33
Tableau XV : Préparation des SV	34
Tableau XVI : Conditions chromatographiques de la méthode de dosage.....	35
Tableau XVII : Résultats de la superposition des quatre chromatogrammes.....	38
Tableau XVIII : Résultats obtenus pour la fonction $\sqrt{y} = f(\sqrt{x})$ pour A	39
Tableau XIX : Résultats obtenus pour la fonction $\sqrt{y} = f(\sqrt{x})$ pour B.....	40
Tableau XX : Critères de choix de la fonction de réponse pour A	41
Tableau XXI : Critères de choix de la fonction de réponse pour B.....	42
Tableau XXII : Alignement des réponses observées sur les trois séries de validation pour A	43
Tableau XXIII : Alignement des réponses observées sur les trois séries de validation de B	44
Tableau XXIV : Prédications inverses obtenus à partir des SV de A	45
Tableau XXV : Prédications inverses obtenus à partir des SV de B	45
Tableau XXVI : Justesse calculée pour chaque niveau de concentration des SV de A	46
Tableau XXVII : Justesse calculée pour chaque niveau de concentration des SV de B ...	46
Tableau XXVIII : Calcul de fidélité en écarts types relativisés pour A.....	47
Tableau XXIX : Calcul de fidélité en coefficients de variations pour A.....	47

Tableau XXX: Calcul de fidélité en écarts types relativisés pour B.....	47
Tableau XXXI : Calcul de fidélité en coefficients de variations pour B.....	47
Tableau XXXII: Résultats du calcul de l'exactitude relative pour A.....	48
Tableau XXXIII : Résultats du calcul de l'exactitude relative pour B	48
Tableau XXXIV : Calcul des limites de tolérance pour A	49
Tableau XXXV: Calcul des limites de tolérance pour B	49
Tableau XXXVI : Vérification de la linéarité de la méthode pour A.....	51
Tableau XXXVII : Vérification de la linéarité de la méthode pour B	51
Tableau XXVIII : Données de la droite du SV de A	51
Tableau XXXIX : Données de la droite du SV de B	52
Tableau XL : Comparaison de la pente et l'ordonnée à l'origine à 0 avec le test de student pour A.....	53
Tableau XLI: Comparaison de la pente et l'ordonnée à l'origine à 0 avec le test de student pour B	53
Tableau XLII : données brutes et résultats de l'étude de la robustesse de A.....	53
Tableau XLIII: matrice des effets du plan factoriel 2^3 de A.....	54
Tableau XLIV: Calcul des effets des paramètres et leurs intervalles de confiance pour A	55
Tableau XLV : données brutes et résultats de l'étude de la robustesse de B	55
Tableau XLVI : Calcul des effets des paramètres et leurs intervalles de confiance B.....	56

Liste des figures

Figure 1 : Logigramme permettant de sélectionner un protocole de validation. SE : standard d'étalonnage. SV : standard de validation.....	18
Figure 2 : Chromatogramme du diluant non chargé	36
Figure 3 :Chromatogramme du diluant avec placebo non chargé de PA.....	37
Figure 4 : Chromatogramme du standard d'étalonnage niveau 100%.....	37
Figure 5 :Chromatogramme du standard de validation, niveau 100%	37
Figure 6 : Superposition des courbes d'étalonnage et de validation de A	38
Figure 7 : Superposition des courbes d'étalonnage et de validation de B	38
Figure 8 : Profil d'exactitude pour la fonction racine carrée pour A	50
Figure 9 : Profil d'exactitude pour la fonction racine carrée pour B	50
Figure 10 :Courbe linéarité de la méthode pour A.....	52
Figure 11 :Courbe linéarité de la méthode pour B	52

Liste des abréviations

A : Chlorhydrate de metformine

ADO : Antidiabétiques oraux

AMM:Autorisation de mise sur le marché

B : Phosphate de sitagliptine

CYP2C8 :Le cytochrome P450, famille 2, sous-famille C, polypeptide 8.

CYP3A4 :Le cytochrome P450, famille 3, sous-famille A, polypeptide 4.

DL: Dose Létale

DPP-4 : Dipéptidyl peptidase-4

DCI : Dénomination commune Internationale

FDA: la FOOD and Drugs Administration

GIP: Gastric inhibitory peptide

GLP-1: Glucagon-like peptide 1

HbA1c: L'hémoglobine glyquée

HPLC: Hight Performance Liquid Chromatography

ICH: International Conference on Harmonization

ISO: International Standard Organization

IUPAC: International Union of Pure and Applied Chemistry

LD : Limite de Détection

LQ_{inf} : Limite de Quantification inférieure

LQ_{sup} : Limite de Quantification supérieure

MSE:Mean Squared Error

MSM: Mean Square Model

NS : Non significatif

PA: Principe actif

PE : Prise d'essai

SE : Standard d'étalonnage

SFSTP :Société Française des Sciences et Techniques Pharmaceutiques

SV : Standard de validation

S : Significatif

UKPDS: United Kingdom Prospective Diabetes Study

USP : United States Pharmacopeia

Glossaire

Affection auto-immune

Maladie auto-immune : maladie dans laquelle le système immunitaire de l'organisme sécrète des anticorps (auto-anticorps) contre ses propres antigènes qu'il considère comme étrangers.

Assurance qualité

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

Cellules β

Constituent l'un des types cellulaires du pancréas, elles produisent et libèrent de manière endocrine l'insuline

CYP2C8

C'est un membre du système d'oxydase à fonction mixte du cytochrome P450, est impliqué dans le métabolisme des xénobiotiques dans le corps. Le cytochrome P450C8 possède également une activité époxygénase, c'est-à-dire qu'il métabolise des acides gras polyinsaturés à longue chaîne, à leurs époxydes biologiquement actifs.

CYP3A4

Elle fait partie de la superfamille d'enzymes du cytochrome P450. Ce sont des mono-oxygénases qui catalysent de nombreuses réactions permettant le métabolisme des médicaments.

FOOD and Drugs Administration (FDA)

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

Glucagon

C'est une hormone hyperglycémiant sécrétée par les cellules alpha des îlots de Langerhans du pancréas, et qui agit principalement sur le foie en provoquant une glycogénolyse.

Glycolyse

Dégradation du glucose d'un organisme vivant, sous l'action d'enzymes.

Ilots de Langerhans

Parties du pancréas contenant des cellules de trois types sécrétant l'insuline, le glucagon et la gastrine (hormone de la digestion).

Incrétines

(GLP-1 et GIP) sont des hormones gastro-intestinales qui stimulent la sécrétion d'insuline lorsque la glycémie est trop élevée (glycémie postprandiale). Ils ralentissent également la vidange gastrique.

Insulinémie

Présence d'insuline dans le sang. Les taux normaux d'insulinémie varient de 6 à 26 microU par millilitre.

ISO/CEI 17025

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

Néoglucogénèse

C'est le processus de formation du glucose à partir des molécules autre que les glucides. Elle a lieu dans le foie.

Pharmacopée

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

Placebo

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

Qualité

La norme **ISO 8402-94** définit la qualité comme suit : « L'ensemble des caractéristiques d'une entité qui lui confèrent l'aptitude à satisfaire des besoins exprimés ou implicites ».

Définition de quelques paramètres statistiques

Biais

Différence entre l'espérance de résultats d'essai et une valeur acceptée comme référence.

Blanc

Essai réalisé en l'absence de la matrice (blanc réactif) ou sur une matrice qui ne contient pas l'analyte (blanc matrice). Par extension, la réponse instrumentale en l'absence d'analyte est utilisée (blanc instrumental).

Coefficient de corrélation

Quotient de la covariance de deux caractères par le produit de leurs écarts-types. Il exprime la relation éventuelle entre deux variables réputées indépendantes.

Coefficient de variation

Pour un caractère non négatif, rapport de l'écart-type à la moyenne.

Matrice

Milieu dans lequel se trouve l'analyte.

Risque β

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

Ce risque est fixé avant de réaliser un test (habituellement 5 ou 1 %). On l'appelle aussi seuil ou niveau d'un test.

Risque α

Probabilité de considérer l'hypothèse nulle comme vraie quand elle est fautive. Le risque β dépend du test effectué, du risque α choisi et du nombre de degrés de liberté.

Valeur conventionnellement vraie

Valeur attribuée à une grandeur particulière et reconnue, parfois par convention, comme le représentant pour une incertitude appropriée pour un usage donné

Valeur de référence acceptée

Une valeur de référence acceptée est une valeur qui sert de référence, agréée pour une comparaison et qui résulte :

- d'une valeur théorique ou établie,
- d'une valeur assignée ou certifiée
- d'une valeur de consensus fondée sur un travail expérimental en collaboration
- de l'espérance mathématique de la quantité (mesurable)

Liste des paramètres statistiques

- a**: Pente de la droite de régression linéaire
- b**: Ordonnée à l'origine de la droite de régression
- CV** : Coefficient de variation
- D**: Droite de régression linéaire
- e** : Erreur de type aléatoire.
- i** : Indice des valeurs individuelles dans le groupe j.
- I_{Rm}**: Intervalle de confiance de recouvrement moyen R_m
- j**: Indice de groupe
- k** : Nombre de groupes
- \bar{m}** : Moyenne des moyennes de groupes
- m_{blanc}** : Moyenne de mesure du blanc
- m_j**: Moyenne de n_j valeurs du groupe j
- n** : Nombre moyen de valeurs par groupe
- n_j**: Nombre d'observations du groupe j
- n** : Nombre de répétition.
- N** : Nombre totale d'observations y_{ij} dans l'ensemble des k groupe.
- \bar{NDL}_j** : Nombre de degré de liberté du groupe j.
- P** : Nombre de série.
- r** : Coefficient de corrélation.
- R** : Facteur de réponse (quantité /hauteur du signal)
- R_m** : Taux de recouvrement moyen .
- S** : Ecart type estimé de n valeurs
- S²** : Variance
- S²max** : Plus grande des variances
- S_{blanc}** : Ecart type de mesure du blanc
- SD** : Seuil de détection.
- SQ** : Seuil de quantification
- v** : Moyenne générale des observations y_{ij} des k groupes
- x_{ij}** : Valeur brute indépendante.
- X** : La quantité (concentration)
- \bar{X}_j** : Moyenne des valeurs x_{ij} du groupe j
- Y** : Signal ou réponse de l'instrument

y_{ij} : Valeur brute dépendante.

\bar{Y}_j : Moyenne des observations y_{ij} dans chaque groupe j

α : Risque de la première espèce.

β : Risque de la deuxième espèce.

μ : Concentration introduite

Introduction

Pour garantir qu'un médicament restera sûr et efficace pendant toute sa durée de validité, les industries pharmaceutiques sont tenues de prouver la qualité de leurs produits et les laboratoires doivent démontrer que l'ensemble des procédés et méthodes utilisés sont aptes à l'emploi prévu et donnent les résultats attendus exactes et fiables.

Toute mise au point d'une nouvelle méthode d'analyse doit faire l'objet d'une validation analytique avant sa mise en routine, l'objectif de cette dernière est de s'assurer qu'une méthode analytique donnera des résultats fiables et reproductibles.

Pour valider une méthode analytique il existe plusieurs protocoles à suivre comme par exemple les normes guidelines ICH Q2A et Q2B et celui de la commission SFSTP 92 ;SFSTP 97 ;SFSTP 2003 et SFSTP 2006 ; L'avantage de la validation analytique est de mettre en application les outils statistiques qui nous permettent de vérifier plusieurs critères de validation tels que : la Spécificité-sélectivité, Fonction de réponse, Linéarité, Fidélité (répétabilité et fidélité intermédiaire), Justesse, Exactitude, Limite de détection (LD), Limite de quantification (LQ), Intervalle de dosage, et Sensibilité.

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

Après l'introduction générale, ce manuscrit s'articule autour de deux grandes parties suivies d'une conclusion générale.

La première partie est consacrée à la synthèse bibliographique qui est répartie en trois chapitres :

Chapitre I : généralités

Chapitre II : les antidiabétiques oraux : metformine et sitagliptine

Chapitre III : Validation analytique

La seconde partie est dédiée à l'aspect pratique de notre travail où nous définissons les équipements, les méthodes utilisées, ainsi nous décrivons les protocoles expérimentaux suivis lors de la mise au point de la méthode de dosage simultané des deux molécules par HPLC. Nous présenterons et nous discuterons les résultats obtenus et conclurons à la fin la validité de

la méthode analytique objet de l'étude.

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.

Objectif

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

Partie théorique

Chapitre 1 : Généralités

Un patient est diagnostiqué diabétique selon l’OMS dès lors qu’il présente deux glycémies à jeun supérieures à 1.26 g/l, ou qu’une mesure de l’hémoglobine glyquée est supérieure à 6 %, ou encore qu’il obtient un résultat positif au test d’hyperglycémie provoqué par voie orale.

Dans le traitement médicamenteux de cette maladie on distingue : les différents types d’insulines et les antidiabétiques oraux. Ces derniers sont présentés sous formes de comprimés avec différents modes de libérations.

1. Généralités sur le diabète

1.1.Définition du diabète

Le diabète est une maladie chronique qui apparaît lorsque le pancréas ne produit pas suffisamment d’insuline ou que l’organisme n’utilise pas correctement l’insuline qu’il produit. L’insuline est une hormone qui régule la concentration de sucre dans le sang. L’hyperglycémie, ou concentration sanguine élevée de sucre, est un effet fréquent du diabète non contrôlé qui conduit avec le temps à des atteintes graves de nombreux systèmes organiques et plus particulièrement des nerfs et des vaisseaux sanguins.[1]

1.2.Types de diabète

Le diabète de type 1

C’est une affection auto-immune, caractérisée par la destruction des cellules β des ilots de Langerhans du pancréas. Le manque d’insuline qui en découle rend l’administration de cette hormone indispensable. Cette affection apparaît généralement à un âge précoce et le diagnostic est souvent posé suite à la présence de symptômes sévères. [2]

Le diabète de type 2

Il apparaît généralement suite à un double dysfonctionnement. D’une part, on voit apparaître une résistance à l’insuline des tissus périphériques (insulinorésistance). D’autre part, les cellules β des ilots de Langerhans sont encore capables de produire de l’insuline, mais elles ne parviennent pas à compenser la résistance à l’insuline.[2]

1.3.Les antidiabétiques oraux

Les antidiabétiques oraux (ADO) sont introduits en thérapie après trois mois d’échec d’un régime diététique. Un des critères de choix des antidiabétiques oraux est la surcharge pondérale. On distingue les antidiabétiques qui ont une action sur :

- L’insulinorésistance : biguanides, thiazolidinediones, principalement indiqués chez les patients diabétiques obèses.

- L'insulinosécrétion : sulfamides, glinides, indiqués en première intention chez les patients présentant une obésité peu sévère.
- Les inhibiteurs de l'alpha-glucosidase indiqués chez les patients présentant des glycémies à la limite supérieure. [3]

Modes d'action des antidiabétiques oraux selon leurs types : les ADO agissent par ;

- Stimulation de la sécrétion d'insuline : Sulfamides, glinides ;
- Diminution de la production hépatique de glucose : Metformine ;
- Augmentation de la captation musculaire du glucose : Glitazones ;
- Diminution de l'absorption intestinale des sucres alimentaires : inhibiteurs de l'alpha-glucosidase ;
- Diminution de l'insulinorésistance : Sulfamides, glinides, glitazones et metformine ;
- Potentialisation de l'action de l'insuline au niveau musculaire : metformine.

Deux nouvelles classes d'agents antidiabétiques viennent d'être présentées :

- Les agonistes des récepteurs du glucagon like peptide-1, mimétiques de l'incrétine,
- Les inhibiteurs de la dipeptidyl-peptidase-4 potentialisant l'activité de l'incrétine.[3]

2. Généralités sur les comprimés

2.1. Définition des comprimés

Ce sont des préparations de consistance solide contenant une unité de prise d'une ou plusieurs substances actives. Ils sont obtenus en agglomérant par compression un volume constant de particules ou par un autre procédé de fabrication approprié tel que l'extrusion, le moulage ou la cryodessiccation ». [4]

2.2. Classification des comprimés

Les comprimés peuvent être classés en deux catégories selon le type de libération

- Les comprimés à libération conventionnelle.
- Les comprimés à libération modifiée. [4]

2.2.1. Comprimés à libération conventionnelle (immédiate)

Ce sont des formes pour lesquelles la libération du principe actif n'a pas fait l'objet d'une modification délibérée résultant de la mise en œuvre d'une formulation particulière et/ou d'un procédé de fabrication spécial. [4]

2.2.1.1. Les comprimés nus ou non enrobés

Ils comprennent des comprimés à couche unique et des comprimés à couches multiples disposées parallèlement ou concentriquement. Les premiers résultent d'une seule

compression, les autres de compressions successives. Ils peuvent être de formes très diverses, sécables ou non. Ils se désagrègent rapidement.[4]

2.2.1.2. Les comprimés enrobés

Ce sont des comprimés dont la surface est recouverte d'une ou plusieurs couches de mélanges de substances diverses comme les résines, les gommes, la gélatine, les sucres, les cires, les polyols et les colorants. [5]

- Quand l'enrobage est constitué d'un film polymère très mince, le comprimé est dit pelliculé.
- Un comprimé dragéifié, quant à lui, est enrobé avec du sucre.[4]

2.2. 2.Comprimés à libération modifiée

Ce sont des comprimés, enrobés ou non, qui sont préparés avec des excipients spéciaux ou par des procédés particuliers, ou les deux, visant à modifier la vitesse, le lieu où le moment de libération de la (ou des) substance(s) active(s). [4]

2.2.2.1 Les comprimés à libération prolongée

Il s'agit de préparations dont la vitesse de libération de la substance active est inférieure à celle qu'assurerait la forme à libération conventionnelle administrée par la même voie. La dose de principe actif totale y est toujours plus élevée que dans une forme à libération conventionnelle

La vitesse de libération plus lente a pour but d'obtenir une concentration en principe actif la plus constante possible dans l'organisme tout en diminuant le nombre d'administrations [4].

2.2.2.2.Les comprimés à libération retardée

Les comprimés à libération retardée sont des formes galéniques où le principe actif est libéré à un moment ou un lieu différent par rapport à la forme conventionnelle administrée par la même voie.C'est le cas notamment des comprimés gastrorésistants. [4]

2.2.2.3. Les comprimés à libération accélérée

Ce sont des préparations dont la vitesse de libération de la substance active est plus rapide que celle de la forme à libération conventionnelle destinée à la même voie d'administration.

Elles sont généralement administrées après mise en solution, on trouve : les comprimés dispersibles, solubles, effervescents, orodispersibles et les lyophilisats oraux.[4]

2.2.3.Comprimés à utiliser dans la cavité buccale

Ce sont le plus souvent des comprimés non enrobés. Leur formule est établie de façon à permettre une libération lente et une action locale de la ou des substances actives ou la libération et l'absorption de la (ou des) substance(s) active(s) dans une partie définie de la cavité buccale. [4]

3. Voie d'administration

L'administration du médicament par la voie orale est la plus commode et la plus utilisée.

Cette voie consiste au passage du PA à travers la partie gastro-intestinale. [6]

Chapitre 2 :

Les antidiabétiques oraux :

Metformine et Sitagliptine

Le traitement pharmacologique du diabète comprend soit des médicaments insulinosécréteurs, soit des médicaments insulinosensibilisateurs, soit généralement dans un second temps une combinaison des deux ; dans ce présent travail nous nous intéressons à la combinaison de la metformine et de la sitagliptine après avoir étudié les caractéristiques et les propriétés de chacune des molécules

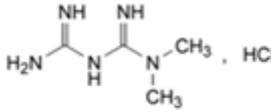
1. Chlorhydrate de metformine

La metformine est un médicament anti hyperglycémiant préconisé au début du traitement du diabète type 2, elle permet de diminuer le taux de glucose sanguin [7]. C'est une molécule qui fait partie des biguanides provenant du Lilas Français « Galéga officinalis » une plante utilisée en médecine depuis des siècles dont le principe actif (PA) est la galéagine ou Isomylinebiguanidine.[8]

1.1. Propriétés physicochimiques

Les principales propriétés physicochimiques du chlorhydrate de metformine sont résumées dans le tableau I ci-dessous

Tableau I : Propriétés physico-chimiques du chlorhydrate de Metformine (A) [9]

Nom chimique selon l'IUPAC	Chlorhydrate de 1,1-diméthylbiguanide
DCI	Chlorhydrate de Metformine
Formule chimique	C ₄ H ₁₂ ClN ₅
Formule chimique développée	
Masse molaire moléculaire	165,62 g/mole
Aspect	Poudre cristalline blanche
Solubilité	facilement soluble dans l'eau, peu soluble dans l'alcool, pratiquement insoluble dans l'acétone et dans le chlorure de méthylène.
Point de fusion/point	232° C
pH en solution aqueuse	6,7 (solution à 1%)

1.2. Pharmacocinétique

1.2.1. Absorption

Son absorption se fait au niveau de l'intestin grêle avec une biodisponibilité de l'ordre de 50 à 60%. La demi-vie d'absorption est estimée entre 0,9 et 2,6 heures avec un pic de concentration plasmatique atteint en 1 à 2 heures pour une dose de 500 à 1000 mg. [10]

1.2.2. Distribution

La metformine a une fixation protéique minimale (inférieure à 20%). La molécule se distribue suivant un modèle bi-compartimental dans le secteur plasmatique et intracellulaire, et en particulier intra-érythrocytaire. Le volume de distribution moyen est compris entre 63 et 276 litres. [3]

1.2.3. Métabolisme

La demi-vie plasmatique est estimée entre 1,5 et 4,9 heures. La metformine n'est pas métabolisée au niveau hépatique. [10]

1.2.4. Elimination

Son élimination est exclusivement rénale sous forme inchangée, par filtration glomérulaire et sécrétion tubulaire. La clairance de la metformine en l'absence d'insuffisance rénale est de 440 ml/min. En cas d'insuffisance rénale, sa clairance se réduit considérablement en parallèle à celle de la créatinine. [10]

1.3. Pharmacodynamie

L'effet anti hyperglycémiant de la Metformine résulte essentiellement de la réduction de la production hépatique de glucose, principalement par inhibition de la néoglucogenèse et, à un moindre degré, par inhibition de la glycolyse.

En outre, la Metformine potentialise l'effet de l'insuline sur la captation musculaire et adipocytaire du glucose. Dans le muscle, elle favorise le stockage du glucose sous forme de glycogène, mais n'augmente pas son oxydation.

Au niveau intestinal, la Metformine réduit l'absorption du glucose, mais cela ne participe probablement que de façon marginale à son effet thérapeutique. [11]

1.4. Toxicité

- DL50 = 1450 mg / kg (Souris) par voie orale
- DL50 = 375 mg / kg (Rat) par voie orale [12]

1.5. Indications thérapeutiques et posologie

L'indication principale est le traitement du diabète de type 2 associé à une obésité. Une autre indication est le diabète de type 1 insulino-résistant associé à une insulinothérapie.

La posologie usuelle est de 1 à 3 comprimés (dosés à 850 mg) par jour à prendre pendant ou à la fin du repas. [3]

2. Phosphate de sitagliptine

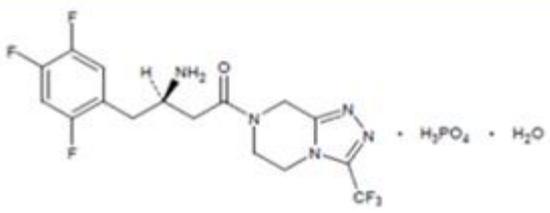
Le phosphate de sitagliptine, appartenant à la famille des gliptines [3], est le premier antagoniste sélectif de la dipeptidylpeptidase-4, enzyme dégradant le glucagon-like peptide-

1(GLP-1). Cette hormone est sécrétée principalement par les cellules L de l'iléon et est déficitaire chez le patient diabétique de type 2. Le phosphate de sitagliptine améliore le contrôle glycémique (HbA1c) chez les patients insulino indépendants traités par régime seul, par Metformine, ou par combinaison avec d'autres antidiabétiques oraux. [13]

2.1. Propriétés physicochimiques

Les principales propriétés physicochimiques du phosphate de sitagliptine sont résumées dans le tableau A II ci-dessous

Tableau II: Propriétés physico-chimiques du phosphate de sitagliptine (B) [14]

Nom chimique selon l'IUPAC	(3 R) - 3-amino-1- [3- (trifluorométhyle) -5,6-dihydro [1,2,4] tri- azolo [4,3 A] pyrazin-7 (8 H) - yl] -4- (2,4,5-tri fluorophényle) butan-1-one monohydrate de phosphate
DCI	Phosphate de sitagliptine
Formule chimique	C ₁₆ H ₁₈ F ₆ N ₅ O ₅ P, H ₂ O
Formule chimique développée	
Poids moléculaire	523,32 g/mole
Aspect	poudre non hygroscopique, cristalline, blanche ou blanc cassé
Solubilité	soluble dans l'eau, très peu soluble dans l'éthanol anhydre, pratiquement insoluble dans l'heptane. Il présente un polymorphisme
Point de fusion/point	216-222° C
pH en solution aqueuse	7,1 (solution à 1%)

2.2. Pharmacocinétique

2.2.1. Absorption

Pour 100 mg chez des sujets sains, la sitagliptine est rapidement absorbée avec un pic de concentration plasmatique atteint entre 1 et 4 heures après la dose. La biodisponibilité absolue de la sitagliptine est d'environ 87%. [15]

2.2.2. Distribution

Après l'administration d'une dose unique par voie intraveineuse de 100 mg de sitagliptine à des sujets sains le volume moyen de distribution est environ de 198 litres, la fraction liée réversiblement aux protéines plasmatiques est de 38 %.[15]

2.2.3. Métabolisme

L'élimination se fait dans l'urine sous forme inchangée (79 %), les enzymes responsables du métabolisme sont le CYP3A4 et le CYP2C8.[3]

2.2.4. Elimination

L'élimination s'effectue dans les fèces (13 %) ou dans l'urine (87 %)[3]. La valeur moyenne de demi-vie terminale apparente après l'administration d'une dose orale de 100 mg de sitagliptine a été d'environ 12,4 heures. la clairance rénale est d'environ 350 ml/min.[15].

2.3. Pharmacodynamie

En augmentant les taux d'incrétines actives, la sitagliptine augmente la libération de l'insuline et diminue les taux de glucagon d'une manière glucose-dépendante. L'inhibition de la DPP-4 est dose dépendante. Chez les patients diabétiques de type 2 avec hyperglycémie, ces modifications des taux d'insuline et de glucagon conduisent à une diminution du taux d'hémoglobine (HbA1c) et une diminution des glycémies à jeun et postprandiale.[15]

2.4. Toxicité

- Par voie orale DL50rat : > 3000 mg / kg.[12]

2.5. Indications thérapeutiques, Posologie

La sitagliptine peut être administrée chez le patient diabétique du type 2 lorsque le contrôle adéquat de la glycémie n'est pas obtenu avec régime alimentaire et exercice physique.

Dans toutes ses indications, la sitagliptine est administrée par voie orale à la dose de 100 mg en une prise quotidienne, sauf en cas d'utilisation d'une association fixe avec la metformine où la dose est donnée en 2 prises de 50 mg.[16]

3. Association metformine- sitagliptine

La sitagliptine existe également en combinaison fixe avec la metformine, sous le nom de Janumet® ; Il n'y a pas d'interactions pharmacocinétiques cliniquement significatives entre la sitagliptine et la metformine [17].

Cette présentation, à administrer en deux prises par jour, est disponible aux dosages suivants : sitagliptine 50 mg plus metformine 500 mg ; sitagliptine 50 mg plus metformine 850 mg et sitagliptine 50 mg plus metformine 1.000 mg [18]

3.1. Mode d'action

JANUMET® et JANUMET® XR réunissent deux anti hyperglycémiantes possédant des modes d'action complémentaires permettant d'améliorer la maîtrise glycémique chez les patients atteints de diabète de type 2 : le phosphate de sitagliptine, et le chlorhydrate de metformine.

JANUMET® et JANUMET® XR ciblent les trois principales anomalies liées au diabète de type 2 : diminution de la synthèse et de la libération d'insuline, augmentation de la production hépatique de glucose et diminution de la sensibilité à l'insuline [19]

3.2. Indications et utilisations cliniques

Janumet ® (sitagliptine / metformine) et JANUMET ® XR (sitagliptine / release modified-chlorhydrate de metformine) est indiqué comme traitement d'appoint à un régime alimentaire et de l'exercice pour améliorer le contrôle glycémique chez les patients adultes atteints de diabète sucré de type 2 mal contrôlé par la metformine ou chez les patients déjà traités par l'association sitagliptine et de la metformine. [19]

Chapitre 3 :
La validation analytique

La validation des procédés de fabrication constitue une des étapes cruciales et indispensables à l'obtention de médicaments de qualité, efficaces et sûrs. En effet, il s'agit d'un des principaux outils de l'assurance qualité permettant de construire la qualité du produit et d'en conserver les caractéristiques depuis la conception jusqu'à la fin de la commercialisation. De la notion essentielle de la qualité découle la nécessité de validation qui permet de réduire fortement le risque d'apparition de non-conformités et de maîtriser la non-qualité. [20].

La validation est aussi une exigence réglementaire parue par les instances réglementaires afin de guider les industriels dans cette étape importante [21]. C'est aussi une démarche de progrès qui, par une meilleure connaissance et une meilleure maîtrise des procédés, permet une diminution des coûts de production et de contrôle. [22].

Actuellement, de nouvelles tendances et de nouveaux concepts scientifiques apparaissent afin de faire évoluer la validation des méthodes analytiques, avec notamment l'apparition de l'utilisation du profil d'exactitude comme outil de décision. Ces nouveaux outils et concepts ont pour la plupart comme objectif commun de remettre les résultats obtenus au centre de la notion de validation analytique. [23]

1. Définition de la validation

Selon ICH Q2(R1) : La validation est « l'établissement de la preuve, en conformité avec les principes de bonnes pratiques de fabrication, que la mise en œuvre ou l'utilisation de tout processus, procédure, matériel, matière première, article de conditionnement ou produit, activité ou système permet réellement d'atteindre les résultats escomptés ». [24]

2. Objectifs de la validation

- Démontrer l'aptitude et la fiabilité d'une méthode vis-à-vis des exigences réglementaires et normatives en vigueur.
- Garantir que chaque mesure qui doit être réalisée en routine est comprise dans une limite d'acceptation appropriée au type de procédure analytique et au produit concerné.
- Obtenir une estimation de la justesse, du biais ou de la fidélité de la méthode,
- Evaluer le risque statistique lié à son utilisation, qui peut être exprimé par l'incertitude de mesure associée au résultat. [23]

3. Contextes réglementaires

Des directives sur la validation des méthodes analytiques sont fournies dans des publications comme les guidelines ICH, notamment le guideline ICH Q2 (R1) paru en 2005 : « Validation of Analytical Procedures: Text and Methodology »

Son but est de fournir des recommandations sur la manière d'appréhender les différentes caractéristiques de la validation pour chaque méthode analytique. En outre, le document fournit une indication sur les données qui devraient être présentées dans un dossier d'enregistrement.

Ce guideline ICH est une exigence réglementaire, toute validation de méthode analytique présentée dans un dossier d'AMM doit répondre à ses exigences.

Il existe également des publications ne constituant pas des exigences réglementaires, comme les guides de validation analytique de la SFSTP.

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

- SFSTP « Guide de validation analytique – Rapport d'une commission SFSTP »
 - A. Méthodologie, paru dans STP Pharma Prat. en 1992
 - B. Exemples d'application, paru dans STP Pharma Prat. en 1992
- SFSTP « Méthodes chromatographiques de dosage dans les milieux biologiques : stratégie de validation. Rapport d'une commission SFSTP » paru dans STP Pharma Prat. en 1997.
- SFSTP « Validation des procédures analytiques quantitatives : Harmonisation des démarches »
 - A. Généralités, paru dans STP Pharma Pratique en 2003
 - B. Statistiques, paru dans STP Pharma Pratique en 2006
 - Exemples d'application, paru dans STP Pharma Prat. En 2006
 - C. Exemples d'application, paru dans Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis en 2008 [23]

4. Critères de validation

Les principaux critères de validation sont ceux 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 :

4.1. 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 » [25]

4.2. Fonction de réponse (courbe d'étalonnage)

« La fonction de réponse d'une procédure d'analyse traduit, à l'intérieur de l'intervalle de dosage, la relation existant 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) » [25]

4.3. Linéarité (des résultats d'essai)

« 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 ». [25]

4.4. 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 (exemple : standard international, standard d'une pharmacopée) » [25]

4.5. Fidélité

« La fidélité exprime l'étroitesse de l'accord (degré de dispersion, coefficient de variation) entre une série de mesures provenant de multiples prises d'un même échantillon homogène (Résultats d'essais indépendants) dans des conditions prescrites. La fidélité fournit une indication sur les erreurs liées au hasard » [25]

La fidélité peut être évaluée à trois niveaux : La répétabilité, la fidélité intermédiaire (intra laboratoire) et la reproductibilité (inter laboratoire).

La fidélité traduit uniquement la distribution des erreurs aléatoires et n'a aucune relation avec la valeur vraie ou spécifiée.

- **Répétabilité** : conditions où les résultats d'essais indépendants sont obtenus par la même méthode sur des échantillons d'essais identiques dans le même laboratoire, par le même opérateur, utilisant le même équipement et pendant un court intervalle de temps. [25]
- **Fidélité intermédiaire** : conditions où les résultats d'essais indépendants sont obtenus par la même méthode sur des échantillons d'essais identiques dans le même laboratoire, avec différents opérateurs et utilisant des équipements différents et pendant un intervalle de temps donné. [25]

- **Reproductibilité** : conditions où les résultats d'essais sont obtenus par la même méthode sur des échantillons d'essais identiques dans différents laboratoires, avec différents opérateurs et utilisant des équipements différents.[25]

4.6. Exactitude

« L'exactitude exprime l'étroitesse de l'accord entre le résultat d'essais et la valeur de référence acceptée, aussi appelée : valeur conventionnellement vraie ».[25]

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.[25]

4.7. 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 ». [25]

4.8.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 ». [25]

4.9. 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 ». [25]

4.10. Robustesse

«La robustesse d'une procédure d'analyse est sa capacité à rendre des résultats exacts en présence de faibles changements de conditions expérimentales susceptibles de se produire dans l'utilisation de cette procédure». [26]

5. Cycle de vie de la méthode

La mise en œuvre d'une procédure de dosage peut se décomposer essentiellement en quatre phases successives :

- **Phase de sélection**, qui permet de définir les objectifs et les conditions opératoires initiales.
- **Phase de développement**, avec ou sans optimisation au moyen de plans d'expériences
- **Phase de validation précédée**, selon les cas, d'une phase de prévalidation

- **Phase d'application en routine**, incluant le plus souvent une validation en routine et parfois une validation partielle. [25]

6. Protocoles en phase de Prévalidation

L'objectif de la phase de prévalidation est de préparer tous les éléments nécessaires à la validation formelle de la méthode, tels que la configuration précise du matériel à utiliser, la préparation des solutions « mères » et « filles » pour la réalisation des standards d'étalonnage et le mode de préparation des standards de validation. L'ensemble de ces informations doit idéalement être formalisé dans un protocole avant d'entreprendre la phase de validation. [25]

7. Protocole en phase de validation

L'ensemble des données de la phase de validation doit faire l'objet d'un rapport détaillé dans lequel tous les résultats obtenus doivent être documentés. Au terme de la phase de validation et avant son exploitation en routine, la procédure d'analyse doit être complètement décrite sous forme d'un mode opératoire standardisé.

À cette fin, les **standards d'étalonnage (SE)** doivent être préparés selon le protocole qui sera appliqué en routine tant au niveau du mode opératoire que du nombre de niveaux de concentration (point d'étalonnage) et du nombre de répétitions par niveau.

Les **standards de validation (SV)** doivent quant à eux être préparés dans la matrice et être des échantillons indépendants (variance intrasérie) dans la mesure où c'est applicable. En effet, ils représentent, en phase de validation, les futurs échantillons que la procédure analytique aura à quantifier. Chaque standard de validation est préparé et traité de façon indépendante comme un futur échantillon. Ce caractère d'indépendance est fondamental pour l'estimation correcte de la variance intersérie. [25]

Le logigramme de la figure 1 ci-dessous présente la démarche proposée pour sélectionner un protocole expérimental de validation en fonction des contraintes ou des spécificités liées à la procédure de dosage sous épreuve.

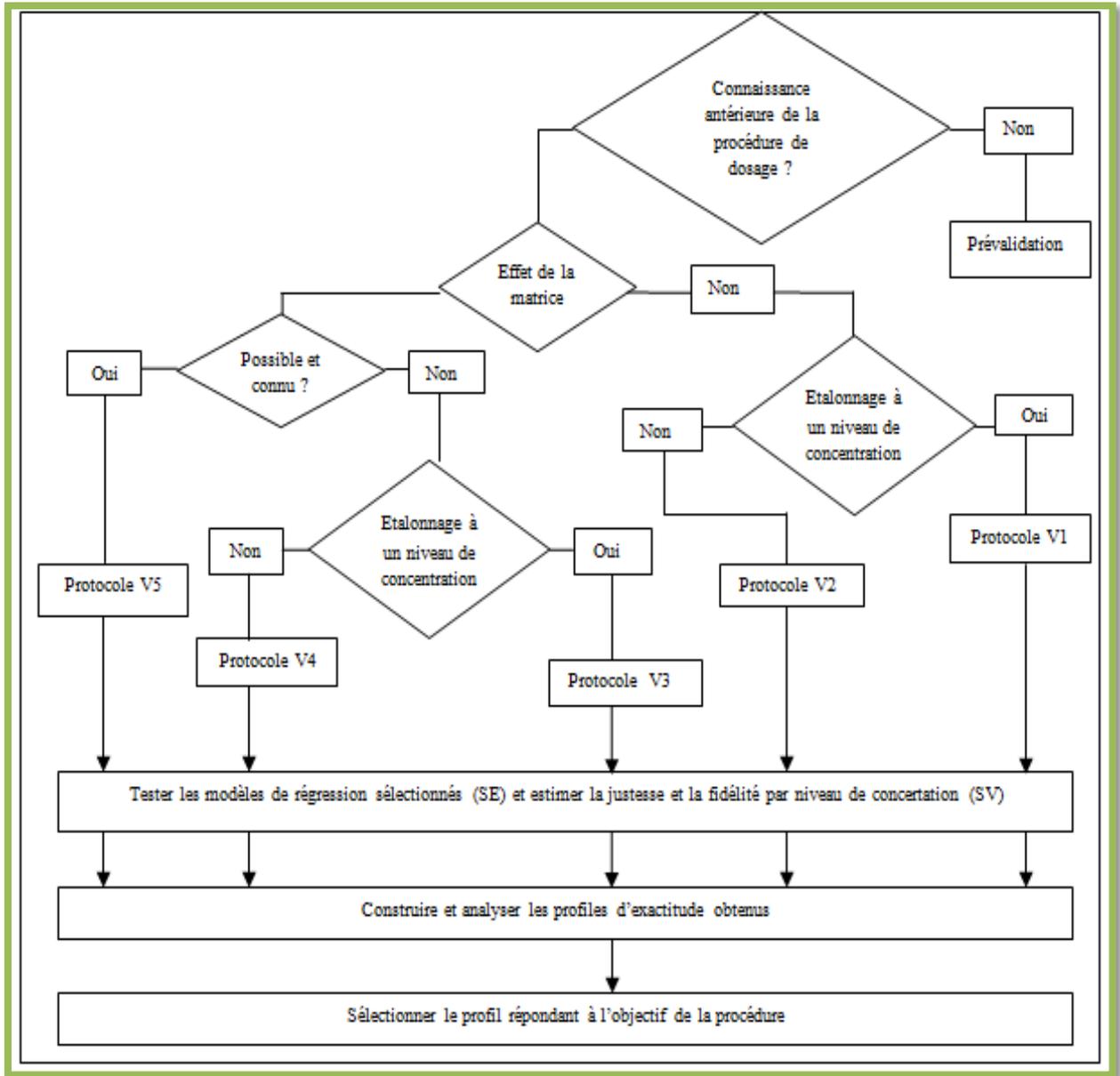


Figure 1 : Logigramme permettant de sélectionner un protocole de validation. SE : standard d'étalonnage. SV : standard de validation. [25]

Le tableau III ci-dessous présente également, selon le protocole choisi, le nombre total d'essais à réaliser pour valider la procédure analytique concernée.

Tableau III : Choix du nombre de standards d'étalonnage et de validation en fonction du protocole choisi. [25]

Standards	Niveau de concentration	Protocole				
		V ₁	V ₂	V ₃	V ₄	V ₅
SE. Etalonnage sans la matrice	Bas Médian Haut		2		2	
		2	2 ⁽²⁾	2	2 ⁽²⁾	
		2 ⁽¹⁾	2	2 ⁽¹⁾	2	
SE. Etalonnage avec la matrice	Bas Médian Haut				2	2
				2	2 ⁽²⁾	2 ⁽²⁾
	Addit			2 ⁽¹⁾	2	2
						2 ⁽³⁾
SV. Validation avec la matrice	Bas Médian Haut	3	3	3	3	3
		3	3	3	3	3
		3	3	3	3	3
Nbre minimum séries		3	3	3	3	3
Nbre total essais (min)		33	45	39	63	45

8. Etudes statistiques de la validation analytique

8.1. Spécificité

La spécificité peut être démontrée de deux façons :

- Soit en comparant les chromatogrammes obtenus à partir des quatre solutions préparées : les chromatogrammes obtenus à partir de la solution standard 100% et l'échantillon 100% doivent renfermer des pics au même temps de rétention et avec des surfaces comparables et les chromatogrammes obtenus à partir du diluant et de la solution placebo ne doivent pas présenter un pic au même temps de rétention que l'analyte.
- Soit par la comparaison de la droite obtenue avec les 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 de l'erreur systématique en vérifiant la spécificité de la méthode pour le dosage du principe actif seul et aussi pour la forme reconstituée. [27]

8.2. 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 Y et la

quantité (concentration) X. Cette relation se caractérise à l'aide d'une fonction f qui doit être strictement monotone 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 à ce que l'erreur résiduelle soit minimisée. Le tableau IV illustre quelques exemples des différentes fonctions de réponse pouvant être envisagées lors d'une validation des méthodes analytiques. [27]

Tableau IV : Exemples de fonction de réponses [27]

Type	Equation	Paramètres	Linéaire
Droite passant par l'origine	$Y = \beta X$	β	Oui
Droite	$Y = \alpha + \beta X$	α, β	Oui
Fonction quadratique	$Y = \alpha + \beta X + \gamma X^2$	α, β, γ	Oui
Fonction logistique à 4 paramètres	$Y = \alpha + \frac{\delta - \alpha}{1 + \left(\frac{X}{\gamma}\right)^\beta}$	$\alpha, \beta, \gamma, \delta$	Non
Fonction logistique à 5 paramètres	$Y = \alpha + \frac{\delta - \alpha}{\left[1 + \left(\frac{X}{\gamma}\right)^\beta\right]^\psi}$	$\alpha, \beta, \gamma, \delta, \psi$	Non

Très vraisemblablement, la plupart des méthodes physicochimiques auront recours à la droite (passant par 0 ou non). Pour les méthodes bioanalytiques, 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. [27]

8.3. Alignement des observations

Si, pour un niveau de concentration, les quantités introduites ne sont pas identiques pour toutes les séries, il est indispensable de procéder à un alignement sur la concentration moyenne ; 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 [27] :

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

Tableau V : Règles d'alignement pour différentes fonctions de réponses [27]

Fonction de réponse	Règle d'alignement
Droite passant par l'origine	$y_{ijk,c} = y_{ijk} + \hat{\beta}_i [\bar{x}_{ijk} - x_{ijk}]$
Droite	$y_{ijk,c} = y_{ijk} + \hat{\beta}_i [\bar{x}_{ijk} - x_{ijk}]$
Fonction quadratique	$y_{ijk,c} = y_{ijk} + \hat{\beta}_i [\bar{x}_{ijk} - x_{ijk}] + \hat{\gamma}_i [\bar{x}_{ij}^2 - x_{ijk}^2]$
Logistique à 4 paramètres	$y_{ijk,c} = y_{ijk} + (\hat{\delta}_i - \hat{\alpha}_i) \left(\frac{1}{\left(1 + \frac{\hat{\gamma}_i}{\bar{x}_{ij}}\right)^{\hat{\beta}_i}} - \frac{1}{\left(1 + \frac{\hat{\gamma}_i}{\bar{x}_{ijk}}\right)^{\hat{\beta}_i}} \right)$

8.4. Prédiction inverses

Avant d'effectuer les prédictions inverses, c'est à-dire, calculer des concentrations en retour avec la fonction de réponse, il est préférable de s'assurer qu'au sein d'un niveau de concentration, les concentrations sont toutes identiques. Si ce n'est pas le cas, il vaut alors mieux les aligner comme décrit dans la section précédente [27]. Les prédictions inverses pour les différents modèles de régression s'obtiennent comme suit (tableau VI):

Tableau VI : Calcul des prédictions inverses pour différentes fonctions de réponses.[27]

Fonction de réponse	Concentration calculée
Droite passant par l'origine	$x_{ijk,calc} = \frac{y_{ijk}}{\hat{\beta}_i}$
Droite	$x_{ijk,calc} = \frac{y_{ijk} - \hat{\alpha}_i}{\hat{\beta}_i}$
Fonction quadratique	$x_{ijk,calc} = \frac{-\hat{\beta}_i + \sqrt{\hat{\beta}_i^2 - 4\hat{\gamma}_i(\hat{\alpha}_i - y_{ijk})}}{2\hat{\gamma}_i}$
Logistique à 4 paramètres	$x_{ijk,calc} = \hat{\gamma}_i \left(\frac{\hat{\delta}_i - \hat{\alpha}_i}{y_{ijk} - \hat{\alpha}_i} - 1 \right)^{\frac{1}{\hat{\beta}_i}}$
Logistique à 5 paramètres	$x_{ijk,calc} = \hat{\gamma}_i \left(\left(\frac{\hat{\delta}_i - \hat{\alpha}_i}{y_{ijk} - \hat{\alpha}_i} \right)^{\frac{1}{\hat{\psi}_i}} - 1 \right)^{\frac{1}{\hat{\beta}_i}}$

Si les observations ont été alignées, il faut remplacer les y_{ijk} par $y_{ijk,c}$ dans le tableau précédent.

Si une transformation a été utilisée il ne faut pas oublier d'effectuer la transformation inverse après ce calcul en retour. [27]

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

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

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

$$\mathbf{recouvrement}(\%)_j = 100 \times \frac{\hat{\mu}_j}{\bar{x}_j}.$$

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

\bar{x}_j : moyenne des concentrations introduites du niveau j.[27]

8.6.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 intersérie donne une estimation de la variance de fidélité intermédiaire :

$$\begin{aligned} \text{Répétabilité : } \hat{\sigma}_{Rej}^2 &= \hat{\sigma}_{Wj}^2 \\ \text{Fidélité intermédiaire : } \hat{\sigma}_{IPj}^2 &= \hat{\sigma}_{Wj}^2 + \hat{\sigma}_{Bj}^2 \quad [27] \end{aligned}$$

8.7.Calcul de l'exactitude

L'exactitude d'un résultat (par opposition à celui de la méthode analytique) exprime l'étroitesse de l'accord entre le résultat d'essai et la valeur de référence acceptée, aussi appelée valeur conventionnellement vraie, à savoir pour chaque mesure:

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

Pour chaque modèle et chaque observation l'exactitude de la mesure en valeur relative, est donnée par :

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

L'erreur maximale relative observée pour chaque modèle sur l'ensemble des séries montredjà l'impact du choix de la fonction de réponse sur l'exactitude des résultats [27]

8.7.1 .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 :

$$\begin{aligned} X &= \mu + |\text{Biais}|_{\text{procédure}} + \text{FidélitéIntermédiaire}_{\text{procédure}} \\ &\quad \Downarrow \\ X - \mu &= |\text{Biais}|_{\text{procédure}} + \text{FidélitéIntermédiaire}_{\text{procédure}} \\ &\quad \Downarrow \\ X - \mu &= \text{ErreurTotale}_{\text{Procédure}} \end{aligned}$$

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

Il est normal que l'erreur maximale observée sur un grand nombre d'observations soit sensiblement plus grande que l'erreur totale vu que ces erreurs maximales représentent des évènements rares tandis que l'erreur totale reflète plutôt les plus grandes erreurs auxquelles on peut s'attendre dans la plupart des cas.

L'erreur totale d'une procédure analytique est donc bien un bon indicateur de l'exactitudes des résultats qu'elle produit. [27]

8.7.2. Calcul de l'intervalle de tolérance

L'importance dans une validation analytique est la garantie ou une représentation de ce qu'une même procédure analytique pourra donner comme résultats dans le futur, C'est le rôle de l'intervalle de Tolérance. L'estimation des paramètres de justesse et fidélité μ_j , $\sigma_{B,j}^2$ et $\sigma_{w,j}^2$ à chaque niveau de concentration est une étape indispensable pour calculer la proportion attendue de résultats qui se situent dans les limites d'acceptation.

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

$$E_{\hat{\mu}_M, \hat{\sigma}_M} \{ P_X [\hat{\mu}_M - k\hat{\sigma}_M < X < \hat{\mu}_M + k\hat{\sigma}_M \mid \hat{\mu}_M, \hat{\sigma}_M] \} = \beta$$

Où :

$$\hat{\sigma}_{F,I,j}^2 = \hat{\sigma}_{W,j}^2 + \hat{\sigma}_{B,j}^2$$

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

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

$$v = \frac{(R + 1)^2}{\frac{(R + \frac{1}{n})^2}{p-1} + \frac{1 - \frac{1}{n}}{pn}}$$

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

Le même intervalle en échelle relative devient :

$$biais(\%)_j - Q_t \left(v; \frac{1 + \beta}{2} \right) \sqrt{1 + \frac{1}{PnB_j^2} CV_{F,I,j}}$$

$$biais(\%)_j + Q_t \left(v; \frac{1 + \beta}{2} \right) \sqrt{1 + \frac{1}{PnB_j^2} CV_{F,I,j}}$$

Deux termes sont contenus dans l'intervalle de tolérance : l'un étant la justesse et l'autre étant, à un facteur près, le coefficient de variation de fidélité intermédiaire. C'est la raison pour laquelle cet intervalle peut ainsi être considéré comme une expression de l'exactitude des résultats. Mais l'intervalle de tolérance intègre une dimension supplémentaire, celle de chance (ou risque) pour des résultats futurs, conditionnellement à des résultats passés. La méthode peut dès lors être considérée comme exacte au niveau de chance β pour le niveau de concentration en question, si l'intervalle de tolérance est inclus dans les limites $[-\gamma, \gamma]$ définies à priori en fonction des objectifs de la méthode.[27]

8.7.3. Profil d'exactitude et décision

8.7.3.1. Calcul

Le profil d'exactitude s'obtient en reliant entre elles les bornes supérieures puis les bornes inférieures de l'intervalle de tolérance :

$$L_j = \text{biais}(\%)_j - Q_t \left(v; \frac{1+\beta}{2} \right) \sqrt{1 + \frac{1}{PnB_j^2}} CV_{F,I,j}$$

$$U_j = \text{biais}(\%)_j + Q_t \left(v; \frac{1+\beta}{2} \right) \sqrt{1 + \frac{1}{PnB_j^2}} CV_{F,I,j}$$

Le profil d'exactitude de la méthode s'obtient en reliant d'une part les bornes L_j entre elles ($L_1 \rightarrow L_2 \rightarrow \dots \rightarrow L_m$) et d'autre part les bornes U_j entre elles ($U_1 \rightarrow U_2 \rightarrow \dots \rightarrow U_m$).[27]

8.7.3.2. Choix de la fonction de réponse

L'utilisation de certaines fonctions ne permet pas à la procédure analytique d'atteindre ses objectifs vu que pour certaines concentrations, les limites de tolérances sortent des limites d'acceptation. Par ailleurs, parmi les fonctions de réponses acceptables, on pourra remarquer que certaines fournissent des résultats meilleurs que d'autres. Ce seront ces dernières qui devront être retenues, sachant que le coefficient de détermination R^2 est toujours supérieur à 0.99 et pas en rapport avec la qualité des résultats.

Le profil d'exactitude, qui est le reflet direct de ce que la procédure analytique est capable, permet de juger l'adéquation de différentes pratiques et permet de prendre des décisions sur le choix de la fonction de réponse adéquate. [27]

8.8. 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)). C'est un prérequis à l'estimation de la justesse. A l'inverse, l'existence d'une relation linéaire entre la concentration estimée et la concentration introduite n'implique pas que la méthode soit juste (ex: biais).[27]

8.9.Limites de quantification

Le profil d'exactitude, construit à partir des intervalles des mesures attendues, permet donc, de décider des niveaux de concentration pour lesquels une procédure est apte à fournir des résultats dans les limites d'acceptation. Ainsi, par définition quand elle se produit, l'intersection entre le profil d'exactitude et les limites d'acceptation définissent les limites de quantification basse (LLOQ) et haute (ULOQ) de la procédure. Entre ces deux limites, il y a bien sûr l'intervalle de dosage. De la sorte, les limites de quantification sont bien les valeurs extrêmes qui peuvent être quantifiées avec une exactitude définie.[27]

8.10.Robustesse

Pour évaluer la robustesse d'une procédure d'analyse on utilise la technique des plans factoriels qui fait varier plusieurs paramètres en même temps. Ce procédé permet de diminuer de façon importante le nombre d'essais et l'étude des interactions entre paramètres, c'est-à-dire dépend de la modification simultanée de deux ou plusieurs paramètres.

Le premier paramètre introduit sera toujours la teneur en substance à analyser, à cause de ses interactions possibles avec les autres paramètres. L'étude de reproductibilité permet d'orienter le choix des paramètres opératoires à étudier grâce aux écarts observés. L'étude de ces écarts précisera la valeur de l'écart admissible de ces paramètres à inclure dans les essais des plans factoriels [26]

Plans d'expériences

Test à quatre essais

Ce test ne permet l'étude que de deux paramètres, soit la teneur en substance à doser, plus un autre .Le plan factoriel appelé 2^2 est résumé par le tableau VII où A est le premier paramètre (la teneur en substance à doser), B le deuxième et AB leur interaction [26]

Tableau VII : Plan factoriel 2²[26]

Numéro de dosage	Paramètres		Interaction AB
	A	B	
1	-	-	+
2	+	-	-
3	-	+	-
4	+	+	+

Le signe contenu dans les colonnes A ou B est celui de la déviation du paramètre par rapport à sa valeur nominale. Celui de la colonne AB est le produit algébrique des signes de colonne A et B

Pour les premiers essais, les deux paramètres sont maintenus au niveau bas (- -), pour le deuxième, le premier paramètre est au niveau haut et le deuxième au niveau bas (+ -).c'est l'inverse pour l'essai 3 (- +) ; le quatrième, enfin a les deux paramètres au niveau haut (+ +)

-Quatre essais seront exécutés en effectuant sur un échantillon, quatre dosage selon les modalités ci-dessus .La mesure analytique de chacun des dosages sera notée y_1, y_2, y_3 et y_4

-L'effet du paramètre A sur la mesure analytique n'est pas calculé, il est déjà connu, l'effet du paramètre B est calculé comme suit :
$$B = \frac{1}{4} (-y_1 - y_2 + y_3 + y_4)$$

-L'effet de l'interaction AB : dans ce cas A et B varient simultanément :

$$B = \frac{1}{4} (+y_1 - y_2 - y_3 + y_4)$$

L'effet est égal à la moyenne des réponses y, chacune étant munie du signe figurant dans le tableau, à l'intersection de la colonne correspondant à l'effet calculé et de la ligne ayant le numéro de la réponse considérée

Calcul des limites de confiances :

- pour l'effet de B : $B \pm t \frac{S_{exp} D}{\sqrt{n}}$
- pour l'interaction AB $\pm t \frac{S_{exp} D}{\sqrt{n}}$

S_{expD} :est l'écart expérimental des mesures t est le coefficient de Student pour une probabilité de $1 -\alpha/2$ et le nombre de degré de liberté de S_{expD} et enfin n est le nombre d'essais du test

- Si l'intervalle de confiance de l'effet d'un paramètre ou d'une interaction contient zéro, l'effet de ce paramètre ou de cette interaction est considéré comme nul

- Si zéro est à l'extérieur de l'intervalle, le résultat de la mesure est influencé par la variation des paramètres en cause
- Si aucun effet (autre que celui de la substance à doser) ne diffère significativement de zéro la méthode étudiée est stable vis à vis des variations des paramètres envisagés, dans le domaine de variations considéré
- Si l'effet des paramètres, ou des interactions de paramètres, produisent un effet différent de zéro, ces paramètres devront être fixés de façon précise par le protocole d'analyse

Ces conditions ne sont valables que si l'effet des paramètres étudiés est linéaire par rapport à leurs variations [26]

Test à huit essais

Ce plan permet de développer l'usage des plans factoriels avec l'utilisation d'alias, il permet de tester trois paramètres A, B, C et ainsi que leurs interactions deux à deux et l'interaction des trois paramètres entre eux, le tableau VIII représente un plan 2^3 [26]

Tableau VIII: Plan factoriel 2^3 [26]

Numéro d'essais	Paramètres			Interactions			
	A	B	C	AB	AC	BC	ABC
1	-	-	-	+	+	+	-
2	+	-	-	-	-	+	+
3	-	+	-	-	+	-	+
4	+	+	-	+	-	-	-
5	-	-	+	+	-	-	+
6	+	-	+	-	+	-	-
7	-	+	+	-	-	+	-
8	+	+	+	+	+	+	+

Pour la détermination des effets des paramètres A, B, C et de leurs interactions ainsi que leurs limites de confiance on procède exactement comme le test à quatre essais

Les interactions du troisième ordre, telles que A, B, C se produisent rarement ou, si elles existent, sont négligeables, dans ce cas on utilise une colonne correspondante pour placer un nouveau paramètre. C'est la technique des alias l'avantage de la technique est de tester un paramètre de plus sans augmenter le nombre d'essais

Dans le cas du test à huit essais, si nous affectons un paramètre D qui choisit de telle façon qu'il n'ait pas a priori interaction avec les autres paramètres à la colonne ABC. Les interactions seront les suivantes :

Colonne AB : interaction AB+CD

Colonne AC : interaction AC+BD

Colonne BC : interaction BC + AD [26]

Test à seize essais

Le test permet la vérification de cinq variables et de toutes leurs interactions du deuxième ordre. Pour la détermination des effets des paramètres et de leurs interactions ainsi que leurs limites de confiance on procède exactement comme le test à quatre essais

-Les effets dont l'intervalle de confiance contient zéro sont considérés comme nuls [26]

Partie pratique

Ce travail étant focalisé sur la validation analytique de dosage simultané de metformine et sitagliptine. L'objectif principal étant de mettre au point et de valider une nouvelle méthode de dosage de metformine et de sitagliptine dans un antidiabétique oral sous forme de comprimé.

Le travail est réalisé au niveau du laboratoire de chimie analytique du département de pharmacie

La validation à été faite selon le protocole proposé par une commission SFSTP parue dans la revue pharmaceutique STP pharmaceutique en 2006 portant «validation des procédures analytiques: harmonisation des démarches »

1. Matériels

1.1. Appareillage

Tableau IX : Matériels du laboratoire de chimie analytique utilisés

Désignation		Spécification	Usage
Appareil HPLC (SHIMADZU LC 20)	Pompe	LC 20 AT	Analyse des solutions et obtention des chromatogrammes
	Injecteur automatique	SIL 20 A	
	Contrôleur	CBM-20	
	Compartiment de la colonne	C TO-20A	
	Colonne	C 18	
	Détecteur	Détecteur spectrophotométrique UV-visible	
	Logiciel d'exploitation	LC-solution	
Purificateur de l'eau		Human power I	Purification de l'eau
Pompe à vide (Pmax = 4 bar)		Fisher bioblock scientific	Filtration de la phase mobile
Bain ultrason : sonicateur		Advantage-LAB	Dissolution
Agitateur magnétique		STUART	Homogénéisation des solutions
Balance de précision		KERN ALT 220-5	Pesée
Etuve		MEMMERT	Séchage

1.2. Verrerie et autres

Tableau X : Verreries et autres matériels utilisés

Verrerie	Autres
- Bêchers ;	- Barreau magnétique
- Eprouvette : 1000 ml ;	-Micropipette : 1 ml ;
-Fioles jaugées : 50 ml, 100 ml, 1000 ml, 2000ml ;	- Poires ;
- Pipettes jaugées : 20 ml ;	- Pissettes ;
- Pipettes jaugées : 10ml ;	- Spatules ;
- Entonnoirs ;	- Papier aluminium ;
- Vials ;	-papier filtre ;
	- flacon pour phase mobile ;
	-filtres millipores ;

1.3. Matieres premieres

Tableau XI : Les matières premières utilisées

Matières premières	Provenance
Metformine	ALDAPH-NOVONORDISK ALGERIE
Sitagliptine	BIOPHARM

2. Méthodes

2.1.Choix du Protocole de validation

Selon le logigramme de la figure 1 ainsi que le tableau III qui nous permettent de sélectionner un protocole de validation sachant qu' il n'y a pas d'effet matrice et l'étalonnage ne se fait pas à un niveau de concentration, le protocole adopté dans notre étude est le V2 ; en ajoutant deux points supplémentaires pour les SE, c'est-à-dire 5 niveaux de concentrations au lieu de trois car selon l'exigence ICH : les SV comportent 5 niveaux de concentrations afin d'aligner le nombre de points en SE et SV on a ajouté deux points supplémentaires pour avoir le même nombre de concertations .

Cette modification apportée nous a amenés à appliquer le protocole nommée le V2 modifié.

Cela consiste selon SFSTP de préparer :

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

2.2. Préparation des solutions

2.2.1. Diluant : eau distillé

2.2.2. Préparation des solutions mères

La préparation des solutions mères est résumée dans les tableaux suivants :

Tableau XII:Préparation des solutions A (chlorhydrate de metformine)

Niveaux	80%		90%		100%		110%		120%	
Répétitions	1	2	1	2	1	2	1	2	1	2
PE	100		112.5		125		137.5		150	
Protocole	-Peser chaque PE théorique de Metformine pour chaque répétition dans une fiole de 50 ml ; - Ajouter environ 30 ml du diluant et mettre dans le sonicateur pour une dissolution complète ; - Compléter au trait de jauge avec le diluant pour ainsi obtenir des solutions mères ;									

Tableau XIII: Préparation de la solution B(phosphate de sitagliptine)

Niveaux	80%		90%		100%		110%		120%	
Répétitions	1	2	1	2	1	2	1	2	1	2
PE	40		45		50		55		60	
Protocole	-Peser chaque PE théorique de sitagliptine pour chaque répétition dans une fiole de 100 ml ; - Ajouter environ 60 ml du diluant et mettre dans le sonicateur pour une dissolution complète ; - Compléter au trait de jauge avec le diluant pour ainsi obtenir des solutions mères ;									

2.2.3. Préparation des SE :

Chaque jour, pendant 03 jours, 05 niveaux de concentration sont préparés à raison de 02 répétitions par niveau. Le tableau ci-dessous résume les étapes de préparation des SE

Tableau XIV: Préparation des SE

Niveaux	80%		90%		100%		110%		120%	
Répétitions	1	2	1	2	1	2	1	2	1	2
Protocole	Pour chaque répétition mettre dans une fiole de 50 ml : -20 ml de la solution A -10 ml de la solution B - Compléter au trait de jauge avec le diluant - Agiter par retournement à chaque fois et remplir les vials.									
Nombre solutions à réaliser	SE = 5x3x2 = 30 solutions (5 niveaux, 3 séries, 2 répétitions)									

2.2.4. Préparation de la solution placebo

2.2.3.1. Préparation du granulé du placebo

On a pris comme référence les comprimés de Janumet de 950 mg composés de 500 mg metformine et 50 mg de sitagliptine

La masse théorique du placebo dans un comprimé est de 0,42g (950-500-50= 400 mg) soit 4 g pour 10 comprimés.

2.2.3.2. Préparation de la solution placebo de Janumet

- Peser **1g** du granulé de placebo dans une fiole de **100 ml**, compléter au trait de jauge et mettre aux ultrasons pour une dissolution complète
- Filtrer par papier filtre puis centrifuger avec la centrifugeuse.
- Filtrer une seconde fois à l'aide d'un filtre seringue.
- Procéder à une dilution **1/10** (avec de l'eau distillée) au filtrat obtenu sachant que le volume de ce dernier est de **95 ml**.

2.2.5. Préparation des standards de validation

Tableau XVI : préparation des SV

Niveaux	80%			90%			100%			110%			120%		
Répétitions	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3
Protocole	Dans une fiole de 50 ml : - Mettre 20 ml de la solution A ; - Ajouter 10 ml de la solution B ; - Ajouter 10 ml de la solution placebo ; - Compléter au trait de jauge avec le diluant ; - Agiter par retournement à chaque fois et remplir les vials.														
Nombre de solutions à préparer	$SV = 5 \times 3 \times 3 = 45$ solutions (5 niveaux, 3 séries, 3 répétitions)														

- Préparation de la solution échantillon 100 % (dans l'analyse en routine)

Pour que cette méthode puisse être utilisé en routine pour le dosage de la metformine et de la sitagliptine le standard de validation sera préparé comme suit :

- Peser une prise d'essais des comprimés broyés équivalente à 125 mg
- Dans une fiole de 50 ml procéder à une dilution 2/50 et filtrer la solution obtenue
- Dans une fiole de 50 ml procéder à une deuxième dilution 2/50

2.2.5. Préparation de la phase mobile

Préparation de Solution tampon dihydrogénophosphate d'ammonium pH=3 /ACN_{HPLC} avec des proportions bien déterminées

2.3. Les conditions expérimentales

Tableau XVII : Conditions chromatographiques de la méthode de dosage

Colonne	Longueur	250 mm
	Diamètre	4.6 mm
	Taille des particules	10µm
	Phase stationnaire	Gel de silice de forme irrégulière sur lequel ont été greffés des groupements acides benzène sulfonique
Détection	Spectrophotomètre UV-Visible : longueur d'onde $\lambda=263$ nm	
Débit	1.2 ml/min	
Volume d'injection	25 µl	
Température	Ambiante	
Temps d'analyse	5 min	
Phase mobile	NH ₄ H ₂ PO ₄ pH = 3/ ACN avec des proportions bien déterminées	

2.4. Préparation de la feuille de calcul

En utilisant le logiciel Excel de Microsoft office 2016 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 nécessaire juste en introduisant les données brutes en termes de prises d'essais et de leurs réponses instrumentales.

1. Résultats

1.1. Résultats de l'étape de la mise au point

On a abouti au :

- Choix du diluant : eau
- Choix des niveaux des concentrations qui se fait en fonction de la réponse sont les suivants : 80% ,90% ,100%,110%,120%
- Nous avons étudié les meilleures conditions chromatographiques, ce qui nous a permis de fixer les conditions expérimentales suivantes :
- Phase mobile : $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$ pH = 3/ ACN avec des proportions bien déterminées
- Un volume d'injection de 25 μl
- Une colonne échangeuse d'ions de longueur de 250 mm et de diamètre de 4.5mm
- Une longueur d'onde de 263 nm dont le choix a été établie en fonction des spectres d'absorbance de la metformine et de la sitagliptine.
- Une température ambiante et un débit de 1.2ml/ min qui nous ont permis d'obtenir un temps de rétention adéquat pour les deux molécules et sous une pression correcte au niveau de la pompe.

1.2. Résultats de l'étape de validation

1.2.1. Spécificité

La spécificité de la méthode est démontrée par deux méthodes :

1.2.1.1. Par comparaison des chromatogrammes

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.

Elle est illustrée dans les figures suivantes

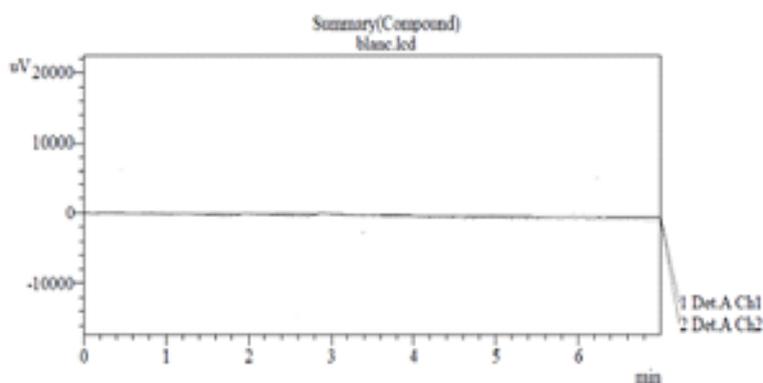


Figure 2 : Chromatogramme du diluant non chargé

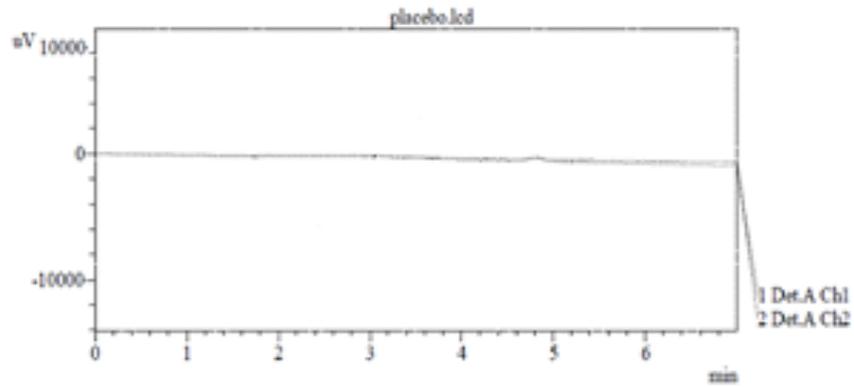


Figure 3 : Chromatogramme du diluant avec placebo non chargé de PA

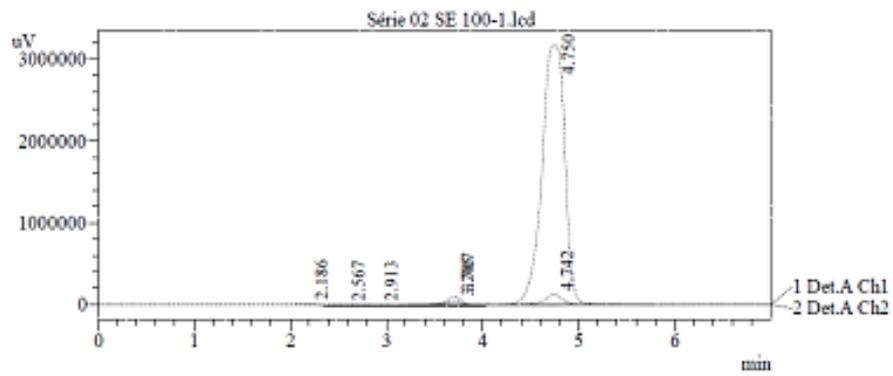


Figure 4 : Chromatogramme du standard d'étalonnage niveau 100%

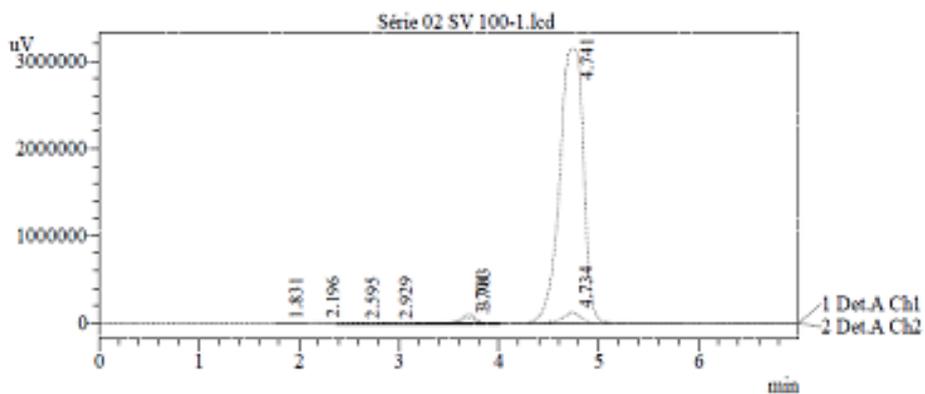


Figure 5 : Chromatogramme du standard de validation, niveau 100%

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

Tableau XVIII : Résultats de la superposition des quatre chromatogrammes

Solutions	Temps de rétention (min)		Superposition
Diluant non chargé	Absence		Absence
Diluant avec placebo non chargés de PA	Absence		Absence
SE	A	4,742	Concluante
	B	3,705	
SV	A	4,734	
	B	3,701	

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

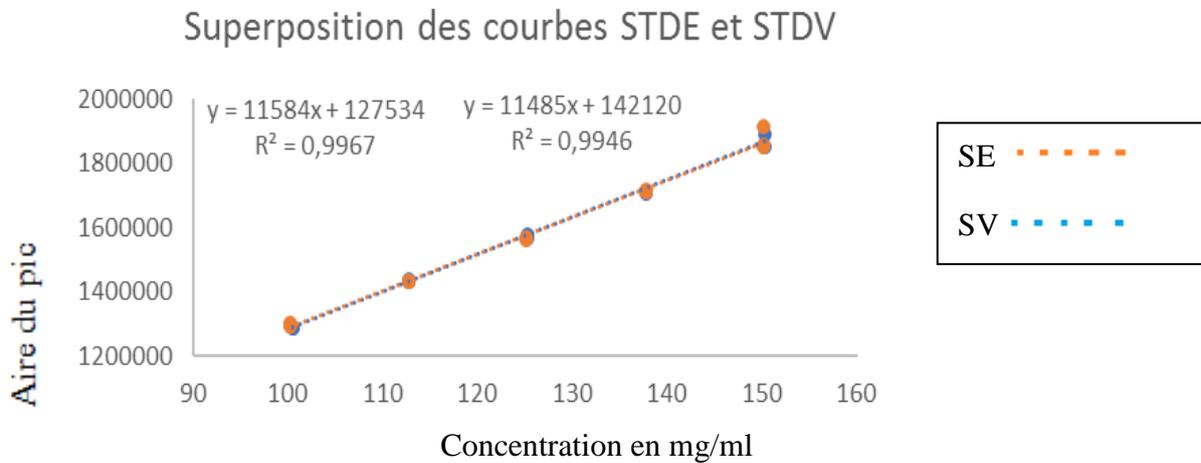


Figure 6: Superposition des courbes d'étalonnage et de validation du chlorhydrate de metformine (A)

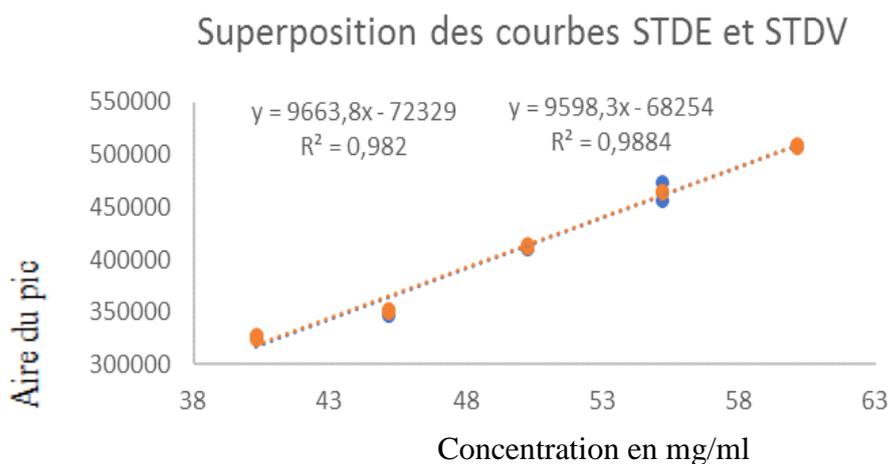


Figure 7 : Superposition des courbes d'étalonnage et de validation du phosphate de sitagliptine (B)

1.2.2. Fonction de réponse

La relation existante entre l'aire du pic (réponse instrumentale) et la masse introduite dans les standards d'étalonnages (concentration), obtenues sur chacune des trois séries, est représentée pour quatre modèles mathématiques.

Les résultats qui seront désormais élucidés sont basés sur le modèle mathématique choisi, en l'occurrence la fonction de réponse : $\sqrt{y} = f(\sqrt{x})$ qui nous a donné les résultats suivants :

Cas du Chlorhydrate de metformine

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

Validation analytique selon le protocole SFSTP 2006						
Gamme standard d'étalonnage						
Série 1		Série 2		Série 3		Niveau de concentration
Masse introduite (mg)	Aire du pic	Masse introduite (mg)	Aire du pic	Masse introduite (mg)	Aire du pic	
10,01	1196,15	10,02	1135,04	10,01	1145,73	80%
10,01	1184,80	10,02	1135,73	10,01	1129,09	
10,61	1246,71	10,61	1198,72	10,61	1206,51	90%
10,61	1218,65	10,61	1199,97	10,61	1209,66	
11,19	1310,94	11,19	1252,84	11,18	1278,01	100%
11,19	1292,25	11,19	1256,07	11,18	1287,68	
11,73	1360,54	11,73	1306,71	11,73	1331,73	110%
11,73	1368,65	11,73	1309,19	11,73	1322,56	
12,26	1448,87	12,25	1376,69	12,25	1390,84	120%
12,26	1426,74	12,25	1361,67	12,25	1377,23	
Pente	111,43	pente	102,99	Pente	109,70	
Ord, à l'origine	62,09	Ord, à l'origine	103,99	Ord, à l'origine	43,90	

Cas du Phosphate de sitagliptine

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

Validation analytique selon le protocole SFSTP 2006						
Gamme standard d'étalonnage						
Série 1		Série 2		Série 3		Niveau de concentration
Masse introduite (mg)	Aire du pic	Masse introduite (mg)	Aire du pic	Masse introduite (mg)	Aire du pic	
6,35	571,79	6,35	591,77	6,33	568,42	80%
6,35	572,79	6,35	594,44	6,33	565,96	
6,72	589,99	6,73	629,53	6,72	602,04	90%
6,72	592,10	6,73	631,81	6,72	600,90	
7,09	641,16	7,09	683,27	7,08	634,68	100%
7,09	642,11	7,09	686,64	7,08	643,74	
7,43	675,78	7,44	696,16	7,43	662,25	110%
7,43	688,89	7,44	696,94	7,43	657,49	
7,75	713,03	7,75	731,18	7,75	701,97	120%
7,75	713,64	7,75	726,66	7,75	699,97	
Pente	106,10	pente	96,10	pente	91,52	
Ord, à l'origine	-109,64	Ord, à l'origine	-12,63	Ord, à l'origine	-12,50	

1.2.2.1. 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

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

Cas du Chlorhydrate de metformine

Tableau XXI : Critères de choix de la fonction de réponse pour A

Modèle de la fonction réponse	Profil d'exactitude
$y = ax + b$	<p> ● limite d'acceptation supérieure ● limite d'acceptabilité inférieure ● limite de tolérance supérieure ● limite de tolérance inférieure — biais </p> <p style="text-align: center;">Profil d'exactitude de la fonction linéaire simple</p>
$y = ax$	<p style="text-align: center;">Profil d'exactitude de la fonction linéaire passant par zéro</p>
$\sqrt{y} = f(\sqrt{x})$	<p style="text-align: center;">Profil d'exactitude de la fonction racine carrée</p>
$\ln y = f(\ln x)$	

Cas du Phosphate de sitagliptine

Tableau XXII : Critères de choix de la fonction de réponse pour B

Modèle de fonction de réponse	Profil d'exactitude																																																																		
$y = ax + b$	<p> ● limite d'acceptation supérieure ● limite d'acceptabilité inférieure ● limite de tolérance supérieure ● limite de tolérance inférieure — biais </p> <p>Profil d'exactitude pour la fonction linéaire simple</p> <table border="1"> <thead> <tr> <th>Niveau de concentration</th> <th>limite d'acceptation supérieure</th> <th>limite d'acceptabilité inférieure</th> <th>limite de tolérance supérieure</th> <th>limite de tolérance inférieure</th> <th>biais</th> </tr> </thead> <tbody> <tr><td>38,00</td><td>5</td><td>-5</td><td>5</td><td>-5</td><td>1,5</td></tr> <tr><td>43,00</td><td>5</td><td>-5</td><td>1,5</td><td>-5</td><td>-1,5</td></tr> <tr><td>48,00</td><td>5</td><td>-5</td><td>5,5</td><td>-1,5</td><td>2,5</td></tr> <tr><td>53,00</td><td>5</td><td>-5</td><td>1,5</td><td>-3,5</td><td>-1,5</td></tr> <tr><td>58,00</td><td>5</td><td>-5</td><td>1,5</td><td>-3,5</td><td>0</td></tr> <tr><td>63,00</td><td>5</td><td>-5</td><td>1,5</td><td>-3,5</td><td>0</td></tr> </tbody> </table>	Niveau de concentration	limite d'acceptation supérieure	limite d'acceptabilité inférieure	limite de tolérance supérieure	limite de tolérance inférieure	biais	38,00	5	-5	5	-5	1,5	43,00	5	-5	1,5	-5	-1,5	48,00	5	-5	5,5	-1,5	2,5	53,00	5	-5	1,5	-3,5	-1,5	58,00	5	-5	1,5	-3,5	0	63,00	5	-5	1,5	-3,5	0																								
Niveau de concentration	limite d'acceptation supérieure	limite d'acceptabilité inférieure	limite de tolérance supérieure	limite de tolérance inférieure	biais																																																														
38,00	5	-5	5	-5	1,5																																																														
43,00	5	-5	1,5	-5	-1,5																																																														
48,00	5	-5	5,5	-1,5	2,5																																																														
53,00	5	-5	1,5	-3,5	-1,5																																																														
58,00	5	-5	1,5	-3,5	0																																																														
63,00	5	-5	1,5	-3,5	0																																																														
$y = ax$	<p>Profil d'exactitude pour la fonction linéaire passant par zéro</p> <table border="1"> <thead> <tr> <th>Niveau de concentration</th> <th>limite d'acceptation supérieure</th> <th>limite d'acceptabilité inférieure</th> <th>limite de tolérance supérieure</th> <th>limite de tolérance inférieure</th> <th>biais</th> </tr> </thead> <tbody> <tr><td>38,00</td><td>5</td><td>-5</td><td>5</td><td>-5</td><td>-1,5</td></tr> <tr><td>43,00</td><td>5</td><td>-5</td><td>3,5</td><td>-8,5</td><td>-2,5</td></tr> <tr><td>48,00</td><td>5</td><td>-5</td><td>7,5</td><td>-5,5</td><td>2,5</td></tr> <tr><td>53,00</td><td>5</td><td>-5</td><td>3,5</td><td>-5,5</td><td>-1,5</td></tr> <tr><td>58,00</td><td>5</td><td>-5</td><td>4,5</td><td>-5,5</td><td>0</td></tr> <tr><td>63,00</td><td>5</td><td>-5</td><td>4,5</td><td>-5,5</td><td>0</td></tr> </tbody> </table>	Niveau de concentration	limite d'acceptation supérieure	limite d'acceptabilité inférieure	limite de tolérance supérieure	limite de tolérance inférieure	biais	38,00	5	-5	5	-5	-1,5	43,00	5	-5	3,5	-8,5	-2,5	48,00	5	-5	7,5	-5,5	2,5	53,00	5	-5	3,5	-5,5	-1,5	58,00	5	-5	4,5	-5,5	0	63,00	5	-5	4,5	-5,5	0																								
Niveau de concentration	limite d'acceptation supérieure	limite d'acceptabilité inférieure	limite de tolérance supérieure	limite de tolérance inférieure	biais																																																														
38,00	5	-5	5	-5	-1,5																																																														
43,00	5	-5	3,5	-8,5	-2,5																																																														
48,00	5	-5	7,5	-5,5	2,5																																																														
53,00	5	-5	3,5	-5,5	-1,5																																																														
58,00	5	-5	4,5	-5,5	0																																																														
63,00	5	-5	4,5	-5,5	0																																																														
$\sqrt{y} = f(\sqrt{x})$	<p>Profil d'exactitude pour la fonction racine carée</p> <table border="1"> <thead> <tr> <th>Niveau de concentration</th> <th>limite d'acceptation supérieure</th> <th>limite d'acceptabilité inférieure</th> <th>limite de tolérance supérieure</th> <th>limite de tolérance inférieure</th> <th>biais</th> </tr> </thead> <tbody> <tr><td>6,20</td><td>5</td><td>-5</td><td>3</td><td>-5</td><td>1</td></tr> <tr><td>6,40</td><td>5</td><td>-5</td><td>1,5</td><td>-3,5</td><td>-1</td></tr> <tr><td>6,60</td><td>5</td><td>-5</td><td>3,5</td><td>-3,5</td><td>1</td></tr> <tr><td>6,80</td><td>5</td><td>-5</td><td>3,5</td><td>-3,5</td><td>1</td></tr> <tr><td>7,00</td><td>5</td><td>-5</td><td>3,5</td><td>-3,5</td><td>1</td></tr> <tr><td>7,20</td><td>5</td><td>-5</td><td>1,5</td><td>-3,5</td><td>-1</td></tr> <tr><td>7,40</td><td>5</td><td>-5</td><td>1,5</td><td>-3,5</td><td>-1</td></tr> <tr><td>7,60</td><td>5</td><td>-5</td><td>1,5</td><td>-3,5</td><td>-1</td></tr> <tr><td>7,80</td><td>5</td><td>-5</td><td>1,5</td><td>-3,5</td><td>-1</td></tr> <tr><td>8,00</td><td>5</td><td>-5</td><td>1,5</td><td>-3,5</td><td>-1</td></tr> </tbody> </table>	Niveau de concentration	limite d'acceptation supérieure	limite d'acceptabilité inférieure	limite de tolérance supérieure	limite de tolérance inférieure	biais	6,20	5	-5	3	-5	1	6,40	5	-5	1,5	-3,5	-1	6,60	5	-5	3,5	-3,5	1	6,80	5	-5	3,5	-3,5	1	7,00	5	-5	3,5	-3,5	1	7,20	5	-5	1,5	-3,5	-1	7,40	5	-5	1,5	-3,5	-1	7,60	5	-5	1,5	-3,5	-1	7,80	5	-5	1,5	-3,5	-1	8,00	5	-5	1,5	-3,5	-1
Niveau de concentration	limite d'acceptation supérieure	limite d'acceptabilité inférieure	limite de tolérance supérieure	limite de tolérance inférieure	biais																																																														
6,20	5	-5	3	-5	1																																																														
6,40	5	-5	1,5	-3,5	-1																																																														
6,60	5	-5	3,5	-3,5	1																																																														
6,80	5	-5	3,5	-3,5	1																																																														
7,00	5	-5	3,5	-3,5	1																																																														
7,20	5	-5	1,5	-3,5	-1																																																														
7,40	5	-5	1,5	-3,5	-1																																																														
7,60	5	-5	1,5	-3,5	-1																																																														
7,80	5	-5	1,5	-3,5	-1																																																														
8,00	5	-5	1,5	-3,5	-1																																																														
$\ln y = f(\ln x)$	<p>Profil d'exactitude pour la fonction logarithmique</p> <table border="1"> <thead> <tr> <th>Niveau de concentration</th> <th>limite d'acceptation supérieure</th> <th>limite d'acceptabilité inférieure</th> <th>limite de tolérance supérieure</th> <th>limite de tolérance inférieure</th> <th>biais</th> </tr> </thead> <tbody> <tr><td>3,65</td><td>5</td><td>-5</td><td>2,5</td><td>-5</td><td>0,5</td></tr> <tr><td>3,70</td><td>5</td><td>-5</td><td>1,5</td><td>-2,5</td><td>-0,5</td></tr> <tr><td>3,75</td><td>5</td><td>-5</td><td>1,5</td><td>-2,5</td><td>-0,5</td></tr> <tr><td>3,80</td><td>5</td><td>-5</td><td>1,5</td><td>-2,5</td><td>-0,5</td></tr> <tr><td>3,85</td><td>5</td><td>-5</td><td>3,5</td><td>-2,5</td><td>0,5</td></tr> <tr><td>3,90</td><td>5</td><td>-5</td><td>3,5</td><td>-2,5</td><td>0,5</td></tr> <tr><td>3,95</td><td>5</td><td>-5</td><td>1,5</td><td>-2,5</td><td>-0,5</td></tr> <tr><td>4,00</td><td>5</td><td>-5</td><td>1,5</td><td>-2,5</td><td>-0,5</td></tr> <tr><td>4,05</td><td>5</td><td>-5</td><td>1,5</td><td>-2,5</td><td>-0,5</td></tr> <tr><td>4,10</td><td>5</td><td>-5</td><td>1,5</td><td>-2,5</td><td>-0,5</td></tr> </tbody> </table>	Niveau de concentration	limite d'acceptation supérieure	limite d'acceptabilité inférieure	limite de tolérance supérieure	limite de tolérance inférieure	biais	3,65	5	-5	2,5	-5	0,5	3,70	5	-5	1,5	-2,5	-0,5	3,75	5	-5	1,5	-2,5	-0,5	3,80	5	-5	1,5	-2,5	-0,5	3,85	5	-5	3,5	-2,5	0,5	3,90	5	-5	3,5	-2,5	0,5	3,95	5	-5	1,5	-2,5	-0,5	4,00	5	-5	1,5	-2,5	-0,5	4,05	5	-5	1,5	-2,5	-0,5	4,10	5	-5	1,5	-2,5	-0,5
Niveau de concentration	limite d'acceptation supérieure	limite d'acceptabilité inférieure	limite de tolérance supérieure	limite de tolérance inférieure	biais																																																														
3,65	5	-5	2,5	-5	0,5																																																														
3,70	5	-5	1,5	-2,5	-0,5																																																														
3,75	5	-5	1,5	-2,5	-0,5																																																														
3,80	5	-5	1,5	-2,5	-0,5																																																														
3,85	5	-5	3,5	-2,5	0,5																																																														
3,90	5	-5	3,5	-2,5	0,5																																																														
3,95	5	-5	1,5	-2,5	-0,5																																																														
4,00	5	-5	1,5	-2,5	-0,5																																																														
4,05	5	-5	1,5	-2,5	-0,5																																																														
4,10	5	-5	1,5	-2,5	-0,5																																																														

Deux modèles mathématiques peuvent être choisis :

-La fonction réponse de logarithme népérien : $\ln y = f(\ln x)$

-La fonction réponse de la racine carrée $\sqrt{y} = f(\sqrt{x})$

Conditions de choix de la fonction de réponse

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

Dans le cadre de notre étude le modèle mathématique choisi est la fonction de réponse de la racine carrée : $\sqrt{y} = f(\sqrt{x})$, sachant que ce sont les mêmes étapes aussi suivies avec l'autre model (model népérien).

1.2.3. Alignement des observations (réponses)

Comme pour chaque niveau de concentrations, les quantités introduites ne sont pas identiques, l'alignement des réponses sur la moyenne des concentrations introduites est exigé. L'alignement appliqué aux réponses obtenues avec les trois séries des standards de validation, sur la moyenne des masses introduites pour chaque niveau de concentration théorique est résumé dans les tableaux suivants :

Cas du Chlorhydrate de metformine

TableauXXIII : Alignement des réponses observées sur les trois séries de validation pour A

Alignement des réponses		
Aire du pic	Aire du pic	Aire du pic
1184,03	1138,41	1154,39
1183,70	1141,47	1156,35
1180,88	1140,78	1158,52
1246,27	1197,51	1220,92
1233,96	1197,59	1221,84
1244,58	1196,96	1217,95
1313,61	1252,04	1276,38
1306,24	1251,78	1291,08
1301,25	1252,91	1275,40
1358,41	1308,44	1338,68
1359,45	1310,61	1326,77
1359,02	1309,92	1332,06
1381,70	1362,41	1383,43
1381,79	1363,95	1381,96
1378,84	1383,97	1386,44

Cas du Phosphate de sitagliptine

Tableau XXIV: Alignement des réponses observées sur les trois séries de validation pour B

Alignement des réponses		
Aire du pic	Aire du pic	Aire du pic
570,15	592,34	575,72
573,53	593,86	576,55
572,70	594,64	580,16
592,11	630,95	602,72
593,12	631,57	603,64
594,77	631,04	602,34
644,61	686,61	635,58
642,21	687,91	645,71
641,87	688,28	637,84
681,83	697,89	666,18
682,19	700,56	661,69
681,37	699,01	664,26
713,70	726,59	698,44
714,12	728,05	697,50
712,74	737,11	698,67

1.2.4. Prédiction inverses

C'est les concentrations que peut nous fournir la méthode pour un échantillon inconnu. Les concentrations inverses prédites des standards de validation sont calculées en utilisant la fonction inverse du modèle d'étalonnage. Ces concentrations retrouvées permettent de calculer le biais de chaque mesure, et également de vérifier la linéarité de la méthode, les prédictions inverses obtenues à partir des SV sont représentées dans les tableaux ci-dessous :

Cas du Chlorhydrate de metformine

Tableau XXV: Prédiction inverse obtenus à partir des SV de A

Prédiction inverse			Moyenne par série	Niveau de concentration
Masse introduite (mg)	Masse introduite (mg)	Masse introduite (mg)		
10,07	10,04	10,12	10,09	80%
10,07	10,07	10,14		
10,04	10,07	10,16		
10,63	10,62	10,73	10,64	90%
10,52	10,62	10,74		
10,61	10,61	10,70		
11,23	11,15	11,24	11,20	100%
11,17	11,15	11,37		
11,12	11,16	11,23		
11,63	11,70	11,80	11,70	110%
11,64	11,72	11,69		
11,64	11,71	11,74		
11,84	12,22	12,21	12,11	120%
11,84	12,23	12,20		
11,82	12,43	12,24		

Cas du Phosphate de sitagliptine

Tableau XXVI: Prédiction inverse obtenus à partir des SV du B

Prédiction inverse			Moyenne par série	Niveau de concentration
Masse introduite (mg)	Masse introduite (mg)	Masse introduite (mg)		
6,41	6,30	6,43	6,39	80%
6,44	6,31	6,44		
6,43	6,32	6,48		
6,61	6,70	6,72	6,68	90%
6,62	6,70	6,73		
6,64	6,70	6,72		
7,11	7,28	7,08	7,17	100%
7,09	7,29	7,19		
7,08	7,29	7,11		
7,46	7,39	7,42	7,42	110%
7,46	7,42	7,37		
7,46	7,41	7,39		
7,76	7,69	7,77	7,75	120%
7,76	7,71	7,76		
7,75	7,80	7,77		

1.2.5. Justesse

La justesse fournit une indication sur les erreurs systématiques de la procédure analytique. Elle est exprimée en termes de biais (en mg/ml), de biais relatif (%) ou de taux de recouvrement et a été estimée à l'aide des tableaux suivants pour chaque niveau de concentration des SV

Cas du Chlorhydrate de metformine

Tableau XXVII : Justesse calculée pour chaque niveau de concentration des SV du A

Biais absolu	Biais relatif	Recouvrement	
0,08	0,821	100,61%	100,51%
		100,58%	
		100,33%	
0,03	0,288	100,13%	99,74%
		99,09%	
		99,99%	
0,02	0,154	100,44%	99,91%
		99,85%	
		99,43%	
-0,03	-0,295	99,15%	99,19%
		99,23%	
		99,19%	
-0,14	-1,122	96,63%	96,57%
		96,64%	
		96,42%	

Cas du Phosphate de sitagliptine

Tableau XXVIII: Justesse calculée pour chaque niveau de concentration des SV du B

Biais absolu	Biais relatif	Recouvrement	
0,05	0,821	100,95%	101,24%
		101,45%	
		101,33%	
-0,04	-0,556	98,45%	98,62%
		98,59%	
		98,82%	
0,08	1,198	100,33%	100,10%
		100,01%	
		99,97%	
-0,01	-0,163	100,43%	100,42%
		100,47%	
		100,37%	
0,00	0,017	100,10%	100,08%
		100,15%	
		99,99%	

1.2.6. Calcul de la 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 les tableaux ci-dessous :

Cas du Chlorhydrate de metformine

TableauXXIX : Calcul de fidélité en écarts types relativisés pour A

MSM	MSE ₁	MSE ₂	Ecart type de répétabilité	Ecart type intersérie
0,0067	0,0003	0,0019	0,02	0,03
0,0157	0,0013	0,0049	0,04	0,04
0,0139	0,0032	0,0059	0,06	0,03
0,0090	0,0010	0,0030	0,03	0,03
0,1814	0,0048	0,0489	0,07	0,14

Tableau XXX: Calcul de fidélité en coefficients de variations pour A

Ecart type de FI	CV répétabilité	CV fidélité intermédiaire
0,03	0,17	0,31
0,05	0,34	0,51
0,07	0,51	0,59
0,04	0,27	0,37
0,16	0,56	1,27

Cas du Phosphate de sitagliptine

Tableau XXXI: Calcul de fidélité en écarts types relativisés pour B

MSM	MSE ₁	MSE ₂	Ecart type de répétabilité	Ecart type intersérie
0,0166	0,0004	0,0044	0,02	0,04
0,0080	0,0001	0,0020	0,01	0,03
0,0322	0,0012	0,0090	0,03	0,06
0,0037	0,0003	0,0011	0,02	0,02
0,0008	0,0012	0,0011	0,03	0,00

Tableau XXXII: Calcul de fidélité en coefficients de variations pour B

Ecart type de FI	CV répétabilité	CV fidélité intermédiaire
0,05	0,30	0,73
0,03	0,13	0,46
0,07	0,49	0,96
0,03	0,22	0,34
0,03	0,45	0,45

1.2.7. Exactitude

Les tableaux suivants élucident pour chaque concentration des standards de validation son exactitude relative, et met en avant l'erreur relative maximale observée pour chaque niveau de concentration théorique :

Cas du Chlorhydrate de metformine

Tableau XXXIII: Résultats du calcul de l'exactitude relative pour A

Exactitude relative ijk			Exactitude relative ij
Série 1	Série 2	Série 3	
0,61	0,39	1,20	0,74
0,58	0,69	1,38	0,88
0,33	0,62	1,58	0,84
0,13	0,07	1,14	0,44
-0,91	0,07	1,21	0,13
-0,01	0,02	0,88	0,29
0,44	-0,31	0,47	0,20
-0,15	-0,33	1,67	0,40
-0,57	-0,23	0,39	-0,14
-0,85	-0,32	0,62	-0,18
-0,77	-0,14	-0,30	-0,40
-0,81	-0,19	0,11	-0,30
-3,37	-0,26	-0,32	-1,32
-3,36	-0,14	-0,43	-1,31
-3,58	1,45	-0,10	-0,74

Cas du Phosphate de sitagliptine

Tableau XXXIV : Résultats du calcul de l'exactitude relative pour B

Exactitude relative ijk			Exactitude relative ij
Série 1	Série 2	Série 3	
0,95	-0,82	1,54	0,55
1,45	-0,57	1,68	0,85
1,33	-0,45	2,30	1,06
-1,55	-0,45	0,09	-0,64
-1,41	-0,35	0,24	-0,51
-1,18	-0,43	0,03	-0,53
0,33	2,67	0,04	1,01
0,01	2,86	1,60	1,49
-0,03	2,92	0,39	1,09
0,43	-0,61	-0,16	-0,12
0,47	-0,24	-0,82	-0,20
0,37	-0,46	-0,44	-0,18
0,10	-0,77	0,24	-0,14
0,15	-0,57	0,11	-0,11
-0,01	0,64	0,27	0,30

1.2.8. 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%

Les résultats des calculs sont résumés dans les tableaux suivants :

Cas du Chlorhydrate de metformine

Tableau XXXV : Calcul des limites de tolérance pour A

Niveaux	Erreur totale absolue	Erreur totale relative	Erreur maximale observée	Limite de tolérance inférieure	Limite de tolérance supérieure
80%	0,11	1,136	1,58	-0,63	2,27
90%	0,08	0,797	1,21	-1,27	1,58
100%	0,08	0,747	1,67	-1,38	1,68
110%	0,08	0,668	0,62	-1,58	0,99
120%	0,29	2,397	1,45	-3,97	1,73

Cas du Phosphate de sitagliptine

Tableau XXXVI: Calcul des limites de tolérance pour B

Niveaux	Erreur totale absolue	Erreur totale relative	Erreur maximale observée	Limite de tolérance inférieure	Limite de tolérance supérieure
80%	0,10	1,555	2,30	-1,39	3,03
90%	0,07	1,015	0,24	-2,41	1,30
100%	0,15	2,162	2,92	-1,17	3,57
110%	0,04	0,507	0,47	-1,46	1,14
120%	0,04	0,464	0,64	-1,30	1,34

1.2.9. Profil d'exactitude

Parmi les différents modèles, nous avons opté pour le modèle de la fonction linéaire racine carrée afin d'ajuster les erreurs mathématique, Les figures ci-dessous dans lesquelles l'axe horizontal représente les masses théorique allant de 100,2 mg jusqu'à 150,06 mg pour la metformine et de 40,19mg jusqu'à 60,06 mg pour la sitagliptine et de et l'axe vertical le biais relatif représente le profil d'exactitude , les profils d'exactitude obtenus pour la fonction racine carrée sont représentés dans les figures ci-dessous :

Cas du Chlorhydrate de metformine

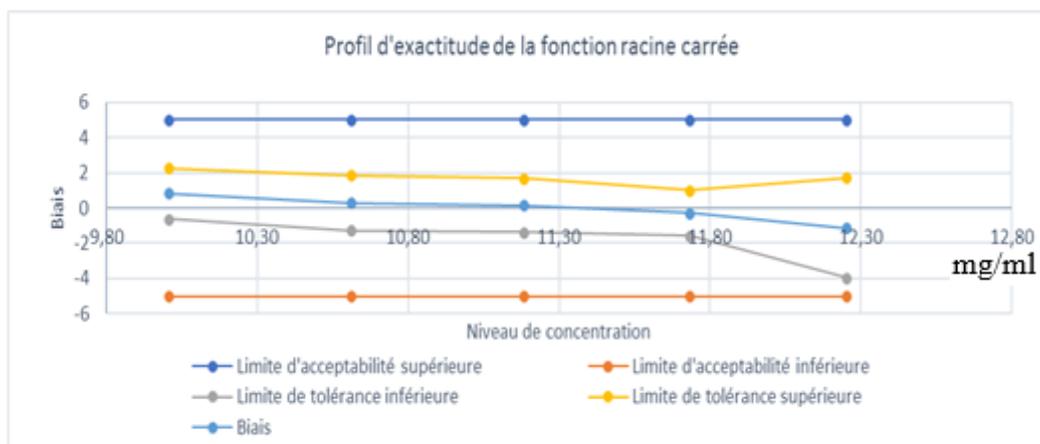


Figure 8: Profil d'exactitude pour la fonction racine carrée pour A

Cas du Phosphate de sitagliptine

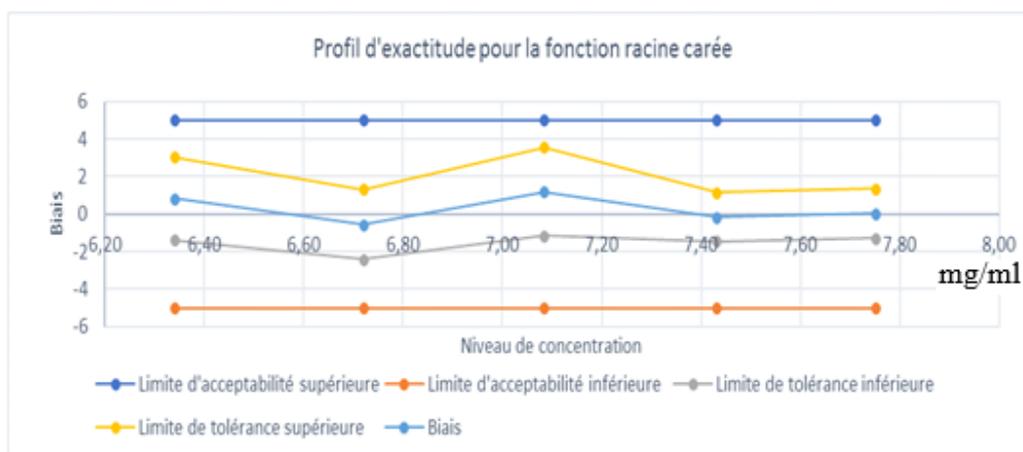


Figure 9 :Profil d'exactitude pour la fonction racine carrée pour B

1.2.10. Linéarité de la justesse

Au sens de la SFSTP 2006 la linéarité exprime les valeurs prédites ou les concentrations calculées en fonction des concentrations introduites (prédites)

La linéarité de la méthode de dosage est vérifiée sur l'intervalle de validation, en utilisant les données des premières répétitions de chaque niveau de concentration, pour les trois séries de validation. la vérification de la linéarité de la méthode est résumée dans les tableaux suivants :

Cas du Chlorhydrate de metformine

Tableau XXXVII : Vérification de la linéarité de la méthode pour A

Niveaux	Données linéarité de justesse	
	Concentration introduite (mg/ml)	Concentration prédite (mg/ml)
80%	10,01	10,08
	10,01	10,09
	10,01	10,09
90%	10,61	10,66
	10,61	10,62
	10,61	10,64
100%	11,18	11,20
	11,18	11,23
	11,18	11,17
110%	11,73	11,71
	11,73	11,68
	11,73	11,70
120%	12,25	12,09
	12,25	12,09
	12,25	12,16

Cas du Phosphate de sitagliptine

Tableau XXVIII : Vérification de la linéarité de la méthode pour B

Niveaux	Données linéarité de justesse	
	Concentration introduite (mg/ml)	Concentration prédite (mg/ml)
80%	6,35	6,406853
	6,35	6,438703
	6,35	6,430818
90%	6,72	6,613785
	6,72	6,623296
	6,72	6,638807
100%	7,09	7,108585
	7,09	7,085976
	7,09	7,082746
110%	7,43	7,459331
	7,43	7,462793
	7,43	7,455051
120%	7,75	7,759748
	7,75	7,763662
	7,75	7,750729

La linéarité de la relation entre les concentrations retrouvées (*calc*) ou prédites et les concentrations introduites (*x*) est évaluée en représentant graphiquement la

fonction $[x_{calc}=f(x)]$ pour les trois séries de validation conjointement les courbes de la linéarité de la méthode sont représentées dans les figures suivantes :

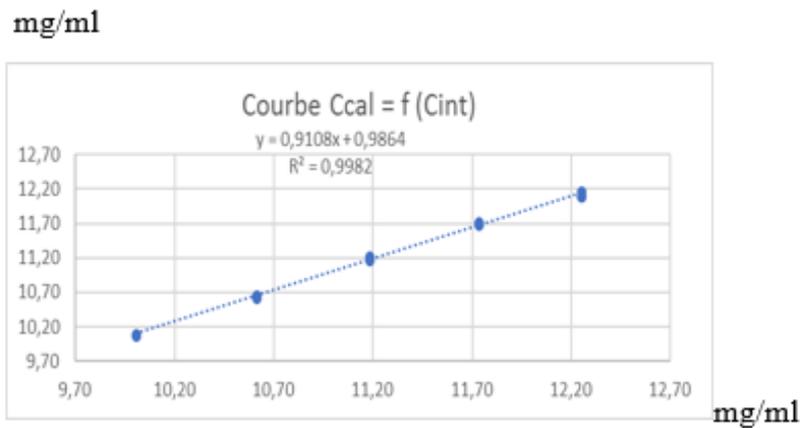


Figure 10 : Courbe linéarité de la méthode pour A

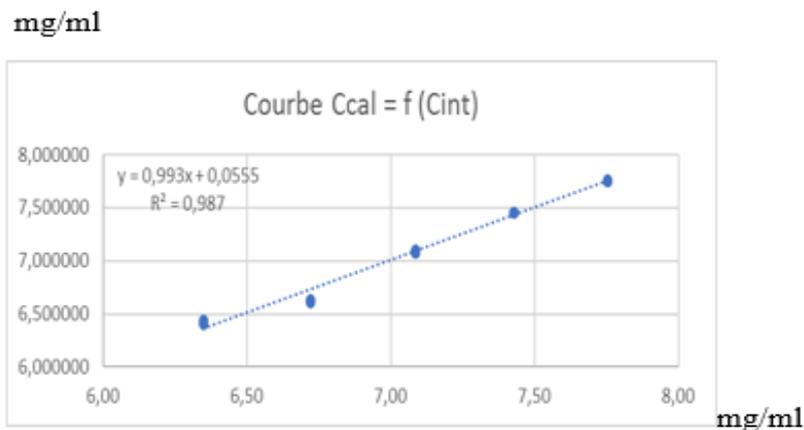


Figure 11 : Courbe linéarité de la méthode pour B

Une analyse statistique des droites obtenues est effectuée, la pente ainsi que l'ordonnée à l'origine sont comparées à la valeur de référence et une vérification de l'ajustement est effectuée ; les données des droites de la justesse sont représentées dans les tableaux ci-dessous :

Tableau XXXIX : Données de la droite du SV de A

Données droite de justesse			
		Ecart -type	Variance
pente	0,91	0,01	0,00011
Ordonné à l'origine	0,99	0,12	0,01424

Tableau XL : Données de la droite du SV de B

Données droite de justesse			
		Ecart -type	Variance
Pente	0,99	0,03	0,00100
Ordonné à l'origine	0,04	0,22	0,05019

La comparaison de la pente et l'ordonnée à l'origine à 0 avec le test de student est résumé dans les tableaux ci-dessous :

Tableau XLI : Comparaison de la pente et l'ordonnée à l'origine à 0 avec le test de student pour A

Test de STUDENT							
Comparaison de la pente à 0			Comparaison de l'ordonnée à l'origine 0				
		Condition	Résultat			Condition	Résultat
ddl	13	$t_c > t_0$	Différente de 0	ddl	13	$t_c > t_0$	Différente de 0
B	0,95			β	0,95		
A	0,05			α	0,05		
$t_0=$	2,16			$t_0=$	2,16		
$t_c=$	91			$t_c=$	8,25		

Tableau XLII : Comparaison de la pente et l'ordonnée à l'origine à 0 avec le test de student pour B

Test de STUDENT							
Comparaison de la pente avec 0			Comparaison de l'ordonnée à l'origine avec 0				
		Condition	Résultat			Condition	Résultat
ddl	13	$t_c > t_0$	Différente de 0	ddl	13	$t_c < t_0$	Comparable à 0
B	0,95			β	0,95		
A	0,05			α	0,05		
$t_0=$	2,16			$t_0=$	2,16		
$t_c=$	33			$t_c=$	0,18		

On a t_c supérieur à t_0 donc la pente ainsi que l'ordonnée à l'origine sont différents de 0 cela veut dire que la pente est l'ordonnée à l'origine sont statistiquement différents de 0

1.2.11. Robustesse

L'étude statistique consiste en premier lieu au calcul des effets d'interactions à partir des réponses mesurées et de la matrice d'expérience, qui sera suivi de la recherche de la significativité des effets

Pour l'influence de chaque paramètre et leurs interactions on utilise la méthode du plan factoriel qui permet de varier plusieurs paramètres au même temps et de minimiser le nombre d'essai à effectuer

Dans le cas de notre étude les paramètres à varier sont : Teneurs en PA(A) Le débit (B) La détection (C)

Cas du Chlorhydrate de metformine

Les données brutes et les résultats de la robustesse sont résumés dans le tableau suivant :

Tableau XLIII: données brutes et résultats de l'étude de la robustesse de A

Masse (concentration) pour une teneur théorique de 100%	50	Mg								
N°de l'essai	A Teneur (en %)	B débit	C détection	Masse introduite échantillon	Masse standard	Teneur introduite (%)	Aire (absorbance) échantillon	Aire (absorbance) standard	Masse (estimée)	Réponse (teneur en %)
1	90%	1	261	112,6	125,14	625,56	3339284	3622772	115,35	92,28
2	110%	1	261	137,65	125,14	764,72	3986491	3622772	137,70	110,16
3	90%	1	265	112,6	125,14	625,56	1058188	1153083	114,84	91,87
4	110%	1	265	137,65	125,14	764,72	1268683	1153083	137,69	110,15
5	90%	1,4	261	112,6	125,14	625,56	2406534	2616204	115,11	92,09
6	110%	1,4	261	137,65	125,14	764,72	2866947	2616204	137,13	109,71
7	90%	1,4	265	112,6	125,14	625,56	758422	826582	114,82	91,86
8	110%	1,4	265	137,65	125,14	764,72	906342	826582	137,22	109,77
									Ecart type	9,58
									t (0, 05,7)	2,36

Nous avons réalisé le plan factoriel suivant :

Tableau XLIV: matrice des effets du plan factoriel de A 2³

Essais	Facteurs			Interactions			
	A Teneurs en PA (%)	B (débit)	C (détection)	AB	AC	BC	ABC
1	-1	-1	-1	1	1	1	-1
2	1	-1	-1	-1	-1	1	1
3	-1	1	-1	-1	1	-1	1
4	1	1	-1	1	-1	-1	-1
5	-1	-1	1	1	-1	-1	1
6	1	-1	1	-1	1	-1	-1
7	-1	1	1	-1	-1	1	-1
8	1	1	1	1	1	1	1
Niveau bas	90%	1.00	261				
Niveau haut	110%	1.4	265				

Les effets des paramètres et leurs intervalles sont résumés dans les tableaux suivant :

Tableau XLV : Calcul des effets des paramètres et leurs intervalles de confiance pour A

Essai	Facteurs			Interactions			
	A teneur en PA (%)	B (débit)	C (détection)	AB	AC	BC	ABC
1	-92,28	-92,28	-92,28	92,28	92,28	92,28	-92,28
2	110,16	-110,16	-110,16	-110,16	-110,16	110,16	110,16
3	-91,87	91,87	-91,87	-91,87	91,87	-91,87	91,87
4	110,15	110,15	-110,15	110,15	-110,15	-110,15	-110,15
5	-92,09	-92,09	92,09	92,09	-92,09	-92,09	92,09
6	109,71	-109,71	109,71	-109,71	109,71	-109,71	-109,71
7	-91,86	91,86	91,86	-91,86	-91,86	91,86	-91,86
8	109,77	109,77	109,77	109,77	109,77	109,77	109,77
somme effet	71,69	-0,59	-1,04	0,69	-0,63	0,25	-0,09
Intervalle de confiance	limite inférieur	8,96	-0,07	-0,13	0,09	-0,08	0,03
	limite supérieur	0,95	-8,08	-8,14	-7,93	-8,09	-7,98
		16,97	7,94	7,88	8,10	7,93	8,04
Facteur signification (S) ou Non significatif (NS)		S	NS	NS	NS	NS	NS

Cas du Phosphate de sitagliptine

Les données brutes et les résultats de l'étude de la robustesse sont résumés dans le tableau suivant :

Tableau XLVI: données brutes et résultats de l'étude de la robustesse de B

Masse (concentration) pour une teneur théorique de 100%		50	Mg							
N°de l'essai	A Teneur (en %)	B débit	C détection	Masse introduite échantillon	Masse standard	Teneur introduite (%)	Aire (absorbance) échantillon	Aire (absorbance) standard	Masse estimée	Réponse (teneur en %)
1	90%	1	261	45,25	50,22	251,39	428584	500688	42,99	85,98
2	110%	1	261	55,34	50,22	307,44	523374	500688	52,50	104,99
3	90%	1	265	45,25	50,22	251,39	501189	587173	42,87	85,73
4	110%	1	265	55,34	50,22	307,44	613109	587173	52,44	104,88
5	90%	1,4	261	45,25	50,22	251,39	299589	351320	42,83	85,65
6	110%	1,4	261	55,34	50,22	307,44	365844	351320	52,30	104,59
7	90%	1,4	265	45,25	50,22	251,39	349764	413915	42,44	84,87
8	110%	1,4	265	55,34	50,22	307,44	431879	413915	52,40	104,80
									Ecart type	10,30
									t (0, 05,7)	2,36

Nous avons réalisé le même plan factoriel pour la sitagliptine ce qui nous a permis de calculer les effets des paramètres et leurs intervalles de confiance comme illustré ci-dessous :

Tableau XLVII : Calcul des effets des paramètres et leurs intervalles de confiance pour B

Essai	facteurs			Interactions				
	A teneur en (%)	B (débit)	C (détection)	AB	AC	BC	ABC	
1	-85,98	-85,98	-85,98	85,98	85,98	85,98	-85,98	
2	104,99	-104,99	-104,99	-104,99	-104,99	104,99	104,99	
3	-85,73	85,73	-85,73	-85,73	85,73	-85,73	85,73	
4	104,88	104,88	-104,88	104,88	-104,88	-104,88	-104,88	
5	-85,65	-85,65	85,65	85,65	-85,65	-85,65	85,65	
6	104,59	-104,59	104,59	-104,59	104,59	-104,59	-104,59	
7	-84,87	84,87	84,87	-84,87	-84,87	84,87	-84,87	
8	104,80	104,80	104,80	104,80	104,80	104,80	104,80	
Somme	77,03	-0,93	-1,66	1,11	0,71	-0,21	0,85	
Effet	9,63	-0,12	-0,21	0,14	0,09	-0,03	0,11	
Intervalle de confiance	limite inférieur	1,02	-8,73	-8,82	-8,47	-8,52	-8,64	-8,50
	limite supérieur	18,24	8,49	8,40	8,75	8,70	8,58	8,72
Facteur signification (S) ou Non significatif (NS)	S	NS	NS	NS	NS	NS	NS	

2. Discussion

2.1. Discussion de l'étape de la mise au point

Les résultats obtenus ont permis d'obtenir des réponses d'aire de pics qui sont acceptables

L'aspect et la forme des pics sont symétriques avec une résolution $R = 3$ qui est de largement supérieur à 2

2.2. Discussion de l'étape de validation

2.2.1 .Spécificité et effet matrice

2.2.1.1 Comparaison des chromatogrammes

La spécificité de la méthode est confirmée par l'absence de pic au même temps de rétention que ceux de la metformine et de la sitagliptine dans les chromatogrammes obtenus à partir du diluant et de la solution placebo comparé aux chromatogrammes obtenus à partir de la solution standard.

On peut dire qu'avec un risque inférieur à 5%, statistiquement la méthode est spécifique.

2.2.2. Fonction de réponse

D'après les profils d'exactitude présentés dans les tableaux XXI et XXII et les intervalles de mesures (intervalle de dosage) de la méthode qui en découlent pour chaque modèle nous constatons que le modèle de la fonction racine carrée $\sqrt{y} = f(\sqrt{x})$ a donné l'intervalle de mesure le plus large de 100,2mg/ml à 150,06 mg/ml pour la metformine et de 40,19 jusqu'à

60,06mg/ml pour la sitagliptine ce qui nous a permis de le sélectionner comme modèle qui convient le plus à notre méthode de dosage.

2.2.3. Critères de performance de la fonction de réponse choisie

L'estimation de la fidélité et de la justesse est une étape intermédiaire obligatoire pour pouvoir évaluer si la procédure analytique va vraisemblablement pouvoir ou non quantifier avec une exactitude suffisante chacune des quantités inconnues, mais elles ne renseignent pas sur la qualité des résultats et ne permettent pas de prendre une décision sur la validité de la méthode

2.2.4 .Justesse

L'accord entre la valeur de la concentration moyenne prédite obtenue à partir des trois séries de validation et la valeur de la moyenne des concentrations théoriques considérées comme étant la valeur de référence est assez étroit pour tous les niveaux, compte tenu du fait que les biais relatifs sont inférieurs à 1 % pour les différents niveaux dans le cas de la metformine et inférieurs à 1,3 % dans le cas de metformine

2.2.5. Fidélité

La dispersion des prédictions inverses des concentrations des trois séries de validation est assez étroite pour tous les niveaux de concentration, du fait que les coefficients de variance de la répétabilité et de la fidélité intermédiaire de tous les niveaux est inférieure à 1.5 % dans le cas metformine et inférieure à 1% dans le cas la sitagliptine.

2.2.6. Critères de décision sur la validité de la méthode

2.2.6.1. L'erreur totale

Cas de la metformine

Selon les résultats du tableau XXXIII les erreurs maximales de tous les niveaux de concentrations sont inférieures à 2 % donc inférieure à la limite d'acceptation 5%.Et ceci est confirmé par l'erreur maximale observée pour tous les niveaux lors du calcul d'exactitude relative qui ne dépasse pas 1%.

Cas de la sitagliptine

Selon les résultats du tableau XXXIV, les erreurs maximales de tous les niveaux de concentrations sont inférieures à 3% donc inférieure à la limite d'acceptation 5%.Et ceci est

confirmé par l'erreur maximale observée pour tous les niveaux lors du calcul d'exactitude relative qui ne dépasse pas 2%.

2.2.6.2. Le profil d'exactitude

En se référant aux profils d'exactitudes présentés dans la figure 8 et 9, on considère que la méthode mise aux point dans ce présent travail est valide pour l'intervalle de dosage s'étant de 100,2mg/ml à 150,06mg/ml pour la metformine et de 40,19mg/ml à 60,06 mg /ml où le profil d'exactitude est compris dans les limites d'acceptation de $\pm 5\%$, sachant que cette limite d'acceptabilité λ devrait être de 5% pour le dosage d'une substance active dans un produit fini. Cela signifie que la méthode est capable de produire une proportion de 95% des résultats acceptables et seulement 5% des futures mesures d'échantillons inconnus peuvent avoir des résultats non fiables.

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

2.2.6.3. Intervalle de dosage

L'intervalle de dosage est l'intervalle compris entre les limites de quantifications inférieure et Supérieure où la procédure analytique atteint l'exactitude souhaitée.

Selon les tableaux, on remarque que pour la metformine ainsi que pour la sitagliptine

-La limite de quantification inférieure est de 80 mg/l.

-La limite de quantification supérieure est de 120 mg/l.

-L'intervalle de validité est [LQinf; LQsup] ; selon les résultats, la méthode est tenue pour valide dans l'intervalle de 100,02 mg/ml à 150,06 mg/ml pour la metformine et de 40,19mg/ml à 60,06 mg /ml pour la sitagliptine.

2.2.6.4. Linéarité

La linéarité de la méthode est démontrée par corrélation des résultats obtenus (masses prédites) à des masses réellement introduites de PA dans les gammes des SV.

Cas du Chlorhydrate de metformine

La droite de régression obtenue présente une équation de : $y = 0,9108x - 0,9864$ avec :

- un coefficient de corrélation ($R^2=0,9982$).

-une pente qui est significativement différente de 0, cela veut dire que la régression est significative entre la variable expliquée (concentration prédite) et la variable explicative (concentration introduite).

- une ordonnée à l'origine qui est statistiquement différente avec 0 au risque de 5 %, ($b=0,9864$)

Cas du Phosphate de sitagliptine

La droite de régression obtenue présente une équation de : $y = 0,993x - 0,0555$ avec :

- un coefficient de corrélation ($R^2=0,987$).

-une pente qui est significativement différente de 0, cela veut dire que la régression est significative entre la variable expliquée (concentration prédite) et la variable explicative (concentration introduite) donc il existe une relation linéaire

- une ordonnée à l'origine qui est statistiquement comparable avec 0 au risque de 5 %, ($b=0,0555$) Ce qui nous amène à conclure que la linéarité de la méthode de dosage est validée.

- Le fait que l'ordonnée à l'origine de la droite de linéarité est différente de 0 il faut dans l'analyse en routine préparer une gamme d'étalonnage pour la quantification de la metformine et de la sitagliptine dans les solutions échantillon

Robustesse

On remarque que pour les deux cas :

-le paramètre A (teneur en PA) est significatif

Ce paramètre doit être obligatoirement significatif (S) car la méthode est linéaire

-Les paramètres B (débit), C (longueur d'onde) : sont non significatifs (NS)

-Les interactions AB, AC, ET, ABC sont non significatifs (NS)

Les autres paramètres et les interactions AB, AC et ABC doivent être non significatifs (NS) pour dire que la méthode est robuste suite aux changements des paramètres expérimentaux de la méthode.

Conclusion :

La spécificité, la justesse, la fidélité, la linéarité et l'exactitude de la méthode de dosage simultané de la metformine et de la sitagliptine par HPLC mise au point dans le présent travail sont démontrés valides dans les intervalles de dosage des deux PA

L'application du Protocole SFSTP 2006 nous a bien permis de mettre au point la méthode de dosage simultané de metformine et de la sitagliptine et valider cette méthode dans un intervalle de dosage [100,2 mg/l ; 150,06 mg/l] pour la metformine et de [40,19 mg/ml ; 60,06 mg/ml] pour la sitagliptine avec une probabilité de confiance de 95 % dans les limites d'acceptation définies ± 5 %.

Autrement dit, 95% des futurs résultats fournis par la méthode analytique développée se situeront dans les limites d'acceptabilité et les limites de dosage.

La validation des méthodes d'analyse de dosage de substances médicamenteuses est, en effet plus ou moins explicitement imposée dans les différentes pharmacopées, elle figure parmi les mesures universellement reconnues, comme faisant nécessairement partie d'un système exhaustif d'assurance qualité.

La finalité de notre étude a été de valider une méthode de dosage simultané de deux principes actifs (Metformine et Sitagliptine) par HPLC en utilisant le profil d'exactitude comme outil de décision de la validation : démarche harmonisée proposée par une commission de la SFSTP publiée en 2006 dans la revue STP Pharma Pratique qui consiste à évaluer l'exactitude d'une manière globale au lieu de mesurer les critères statistiques séparément.

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

En deuxième lieu nous avons réalisé un plan de validation pour pouvoir estimer le biais et la fidélité de la méthode. Cependant nous avons constaté que la méthode est juste pour le dosage des deux principes actifs avec un biais relatif qui ne dépasse pas 1% pour la Metformine et inférieur à 1,3% pour la Sitagliptine. Aussi nous avons constaté que la méthode est valide puisque les coefficients de variations de répétabilité et de fidélité intermédiaire sont généralement inférieurs à 1,5% pour la Metformine et inférieur à 1% pour la Sitagliptine.

En troisième lieu, l'établissement des intervalles de tolérance apparié à des limites d'acceptation nous permet de construire les profils d'exactitudes. Les profils d'exactitudes construit à l'issue de ce travail caractérisant la validité de la méthode dans l'intervalle de concentration étudié [100,2 ; 150,06] mg/ml pour la Metformine et dans l'intervalle de concentration étudié [40,19 ; 60,06] mg/ml pour la Sitagliptine, avec une proportion $\beta=95\%$ de mesures dans les limites d'acceptations ($\pm 5\%$).

Dans le même contexte, nous avons démontré que la méthode est robuste en calculant la robustesse. Ce qui nous permet de déclarer que cette méthode peut être utilisée dans le contrôle de qualité de routine.

- [1] Diabète [Internet]. World Health Organization. [cité 11 juin 2018]. Disponible sur: <http://www.who.int/fr/news-room/fact-sheets/detail/diabetes>
- [2] NOBELS.F, SUNAERT.P, WENS.J.et al. diabète sucré de type 2.recommandations de bonne pratique .SSMG.2017.[Internet]. [cité 28 mai 2018]. Disponible sur: http://www.rmliege.be/docs/RBP_Diabete2_recommandations_SSMG.pdf
- [3] DOMENZI A. les nouveaux antidiabétiques oraux : Les incrétinomimétiques et les inhibiteurs de la dipeptidyl-peptidase-4 .doctorat de l'université de Limogne 2011,p175.
- [4] GRENOUILL.V, « Modification galénique des formes orales sèches: amélioration des pratiques en gériatrie ».p78.
- [5]« Memoire Online - Etude des interactions physicochimiques des bétabloquants avec les excipients - Wiem DAHMEN ». [En ligne]. Disponible sur: https://www.memoireonline.com/01/16/9384/m_Etude-des-interactions-physicochimiques-des-betabloquants-avec-les-excipients0.html. [Consulté le: 22-mai-2018].
- [6]JEAN-FRANÇOIS.J ;synthèse et évaluation in vivo de microparticules d'hydrogels.. Doctorat université de Québec à Montréal.2004 ,p227
- [7] Kirmichnikovd, Mc. Farlane S.I, Sowers J.B, « Metformin : an update. Ann Intern Med 137; p25-33 ».
- [8]Borel. A-L .Mécanisme d'action d'une nouvelle molécule E008 sur les fluxmétaboliques hépatiques et l'oxydation phosphorylante mitochondriale, thèse de doctorat en biologie , Français , université Joseph-Fourier Grenoble , 2009, p196
- [9] Pharmacopée européenne 6.0
- [10]Peron N. Intoxication à la metformine en réanimation: étude clinique, pronostique et pharmacocinétique. thèse de doctorat université de paris Descartes ,2016,p67
- [11] Otmane .C, « vitamine B12 chez les patents diabétiques traite par metformines ».thèse de doctorat, université Sidi Mohammed Ben Abdallah, FES, 2015,p78
- [12] USP.
- [13] A.J. Scheen , L.F. Van Gaa2010. L'étude clinique du mois sugar : résultats d'une étude observationnelle belge concernant l'utilisation de la sitagliptine chez des patients diabétiques de type 2.65,3,p127-132.
- [14]Pharmacopée européenne 9.1
- [15]Garin.A.Lesgliptine et leur toxicité. Thèse de doctorat université de Paris Diderot –Paris 7 .1,2012
- [16] Blicklé. J,F. 2010. Inhibiteurs de la dipeptidylpeptidase-4 : place thérapeutique actuelle, perspectives et questions non résolues. Vol. 16, n° 2, p105-114.

- [17] Scheen.A.J, Van Gaal.L.F.2013.la sitagliptine dans le traitement du diabète de type 2 :le point, cinq ans après sa commercialisation.68 ,10 ,p504-510.
- [18]Janumet (sitagliptine - metformine) - Informations sur ce médicament [Internet]. Uniprix. [cité 15 mars 2018].Disponible sur:<https://www.uniprix.com/fr/lexiquemedicaments/5283/janumet>
- [19] monographie de produit , JANUMET® JANUMET® XR, Antihyperglycémiant oral Inhibiteur de la DPP-4 Produit d'association composé d'un amplificateur d'incrétines et de biguanide, Merck Canada Inc. , 2017(www.merck.ca)
- [20] Emaille. C. qualification d'une ligne de conditionnement. Thèse de doctorat de l'université de Nantes, 2010, p145.
- [21] TINSSON.C.validation des procédés de fabrication : nouvelles réglementations FDA-EMA et application industrielle de la vérification en continu des procédés.thèse de doctorat .université de Nantes,2014, p104
- [22]RAYNAUD.M,validation du procédé de fabrication dans l'industrie pharmaceutique ,appliquée aux formes solides orales.Thèse de doctorat de l'université de Limogne ,2011,p137
- [23] PINGUET .I. Validation analytique : application de la procédure SFSTP2003-2006 au domaine de la phytothérapie. Thèse de Doctorat université de Bordeaux, 2015,p85
- [24]La réglementation des médicaments dans l'union européenne vol.4.bonne pratique de fabrication .médicament à usage humains et médicament vétérinaire édition1998
- [25]Hubert Ph., Nguyen-Huu J.J., Boulanger E., Chapuzet E., et al. 2003. Validation des procédures analytiques quantitatives : Harmonisation des démarches.STP Pharma Pratiques, STP PHARMA PRATIQUES, 13, 3, p101-138.
- [26]Caporal-Gautier J., Nivet J.M., Algranti P., et al.Guide de validation analytique.Rapport d'une commission SFSTP, Partie I: Méthodologie. STP Pharma Pratiques, 1992, 2, 4, p205-226.
- [27]Commission SFSTP., Hubert Ph., Nguyen-Huu J.J., Boulanger E., Chapuzet E., et al. 2006. Validation des procédures analytiques quantitatives : Harmonisation des démarches Partie II - Statistiques. STP Pharma Pratique, 16, 1, p28-58.
- [28]SKOOG, WEST, HOLLER .chimie analytique.1-7e Ed :Boeck – Université Rue des Minimes 39,B-1000 Bruxelles,1997, p701-715
- [29]ROUESSAC ;A .Rouessac,analyse chimique « methodes et techniques instrumentales ,7 Ed, paris :dunod,2009

Références bibliographiques

- [30] BEN SAAD L, « étude de la séparation des fluoroquinonones par HPLC : application à l'étude de leur dégradation par rayonnement gamma », mémoire master, Université Tunis El Manar, Tunis, 2013.
- [31] JACOB Véronique. IUT de Chimie de Grenoble. la Chromatographie Liquide haute Performance (HPLC) ,2010
- [32] « [PDF] HPLC Principe Et Appareillage - Free Download PDF ». [En ligne]. Disponible sur: <https://azpdf.site/download/pdf-ebook-hplc-principe-et-appareillage>. [Consulté le: 19-Avril-2018].
- [33] D. T. BRIERE, « COURS DE CHROMATOGRAPHIE LIQUIDE ». p72



Annexes



1. La chromatographie

La chromatographie est une méthode analytique qui est largement utilisée pour la séparation, l'identification et le dosage des constituants chimiques dans des mélanges complexes

Toutes les méthodes chromatographiques ont en commun l'utilisation simultanée d'une phase stationnaire et d'une phase mobile. Les constituants de l'échantillon à analyser sont entraînés à travers la phase stationnaire par le flux d'une phase mobile gazeuse ou liquide, et les séparations résultent de la différence entre les vitesses de progression des diverses substances. [28]

Chaque séparation effectuée donne lieu à un enregistrement particulier appelé chromatogramme qui correspond au tracé des variations de composition de la phase éluée au cours du temps. [29]

1.2. Classification des méthodes chromatographiques

On distingue deux types de méthodes chromatographiques :

1.2.1. Chromatographie sur colonne ou la phase stationnaire est maintenue dans un tube étroit et la phase mobile y progresse par gravité ou sous l'action d'une différence de pression.

Dans cette catégorie on trouve :

- ✓ Chromatographie en phase liquide CPL
- ✓ Chromatographie en phase gazeuse CPG
- ✓ Chromatographie en fluide supercritique CFS

1.1.2. Chromatographie planaire : la phase stationnaire est présente à la surface d'un support plat (chromatographie sur couche mince) ou immobilisé à l'intérieur des pores d'une feuille de cellulose (chromatographie sur papier) dans ce cas la phase mobile se déplace à travers la phase stationnaire par capillarité ou sous l'effet de la gravité. [28]

2. Chromatographie liquide à haute performance (HPLC)

Elle dérive de la forme la plus ancienne de la chromatographie sur colonne dont les performances se sont trouvées grandement améliorées par la miniaturisation et la mise au point de nouvelles phases stationnaires. Celles-ci formées de microparticules génèrent des colonnes garnies très compactes qui impose l'emploi, en tête de colonne, de fortes pressions pour assurer un écoulement suffisant de la phase mobile.

En raison de ces particularités, une chaîne HPLC comporte plusieurs modules spécialisés, qui se présentent dans des boîtiers distincts ou intégrés dans un même châssis pour des raisons de moindre encombrement.

Ces modules sont reliés entre eux par l'intermédiaire de canalisations de très faible diamètre interne (0,1mm) pour assurer la circulation de la phase mobile.

Elles peuvent être en acier inoxydable ou en PEEK(polyether-etherketone),un polymère souple et coloré qui résiste aux solvants usuels ,même sous des pressions élevés (350 bars). [29]

2.1.Principe

Les composés à séparer (solutés) sont mis en solution d'abord, puis elle sera introduite dans la phase mobile liquide (éluant). Grâce à la répartition sélective des solutés entre la phase mobile et la phase stationnaire, chaque soluté est donc soumis à une force de rétention exercée par la phase stationnaire, et une force de mobilité due à la phase mobile. 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 forte pression, parcourt le système chromatographique. Le mélange à analyser est injecté puis transporté à travers le 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 représentés par des pics. L'ensemble des pics enregistrés est appelé chromatogramme [30]

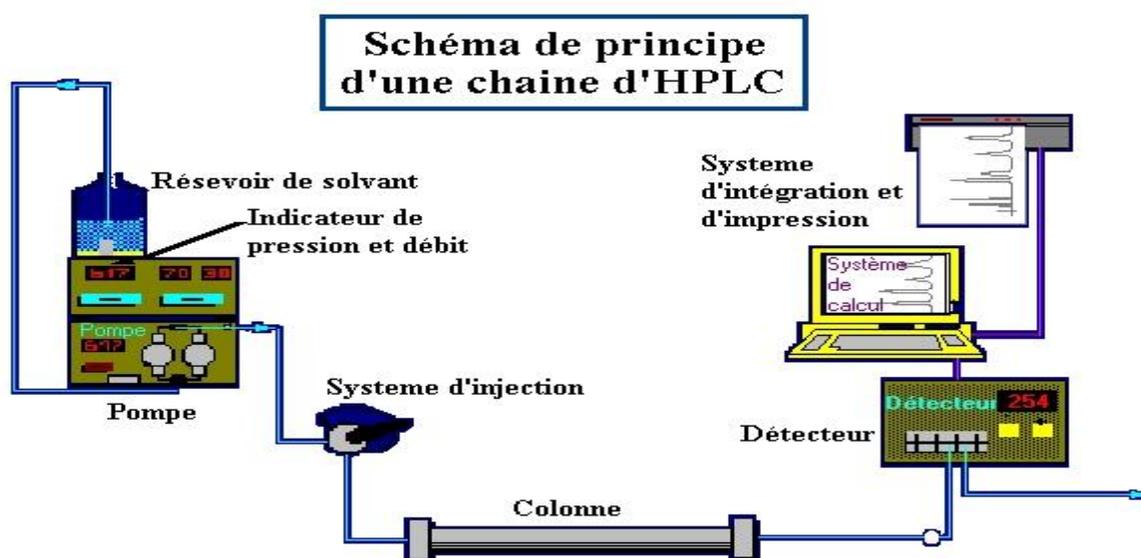


Figure : Schéma de principe d'une chaîne HPLC. [30]

2.2. Les composants d'une chaîne HPLC

2.2.1. Réservoir de la phase mobile

Les appareils modernes sont équipés d'un ou de plusieurs réservoirs en verre ou en acier inoxydable, contenant chacun au moins 500 ml de solvant. On y adjoint souvent des dispositifs qui permettent d'en éliminer les poussières et les gaz dissous. En effet, ces derniers peuvent former des bulles au sein de la colonne, ce qui cause un élargissement des pics ; en outre, les bulles et poussières perturbent le fonctionnement du détecteur.

Le dégazage peut s'effectuer par pompage sous vide, par distillation, par chauffage et agitation, ou encore, par barbotage. [28]

2.2.2. La phase mobile

La plupart des applications actuelles font appel à des gels de silice transformés, peu polaires, de nature plutôt hydrophobe, on choisit comme phases mobiles des mélanges d'eau et d'un modifiant tel le méthanol ou l'acétonitrile. [29]

2.2.2.1. Les paramètres qui influencent sur le choix de la phase mobile

- **Miscibilité des solvants et solubilité des solutés** : si la phase mobile est constituée par plusieurs solvants, ceux-ci doivent être totalement miscibles et les composés à analyser doivent y être solubles.
- **Viscosité** : La viscosité de la phase mobile a une influence :
 - Sur la cinétique de transfert de masse : une augmentation de la viscosité diminue les coefficients de diffusion et de transfert de masse.
 - Sur la pression en tête de colonne. La pression d'entrée de colonne augmente proportionnellement à la viscosité de la phase éluante.

En général, on utilise des solvants dont la viscosité est inférieure à 10^{-3} Pa s.

- **Le pH de la phase mobile** : il doit être compris entre 2 et 7,5. Des pH plus élevés dissolvent le gel de silice et des pH inférieurs à 2 peuvent détacher une partie du greffage.
- **Température d'ébullition** : Dans la mesure du possible, on évite des solvants trop volatils à la température ambiante car il peut se produire un phénomène de dégazage au niveau du système de détection, ce qui rend la détection impossible.
- **Pureté des solvants** : elle est indispensable pour la chromatographie liquide pour améliorer le seuil de détection. [31]

2.2.3. Pompes

Toutes les installations HPLC comportent au moins une pompe pour forcer le passage de la phase mobile à travers la colonne dont le remplissage est très compact. Il en résulte une

pression importante au niveau de l'injecteur qui peut atteindre et même dépasser 40 MPa (400 bars) selon le débit imposé à la phase mobile, viscosité ainsi que selon la phase stationnaire. [29]

2.2.3.1. Système de pompage

Suivant leur conception, les chromatographe comportent une ou plusieurs pompes associées à une chambre de mélange située en amont ou en aval, elles permettent de délivrer un éluant en composition fixe (mode isocratique) ou variable (gradient d'éluion). [29]

- **Système en mode isocratique** : qui s'effectue avec un solvant de composition constante. [28]
- **Système en mode gradient d'éluion** : qui s'effectue en modifiant la composition du solvant au cours de l'éluion de manière continue ou discontinue

Les pompes doivent répondre aux exigences suivantes :

- ✓ Fournir des pressions allant jusqu'à 400 bars
- ✓ Absence de pulsations
- ✓ Débit compris entre 0,1 à 10 ml/min
- ✓ Un contrôle de débit meilleur que 0,5 %
- ✓ Résistance à la corrosion quel que soit le solvant utilisé. [28]

2.2.3.2. Types de pompe

On utilise des pompes conçues pour maintenir un débit non pulsé et stable, même si la composition de la phase mobile varie. Ces pompes débit métriques comportent généralement deux pistons en série fonctionnant en opposition pour éviter les interruptions de débit dues au remplissage du cylindre. Le déplacement pistons est contrôlé par un moteur pas à pas associé à une came de forme particulière. [29]

2.2.4. Dispositif d'injection de l'échantillon

La méthode d'introduction la plus utilisée consiste à l'emploi des boucles échantillonnage ces dispositifs font généralement partie intégrante de l'appareillage de l'HPLC moderne. [28]

2.2.5. La colonne

Les colonnes HPLC sont usuellement en acier inoxydable, qui ont une longueur de 10 à 30 cm et un diamètre intérieur de 4 à 10 mm, avec des tailles particulières de 5 à 10 μm . Ce type de colonne offre souvent de 40 000 à 60 000 plateaux par mètre.

On a aussi des microcolonnes qui ont un diamètre intérieur de 1 à 4,6 avec une longueur de 3 à 7,5 cm, elles sont remplies de particules de 3 à 5 μm , offrent jusqu'à 100 000 plateaux par mètre et présentent les avantages de la rapidité et d'une consommation minimale de solvant

Parfois des tubes en verre à paroi épaisse sont utilisés dans le domaine des basses pressions (<40bars). [28]

Colonne de garde : on place souvent une courte colonne de protection en amont de la colonne analytique afin d'augmenter la durée de vie, en éliminant les poussières et les contaminants contenus dans les solvants.[28]

Thermostat pour de nombreuses applications, un contrôle rigoureux de la température n'est pas nécessaire et les colonnes sont utilisées à température ambiante car on obtient souvent de meilleurs chromatogrammes en maintenant la température de la colonne constante à quelques dixièmes de degrés Celsius.[28]

2.2.6. La phase stationnaire

La phase stationnaire, maintenue dans la colonne, est constituée de microparticules sphériques ou d'un solide poreux dont la surface au contact de la phase mobile atteint plusieurs centaines de m² par gramme, favorisant ainsi les mécanismes de répartition avec les différents solutés présents. [29]

2.2.7. Les détecteurs

Le détecteur suit en continu l'apparition des solutés. Pour détecter, on utilise différents phénomènes physico-chimiques. Le signal obtenu est enregistré en fonction du temps. Généralement, on compare le signal obtenu pour la phase mobile et le soluté à celui de la phase mobile seule.

Le détecteur le plus utilisé en CLHP est un spectrophotomètre d'absorption UV-visible (190-800 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.[32]

2.2.8. L'intégrateur- enregistreur

L'enregistreur reçoit un signal électrique proportionnel à la concentration de l'analyte qui traverse le détecteur. Ce signal est traité, amplifié puis utilisé pour tracer le chromatogramme. [30]

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

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

La largeur de pic est à peu près prévisible en fonctions de la technique d'analyse et des conditions opératoires. Elle détermine la fréquence d'échantillonnage du signal. Le pic est alors découpé en tranches. Le seuil d'intégration est la valeur du signal à partir de laquelle le calculateur repère un début de pic. [32]

3. Les différents modes de séparation

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

-la chromatographie d'adsorption (LSC, GSC) (lorsque la phase stationnaire est un solide); par extension on pourrait y rattacher **la chromatographie d'affinité**, qui correspond à un cas où les propriétés d'adsorption de la phase stationnaire sont spécifiques vis-à-vis d'un (ou une famille de) composé(s).

-la chromatographie de partage (LLC, GLC), lorsque la phase stationnaire est un liquide non miscible avec la phase mobile (mise en jeu de coefficients de partage).

-la chromatographie d'échange d'ions (IEC), où la phase stationnaire porte des groupes fonctionnels acides ou basiques, destinée à séparer des composés ionisés.

-la chromatographie d'exclusion (SEC) où la phase stationnaire (poreuse) se comporte comme un tamis et sépare les composés en fonction de leur taille; on parle aussi de chromatographie de perméation de gel (GPC).[33]

4. Paramètres de la chromatographie

4.1. Notion de temps

-t₀ est le temps du début de l'injection

-Le temps mort (t_m) est le temps mis par un composé non retenu par la phase stationnaire pour traverser la colonne (temps passé dans la phase mobile)

-le temps de rétention (t_r) est le temps mis par un soluté pour traverser la colonne.

-Le temps de rétention réduit (t'_r) est le temps passé par un soluté dans la phase stationnaire, soit :

$$t'_r = t_r - t_m \quad [32]$$

4.2. Notion de concentration

✓ **Le coefficient de partage K :**

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

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

✓ **Le facteur de capacité K'** est le rapport de la quantité d'un soluté dans la phase stationnaire et dans la phase mobile.

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

V_s : volume de la phase stationnaire

V_m : volume de la phase mobile ou volume mort

✓ **K'** est aussi le rapport du temps passé par un soluté dans la phase stationnaire sur le temps passé par ce même soluté dans la phase mobile.

$$K' = \frac{t_r - t_m}{t_m} [32]$$

4.3. Notion d'efficacité

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

✓ **le nombre de plateaux théoriques Nth**

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

avec :

t_r : temps de rétention

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

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

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

-Expérimentalement t_m est difficile à déterminer d'ou l'utilisation de N_{th} . [32]

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

$$\text{HEPT} = \frac{L}{N_{th}} \quad [32]$$

avec :

L : Longueur de la colonne

N_{th} : Nombre de plateaux théoriques

4.4. Qualité de la séparation :

- **Sélectivité :**

Le facteur de sélectivité α permet de préciser les positions relatives de deux pics adjacents A et B sur un chromatogramme, il est défini par : [31]

$$\alpha = \frac{tr'_{(B)}}{tr'_{(A)}}$$

-Il ne peut, par définition être, inférieur 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.

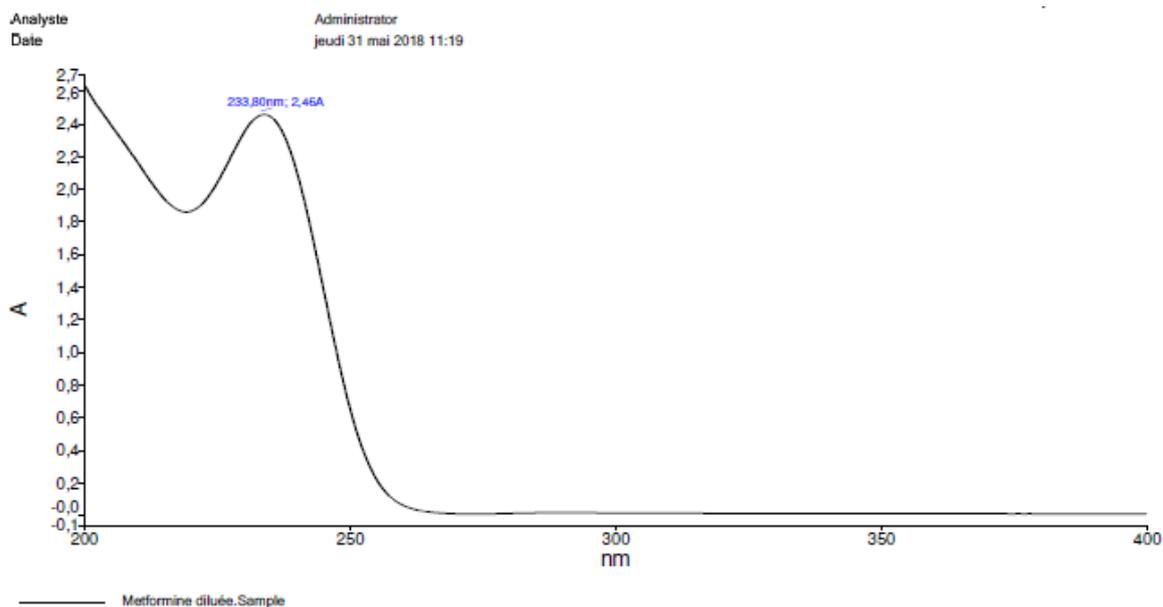
$$R = \frac{tr_B - tr_A}{\omega_{0B} - \omega_{0A}}$$

- ✓ $R < 1$: mauvaise résolution
- ✓ $1 < R < 1,4$: résolution acceptable
- ✓ $1,4 < R < 1,6$: résolution optimale
- ✓ $R > 1,6$: résolution trop bonne car le temps d'analyse est rallongé

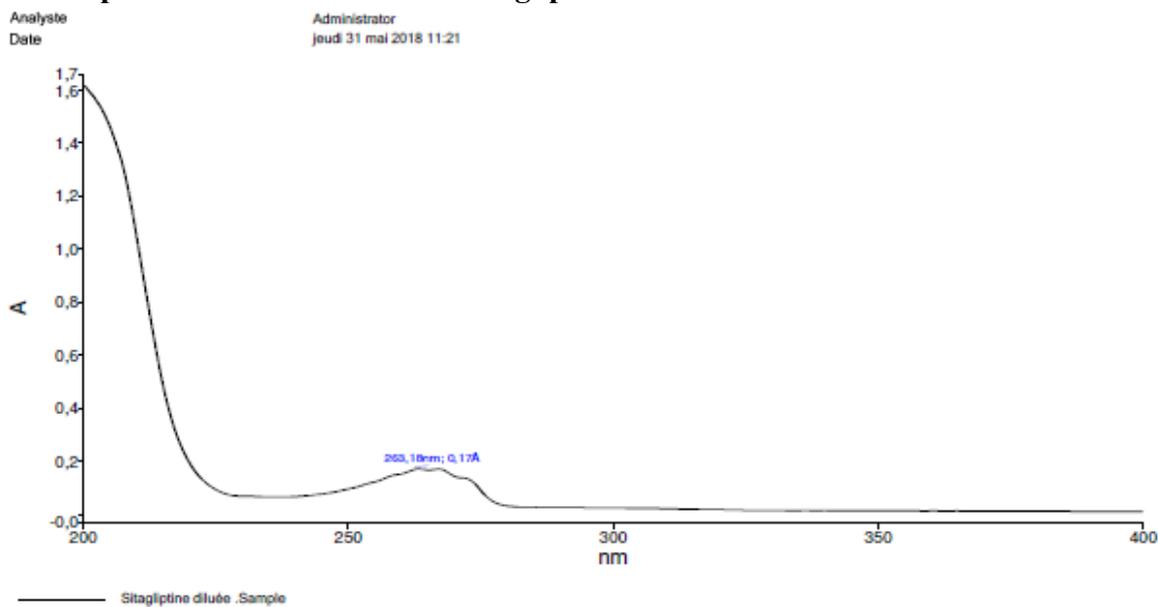
-Il est parfois utile d'exprimer cette résolution en fonction de la sélectivité et de l'efficacité du dernier des 2 pics étudiés

$$R = \frac{1}{4} \times \frac{\alpha-1}{\alpha} \times \frac{K'_B}{1+K'_B} \times \sqrt{N_{th}} = \frac{1}{4} \times \frac{\alpha-1}{\alpha} \times \frac{K'_B}{1+K'_B} \times \sqrt{N_{eff}} \quad [32]$$

– Spectre d'absorbance de la Metformine



– Spectre d'absorbance de la Sitagliptine



– Spectre d'absorbance du diluant

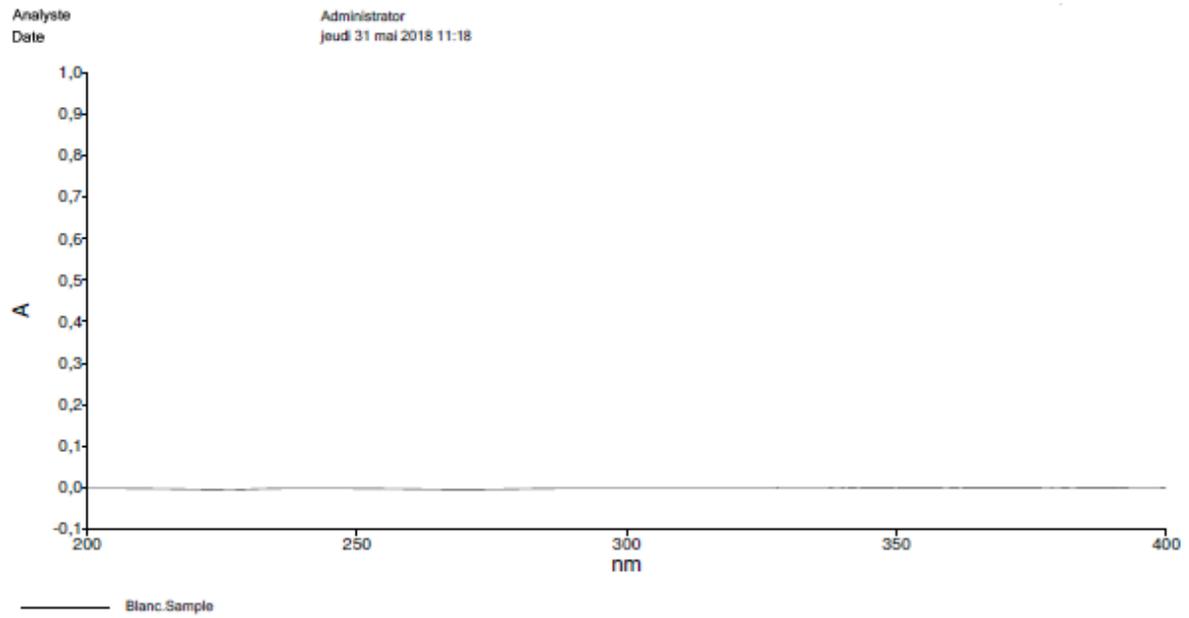


TABLE DE STUDENT

La table donne la probabilité α pour que t égale ou dépasse, en valeur absolue, une valeur donnée, en fonction du nombre de degrés de liberté (ddl).

Exemple : avec $ddl = 10$, pour $t = 2,228$, la probabilité est $\alpha = 0,05$

α ddl	0,90	0,50	0,30	0,20	0,10	0,05	0,02	0,01	0,001
1	0,158	1,000	1,963	3,078	5,314	12,706	31,821	63,656	636,578
2	0,142	0,815	1,386	1,886	2,920	4,303	6,965	9,925	31,600
3	0,137	0,765	1,250	1,638	2,353	3,182	4,541	5,841	12,924
4	0,134	0,741	1,190	1,533	2,132	2,776	3,747	4,604	8,610
5	0,132	0,727	1,156	1,476	2,015	2,571	3,365	4,032	6,869
6	0,131	0,718	1,134	1,440	1,943	2,447	3,143	3,707	5,959
7	0,130	0,711	1,119	1,415	1,895	2,365	2,998	3,499	5,408
8	0,130	0,705	1,108	1,397	1,860	2,306	2,896	3,355	5,041
9	0,129	0,703	1,100	1,383	1,833	2,262	2,821	3,250	4,781
10	0,129	0,700	1,093	1,372	1,812	2,228	2,764	3,169	4,587
11	0,129	0,697	1,088	1,363	1,796	2,201	2,718	3,106	4,437
12	0,128	0,695	1,083	1,356	1,782	2,179	2,681	3,055	4,318
13	0,128	0,694	1,079	1,350	1,771	2,160	2,650	3,012	4,221
14	0,128	0,692	1,076	1,345	1,751	2,145	2,624	2,977	4,140
15	0,128	0,691	1,074	1,341	1,753	2,131	2,602	2,947	4,073
16	0,128	0,690	1,071	1,337	1,746	2,120	2,583	2,921	4,015
17	0,128	0,689	1,069	1,333	1,740	2,110	2,567	2,898	3,965
18	0,127	0,688	1,067	1,330	1,734	2,101	2,552	2,878	3,922
19	0,127	0,688	1,066	1,328	1,729	2,093	2,539	2,861	3,883
20	0,127	0,687	1,064	1,325	1,725	2,086	2,528	2,845	3,850
21	0,127	0,686	1,063	1,323	1,721	2,080	2,518	2,831	3,819
22	0,127	0,685	1,061	1,321	1,717	2,074	2,508	2,819	3,792
23	0,127	0,685	1,060	1,319	1,714	2,069	2,500	2,807	3,768
24	0,127	0,685	1,059	1,318	1,711	2,064	2,492	2,797	3,745
25	0,127	0,684	1,058	1,316	1,708	2,060	2,485	2,787	3,725
26	0,127	0,684	1,058	1,315	1,706	2,056	2,479	2,779	3,707
27	0,127	0,684	1,057	1,314	1,703	2,052	2,473	2,771	3,689
28	0,127	0,683	1,056	1,313	1,701	2,048	2,467	2,763	3,674
29	0,127	0,683	1,055	1,311	1,699	2,045	2,462	2,756	3,660
30	0,127	0,683	1,055	1,310	1,697	2,042	2,457	2,750	3,646
40	0,126	0,681	1,050	1,303	1,684	2,021	2,423	2,704	3,551
80	0,126	0,678	1,043	1,292	1,664	1,990	2,374	2,639	3,416
120	0,126	0,677	1,041	1,289	1,658	1,980	2,358	2,617	3,373
∞	0,126	0,675	1,037	1,282	1,645	1,960	2,327	2,577	3,293

Données brutes de validation



Spécificité

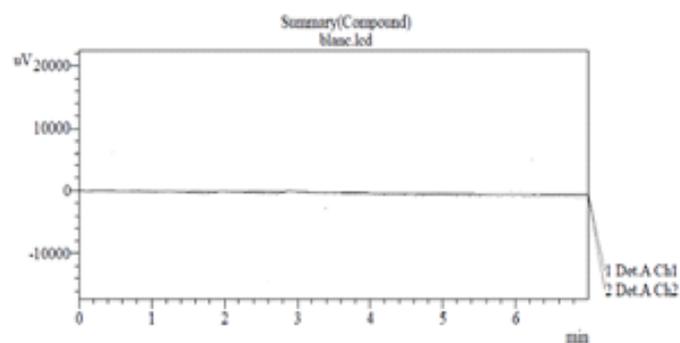


Figure 2 : Chromatogramme du diluant non chargé de PA

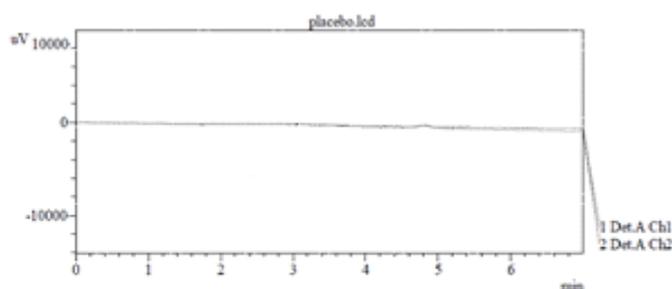


Figure 03: Chromatogramme du diluant avec placebo non chargé de PA.

<< Detector A >>

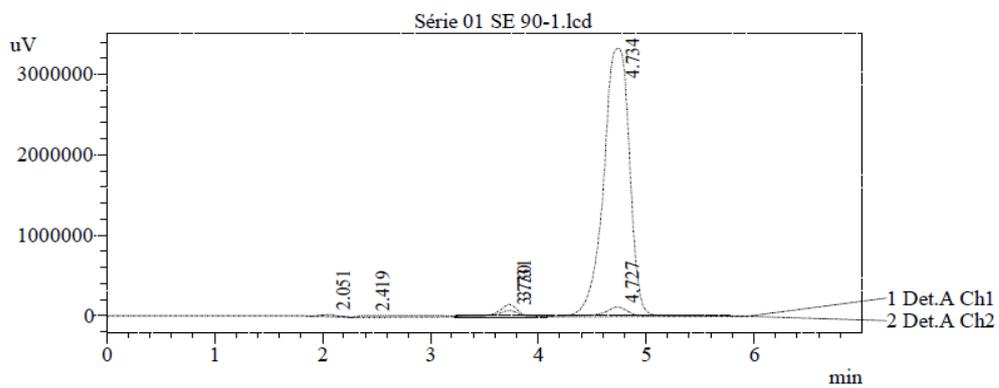
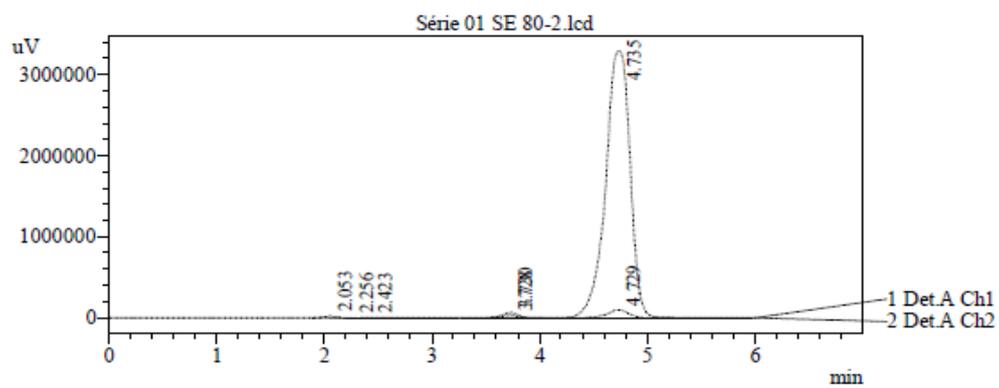
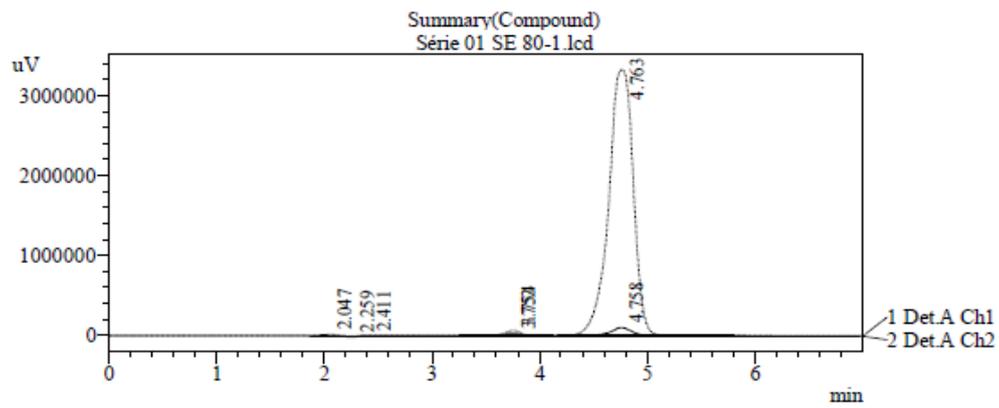
ID#1 Compound Name: Sitagliptine

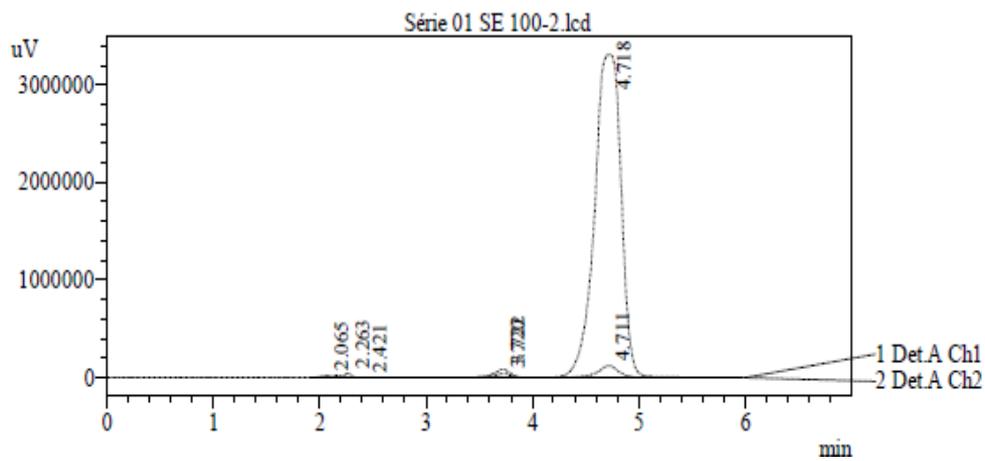
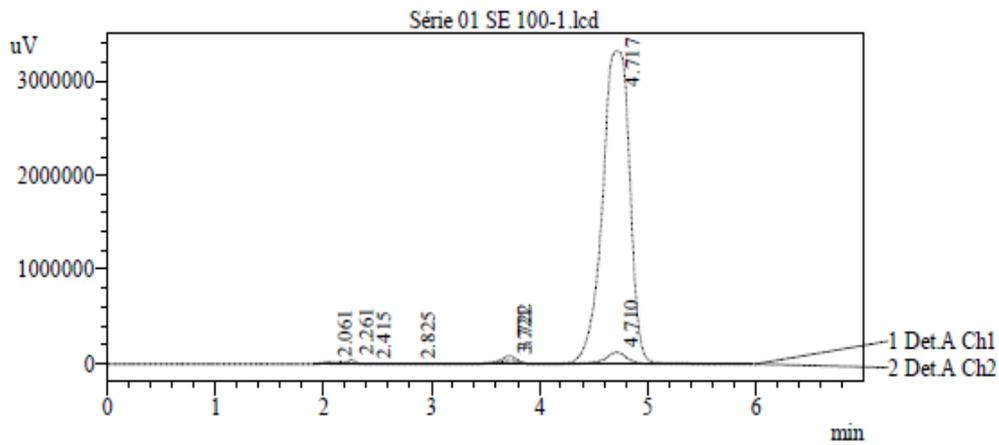
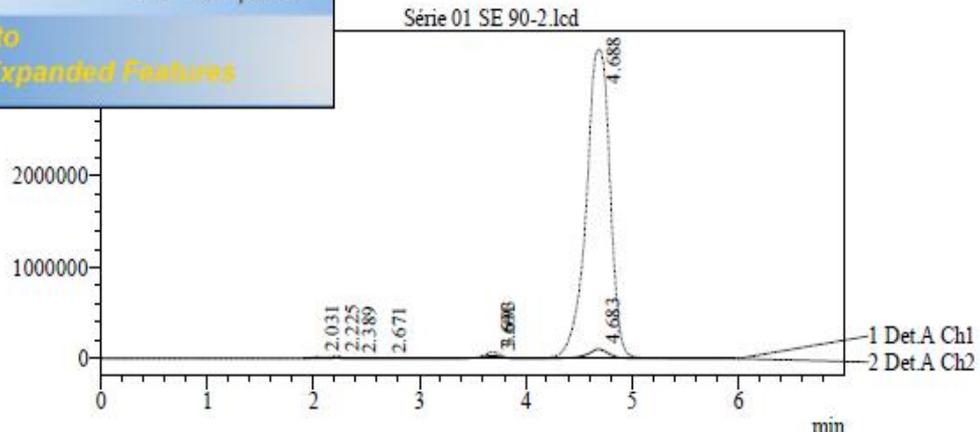
Title	Sample Name	Sample ID	Ret. Time	Area
blanc.lcd	Spécificité	Blanc	0.000	0
placebo.lcd	Spécificité	Placebo	0.000	0
Average			0.000	0
%RSD			0.000	0.000
Maximum			0.000	0
Minimum			0.000	0
Standard Deviation			0.000	0

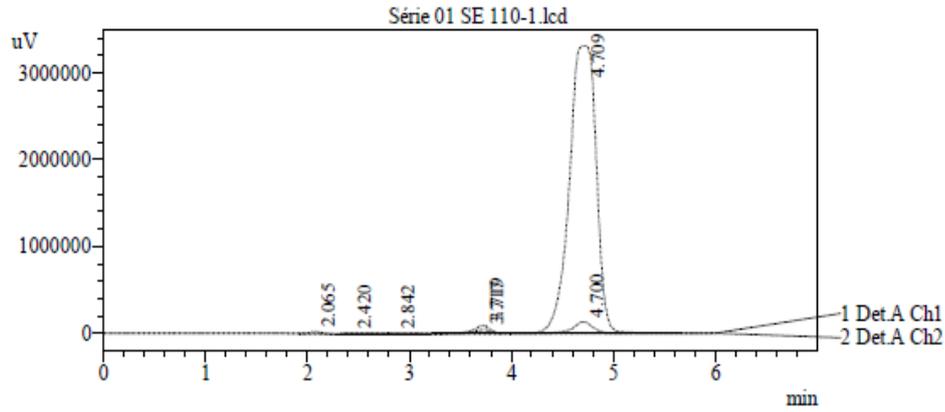
ID#2 Compound Name: Metformine

Title	Sample Name	Sample ID	Ret. Time	Area
blanc.lcd	Spécificité	Blanc	0.000	0
placebo.lcd	Spécificité	Placebo	0.000	0
Average			0.000	0
%RSD			0.000	0.000
Maximum			0.000	0
Minimum			0.000	0
Standard Deviation			0.000	0

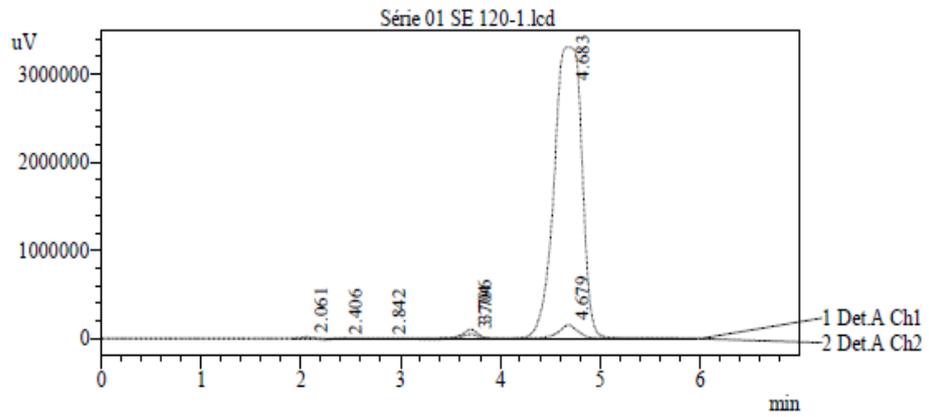
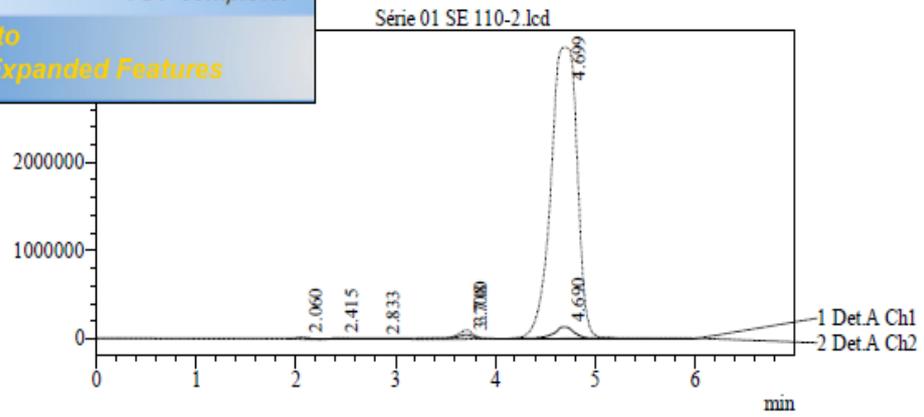
Linéarité

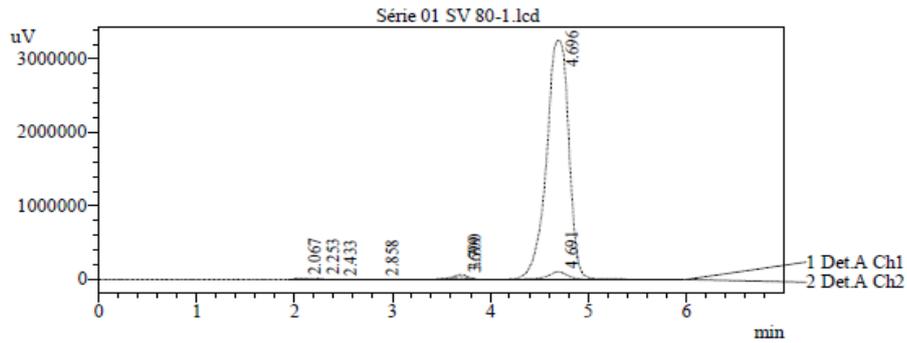
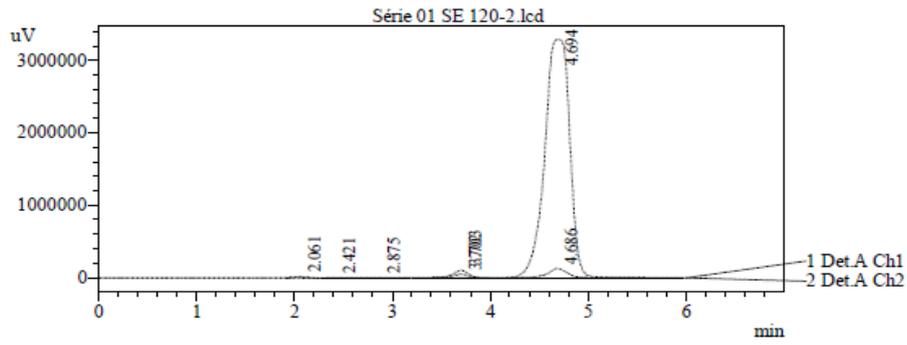






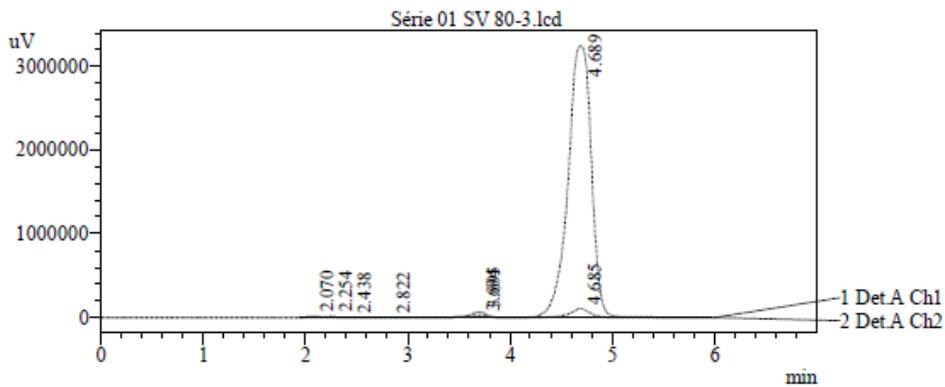
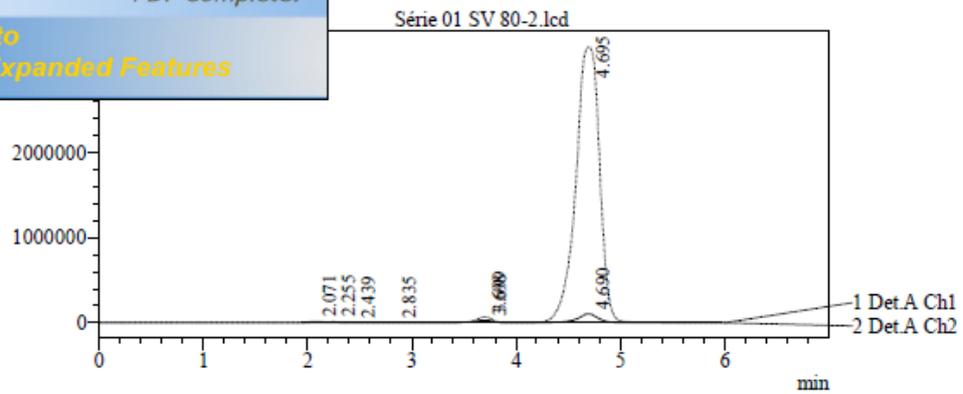
PDF Complete
 Your complimentary use period has ended.
 Thank you for using PDF Complete.
 Here to upgrade to Unlimited Pages and Expanded Features

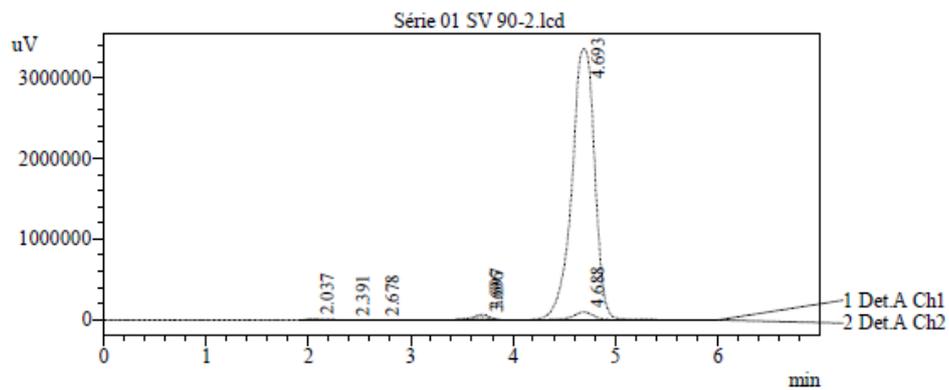
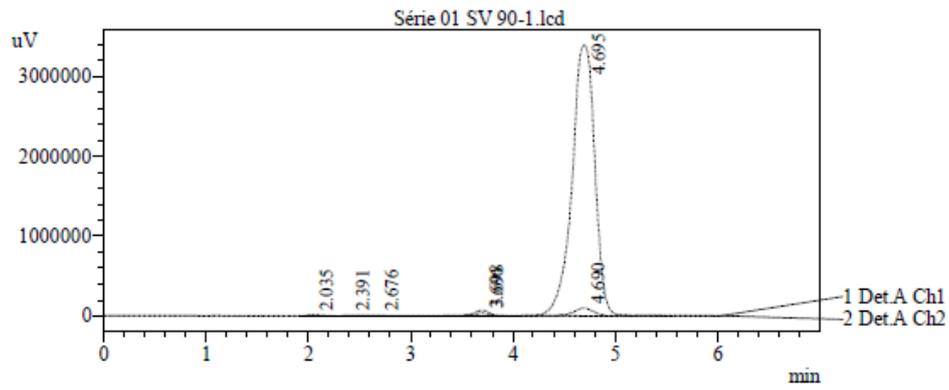




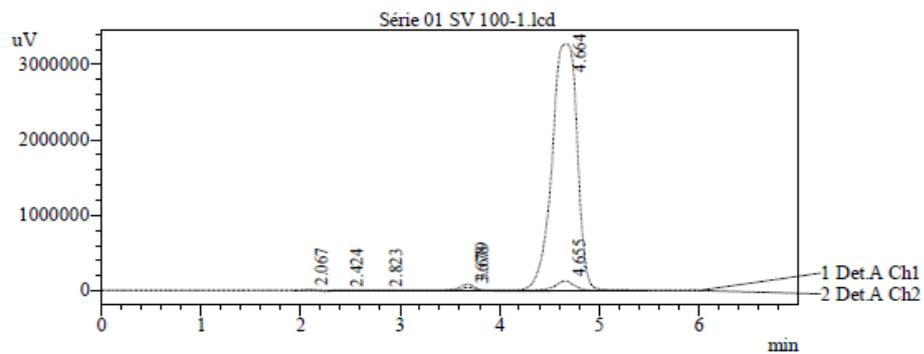
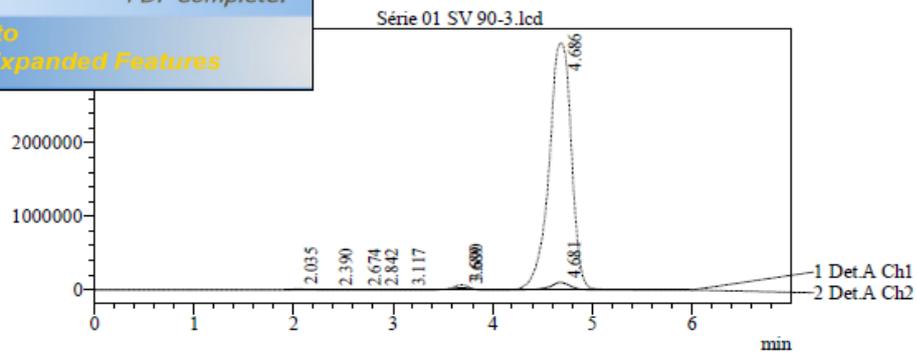
Your complimentary
use period has ended.
Thank you for using
PDF Complete.

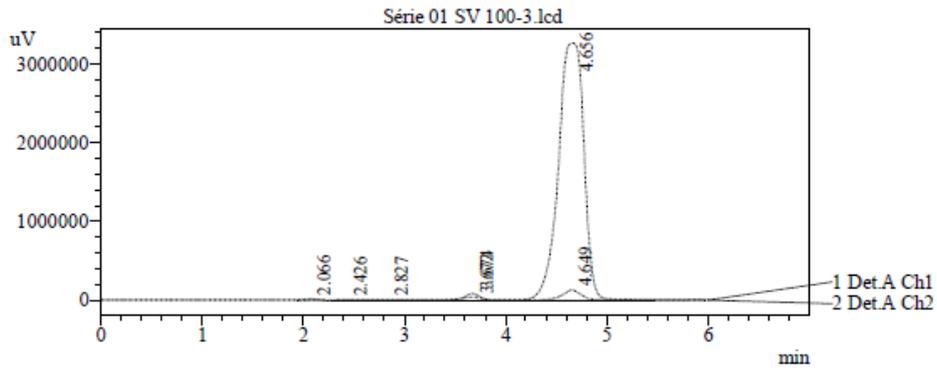
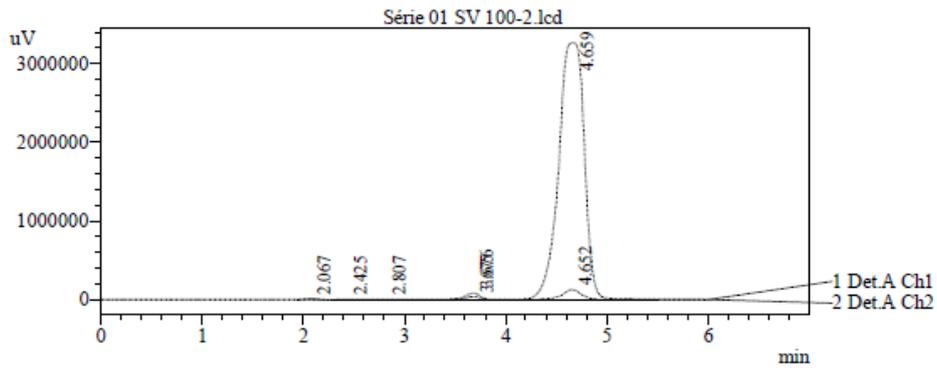
Here to upgrade to
ited Pages and Expanded Features



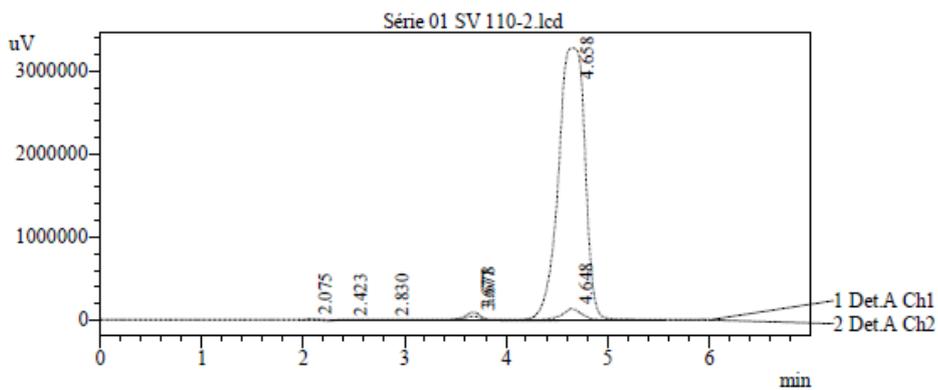
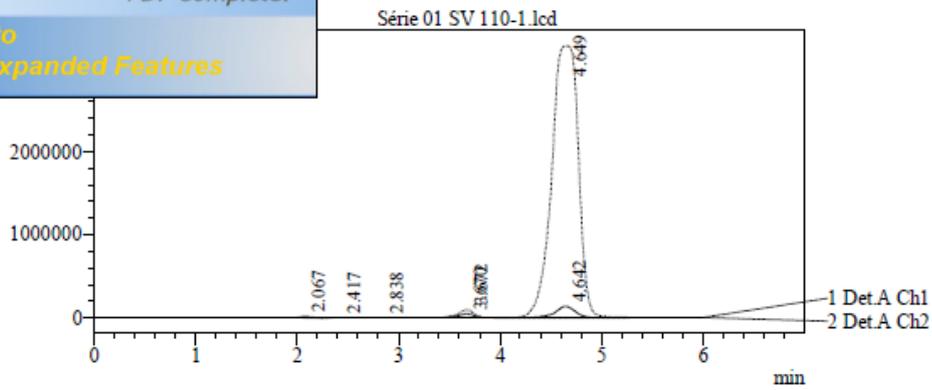


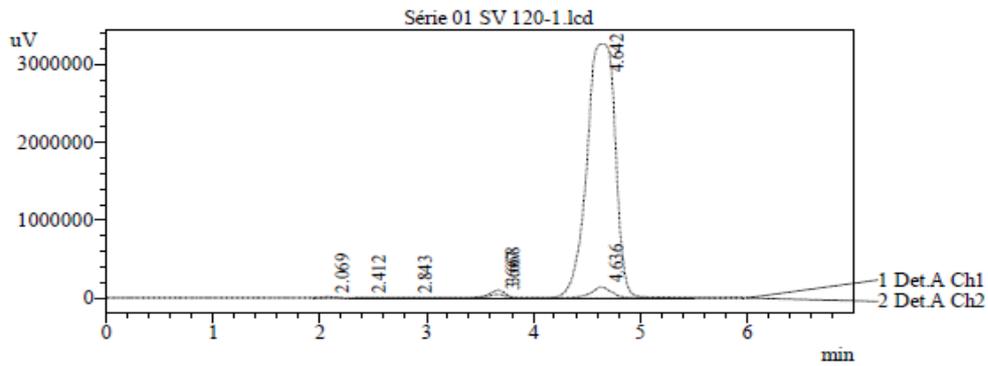
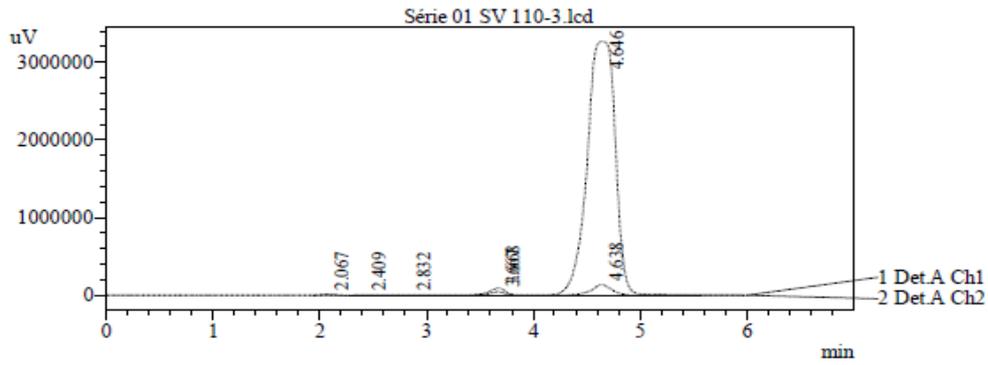
PDF Complete
 Your complimentary use period has ended.
 Thank you for using PDF Complete.
 Here to upgrade to
 ited Pages and Expanded Features



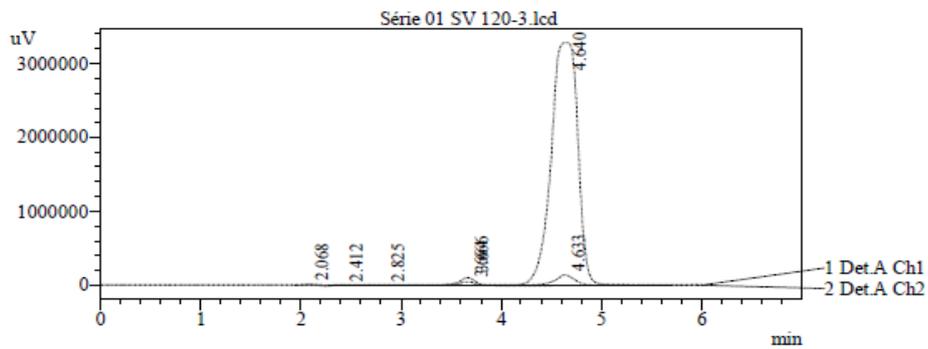
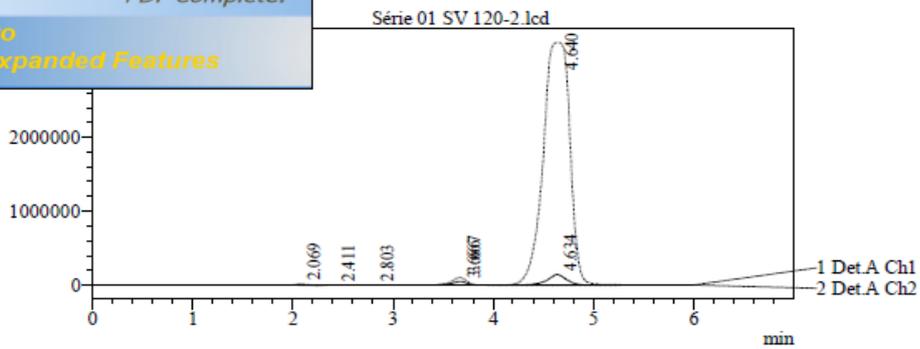


PDF Complete
 Your complimentary use period has ended.
 Thank you for using PDF Complete.
 Upgrade to **Pages and Expanded Features**





PDF Complete
 Your complimentary use period has ended.
 Thank you for using PDF Complete.
 Upgrade to 100 Pages and Expanded Features



<< Detector A >>

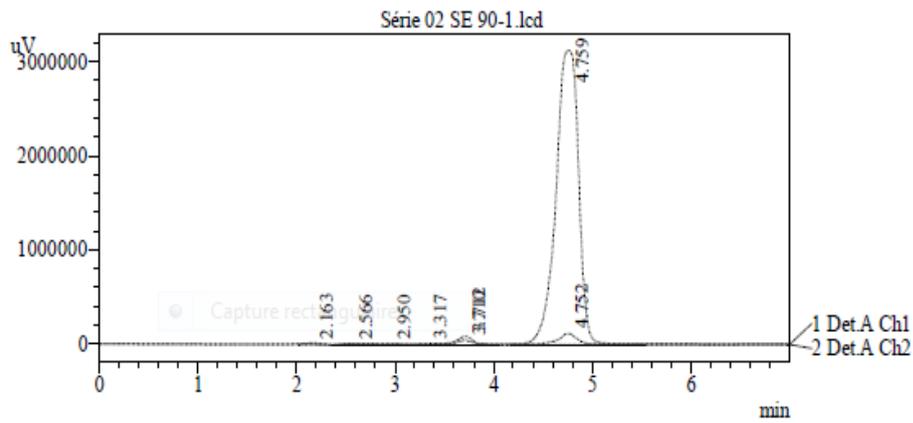
ID#1 Compound Name: Sitagliptine

Title	Sample Name	Sample ID	Ret. Time	Area
Série 01 SE 80-1.lcd	SE	SE	3.752	326943
Série 01 SE 80-2.lcd	SE	SE	3.728	327474
Série 01 SE 90-1.lcd	SE	SE	3.681	348085
Série 01 SE 90-2.lcd	SE	SE	3.691	350582
Série 01 SE 100-1.lcd	SE	SE	3.721	411084
Série 01 SE 100-2.lcd	SE	SE	3.720	412306
Série 01 SE 110-1.lcd	SE	SE	3.717	456680
Série 01 SE 110-2.lcd	SE	SE	3.708	474567
Série 01 SE 120-1.lcd	SE	SE	3.704	508416
Série 01 SE 120-2.lcd	SE	SE	3.702	509288
Série 01 SV 80-1.lcd	SE	SV	3.699	325076
Série 01 SV 80-2.lcd	SE	SV	3.698	328941
Série 01 SV 80-3.lcd	SE	SV	3.694	327982
Série 01 SV 90-1.lcd	SE	SE	3.696	350595
Série 01 SV 90-2.lcd	SE	SE	3.696	351791
Série 01 SV 90-3.lcd	SE	SE	3.689	353746
Série 01 SV 100-1.lcd	SE	SV	3.678	415523
Série 01 SV 100-2.lcd	SE	SV	3.675	412436
Série 01 SV 100-3.lcd	SE	SV	3.672	411996
Série 01 SV 110-1.lcd	SE	SV	3.670	464887
Série 01 SV 110-2.lcd	SE	SV	3.677	465388
Série 01 SV 110-3.lcd	SE	SV	3.667	464268
Série 01 SV 120-1.lcd	SE	SV	3.667	509370
Série 01 SV 120-2.lcd	SE	SV	3.666	509963
Série 01 SV 120-3.lcd	SE	SV	3.664	508005
Average			3.693	413016
%RSD			0.609	16.824
Maximum			3.752	509963
Minimum			3.664	325076
Standard Deviation			0.022	69484

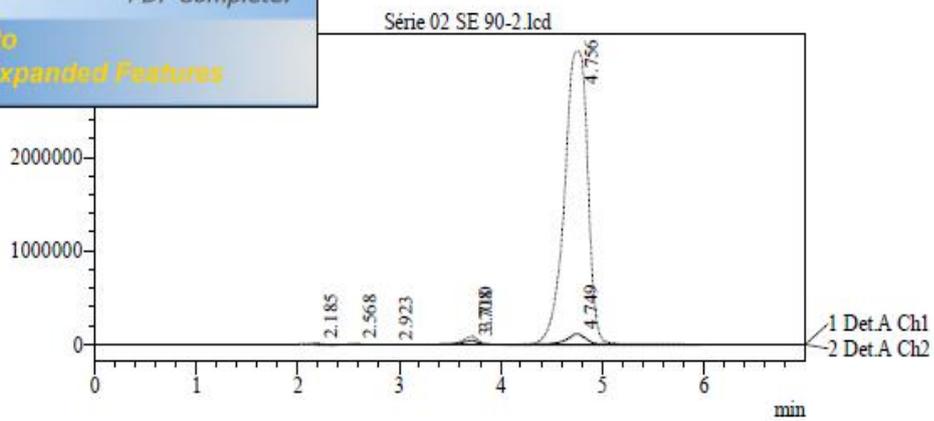
ID#2 Compound Name: Metformine

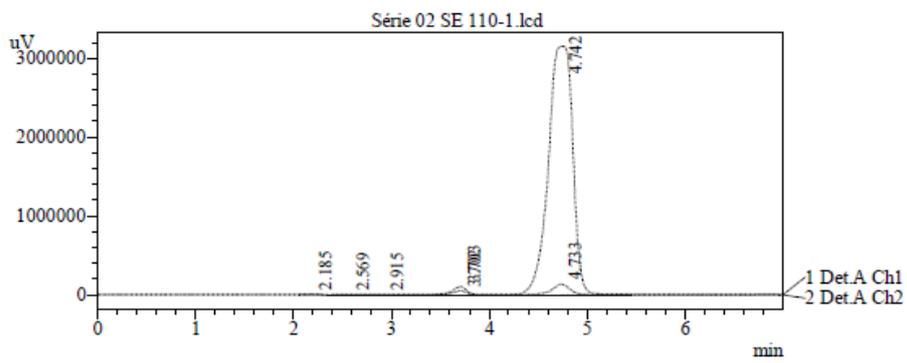
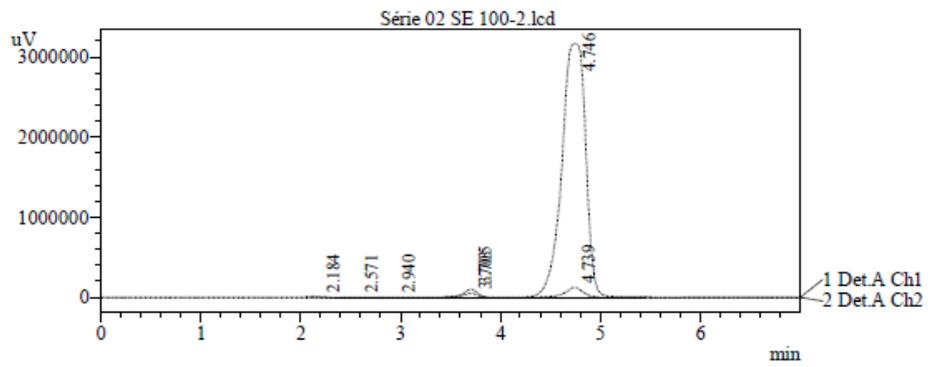
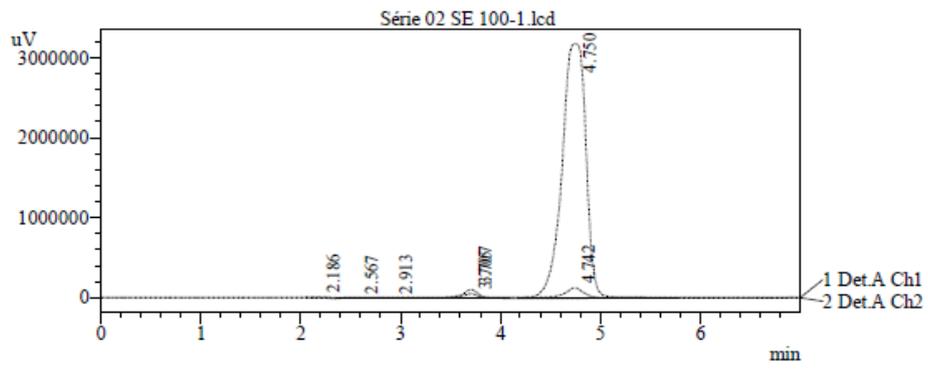
Title	Sample Name	SampleID	Ret .Time	Area
Série 01 SE80-1.Icd	SE	SE	4.758	1430780
Série 01 SE80-1.Icd	SE	SE	4.729	1403745
Série 01 SE 90-1.Icd	SE	SE	4.727	1554283
Série 01 SE 90-1.Icd	SE	SE	4.0722	1485112
Série 01 SE 100-1.Icd	SE	SE	4.710	1718561
Série 01 SE 100-2.Icd	SE	SE	4.711	1669909
Série 01 SE 110-1.Icd	SE	SE	4.700	1851075
Série 01 SE 110-2.Icd	SE	SE	4.690	1873210
Série 01 SE 120-1.Icd	SE	SE	4.679	2099223
Série 01 SE 120-2.Icd	SE	SE	4.686	1735583
Série 01 SV 80-1.Icd	SE	SV	4.691	1401923
Série 01 SV 80-2.Icd	SE	SV	4.690	1401154
Série 01 SV 80-3.Icd	SE	SV	4.685	1394489
Série 01 SV 90-1.Icd	SE	SV	4.674	1553185
Série 01 SV 90-2.Icd	SE	SV	4.672	1522649
Série 01 SV 90-3.Icd	SE	SV	4.666	1548973
Série 01 SV 100-1.Icd	SE	SV	4.655	1725578
Série 01 SV 100-2.Icd	SE	SV	4.652	1706265
Série 01 SV 100-3.Icd	SE	SV	4.649	1692736
Série 01 SV 110-1.Icd	SE	SV	4.642	1845283
Série 01 SV 110-2.Icd	SE	SV	4.648	1848104
Série 01 SV 110-3.Icd	SE	SV	4.638	1846937
Série 01 SV 120-1.Icd	SE	SV	4.636	1909100

Série 01 SV 110-2.Icd	SE	SV	4.634	1909339
Série 01 SV 110-3.Icd	SE	SV	4.633	1901190
Average			4.677	1652064
%RSD			0.679	13.929
Maximum			4.758	2099223
Minimum			4.633	1380778
Standard Deviation			0.032	230117



PDF Complete
 Your complimentary use period has ended.
 Thank you for using PDF Complete.
 Upgrade to Pages and Expanded Features

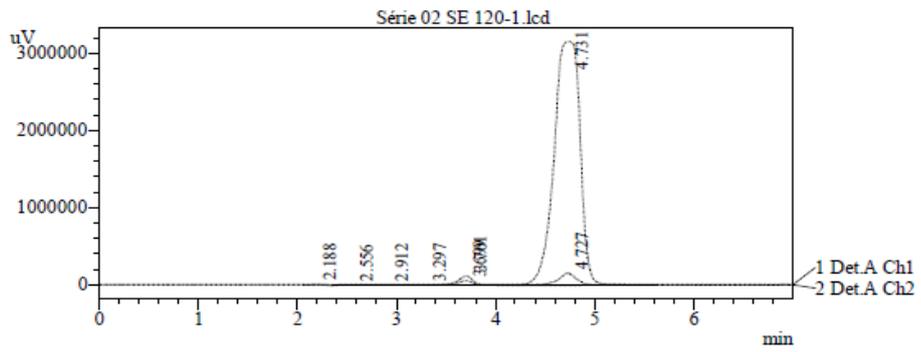
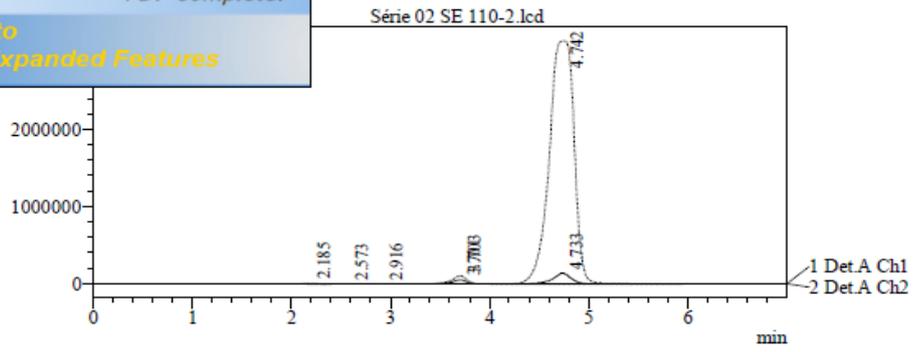


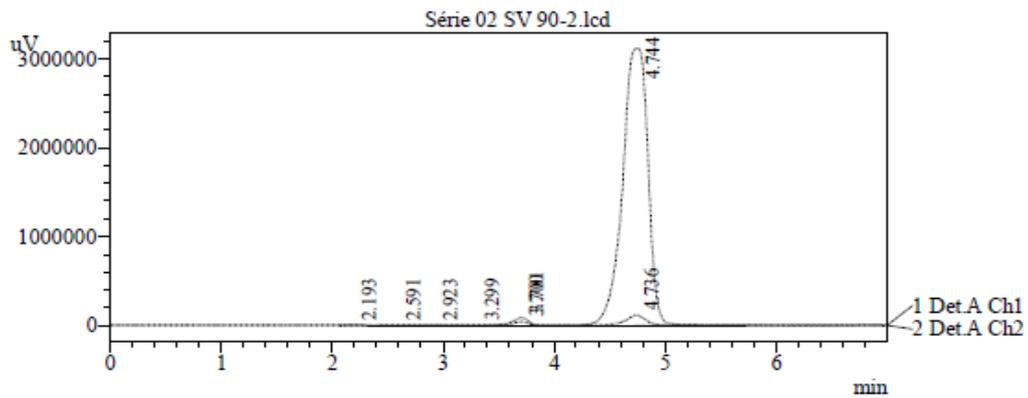
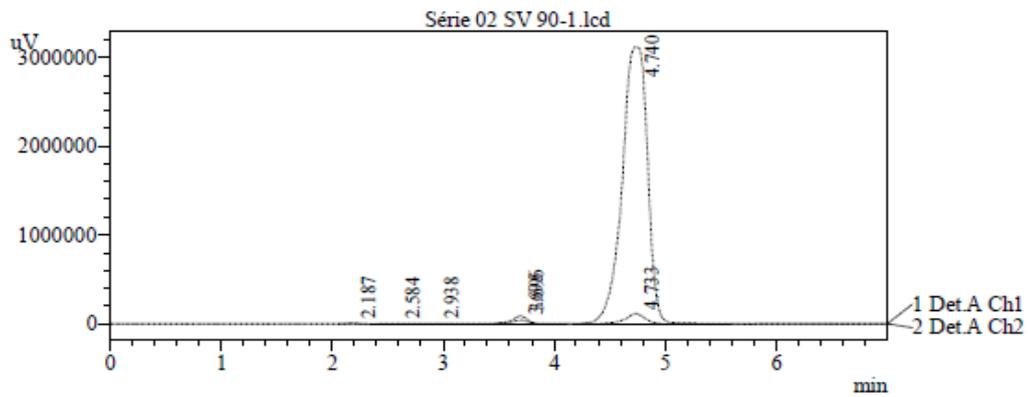
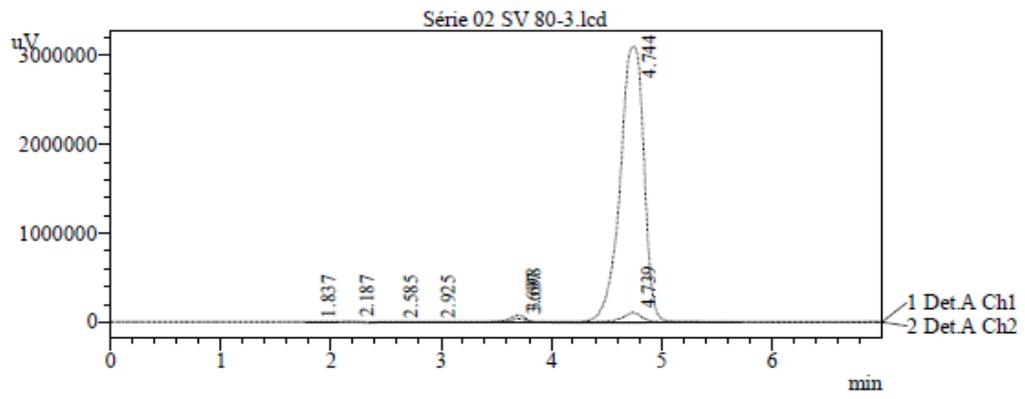
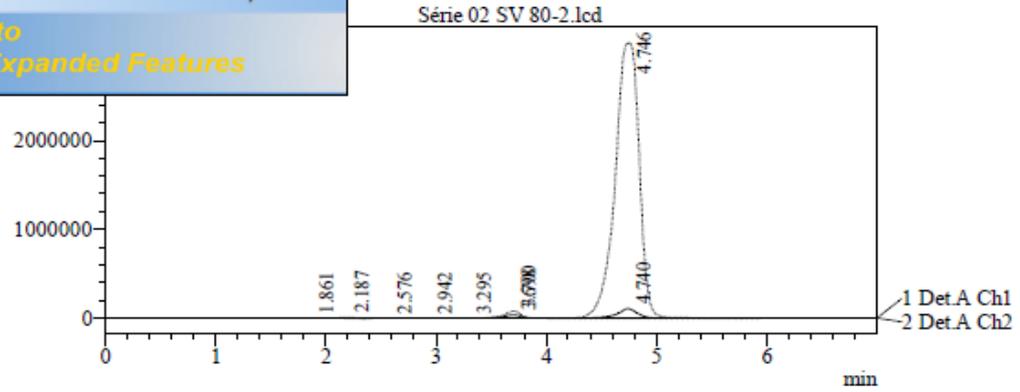


PDF Complete

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

to upgrade to
Pages and Expanded Features

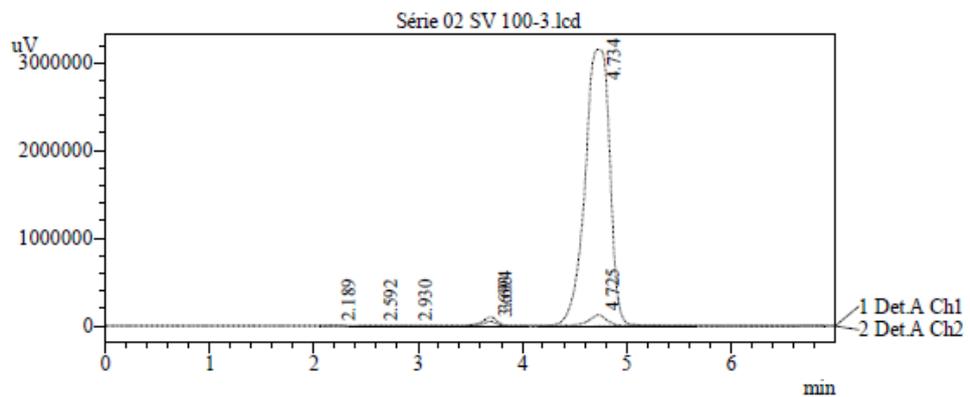
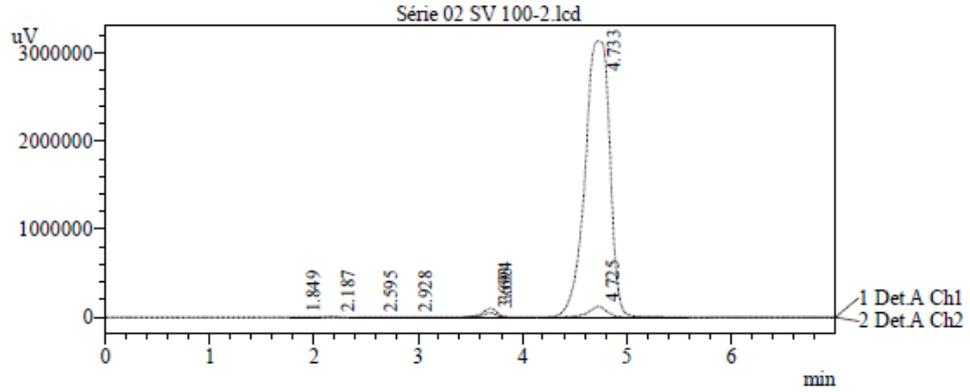
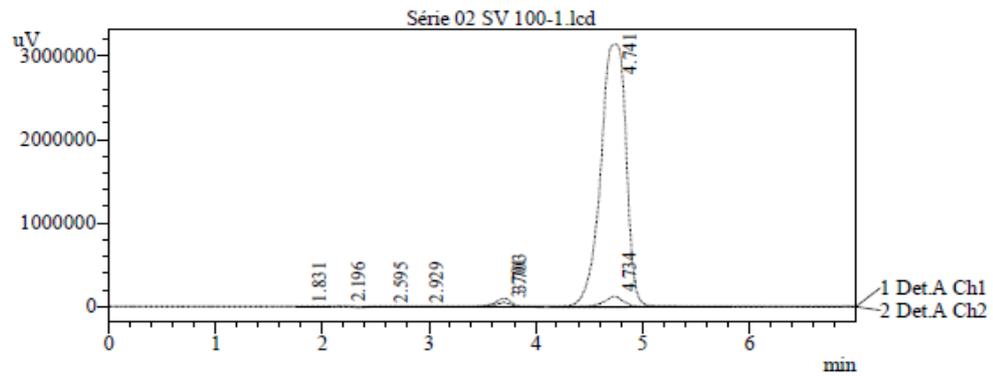
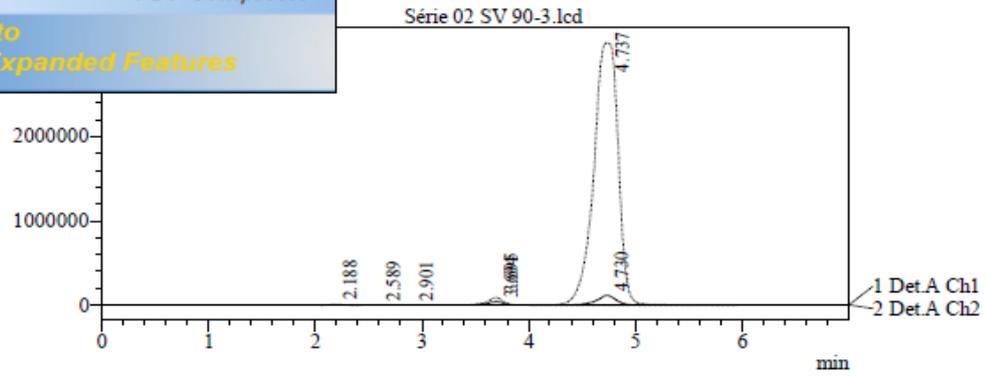


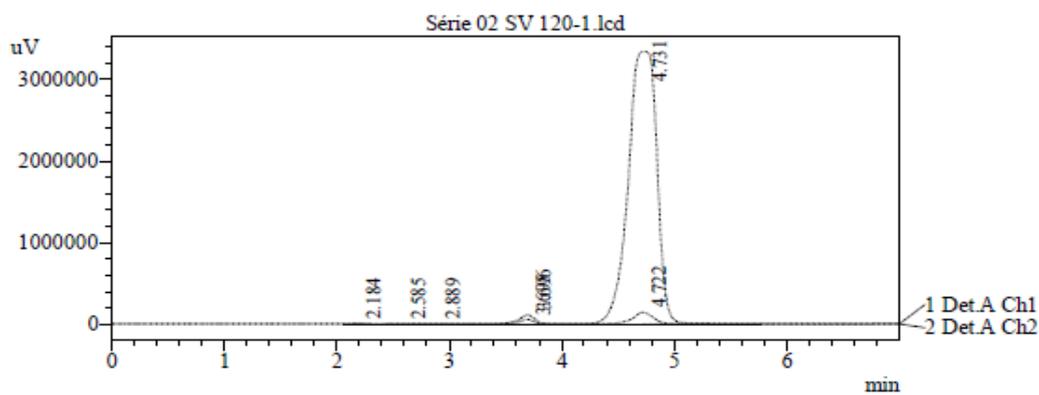
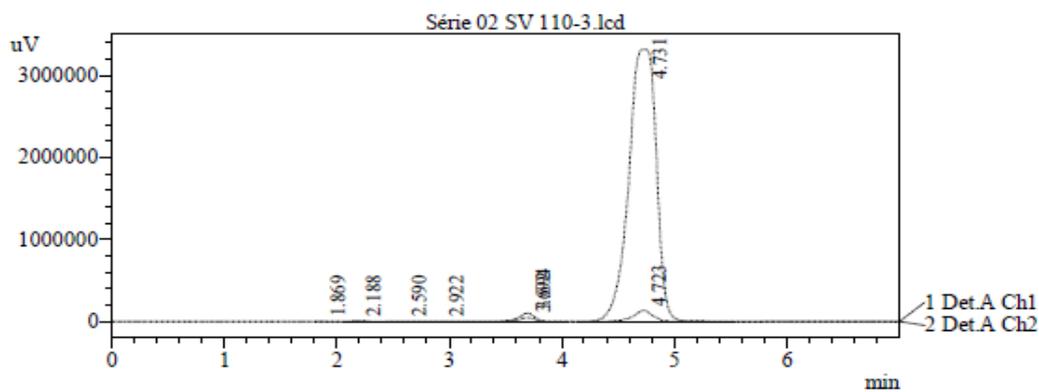
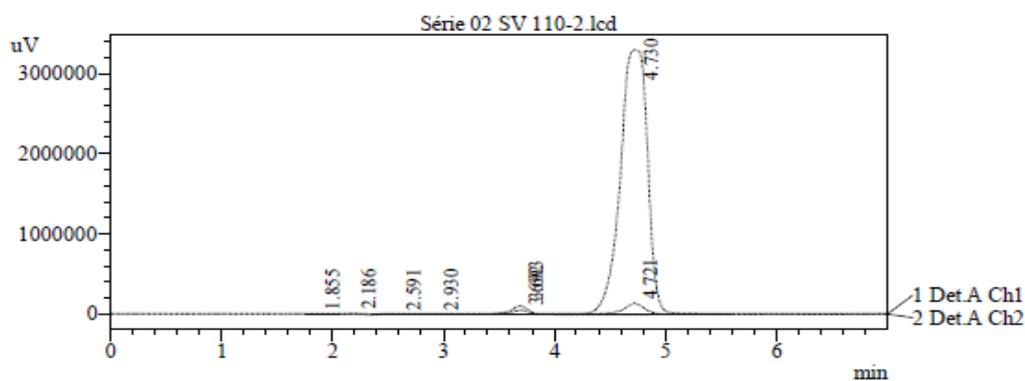
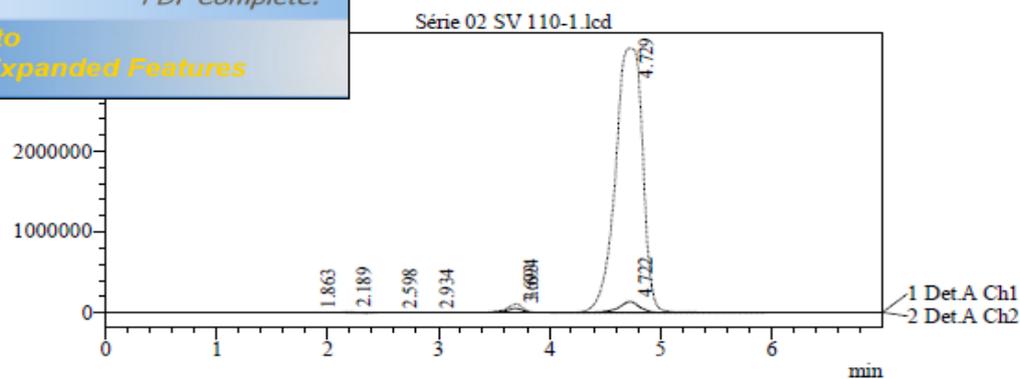


PDF
complete

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

to upgrade to
Pages and Expanded Features





<< Detector A >>

ID#1 Compound Name: Sitagliptine

Title	Sample Name	Sample ID	Ret. Time	Area
Série 02 SE 80-1.lcd	SE	STD	3.715	350192
Série 02 SE 80-2.lcd	SE	STD	3.712	353364
Série 02 SE 90-1.lcd	SE	STD	3.710	396308
Série 02 SE 90-2.lcd	SE	STD	3.708	399182
Série 02 SE 100-1.lcd	SE	STD	3.705	466861
Série 02 SE 100-2.lcd	SE	STD	3.703	471471
Série 02 SE 110-1.lcd	SE	STD	3.702	484635
Série 02 SE 110-2.lcd	SE	STD	3.701	485728
Série 02 SE 120-1.lcd	SE	STD	3.699	534627
Série 02 SE 120-2.lcd	SE	STD	3.701	528029
Série 02 SV 80-1.lcd	SE	ECH	3.698	350872
Série 02 SV 80-2.lcd	SV	ECH	3.698	352673
Série 02 SV 80-3.lcd	SV	ECH	3.697	353592
Série 02 SV 90-1.lcd	SV	ECH	3.695	398094
Série 02 SV 90-2.lcd	SV	ECH	3.700	398875
Série 02 SV 90-3.lcd	SV	ECH	3.694	398213
Série 02 SV 100-1.lcd	SV	ECH	3.701	471432
Série 02 SV 100-2.lcd	SV	ECH	3.693	473224
Série 02 SV 100-3.lcd	SV	ECH	3.693	473732
Série 02 SV 110-1.lcd	SV	ECH	3.693	487049
Série 02 SV 110-2.lcd	SV	ECH	3.692	490781
Série 02 SV 110-3.lcd	SV	ECH	3.692	488620
Série 02 SV 120-1.lcd	SV	ECH	3.695	527927
Série 02 SV 120-2.lcd	SV	ECH	3.700	530057
Série 02 SV 120-3.lcd	SV	ECH	3.703	543331
Average			3.700	448355
%RSD			0.175	14.755
Maximum			3.715	543331
Minimum			3.692	350192
Standard Deviation			0.006	66155

ID#2 Compound Name: Metformine

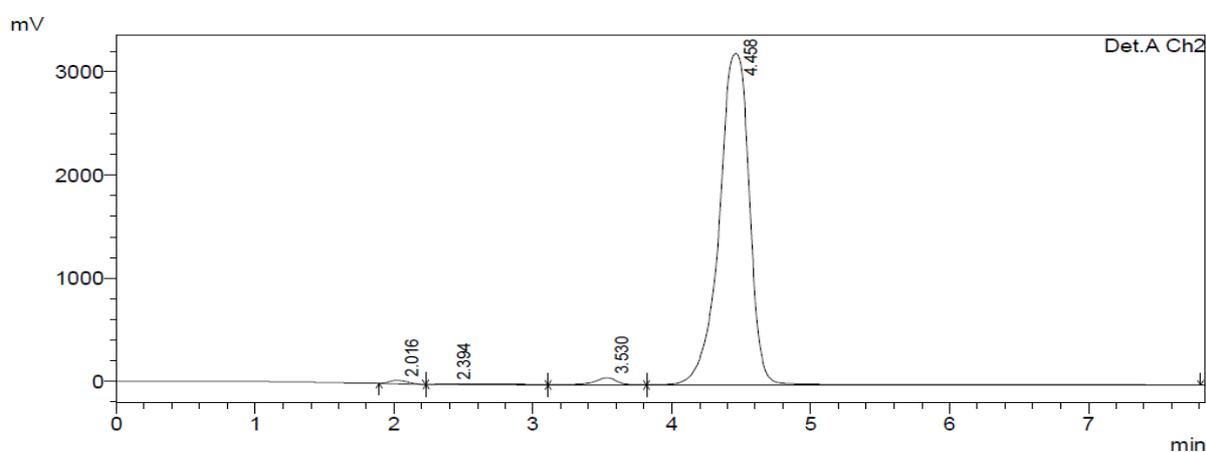
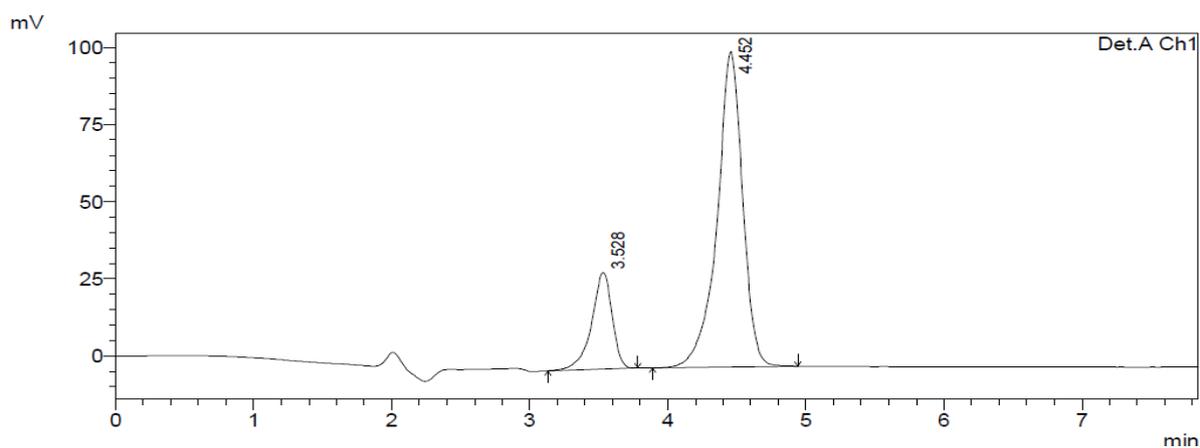
Title	Sample Name	Sample ID	Ret. Time	Area
Série 02 SE 80-1.lcd	SE	STD	4.762	1288313
Série 02 SE 80-2.lcd	SE	STD	4.758	1289880
Série 02 SE 90-1.lcd	SE	STD	4.752	1436918
Série 02 SE 90-2.lcd	SE	STD	4.749	1439934
Série 02 SE 100-1.lcd	SE	STD	4.742	1569606

PDF
omplete

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

to upgrade to
Pages and Expanded Features

	Sample Name	Sample ID	Ret. Time	Area
	SE	STD	4.739	1577711
	SE	STD	4.733	1707479
	SE	STD	4.733	1713975
Série 02 SE 120-1.lcd	SE	STD	4.727	1895289
Série 02 SE 120-2.lcd	SE	STD	4.728	1854157
Série 02 SV 80-1.lcd	SE	ECH	4.741	1295968
Série 02 SV 80-2.lcd	SV	ECH	4.740	1302957
Série 02 SV 80-3.lcd	SV	ECH	4.739	1301373
Série 02 SV 90-1.lcd	SV	ECH	4.733	1434019
Série 02 SV 90-2.lcd	SV	ECH	4.736	1434217
Série 02 SV 90-3.lcd	SV	ECH	4.730	1432708
Série 02 SV 100-1.lcd	SV	ECH	4.734	1567604
Série 02 SV 100-2.lcd	SV	ECH	4.725	1566948
Série 02 SV 100-3.lcd	SV	ECH	4.725	1569795
Série 02 SV 110-1.lcd	SV	ECH	4.722	1712019
Série 02 SV 110-2.lcd	SV	ECH	4.721	1717711
Série 02 SV 110-3.lcd	SV	ECH	4.723	1715886
Série 02 SV 120-1.lcd	SV	ECH	4.722	1856173
Série 02 SV 120-2.lcd	SV	ECH	4.728	1860353
Série 02 SV 120-3.lcd	SV	ECH	4.732	1915372
Average			4.735	1578255
%RSD			0.232	13.190
Maximum			4.762	1915372
Minimum			4.721	1288313
Standard Deviation			0.011	208176

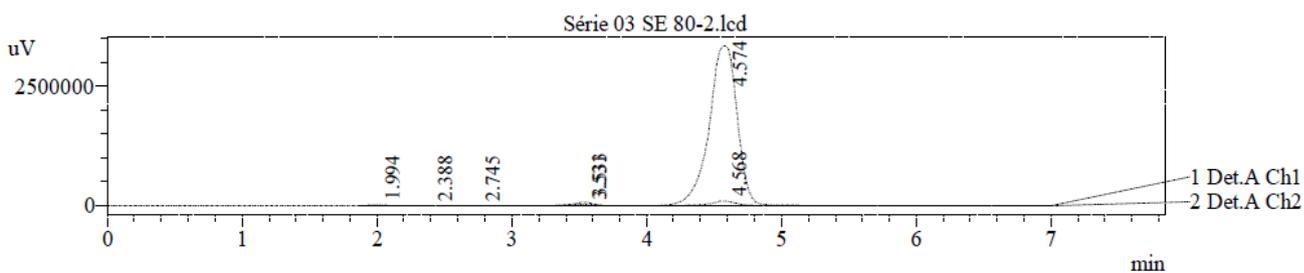
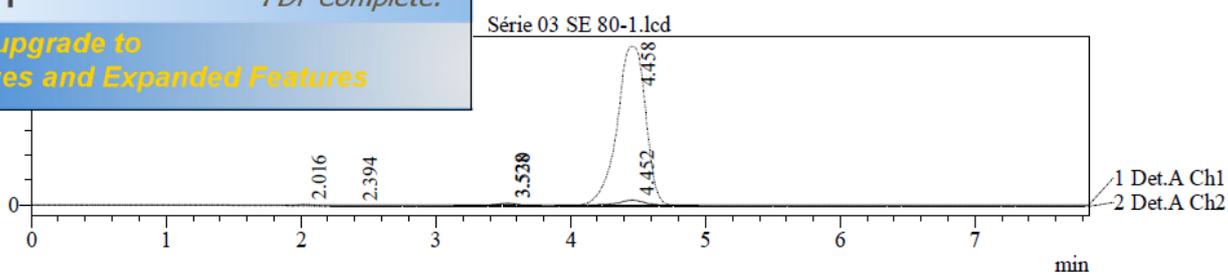


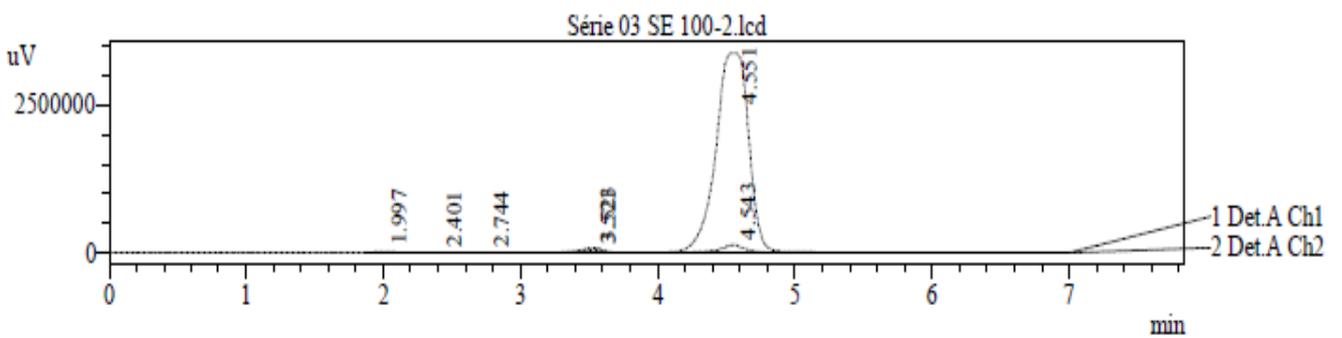
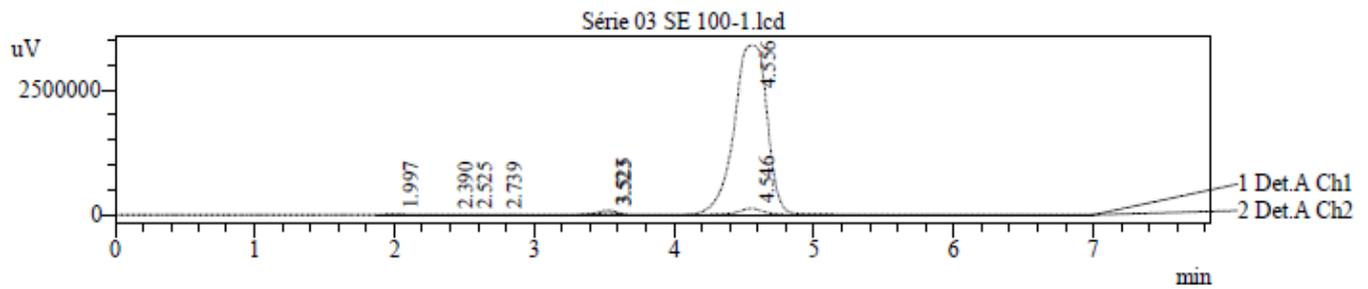
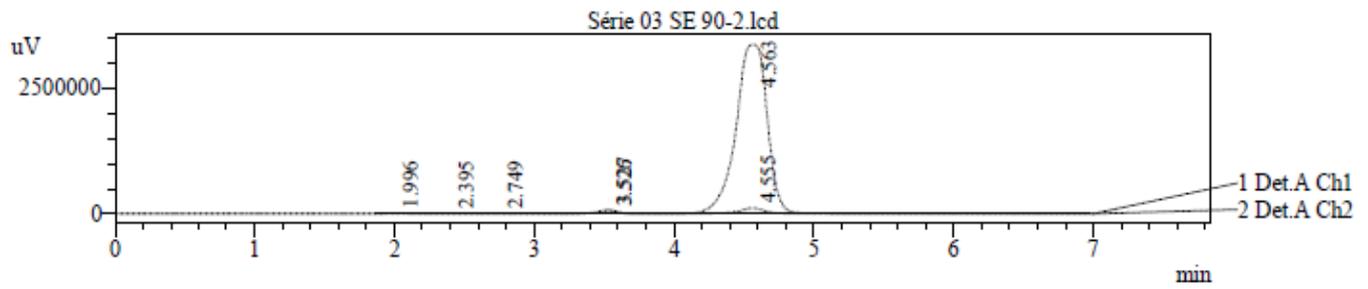
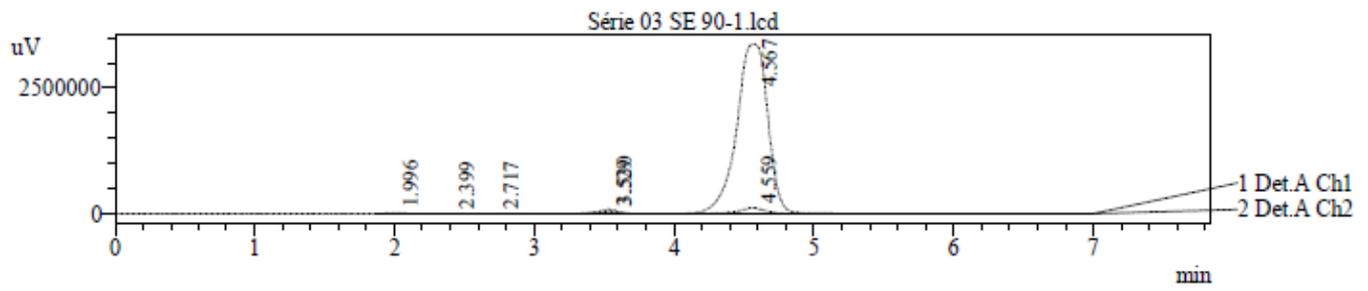
1 Det.A Ch1/263nm
2 Det.A Ch2/218nm

PDF
omplete

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

Upgrade to
Full Pages and Expanded Features

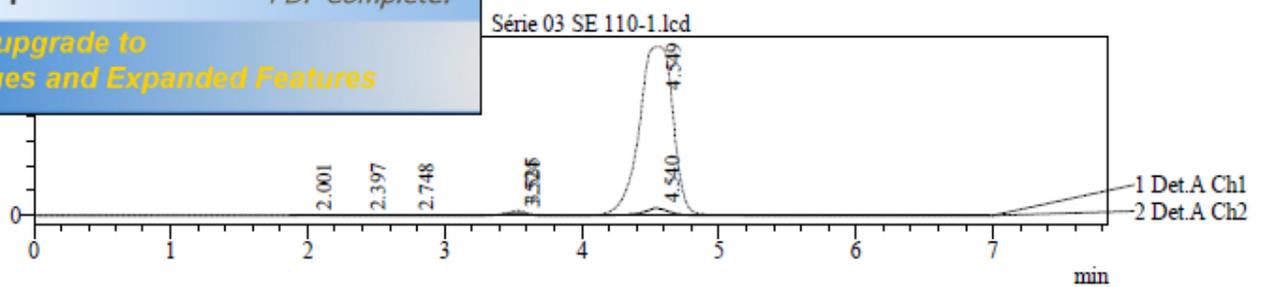


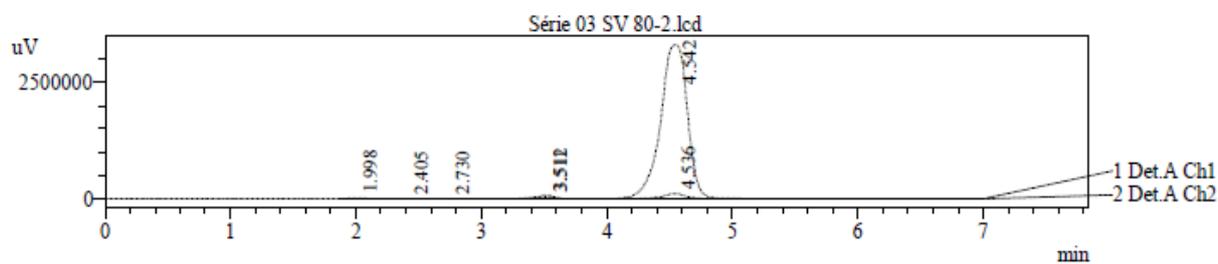
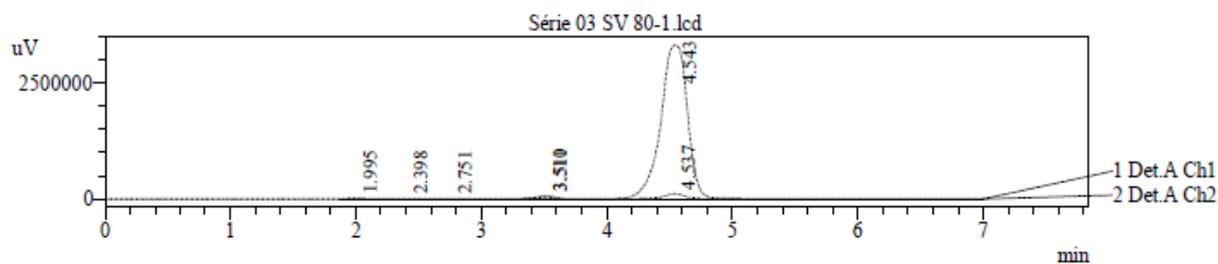
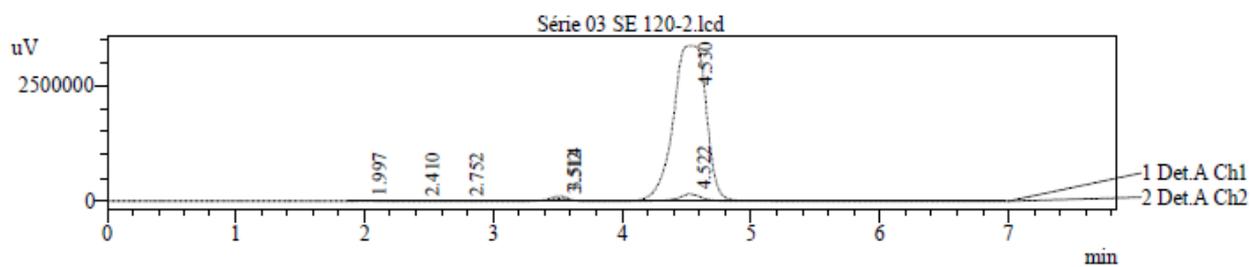
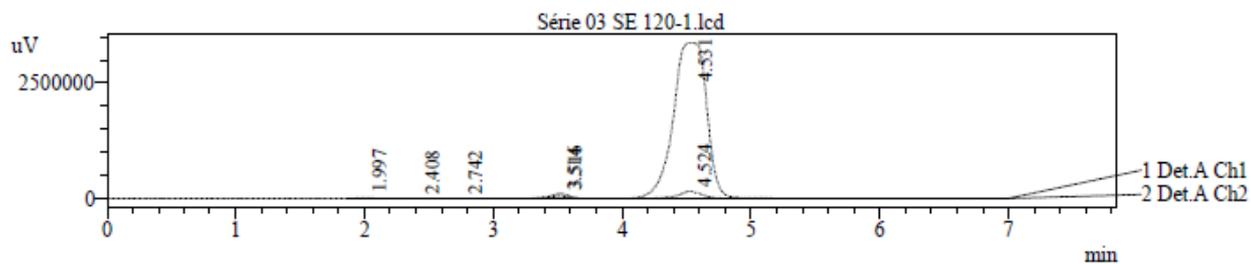
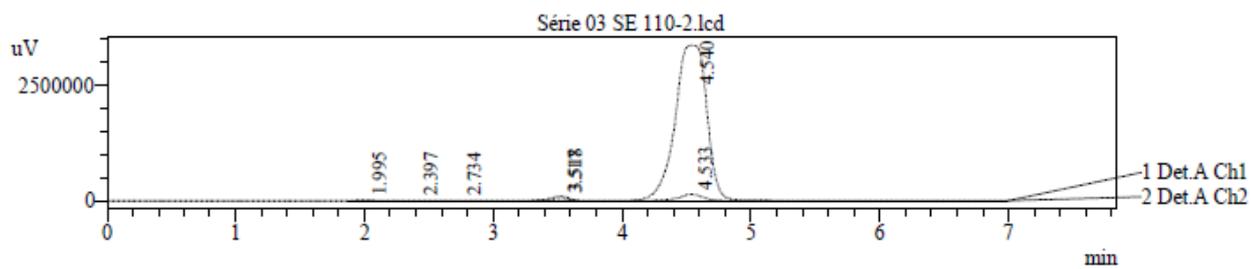


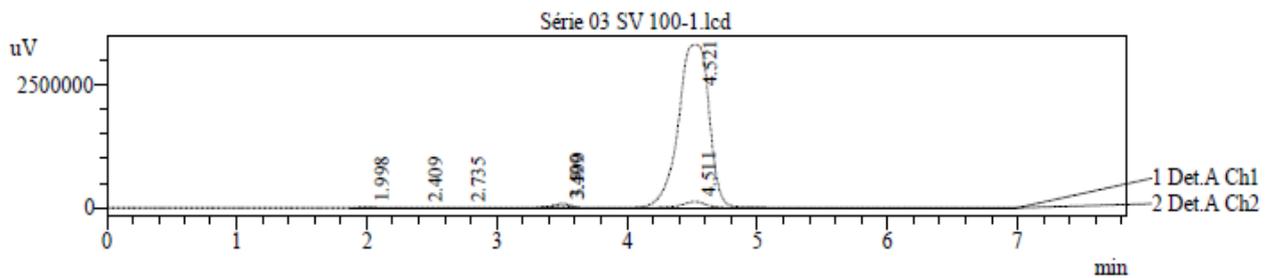
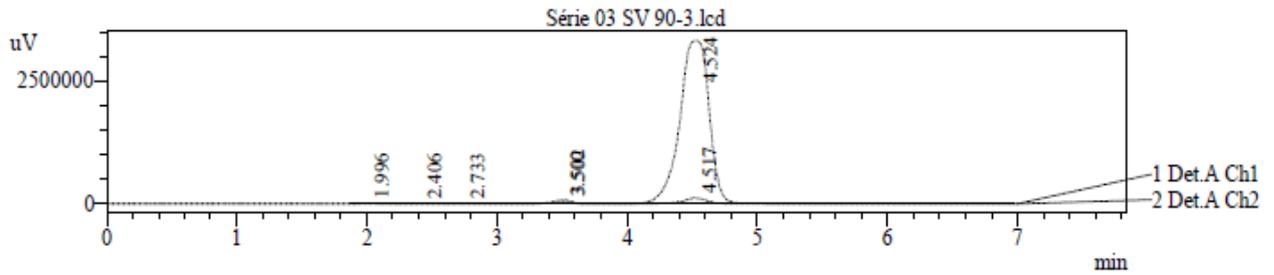
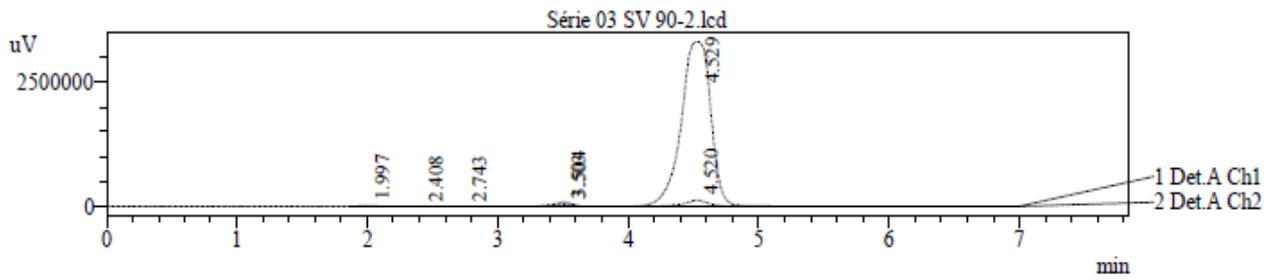
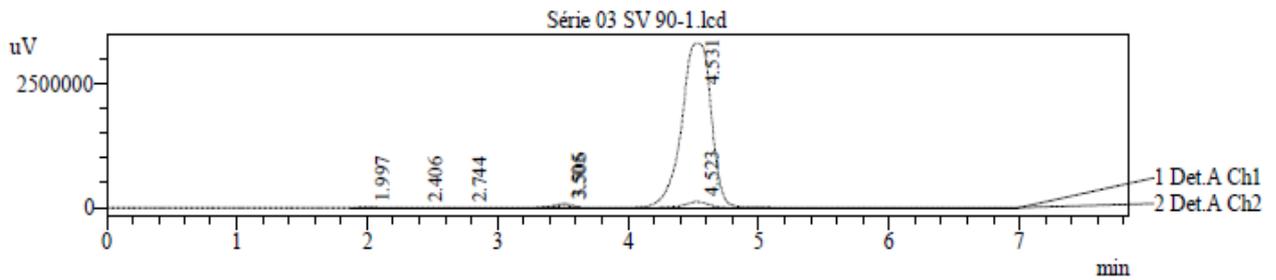
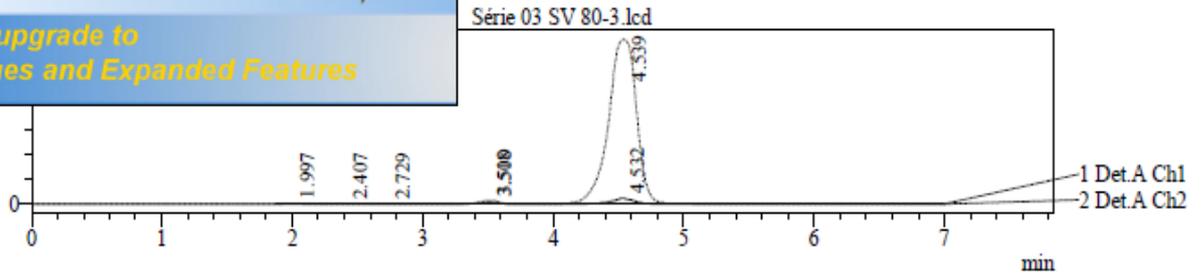
PDF
complete

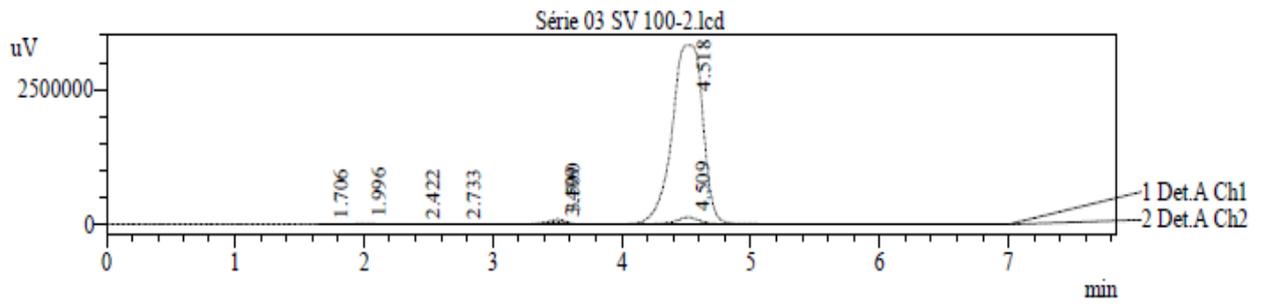
Your complimentary
use period has ended.
Thank you for using
PDF Complete.

Upgrade to
Full Pages and Expanded Features





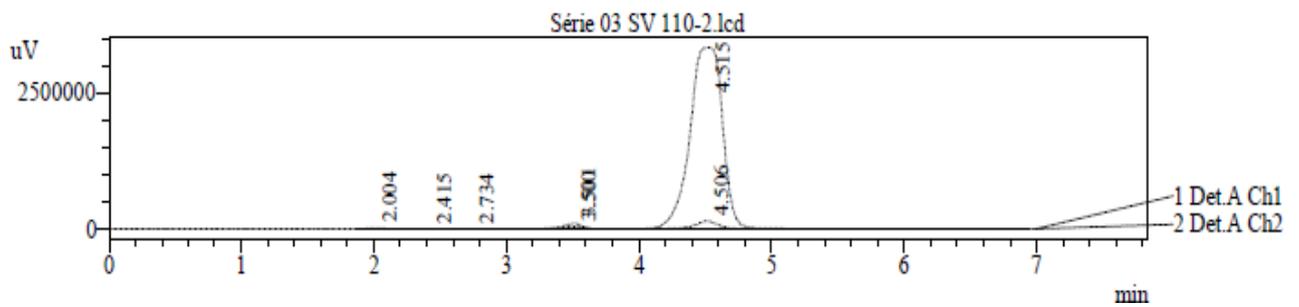
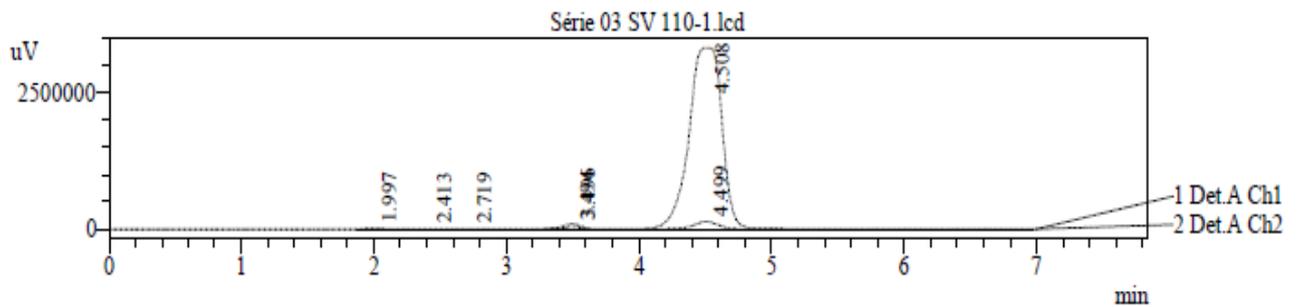
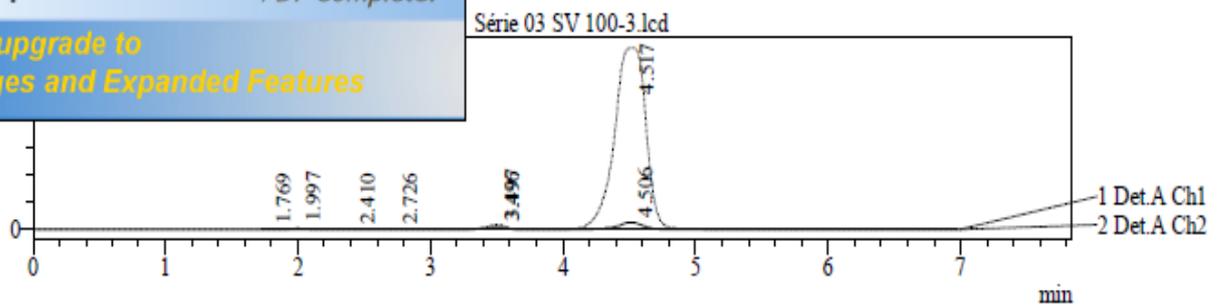


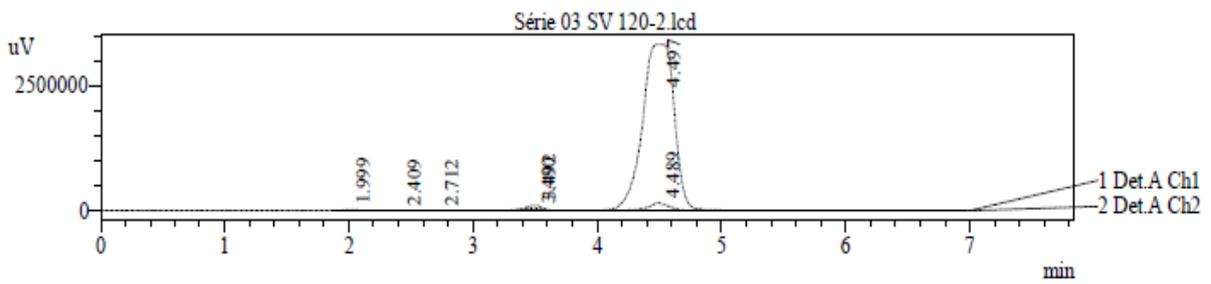
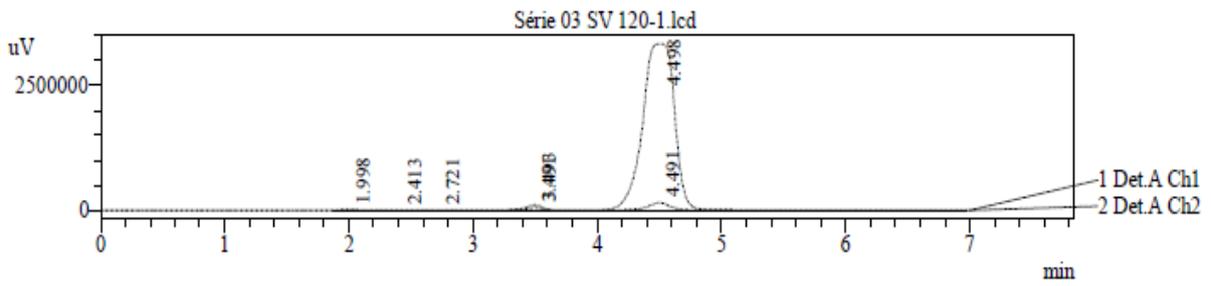
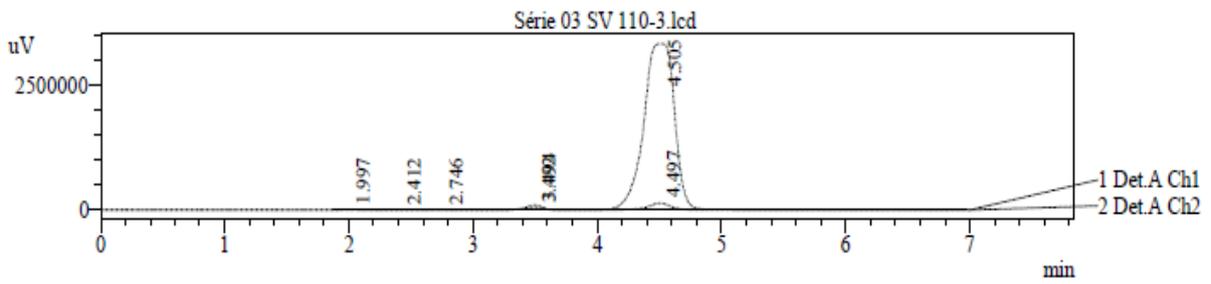


PDF
omplete

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

Upgrade to
Full Pages and Expanded Features

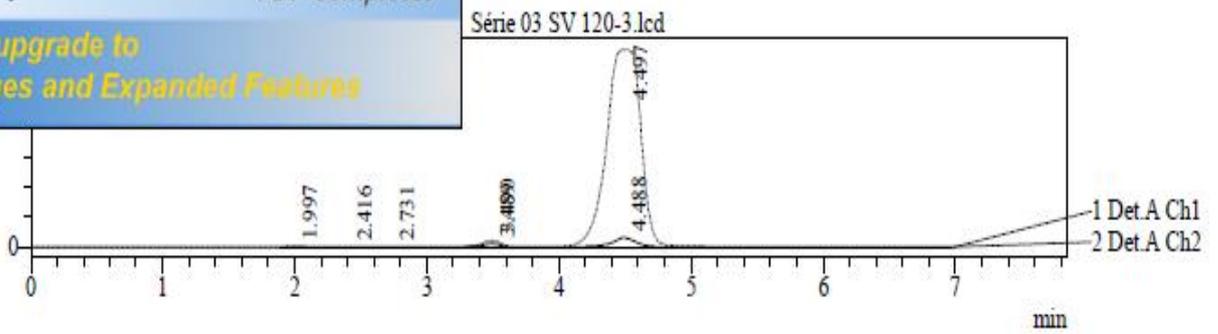




PDF
omplete

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

Upgrade to
Full Pages and Expanded Features



<< Detector A >>

ID#1 Compound Name: setagliptine

Title	Sample Name	Sample ID	Ret. Time	Area	Height	Conc.
Série 03 SE 80-1.lcd	SE	SE	3.528	323103	31326	0.000
Série 03 SE 80-2.lcd	SE	SE	3.531	320309	31654	0.000
Série 03 SE 90-1.lcd	SE	SE	3.529	362449	35910	0.000
Série 03 SE 90-2.lcd	SE	SE	3.526	361079	35835	0.000
Série 03 SE 100-1.lcd	SE	SE	3.523	402813	40057	0.000
Série 03 SE 100-2.lcd	SE	SE	3.521	414395	41244	0.000
Série 03 SE 110-1.lcd	SE	SE	3.524	438576	43733	0.000
Série 03 SE 110-2.lcd	SE	SE	3.517	432298	43177	0.000
Série 03 SE 120-1.lcd	SE	SE	3.514	491811	49368	0.000
Série 03 SE 120-2.lcd	SE	SE	3.512	489956	49147	0.000
Série 03 SV 80-1.lcd	SE	SV	3.510	331454	33291	0.000
Série 03 SV 80-2.lcd	SE	SV	3.511	332410	33413	0.000
Série 03 SV 80-3.lcd	SE	SV	3.508	336580	33874	0.000
Série 03 SV 90-1.lcd	SE	SV	3.505	363268	36714	0.000
Série 03 SV 90-2.lcd	SE	SV	3.503	364385	36893	0.000
Série 03 SV 90-3.lcd	SE	SV	3.500	362812	36720	0.000
Série 03 SV 100-1.lcd	SE	SV	3.499	403957	40947	0.000
Série 03 SV 100-2.lcd	SE	SV	3.499	416936	42360	0.000
Série 03 SV 100-3.lcd	SE	SV	3.496	406841	41399	0.000
Série 03 SV 110-1.lcd	SE	SV	3.494	443799	45122	0.000
Série 03 SV 110-2.lcd	SE	SV	3.500	437831	44534	0.000
Série 03 SV 110-3.lcd	SE	SV	3.492	441235	44892	0.000
Série 03 SV 120-1.lcd	SE	SV	3.491	487821	49551	0.000
Série 03 SV 120-2.lcd	SE	SV	3.490	486510	49561	0.000
Série 03 SV 120-3.lcd	SE	SV	3.489	488137	49780	0.000
Average			3.508	405631	40820	0.000
%RSD			0.383	14.173	14.781	0.000
Maximum			3.531	491811	49780	0.000
Minimum			3.489	320309	31326	0.000
Standard Deviation			0.013	57488	6034	0.000

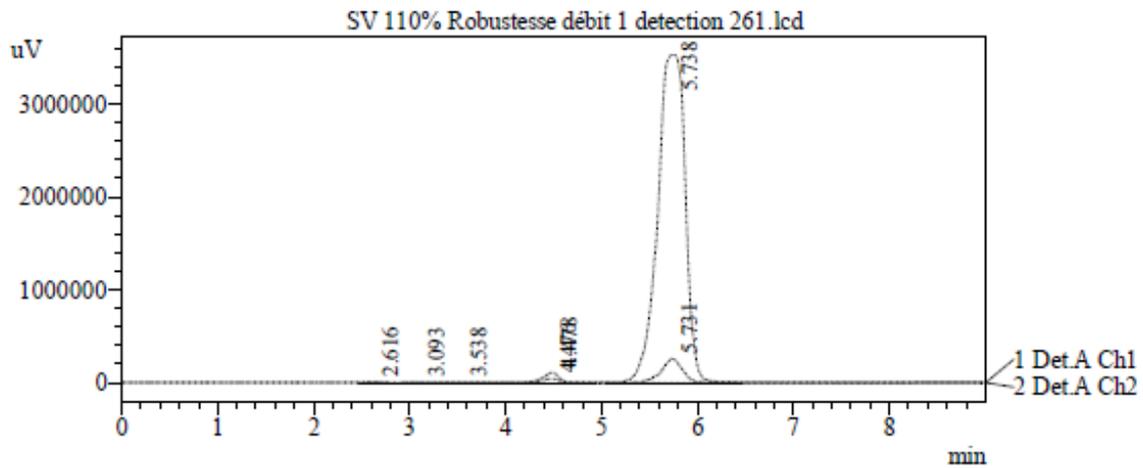
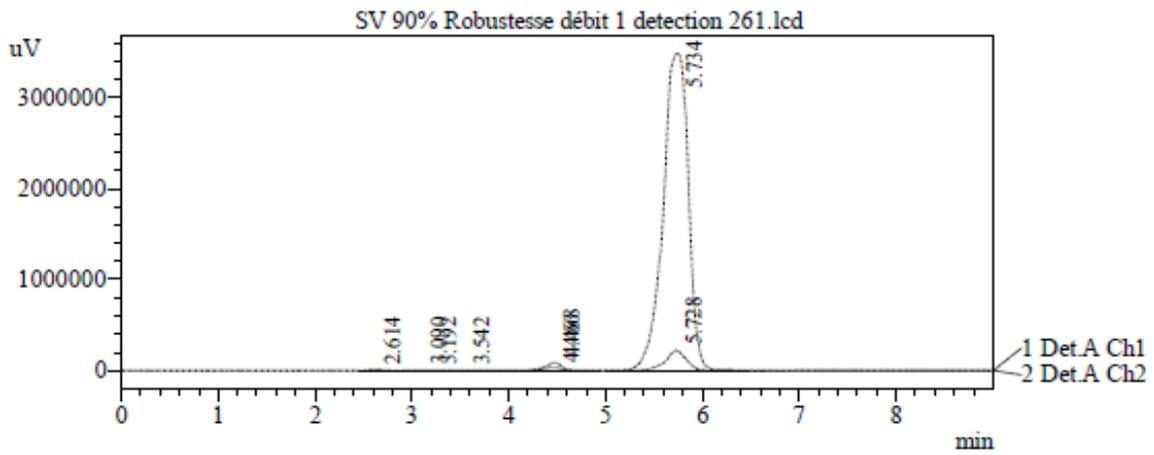
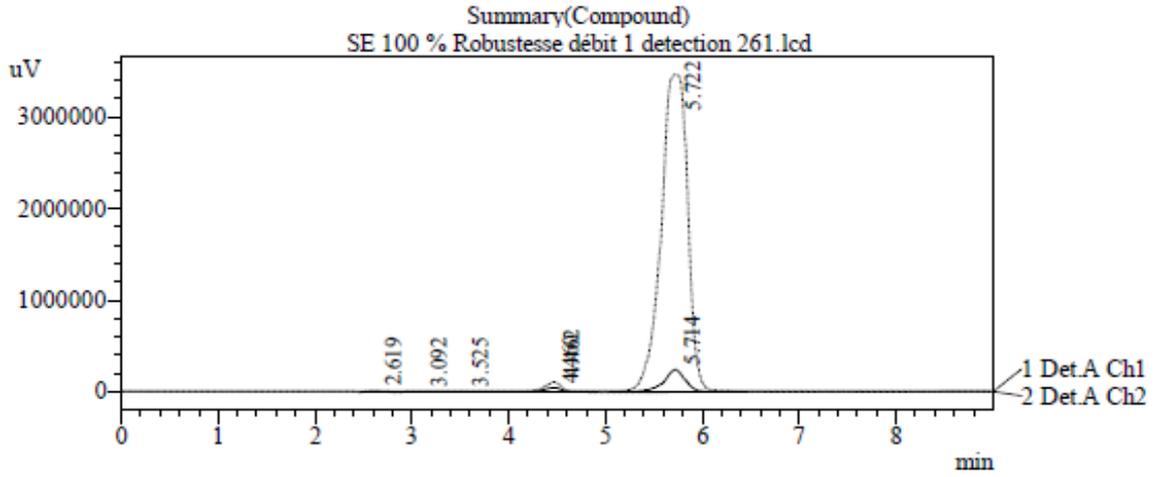
ID#2 Compound Name: metformine

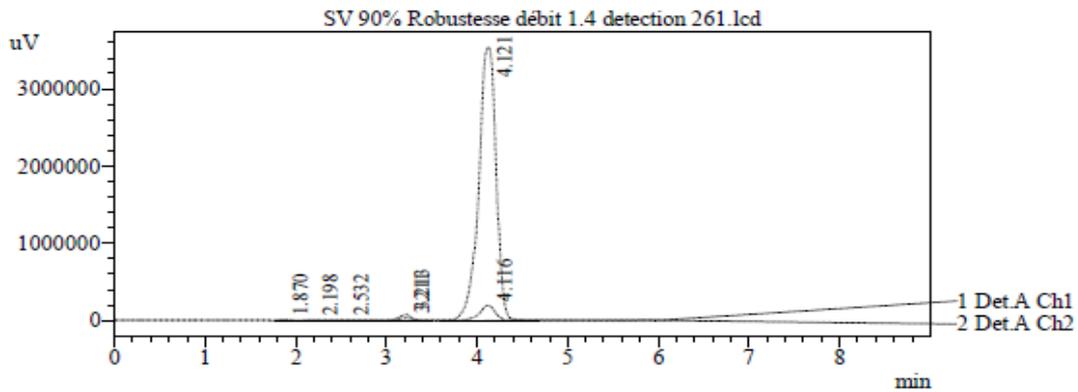
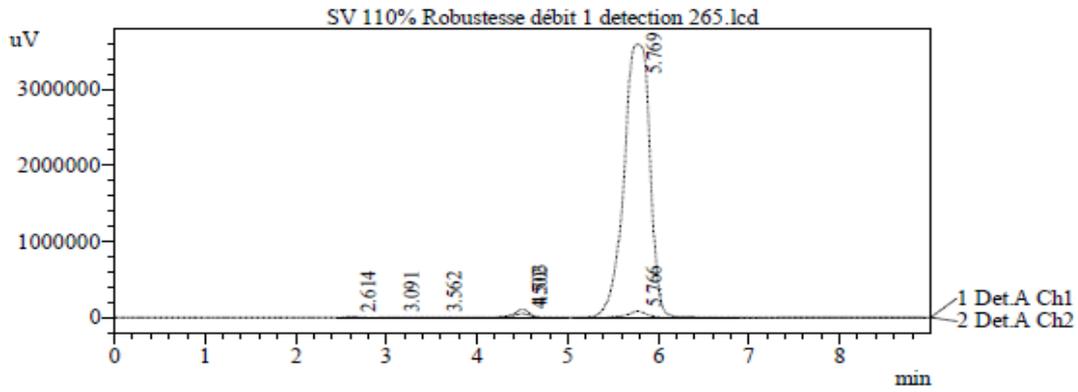
Title	Sample Name	Sample ID	Ret. Time	Area	Height	Conc.
Série 03 SE 80-1.lcd	SE	SE	4.452	1312689	102115	0.000
Série 03 SE 80-2.lcd	SE	SE	4.568	1274833	99598	0.000
Série 03 SE 90-1.lcd	SE	SE	4.559	1455666	113489	0.000
Série 03 SE 90-2.lcd	SE	SE	4.555	1463267	114685	0.000
Série 03 SE 100-1.lcd	SE	SE	4.546	1633315	127443	0.000
Série 03 SE 100-2.lcd	SE	SE	4.543	1658110	129252	0.000
Série 03 SE 110-1.lcd	SE	SE	4.540	1773499	138241	0.000
Série 03 SE 110-2.lcd	SE	SE	4.533	1749159	136485	0.000
Série 03 SE 120-1.lcd	SE	SE	4.524	1934431	150797	0.000
Série 03 SE 120-2.lcd	SE	SE	4.522	1896767	147951	0.000
Série 03 SV 80-1.lcd	SE	SV	4.537	1332622	105893	0.000
Série 03 SV 80-2.lcd	SE	SV	4.536	1337147	105846	0.000
Série 03 SV 80-3.lcd	SE	SV	4.532	1342180	106586	0.000
Série 03 SV 90-1.lcd	SE	SV	4.523	1490643	118189	0.000
Série 03 SV 90-2.lcd	SE	SV	4.520	1492892	118672	0.000
Série 03 SV 90-3.lcd	SE	SV	4.517	1483401	117890	0.000
Série 03 SV 100-1.lcd	SE	SV	4.511	1629145	129293	0.000
Série 03 SV 100-2.lcd	SE	SV	4.509	1666886	131963	0.000
Série 03 SV 100-3.lcd	SE	SV	4.506	1626656	129325	0.000
Série 03 SV 110-1.lcd	SE	SV	4.499	1792056	141834	0.000
Série 03 SV 110-2.lcd	SE	SV	4.506	1760313	139782	0.000
Série 03 SV 110-3.lcd	SE	SV	4.497	1774391	140698	0.000
Série 03 SV 120-1.lcd	SE	SV	4.491	1913872	151056	0.000
Série 03 SV 120-2.lcd	SE	SV	4.489	1909808	151397	0.000
Série 03 SV 120-3.lcd	SE	SV	4.488	1922219	151777	0.000
Average			4.520	1625039	128010	0.000
%RSD			0.581	13.236	13.188	0.000
Maximum			4.568	1934431	151777	0.000
Minimum			4.452	1274833	99598	0.000



Robustesse



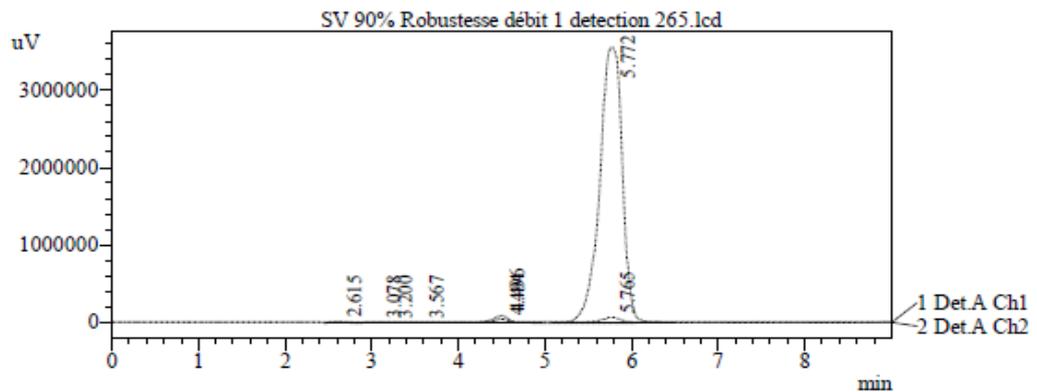
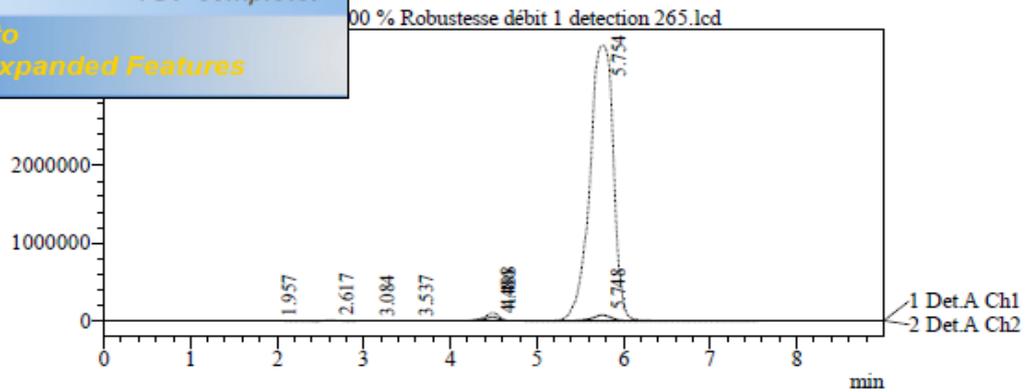


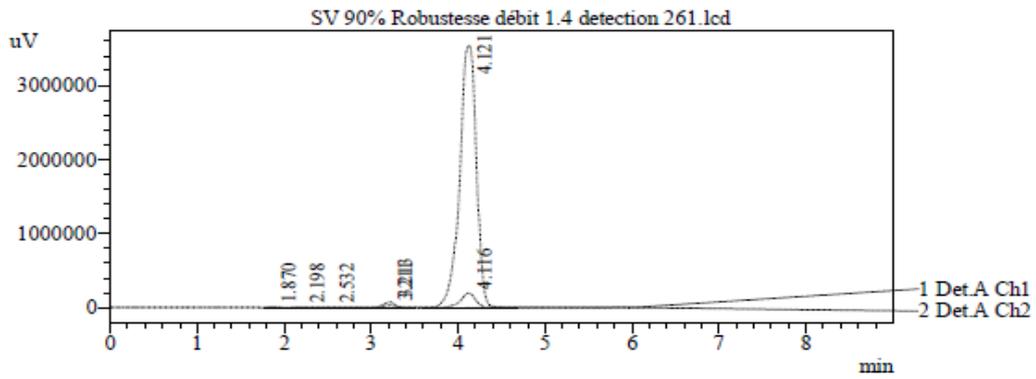
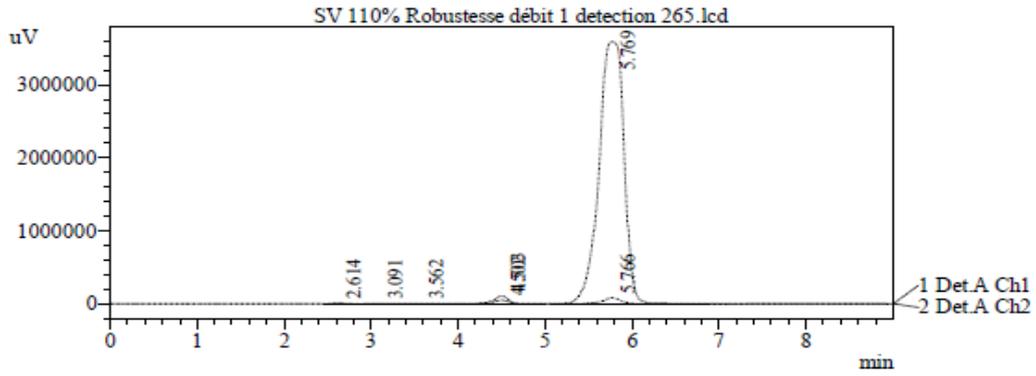


PDF
complete

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

Upgrade to
Pages and Expanded Features

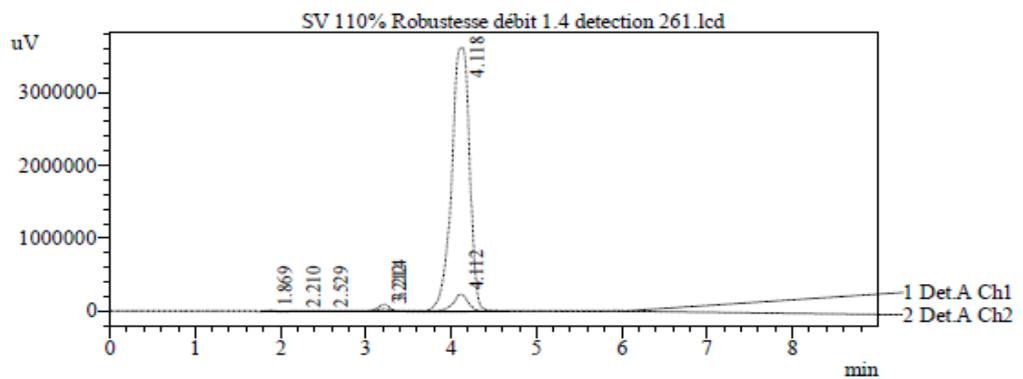
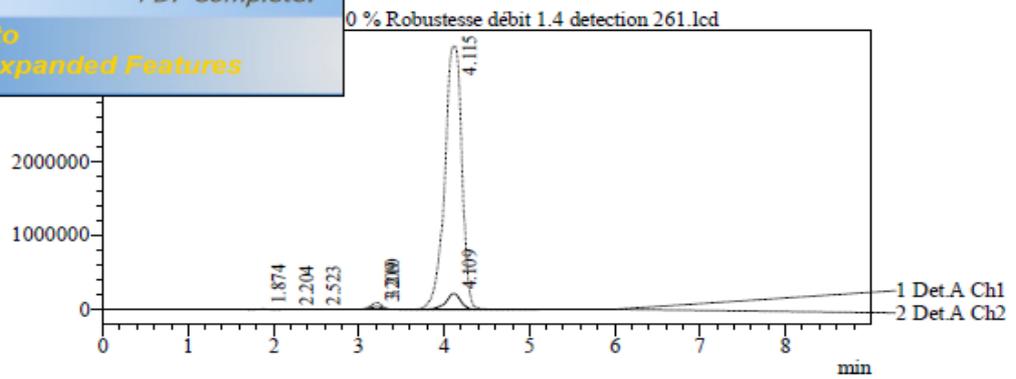


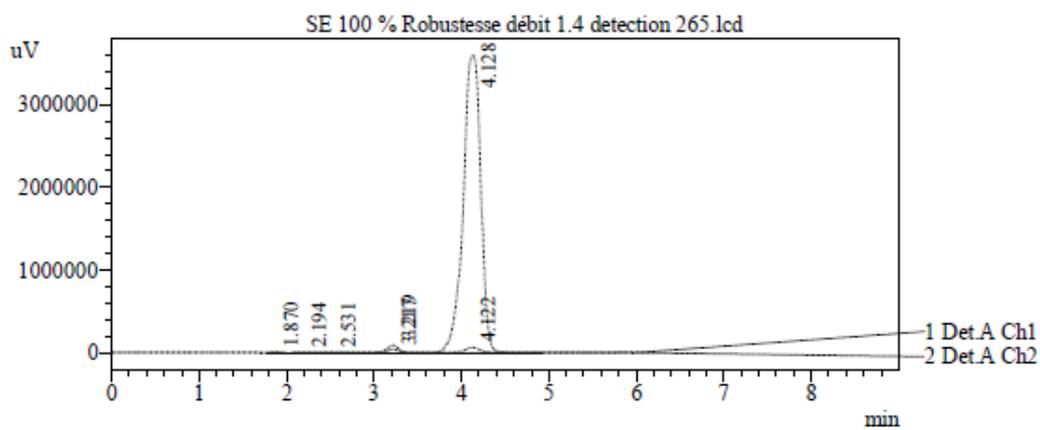
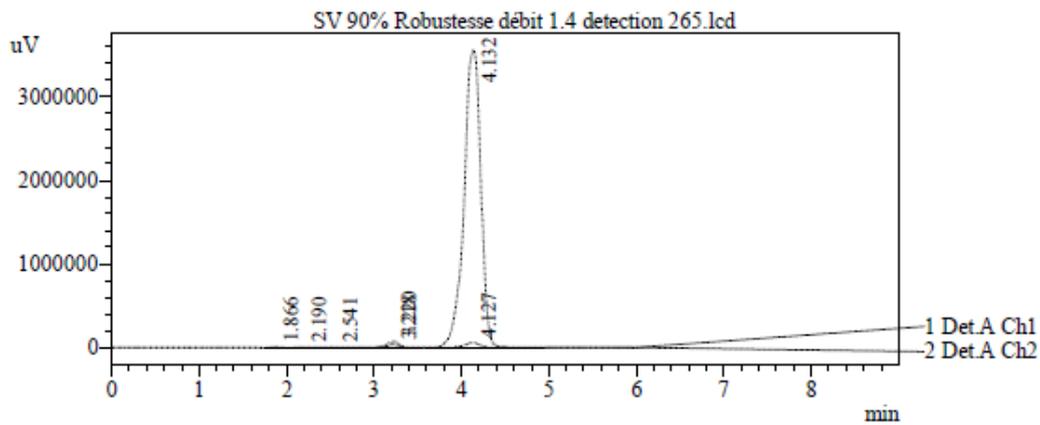


PDF
complete

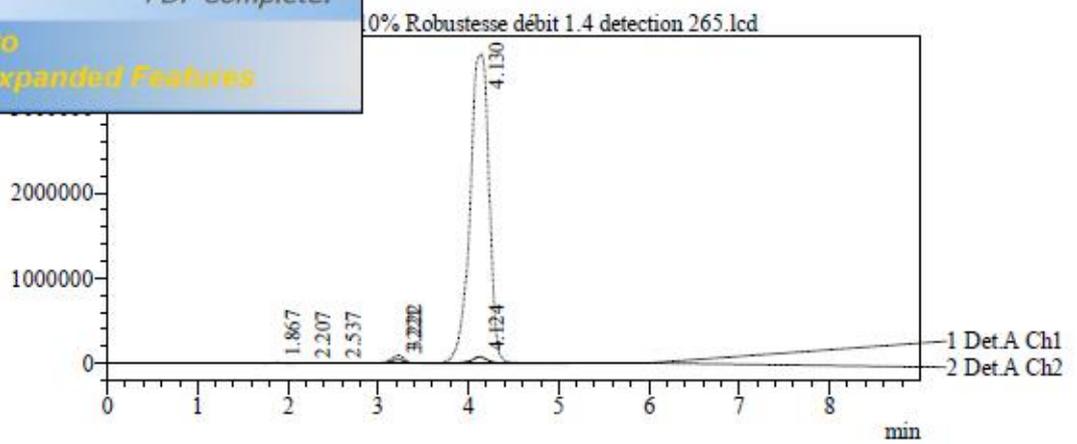
Your complimentary
use period has ended.
Thank you for using
PDF Complete.

to upgrade to
Pages and Expanded Features





PDF Complete
 Your complimentary use period has ended.
 Thank you for using PDF Complete.
 Upgrade to **Pages and Expanded Features**



Résumé

Avant l'autorisation de mise sur le marché d'un médicament, le contrôle analytique est une étape importante et nécessaire pour garantir la qualité du produit qui va être délivré aux patients. Les laboratoires pharmaceutiques sont tenus de prouver que les méthodes utilisées lors de ce contrôle sont parfaitement valides et fiables, en procédant à leur validation.

L'objectif de notre étude est de mettre au point et valider une méthode de dosage simultané de deux antidiabétiques oraux : metformine et sitagliptine par CLHP. La méthode analytique a été validée selon l'approche du profil d'exactitude développé par la commission de la société française des sciences et techniques pharmaceutiques SFSTP 2006 comme un moyen de décision qui permet de prévoir avec quelle garantie une proportion donnée des résultats futurs obtenus avec la méthode seront compris dans des limites d'acceptabilité fixées au préalable.

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

Mots clefs : Metformine, sitagliptine, CLHP, validation analytique, SFSTP, profil d'exactitude.

Abstract

Before the marketing authorization of a medicine, the analytical control is an important and necessary step to guarantee the quality of the product that will be delivered to patients. Pharmaceutical laboratories are required to prove that the methods used in this test are perfectly valid and reliable, by validating them.

The objective of our study is to develop and validate a method of simultaneous dosing of two oral antidiabetic agents: metformin and sitagliptin by HPLC. The analytical method has been validated according to the approach of the accuracy profile developed by the commission of the French Society of Sciences and Pharmaceutical Technics FSSP 2006 as a means of decision making that makes it possible to foresee with which guarantee a given proportion of the future results obtained with the method will be included within limits of acceptability established in advance.

The results obtained prove that all the specific requirements developed in this harmonized approach are fulfilled, which means the method is specific, linear, faithful, fair, accurate and robust, which attests the validity of the proposed method in our work for routine use.

Keywords: Metformin, sitagliptin, CLHP, analytical validation, SFSTP, accuracy profile