

Ministère de l'Enseignement
Supérieur et de la Recherche
Scientifique
Université Mouloud MAMMERI
de Tizi Ouzou
FACULTE DE MEDECINE
Département de pharmacie



وزارة التعليم العالي والبحث العلمي
جامعة مولود معمري بتيزي وزو
كلية الطب
قسم الصيدلة

٢٠٢٠/١١/١٠

N° D'ORDRE :

MEMOIRE DE FIN D'ETUDES

En vue de l'obtention du diplôme de Docteur en Pharmacie
Intitulé ;

**Les différentes approches de validation analytique en
industrie pharmaceutique : étude comparative et application
au dosage du piroxicam dans des comprimés de 20 mg**

KADI Billal

Réalisé par :
MESSAAD Ahmad

INGARACHEN Yasmina

Encadré par : Pr M. MAMOU

Co-encadré par : Dr A. ABDENNOURI

Présenté et soutenu publiquement le 22/10/2020

Devant le jury composé de ;

Nom et Prénoms	Grade	Qualité	Etablissement
BENSISAID Hassane	MAHU	Président	UMMTO
TIGHRINE Abderrahmane	MAB	Examineur	Université de BOUIRA
BOURSOUTI Mourad	Assistant	Examineur	CHU Tizi-Ouzou
MAMOU Marzouk	MCA HU	Promoteur	UMMTO
ABDENNOURI Abdelhamid	Résident	Co-promoteur	UMMTO

Année universitaire 2019/2020

Dédicaces

*Je dédie ce modeste travail :
A ma très chère maman **Fatiha**,
A mon très cher père **Ali***

Aucune dédicace ne saurait exprimer mon respect, mon amour éternel et ma considération pour les sacrifices que vous avez consenti pour mon instruction et mon bien être.

Je vous remercie pour tout le soutien et l'amour que vous me portez depuis mon enfance.

Puisse Dieu, le très Haut, vous accorde santé, bonté, longue vie Inshallah et que la réussite soit toujours à ma portée pour que je puisse vous combler de bonheur.

*À mon adorable frère **Wassim**, et mes chères sœurs **Wissam** et **Djahida**. Qui n'ont jamais cessé de me soutenir et m'encourager*

*À ma chère tante **Aïcha** qui m'a toujours aimé et comblé par sa bénédiction, que dieu le tout puissant te garde pour moi.*

*À ma **grand-mère maternelle** Qui m'a accompagné par ses prières puisse Dieu lui prêter longue vie et beaucoup de santé et de bonheur.*

*Mes chers oncles paternels **Belkacem** et **Vava Moh**, mon cher oncle maternel **kamel** vous vous êtes toujours souciés de moi ; que dieu vous garde pour moi.*

*A mes chers cousins et cousines qui cherchaient à avoir mes nouvelles : **Rafik**, **Nabil**, **Zahir**, **Momad**, **Mimid**, **Fares**, **Sliman**, **Razik**, **Fazia**, **Nora**, **Fatiha** vous étiez une source d'énergie pour moi.*

*A toute la famille **KADI***

*A mes chers amis : **Yacine**, **Marouane**, **Kouki**, **lylia**, **Arezki**, **yasmine**, **Massi**, **Fodil**, **Azzedine**, **Faiz**, **Meriem**, **Sofiane**, **Nassim**, **Mehdi**, **Tina**, **Mbarek***

*et plus particulièrement **Oualid** et **Idir** qui m'ont toujours soutenu et encouragé durant toutes les années passées ensemble.*

***Alafleur** qui m'a encouragé et a su me soutenir à surmonter les obstacles rencontrés, ce travail témoigne mon estime et mon affection*

*A toi mon binôme **Ahmed** ensemble mon frère ; nous avons pu mener ce travail à terme.*

A tous ceux que j'aime et qui m'aiment

BILLAL

Dédicaces

Je dédie ce mémoire de fin d'étude :

*A la mémoire de mon très cher **père** parti si tôt, qui quoiqu'il n'y'est plus a su prendre soin de moi et me guider quand il faisait nuit vers la lumière du jour. J'espère que tu vas apprécier cet humble travail comme preuve de reconnaissance et d'affection. Que dieu le tout puissant puisse t'accueillir dans son vaste paradis.*

*A toi **ma meilleure** ; quoique je fasse je ne saurai exprimer ma gratitude et mon amour indéfectibles. **Maman** tu as été pour moi tout au long de mes études le plus grand symbole d'amour et de dévouement qui n'a ni cessé ni diminué.*

En ce jour, j'espère réaliser l'un de tes rêves, et j'espère ne jamais te décevoir, ni trahir ta confiance. Que dieu te garde et te procure santé, bonheur, et longue vie pour que tu demeurerai à jamais le flambeau illuminant le chemin de tes enfants.

*A mon cher frère **Toufik** qui a toujours été là pour moi. Puisse dieu, te tout haut, te procurer santé, bonheur et réussite.*

A ma chère famille, mes amis et toutes personnes connaissant mon humble personne ; ce modeste travail est témoin de ma gratitude et mon affection.

A toute ma promo (pharmacie. UMMTO 2014) ; ce fut un plaisir de partager tant d'années avec vous, je vous souhaite plein de réussites.

*A mon cher ami et binôme **Billal** ; ton amitié sans faille et ton soutien font que je suis ravi d'avoir croisé ton chemin dans le train de la vie.*

A mon autre moitié, ta présence est le plus beau des cadeaux, ton soutien indéfectible fait que ce travail soit témoin de mon affection.

A toutes les personnes qui me sont chères ; sans citer de noms car elles sont innombrables, je vous souhaite tout le bonheur du monde

AHMED

Dédicaces

Je dédie cet évènement marquant de ma vie

A mes chers parents, pour tous leurs sacrifices, leur amour, leur tendresse, leur soutien et leurs prières tout au long de mes études,

A mes chères sœurs Assia, Linda pour leurs encouragements permanents, et leur soutien moral,

A mon cher frère, Amirouche, pour son appui et son encouragement,

A mes amis, qui étaient toujours là pour moi, à m'encourager, à m'aider à réviser et surtout à tenir le coup,

A toute ma famille pour leur soutien tout au long de mon parcours universitaire,

Que ce travail soit l'accomplissement de vos vœux tant allégués, et le fruit de votre soutien infailible,

Merci d'être toujours là pour moi

YASMINA

REMERCIEMENTS

Nous remercions en premier lieu Dieu de nous avoir donné le courage et la volonté pour réaliser ce travail.

Nous voudrions remercier très sincèrement notre promoteur Professeur MAMOU.M maitre de conférences hospitalo-universitaire en Chimie-Analytique au département pharmacie de la faculté de médecine de Tizi-Ouzou pour nous avoir encadré, suivi, conseillé, aidé durant ce mémoire et tout le cursus universitaire.

Nous tenons à remercier énormément Docteur A. ABDENNOURI résident en chimie analytique du CHU Tizi – Ouzou /UMMTO pour sa disponibilité, ses conseils précieux tout au long de ce travail ainsi que pour sa grande patience. Nous n’oublierons pas votre gentillesse et soutien, votre bienveillance qui nous a permis de surmonter les difficultés rencontrées.

Nous remercions également tout le personnel du laboratoire de chimie analytique pour l’aide fournie à l’accomplissement de ce travail.

Merci aux membres de jury pour l’honneur qu’ils nous ont attribué en acceptant d’évaluer et examiner notre travail.

TABLE DES MATIERES

Table de matière.....	i
Liste des abréviations.....	v
Liste des figures.....	vi
Liste des tableaux.....	vii
Introduction générale.....	01
Problématique.....	02
Objectifs.....	03
PARTIE THEORIQUE	
Chapitre I : PIROXICAM	
1 Définition.....	04
2 Propriétés physicochimiques.....	04
2.1 Structure chimique	04
2.2 Propriétés pharmacologiques.....	04
2.2.1 Propriétés pharmacocinétiques	04
2.2.2 Propriétés pharmacodynamiques	05
2.2.3 Mécanisme d'action	05
3 Indications thérapeutiques :.....	05
4 Surdosage.....	06
Chapitre II : VALIDATION ANALYTIQUE	
1 Historique.....	07
2 Définition	09
3 But de la validation :	09
4 Aspect réglementaire et normatif.....	10
4.1 Documents ISO 17025.....	10
4.2 Document ISO 5725	10
4.3 Documents ICH	10
4.4 Documents de la FDA (guidance for industry)	11
4.5 Guides de validation analytique : rapports des commissions de la SFSTP	11
5 Critères de validation	11
5.1 Spécificité/Sélectivité	12
5.2 Fonction de réponse.....	12
5.3 Exactitude	12
5.4 Linéarité.....	13
5.5 Fidélité.....	13
5.6 Justesse	13
5.7 Sensibilité	14
5.8 Limite de détection (LD)	14
5.9 Limite de quantification.....	14
5.10 Robustesse	14
6 Étude critique des différentes approches de validation.....	15
6.1 Différentes approches de validation	15
6.1.1 Le guide ICH	15
6.1.2 Le guide SFSTP	15
6.1.3 Guide de la FDA	16
6.1.4 Guide de l'EMA	16
6.1.5 Validation selon la norme	16
6.1.6 Approche de process capability.....	16
6.2 Etude critique et comparaison des différentes approches.....	17
6.2.1 Spécificité / Sélectivité	17
6.2.2 Fonction de réponse	18
6.2.3 Exactitude	19

TABLE DES MATIERES

6.2.4	Linéarité	20
6.2.5	Fidélité.....	21
6.2.6	Justesse	23
6.2.7	Limite de détection.....	24
6.2.8	Limite de quantification	26
6.2.9	Robustesse	27
7	Etude statistique de la validation analytique :	29
7.1	Selon les recommandations de la commission SFSTP 2006 :	29
7.1.1	Spécificité.....	29
7.1.2	. Fonction de réponse	32
7.1.3	Alignement des observations	33
7.1.4	Prédictions inverses.....	33
7.1.5	Calcul de la justesse et de la fidélité	34
7.1.5.1	Modèle	34
7.1.5.2	Justesse	36
7.1.5.3	Fidélité	36
7.1.6	Calcul de l'exactitude	36
7.1.6.1	Erreur totale et profil de l'erreur totale.....	37
7.1.7	Calcul de l'intervalle de tolérance	37
7.1.8	Profil d'exactitude et décision.....	38
7.1.8.1	Calcul.....	38
7.1.8.2	Choix de la fonction de réponse	39
7.2	Selon le guideline ICH Q2 (R1)	39
7.2.1	Spécificité.....	41
7.2.1.1	Comparaison des pentes des droites D1 et D2.	41
7.2.1.2	Comparaison des ordonnées à l'origine des droites D ₁ et D ₂	41
7.2.2	Linéarité	41
7.2.2.1	Étude statistique.....	41
7.2.2.1.1	Estimation d'une droite de régression linéaire	41
7.2.2.1.2	Calcul de la pente (b)	41
7.2.2.1.3	Calcul de l'ordonnée à l'origine (a)	42
7.2.2.1.4	Calcul du coefficient de corrélation :	42
7.2.2.1.5	Tests de comparaison de l'ordonnée à l'origine avec 0	42
7.2.2.1.6	Comparaison des ordonnées à l'origine des droites D ₁ et D ₂	42
7.2.2.1.7	Test d'homogénéité des variances	43
7.2.2.1.8	Test de l'existence d'une pente significative	43
7.2.2.1.9	Test de la validité de la droite de régression	43
7.2.2.2	Méthode de linéarisation	44
7.2.3	Exactitude.....	44
a)	Système de référence considéré	44
b)	Système de référence considéré	44
7.2.3.1	Vérification de l'homogénéité des variances liées	44
7.2.3.2	Test de validité des moyennes	45
7.2.3.3	Estimation du recouvrement moyen :	46
7.2.3.4	Estimation de l'intervalle de confiance :	46
7.2.4	Fidélité.....	46
7.2.4.1	Test d'homogénéité des variances (test de Cochran)	46
7.2.4.2	Test de Dixon :	46
7.2.4.3	Moyennes des groupes :	47
7.2.4.4	Étude des variances	47

TABLE DES MATIERES

7.3	Étude statistique de la validation analytique selon la guidelines FDA.....	47
7.3.1	Sélectivité :	47
7.3.2	Exactitude.....	48
7.3.3	Fidélité.....	49
PARTIE PRATIQUE		
1	Matériel et méthodes.....	51
1.1	Matériel	51
1.1.1	Matières premières	51
1.1.2	Réactifs.....	51
1.1.3	Appareillages et équipements.....	51
1.1.4	Verrerie et autres	52
1.2	Méthodes	53
1.2.1	Méthodologie de la validation.....	53
1.2.2	Choix du protocole de validation	53
1.2.3	Choix des paramètres de la validation.....	53
1.2.3.1	Domaines d'application et niveaux de concentration.....	53
1.2.3.	Limites d'acceptabilité (λ)	54
1.2.3.	Probabilité de confiance (β)	54
1.2.3.	Conditions expérimentales	54
1.2.3.	Préparation des solutions.....	54
1.2.3.	Conditions chromatographiques.....	55
1.2.4	Préparation de la feuille de calcul	56
2	Résultats	
2.1	Selon le rapport de la commission SFSTP 2006 :	57
2.1.1	Spécificité et effet matrice.....	57
2.1.1.1	Comparaison des chromatogrammes.....	57
2.1.1.2	Confirmation de la spécificité sur les deux gammes	58
2.1.1.3	Vérification de l'absence d'effet matrice et d'erreur systématique :.....	59
2.1.2	Fonction de réponse	60
2.1.2.1	Modèle : $y = ax$	60
2.1.2.2	Modèle : $y = ax + b$	61
2.1.2.3	Modèle : $\sqrt{y} = f(\sqrt{x})$	62
2.1.2.4	Modèle : $\ln y = f(\ln x)$	63
2.1.2.5	Critères de choix de la fonction de réponse.....	64
2.1.3	Alignement des observations	64
2.1.4	Prédictions inverses.....	66
2.1.5	Justesse	68
2.1.6	Fidélité.....	68
2.1.7	Erreur totale et profil d'erreur totale	69
2.1.8	Intervalle de tolérance	69
2.1.9	Profil d'exactitude	70
2.1.10	Linéarité	72
2.2	Selon ICH	74
2.2.1	Spécificité.....	74
2.2.2	Linéarité :	74
2.2.2.1	Test d'homogénéité des variances	74
2.2.2.2	Estimation des critères de la droite de régression.....	75
2.2.2.3	Test de l'existence d'une pente significative.....	75

TABLE DES MATIERES

2.2.2.4	Test de validité de la droite de régression	75
2.2.2.5	Test de comparaison de l'ordonnée à l'origine avec 0	75
2.2.2.6	Test de comparaison de la pente avec 0 :	76
2.2.2.7	Test des graphes des résidus	76
2.2.3	Exactitude.....	77
2.2.3.1	Test d'homogénéité des variances	79
2.2.3.2	Test de validité des moyennes	79
2.2.3.3	Estimation du recouvrement moyen :	79
2.2.3.4	Calcul de l'intervalle de confiance de recouvrement moyen :	79
2.2.4	Fidélité.....	79
2.2.4.1	Test d'homogénéité des variances :	81
2.2.4.2	La répétabilité	81
2.2.4.3	Fidélité intermédiaire.....	81
3	Discussion	
3.1	Selon le rapport de la commission SFSTP 2006	82
3.1.1	Spécificité.....	82
3.1.1.1	Comparaison des deux pentes a_1 et a_2	82
3.1.1.2	Comparaison des deux ordonnées à l'origine b_1 et b_2	82
3.1.2	Choix de la fonction de réponse	82
3.1.3	Critères de performance de la fonction de réponse choisie.....	82
3.1.3.1	Justesse	82
3.1.3.2	Fidélité	83
3.1.4	Critères de décision sur la validité de la méthode	83
3.1.4.1	Erreur totale	83
3.1.4.2	Profil d'exactitude	83
3.2	Selon l'approche de l'ICH.....	83
3.2.1	Spécificité.....	83
3.2.1.1	Comparaison des deux pentes b_1 et b_2	83
3.2.1.2	Comparaison des deux ordonnées à l'origine a_1 et a_2	83
3.2.2	Linéarité	84
3.2.2.1	Test d'homogénéité des variances	84
3.2.2.2	Estimation des critères de droite de régression	84
3.2.2.3	Test de l'existence d'une pente significative.....	84
3.2.2.4	Test de validité de la droite de régression	84
3.2.2.5	Test de comparaison de l'ordonnée à l'origine avec 0	85
3.2.2.6	Test de comparaison de la pente avec 0	85
3.2.2.7	Test des graphes des résidus	85
3.2.3	Exactitude :	85
3.2.3.1	Test d'homogénéité des variances	85
3.2.3.2	Test de validité des moyennes	85
3.2.3.3	Estimation du recouvrement moyen	85
3.2.3.4	Calcul de l'intervalle de confiance de recouvrement moyen :	86
3.2.4	Fidélité.....	86
3.2.4.1	Test d'homogénéité des variances :	86
	Conclusion général.....	87
	Perspectives	88
	Références bibliographiques	
	Annexes	
	Résumé	
	Abstract	

LISTE DES ABRÉVIATIONS

AINS = anti-inflammatoire non stéroïdien.

BPF = bonne pratique de fabrication.

C₁₈ = octadecylsilyl .

C_{max}= concentration maximale.

COX = cyclooxygénase.

EMA = European Medicines Agency.

FDA = food and drug administration.

GMP = good manufacturing practices.

HCl = acide chlorhydrique.

HPLC = High Performance Liquid Chromatography.

ICH = international conference of harmonization.

ISO = international standard organization.

LD = limite de détection.

LLOQ = lower limit of quantification.

LOQ = limit of quantification.

LQI = limite de quantification inférieure.

LQS = limite de quantification supérieure.

mG = milligramme.

mL = millimètre.

NA = non appliqué.

Na₂ HPO₄ = sodium phosphate dibasic.

P450 CYP2 C9 = cytochrome 2C9.

SFSTP = société française des sciences et techniques pharmaceutiques.

SI = standard interne.

SV = standard de validation.

T_{max} = temps maximum.

US = united states.

UV = ultra violet.

V₂ = Volume 2.

µg = microgramme.

3rd = third.

LISTE DES FIGURES

Numéro de la figure	Titre de la figure	Page
Figure 1	Structure chimique développée du piroxicam	04
Figure 2	Logigramme permettant de sélectionner un protocole de validation	31
Figure 3	HPLC (SHIMADZU LC20)	52
Figure 4	Chromatogramme du diluant non chargé de PA	57
Figure 5	Chromatogramme du diluant avec placebo non chargé de PA	57
Figure 6	Chromatogramme du standard d'étalonnage	57
Figure 7	Chromatogramme du standard de validation	57
Figure 8	Courbe de la fonction de réponse $y=ax$	60
Figure 9	Courbe de la fonction de réponse $y=ax+b$	61
Figure 10	Courbe de fonction de réponse $\sqrt{y}= (\sqrt{x})$	62
Figure 11	Courbe de fonction de réponse $\ln y=f(\ln x)$	63
Figure 12	Courbe du profil d'exactitude obtenu avec la fonction $y= ax$	70
Figure 13	Courbe du profil d'exactitude obtenu avec la fonction $y = ax+b$	70
Figure 14	Courbe du profil d'exactitude obtenu avec la fonction $\ln y = f(\ln x)$	71
Figure 15	Courbe du profil d'exactitude obtenu avec la fonction $\sqrt{Y} = f(\sqrt{X})$	71
Figure 16	Courbe de linéarité obtenue avec la fonction $y=ax+b$	73
Figure 17	Droit de régression	74
Figure 18	graphe des résidus	74

LISTE DES TABLAUX

Numéro du tableau	Titre	Page
Tableau I	Propriétés physiques et chimiques du Piroxicam	04
Tableau II	Comparaison de l'évolution de la réglementation entre l'Europe et les Etats-Unis	08
Tableau III	Comparaison du critère de spécificité dans les différents guidelines	17
Tableau IV	Comparaison du critère de fonction de réponse dans les différents guidelines	18
Tableau V	Comparaison du critère d'exactitude dans les différents guidelines	19
Tableau VI	Comparaison du critère de linéarité dans les différents guidelines	20
Tableau VII	Comparaison du critère de fidélité dans les différents guidelines	21
Tableau VIII	Comparaison du critère de justesse dans les différents guidelines	23
Tableau IX	Comparaison du critère de limite de détection dans les différents guidelines	25
Tableau X	Comparaison du critère de limite de quantification dans les différents guidelines	26
Tableau XI	Comparaison du critère de robustesse dans les différents guidelines	27
Tableau XII	Choix du nombre de standards d'étalonnage et de validation en fonction du protocole choisi	31
Tableau XIII	Exemples de fonctions de réponses	32
Tableau XIV	Règle d'alignement pour différentes fonctions de réponses	33
Tableau XV	Calcul des prédictions inverses pour différentes fonction de réponses	34
Tableau XVI	Principaux critères d'étude statistique de la validation analytique selon l'ICH Q2(R1)	40
Tableau XVII	Test de validité des moyennes	45
Tableau XVIII	Matières premières utilisées	51
Tableau XIX	Réactifs utilisés	51
Tableau XX	Appareillages utilisés	51
Tableau XXI	Verreries et autre matériel utilisés	52
Tableau XXII	Masses correspondantes pour chaque niveau de concentration des solutions mères	54
Tableau XXIII	Conditions chromatographiques de la méthode de dosage	55
Tableau XXIV	Résultats obtenus sur la gamme SE	58
Tableau XXV	Résultats obtenus sur la gamme SV	59
Tableau XXVI	Comparaison de deux pentes	59
Tableau XXVII	Résultats obtenus pour la fonction $y=ax$	60
Tableau XXVIII	Résultats obtenus pour la fonction $y=ax+b$	61
Tableau XXIX	Résultats Obtenus pour la fonction $y= (\sqrt{x})$	62
Tableau XXX	Résultats obtenus pour la fonction $\ln y=f(\ln x)$	63
Tableau XXXI	Alignement des observations	65
Tableau XXXII	Prédictions inverses obtenues avec le SV	67
Tableau XXXIII	Justesse calculée pour chaque niveau de concentration des standards de validation.	68
Tableau XXXIV	Fidélité calculée pour chaque niveau de concentration des standards de validation.	68
Tableau XXXV	Calcul de l'erreur totale pour chaque niveau de concentration des standards de validation	69
Tableau XXXVI	Calcul des limites de tolérance pour chaque niveau de concentration j.	69

LISTE DES TABLAUX

TableauXXXVII	Masses prédites en fonction des masses introduites	72
TableauXXXVIII	Test de Cochran pour vérifier l'homogénéité des variances	74
TableauXXXIX	Critères de la droite de régression	75
TableauXL	Test de l'existence d'une pente significative	75
TableauXLI	Test de la validité de la droite de régression	75
TableauXLII	Test de Student pour la comparaison de l'ordonnée à l'origine avec 0	76
Tableau XLIII	Test de Student pour la comparaison de la pente avec 0	76
Tableau XLIV	Les données brutes de la procédure d'analyse	78
Tableau XLV	Test de Cochran pour vérifier l'homogénéité des variances	79
Tableau XLVI	Test de Fisher pour la validité des moyennes	79
Tableau XLVII	Les données brutes de l'étude de la fidélité	80
Tableau XLVIII	Test de Cochran pour vérifier l'homogénéité des variances	81
Tableau XLIX	Données calculées de la fidélité	81

Introduction

INTRODUCTION

Le développement d'un médicament passe par plusieurs étapes, la découverte de la molécule active, les essais de laboratoires, les études précliniques, les essais cliniques et les enregistrements réglementaires. Avant sa mise sur le marché, les agences réglementaires exigent que le médicament soit testé sur son origine, son dosage, sa pureté et sa stabilité.

Les laboratoires pharmaceutiques doivent d'un point de vue éthique, de produire et de mettre sur le marché des médicaments d'un haut degré de qualité, ces obligations réglementaires et commerciales exigent de mettre en place un système d'assurance qualité à tous les niveaux de l'entreprise depuis le développement du médicament jusqu'à sa mise sur le marché. Cette notion essentielle de qualité impose la nécessité de la validation. Elle est effectuée en se basant sur des principes scientifiques afin d'établir la respectabilité des méthodes et d'assurer la conformité du médicament. En effet, si la validité d'une méthode analytique n'est pas confirmée, la décision de conformité ou non des produits finis basée sur les données obtenues par le contrôle qualité en utilisant cette procédure analytique devient contestables.

C'est pourquoi l'assurance de la fiabilité de la méthode garantie par la validation est non seulement une exigence réglementaire, mais également un critère essentiel de l'assurance de la qualité.

Afin d'établir des règles et des normes de qualité, les organismes de santé mondiale ont pu proposer des approches de validation optimisant la qualité, la sécurité et même le coût des médicaments, bénéfiques à la fois aux patients acheteurs et aux organismes de l'industrie pharmaceutique [1].

Pour cela, toute nouvelle méthode d'analyse mise en œuvre au sein d'un laboratoire doit systématiquement faire l'objet d'une validation analytique, avant sa mise en routine, cette dernière repose sur un ensemble de mesures expérimentales, de tests statistiques qui permettent de prouver qu'une procédure est suffisamment exacte et fiable, et de nos jours une nouvelle tendance et de nouveaux concepts scientifiques apparaissent et proposent de revoir les bases mêmes de la validation analytique pour une démarche harmonisée, avec notamment l'apparition de l'utilisation de profil d'exactitude comme outil de décision, permettant de simplifier l'approche de la validation d'une procédure analytique tout en contrôlant le risque associé à son utilisation [1],[2].

Ce travail vient mettre le point sur plusieurs principes et fondements de la validation mettant en exergue leurs différences et leurs qualités, exposant un exemple de plusieurs approches de validation de méthodes analytiques, en s'intéressant particulièrement à la mise au point et la validation des méthodes de dosage par HPLC du Piroxicam.

Le présent manuscrit est structuré en deux parties ;

La première partie est bibliographique, elle est subdivisée en deux chapitres, un chapitre dédié au piroxicam et un autre qui traitera la validation analytique dans ses volets définition, réglementation avec une étude critique des différentes approches.

La seconde partie documentera le matériel et méthodes, les résultats obtenus avec les discussions qui en découlent. Enfin, nous finirons avec une conclusion et des perspectives.

Problématique

PROBLEMATIQUE

Le contexte industriel actuel impose à de nombreuses entreprises de démontrer que l'ensemble des procédés et des méthodes utilisées dans l'évaluation d'un produit manufacturé conduisent effectivement au résultat recherché. L'industrie pharmaceutique n'échappe pas à cette règle et ses laboratoires de contrôle qualité sont tenus de prouver que les méthodes d'analyse employées sont parfaitement valides et fiables, ce qui fait que la validation est une exigence réglementaire et une étape indispensable dans le cycle de vie des médicaments. Les fabricants des médicaments sont tenus de définir le travail de validation à effectuer, en vue de démontrer qu'ils contrôlent les aspects critiques de leurs méthodes et opérations spécifiques [3].

Pour cela, il existe diverses réglementations relatives aux bonnes pratiques BPF, GMP, et autres documents à caractère normatif ISO, ICH, EMEA. En effet, on est confronté à plusieurs approches de validation analytique dans la littérature et dans les différents textes réglementaires sans qu'il y ait un protocole harmonisé.

Cette absence d'harmonisation est problématique de point de vue pratique, dans notre travail, nous nous interrogerons sur la meilleure approche de validation analytique ce qui nous a mené à étudier puis comparer les différents protocoles et d'en déduire celui adéquat à chaque type d'analyse.

Objectifs

OBJECTIFS

L'objectif principal de notre travail est de documenter les différentes approches de validation analytique avec une comparaison suivie d'une étude critique de ces approches. L'étude est concrétisée par la validation de la méthode de dosage du piroxicam dans des comprimés de 20 mg par HPLC.

PARTIE THEORIQUE

Chapitre I : Piroxicam

1 Définition

Le Piroxicam est un anti-inflammatoire non stéroïdien du groupe des oxicams. Il possède les propriétés : antalgique, antipyrétique et anti inflammatoire [4].

2 Propriétés physicochimiques

2.1 Structure chimique

Le Piroxicam est composé de groupes fonctionnels variés lui conférant de nombreuses propriétés physicochimiques. Les groupes les plus marqués sont le groupe amine –NH – lui assurant un caractère basique et les groupes OH responsable de l'acidité de la molécule. Le Piroxicam présente donc un comportement amphotère [6].

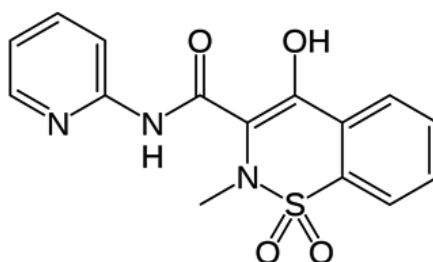


Figure 1:structure chimique développée du Piroxicam[6]

Le tableau I ci-dessous regroupe les principales propriétés physicochimiques du Piroxicam.

Table I:Propriétés physiques et chimiques du Piroxicam [5]

Formule brute	C₁₅H₁₃N₃O₄S
Masse molaire moléculaire	331.348 g.mol⁻¹
pKa	6,3
Point de fusion	198 -200°C
Pression de vapeur saturante	4,67×10⁻¹⁵mm Hg à 25 °C
Solubilité	23 mg/L eau à 20°C
Aspect en solution	Clair, jaune

2.2 Propriétés pharmacologiques

2.2.1 Propriétés pharmacocinétiques

Les données pharmacocinétiques du Piroxicam sont résumées dans les paragraphes ci-après ;

La pharmacocinétique du Piroxicam est linéaire. Diverses études ont montré l'absence de modification de la pharmacocinétique du Piroxicam en fonction de l'âge.

Absorption

Administré par voie orale, il est rapidement absorbé (demi-vie de résorption est d'environ 50 minutes).

La biodisponibilité globale et l'importance de l'absorption ne sont pas modifiées par l'alimentation, cette dernière retarde légèrement la vitesse d'absorption [4], [5].

Distribution

Après administration *per os* d'une gélule de Piroxicam 20 mg, on obtient un $C_{\max}$ de 1,85 µg/ml en 1 heure ($T_{\max}$) et de 3,72 µg/ml en 1 heure ($T_{\max}$) après administration de 40 mg.

La fixation aux protéines plasmatiques est importante : de l'ordre de 99 pour cent.

Le Piroxicam traverse rapidement la membrane synoviale, les taux synoviaux sont en moyenne, de 45 à 50 % des taux sanguins.

La liaison aux protéines du liquide synovial est la même que la liaison aux protéines plasmatiques.

Une étude préliminaire a montré que le Piroxicam est présent dans le lait maternel (environ 1 à 3 % des taux plasmatiques).

Métabolisme - Excrétion :

Le Piroxicam est éliminé lentement. Il est presque totalement métabolisé.

Moins de 5 % de la dose ingérée sont éliminés inchangés dans les urines et les fèces.

Le Piroxicam est métabolisé principalement par le cytochrome P450 CYP2C9 dans le foie.

Une des voies métaboliques importantes est l'hydroxylation du noyau pyridine de la chaîne latérale du Piroxicam, suivie d'une glycuco-conjugaison et d'élimination urinaire.

2.2.2 Propriétés pharmacodynamiques

Le Piroxicam est un anti-inflammatoire non stéroïdien du groupe des oxicams. Il possède les propriétés suivantes ;

Effet anti-inflammatoire, antalgique et un effet antipyrétique résultants de l'inhibition de la formation des prostaglandines.

- Effet anti-inflammatoire : Atténuation des phénomènes inflammatoires impliquant les prostaglandines (vasodilatation, œdème, douleur) sans effet sur les processus entraînant des lésions tissulaires chroniques.
- Effet antalgique : atténuation des douleurs d'origine périphérique.
- Effet antipyrétique : Diminution de la fièvre et retour à la normale de la température corporelle par abaissement du seuil du thermostat hypothalamique.

L'effet antiagrégant plaquettaire résulte de l'inhibition de la formation de thromboxane.

2.2.3 Mécanisme d'action

Par son action inhibitrice de la COX, le Piroxicam inhibe la transformation de l'acide arachidonique en prostaglandines ou thromboxanes.

3 Indications thérapeutiques :

Le Piroxicam est indiqué dans le traitement symptomatique de :

- Arthrose ;
- Polyarthrite rhumatoïde ;
- Spondylarthrite ankylosante.

En raison de son profil de tolérance, le Piroxicam ne doit pas être utilisé en traitement de première intention lorsqu'un traitement par AINS est indiqué. La décision de prescrire une spécialité contenant du Piroxicam doit être basée sur l'évaluation de l'ensemble des risques spécifiques à chaque patient [5].

4 Surdosage

Un surdosage sévère peut conduire à une hypertension, une insuffisance rénale aiguë, une atteinte hépatique, une détresse respiratoire, un coma, des convulsions et un collapsus cardiovasculaire avec arrêt cardiaque [5].

Chapitre II :

Validation analytique

La validation d'une méthode d'analyse correspond à une reconnaissance de son aptitude à satisfaire à l'usage attendu en routine. En effet, il est essentiel que chaque test et expérimentation réalisé sur la molécule thérapeutique soient fiables.

La mise au point et la validation des méthodes d'analyse sont aujourd'hui un enjeu important pour les laboratoires pharmaceutiques, elles découlent de la mise en place des systèmes d'assurance qualité.

1 Historique

Avant le début des années 1960, la validation n'était pas une exigence réglementaire, la seule voie pour les autorités pour prouver qu'un procédé n'avait pas fait ce qu'il devait faire était de prendre des échantillons du produit final, les analyser et montrer des écarts aux spécifications. En 1962, aux États-Unis l'amendement Kefauver-Harris est approuvé, suite aux malformations de nouveau-nés en Europe, liées à la prise de thalidomide pendant la grossesse. L'amendement exige alors que les fabricants de médicaments démontrent l'efficacité et la sécurité de leurs produits, déclarent les effets indésirables à la FDA et diffusent clairement aux médecins les avantages et les risques du médicament [7], [8], [9].

En 1963 la FDA a pu mettre en place une approche préventive plutôt qu'une approche réactive à un contrôle qualité[10]. Ce fut aussi important dans la mise en œuvre des exigences de validation car cela a donné à l'agence le droit de refuser l'approbation d'un nouveau médicament si les méthodes, les installations et les contrôles utilisés étaient inadéquats[11].

A la fin des années 1960 et au début des années 1970. Une enquête menée par la FDA a permis de mettre en évidence des hétérogénéités de teneurs résultantes de procédés, de méthodes mal contrôlées. Beaucoup de discours indiquant le besoin d'une validation ont été faits par les autorités et l'expression « procédé validé » a finalement été définie dans le Programme de Conformité d'Inspections de Processus de Médicament (Drug Process Inspections Compliance Program) en 1978 (Helle M., 2003) [12], [13], [14], [15].

En 1989, la première édition du Guide européen GMP (Commission Européenne, 2008) a remplacé toutes les directives nationales dans l'Union Européenne. Ce guide de la Commission Européenne, en accord avec les directives de l'EMA, a servi de modèle pour tous les pays européens comme aux États-Unis [16].

Le Tableau II, ci-après présente le parallèle entre l'évolution de la réglementation de la validation en Europe et aux États-Unis, de 1963 à nos jours.

Tableau II : comparaison de l'évolution de la réglementation entre l'Europe et les Etats-Unis [17],[18].

ETATS-UNIS		EUROPE
1 ^{er} guide cGMP	1963	-
-	1971	1 ^{ère} édition du Guide Orange – GMP par le PIC
-	1977	2 ^{ème} édition du Guide Orange – GMP par le PIC
<i>Drug process inspections compliance programme, révision des cGMP</i>	1978	-
-	1983	3 ^{ème} édition du Guide Orange – GMP par le PIC
<i>Directive General Principles on Process Validation</i>	1987	-
-	1989	Guide européen des GMP par la Communauté Européenne
Proposition d'amendements cGMP, incluant les règles de la validation	1996	-
-	2001	Directive EMEA : <i>Note for guidance on process validation</i> Guide GMP : annexe 15 Qualification et Validation
-	2010	<i>En cours</i> : révision directive EMEA de 2001
Nouvelle directive <i>Process Validation: General Principles and Practices</i>	2011	-

Pendant les années 1980 la FDA a publié un certain nombre de lettres réglementaires aux fabricants concernés citant le manque de validation adéquate comme une déviation réglementaire vis-à-vis des cGMP, engendrant la non-conformité du médicament [19].

En Europe, la préparation de nouvelles directives sur la validation commença dans les années 1990 et continua entre 1997 et 2001. En septembre 2001, l'Annexe 15 du Guide européen GMP (intitulée « Qualification et Validation ») (Commission Européenne, 2001) et la « Note for Guidance on Process Validation » (The European Agency for the Evaluation of Medicinal Products, 2001) ont été présentées [20].

La validation des procédés et méthodes pharmaceutiques s'est grandement développée pendant ces dernières années. Pour la plupart des industries, elle est, à l'origine, apparue comme une exigence réglementaire et, de là, était souvent considérée comme un fardeau. Malgré les critiques initiales, la validation est maintenant bien acceptée et considérée comme une partie de la gestion de qualité [21].

L'avenir de la validation est d'un grand intérêt, particulièrement avec l'expansion mondiale de la fabrication pharmaceutique et le désir de normes et d'exigences internationales harmonisées. De nombreux fabricants travaillent sur des stratégies pour réduire le coût de la validation et considèrent la validation dès la conception même du produit et son développement. De nouvelles technologies en développement pour l'analyse à 100 % des médicaments et d'autres innovations dans l'industrie pharmaceutique peuvent aussi avoir un effet significatif sur les concepts de validation de procédé.

2 Définition

La validation, dans son terme général, 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.

La validation d'une méthode analytique est définie :

- Selon la norme ISO/IEC 17025 : La validation se définit comme la « confirmation par l'examen et l'apport de preuves objectives du fait que les prescriptions particulières en vue de l'utilisation prévue déterminée sont remplies ».
- Selon la norme ISO/U47-600-1, cette confirmation « consiste à comparer les valeurs des critères de performance déterminées au cours de l'étude de caractérisation de la méthode à celles attendues ou assignées au préalable (limites d'acceptabilité, objectifs à atteindre), puis à déclarer la méthode d'analyse valide ou non valide ».
- Selon la FDA : « Valider une méthode consiste à démontrer, avec un degré de confiance élevé et sous une forme documentée, que la méthode permet d'obtenir un résultat analytique qui atteint les spécifications à l'avance. »
- Selon ICH Harmonised Tripartite Guideline, 2005 : « C'est l'évaluation d'attributs de qualité du produit par des essais, pour démontrer que la fiabilité est maintenue tout au long du cycle de vie du produit et que la précision, l'exactitude, le dosage, la pureté et les spécifications n'ont pas été modifiés. Ces critères analytiques doivent être validés avant le commencement de tout programme de validation (exactitude de méthode, précision de la méthode et spécificité de la méthode)

3 But de la validation :

L'objectif principal d'une validation d'une méthode d'analyse est de démontrer qu'elle correspond à l'usage pour lequel elle est prévue. Prouver qu'un protocole est suffisamment exact et fiable pour avoir confiance dans les résultats fournis et ceci pour un usage déterminé, qui consiste à :

- Démontrer que chaque mesure réalisée sera assez proche de la valeur vraie ou dans les limites acceptables ;
- Mettre en œuvre des protocoles expérimentaux appliqués basés sur une méthodologie commune inspirée de la stratégie des guidelines : ICH, SFSTP, FDA, Les normes ISO et l'EMA ;
- Garantir la qualité des résultats avec un risque connu prédéfini en fonction de l'utilisation finale de la méthode d'analyse à valider ;
- Assurer la fiabilité, une évaluation erronée entraîne une perte de confiance dans la fiabilité des résultats analytiques. Cette fiabilité est très importante dans la satisfaction des clients ou partenaires, ce qui fait que la validation des méthodes d'analyses est une étape primordiale ;
- Donner des garanties quant à l'aptitude de la méthode analytique à quantifier le plus exactement possible chacune des quantités inconnues que le laboratoire aura à quantifier à l'avenir s'assurer qu'une méthode analytique donnée donnera des résultats suffisamment fiables et reproductibles, compte tenu du but de l'analyse ;
- S'assurer qu'une méthode analytique donnée donnera des résultats suffisamment fiables et reproductibles, compte tenu du but de l'analyse. Elle définit correctement à la fois les conditions dans lesquelles la méthode sera utilisée et le but dans lequel elle sera employée.

4 Aspect réglementaire et normatif

Les principaux référentiels qui décrivent les procédures de validation analytique sont les suivants :

4.1 Documents ISO 17025

« Exigences générales concernant la compétence des laboratoires d'étalonnages et d'essais ». C'est une norme internationale élaborée dans le but de l'évaluation de la conformité, ainsi que l'organisation en continu de la qualité des laboratoires.

4.2 Document ISO 5725

« Exactitude (justesse et fidélité) » des résultats et méthodes de mesure. Elle exprime le profil comme outil de décision.

4.3 Documents ICH

Deux guidelines ICH (International Conference on Harmonization) sont dédiés à la validation analytique : Q2 : « validation analytique ».

➤ ICHQ2A

Validation of analytical method « definitions and terminology » 1995:

Textes qui regroupent les définitions et la terminologie qui doivent être prises en compte au cours de la validation des méthodes analytiques.

➤ ICHQ2B

Validation of analyticals method «Methodology» 1997:

Son but est de fournir des conseils et 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.

➤ ICHQ2R1

Validation of analyticals methods « Text and methodology » 2005:

C'est une révision de l'ICHQ 2A et ICHQ 2B, dans le but de regrouper les textes de la terminologie et les définitions avec la méthodologie.

4.4 Documents de la FDA (guidance for industry)

- Validation of Bioanalytical Method (2001) ;
- FDA 2015 ;
- Guidelines for the Validation of Chemical Methods for the FDA FVM Program, 3rd Edition (FDA, 2019)

4.5 Guides de validation analytique : rapports des commissions de la SFSTP

Ils présentent les recommandations réglementaires communément admises et appliquées dans l'industrie pharmaceutique nationale et une démarche statistique pour la validation d'une procédure analytique.

- ✓ SFSTP « Guide de validation, rapport d'une commission SFSTP »
 - ❖ Méthodologie (1992) ;
 - ❖ Exemples d'application (1992).
- ✓ SFSTP « dosage dans les milieux biologiques par des méthodes chromatographiques » (1997)
- ✓ SFSTP « validation des procédures analytiques : harmonisation des démarches »
 - ❖ Partie I : généralités (2003) ;
 - ❖ Partie II : statistiques (2006) ;
 - ❖ Partie III : exemples d'application (2008).
- ✓ SFSTP (2012) : approche de capabilité.

5 Critères de validation

Les principaux critères de validation qui sont largement reconnus et couramment utilisés dans les laboratoires d'analyse présentent des confusions et des divergences concernant les

terminologies, les protocoles expérimentaux et les critères d'acceptation. Une étude comparative des trois principaux guides de validation se présente comme suit ;

5.1 Spécificité/Sélectivité

Selon ICH : (La spécificité) La propriété qui fait qu'une méthode d'analyse rende compte sans ambiguïté de la substance analysée en présence d'autres composés présents [22].

Selon US FDA : La Sélectivité : La propriété d'une méthode d'analyse de différencier et de quantifier la substance à analyser en présence d'autres composantes dans l'échantillon [23].

Selon ISO 17025 : 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 composés [24].

5.2 Fonction de réponse

Selon ICH : Capacité de donner des résultats qui sont directement (à l'intérieur de certaines limites) proportionnels à la concentration (quantité) de la substance analysée dans un échantillon (On parle de linéarité) [22].

Selon US FDA : NA

Selon ISO 17025 : La fonction de réponse d'une procédure d'analyse traduit, à l'intérieur de l'intervalle de dosage, la relation existante entre la réponse (signal) et la concentration (quantité) en substance à examiner dans l'échantillon [24].

5.3 Exactitude

Selon ICH : L'exactitude d'une procédure analytique exprime l'étroitesse de l'accord entre la valeur qui est acceptée en tant que valeur vraie conventionnelle ou valeur de référence acceptée et la valeur trouvée [22].

Selon US FDA : (Confondu avec la justesse) l'exactitude exprime le degré d'accord de la moyenne des résultats obtenus par la méthode et la vraie valeur (concentration) de l'analyte [23].

Selon ISO 17025 : L'exactitude exprime l'étroitesse de l'accord entre le résultat d'essai et la valeur de référence acceptée, aussi appelée « valeur conventionnellement vraie ». L'étroitesse de l'accord ainsi observée est la résultante de la somme des erreurs systématique et aléatoire, en d'autres termes l'erreur totale liée au résultat. Par conséquent, l'exactitude est l'expression de la somme de la justesse et de la fidélité [24].

5.4 Linéarité

Selon ICH : Capacité de donner des résultats qui sont directement (à l'intérieur de certaines limites) proportionnels à la concentration (quantité) de la substance analysée dans un échantillon [22].

Selon US FDA : NA

Selon ISO 17025 : 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 [24].

5.5 Fidélité

Selon ICH : Correspond au degré d'accord (degré de dispersion) entre les résultats des mesures obtenues par l'analyse individuelle de plusieurs prélèvements à partir d'un même échantillon homogène, prélevés dans des conditions prescrites [22].

Selon US FDA : Décrit le degré d'accord des mesures individuelles de l'analyte quand la méthode est appliquée avec répétabilité sur plusieurs prélèvements d'un même échantillon homogène de la matrice biologique [23].

Selon ISO 17025 : 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. La fidélité peut être évaluée à trois niveaux : la répétabilité, la fidélité intermédiaire (intra -laboratoire) et la reproductibilité (inter -laboratoire) [24].

5.6 Justesse

Selon ICH : Correspond au degré de concordance entre la valeur de la méthode obtenue et la valeur de référence ou la valeur considérée comme véritable par convention. (L'exactitude est aussi désignée par la justesse) [22].

Selon US FDA :(exactitude) décrit le degré de concordance entre la moyenne des résultats obtenus par la méthode et la valeur de référence (concentration) [23].

Selon ISO 17025 :(biais) 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. La mesure de la justesse est généralement exprimée en

termes de recouvrement et de biais absolu ou relatif (erreur systématique) [24].

5.7 Sensibilité

Selon ICH : NA

Selon US FDA : La FDA définit la sensibilité à partir de (The LLOQ) la limite de quantification inférieure et qui doit être déterminée pendant le développement de la méthode [23].

Selon ISO 17025 : La sensibilité à une concentration donnée correspond au rapport de la valeur de la variable mesurée à la valeur correspondante de la concentration de l'élément dosé [24].

5.8 Limite de détection (LD)

Selon ICH : La plus faible quantité de la substance analysée que la méthode permet de détecter, sans nécessairement fournir la valeur exacte [22].

Selon US FDA : La plus faible concentration d'un analyte que la méthode bioanalytique peut différencier, d'une façon fiable, du bruit de fond [23].

Selon ISO 17025 : 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 [24].

5.9 Limite de quantification

Selon ICH : La plus faible quantité de la substance analysée que la méthode permet de doser avec un degré acceptable de précision et d'exactitude [22].

Selon US FDA : Limite de quantification inférieure & supérieure (LQI & LQS) : la plus faible/grande quantité de la substance analysée que la méthode permet de doser avec un degré acceptable de précision et d'exactitude [23].

Selon ISO 17025 : est la plus petite quantité de l'analyte dans un échantillon pouvant être dosée dans les conditions expérimentales décrites avec une exactitude définie [24].

5.10 Robustesse

Selon ICH : La robustesse d'une procédure analytique est une mesure de sa capacité à donner des résultats fiables des paramètres de la méthode et sa capacité à ne pas être affectée par les faibles variations [22].

Selon US FDA : NA

Selon ISO 17025 : Mesure de la capacité d'une méthode d'analyse à ne pas être affectée par des variations faibles mais délibérées des paramètres de la méthode

d'analyse. Elle fournit une indication sur la fiabilité de la méthode d'analyse dans les conditions normales d'utilisation [24].

6 Étude critique des différentes approches de validation

La validation des méthodes analytiques est d'une importance capitale dans l'industrie pharmaceutique, outre que c'est une exigence réglementaire, elle constitue une étape indispensable dans le système d'assurance qualité. En effet la validation est une étape obligatoire du cycle de vie d'une procédure analytique comme il a été défini et publié dans les différents principaux référentiels, documents et guides (ISO, ICH, SFSTP, FDA, etc.). Il existe une panoplie de documents officiels, référentiels et guidelines publiées dans ce sens.

6.1 Différentes approches de validation

6.1.1 Le guide ICH

Guideline for industry on validation of analytical procedure (ICH Q2A: definitions and terminology) (Mar 1995). Il traite les définitions et la terminologie. Guidance for Industry-Q2B validation of analytical procedures : (ICHQ2B : Methodology) (Nov 1996). Il fournit des conseils et recommandations. En 2005 ils ont publié l'ICHQ2R1 : Validation of analyticals methods « Text and methodology » qui est une révision des 2 documents sus-mentionnés.

6.1.2 Le guide SFSTP :

Rapports des commissions de la SFSTP. Ils décrivent des recommandations et une démarche statistique de validation d'une méthode analytique. Publiés et améliorés au fil des années, ces rapports constituent un outil incontournable pour statuer sur la validité ou non d'une méthode analytique :

- « Guide de validation, rapport d'une commission SFSTP : » : décrit la méthodologie utilisée et propose des exemples d'application en 1992 ;
- « Dosage dans les milieux biologiques par des méthodes chromatographiques » : il suggère certaines recommandations sur le plan expérimental et l'évaluation des données en bio-analyse en 1997 ;
- « Validation des procédures analytiques : harmonisation des démarches ». C'est un triptyque destiné à décrire une nouvelle démarche harmonisée et globale de validation interne des procédures d'analyse. Il est scindé en 3 parties :
 - ✓ Généralités (2003) : limité aux concepts généraux, définitions et terminologie.
 - ✓ Statistiques (2006) : décrit la méthodologie statistique permettant la prise de décision quant à la validité ou non d'une méthode analytique.
 - ✓ Exemples d'application (2008) : propose des exemples réels d'applicabilité sur différents types de méthodes.

6.1.3 Guide de la FDA :

Guidance for industry - bio analytical method validation (2001) : ce guide fournit des recommandations générales pour la validation des méthodes bio-analytiques telles que les méthodes chromatographiques (CPG, HPLC.). Il peut-être aussi utilisé, entre autres, dans les études microbiologiques, pharmacologiques et toxicologiques avec l'ajustement et les modifications nécessaires.

6.1.4 Guide de l'EMA :

Guideline on bioanalytical method validation. Publiée par (European Medicines Agency). Il définit les recommandations nécessaires à la validation des méthodes bio analytiques applicables au dosage dans les matrices biologiques (sérum, salive...). Cette ligne directrice demeure un guide incontournable pour les études pharmacocinétiques et toxicocinétiques sur l'homme et l'animal.

6.1.5 Validation selon la norme ISO 17025 :

La NF EN ISO/CEI 17025 : 2005 exigences générales concernant la compétence des laboratoires d'étalonnages et d'essais. Ce guide donne des lignes directrices générales sur le processus de validation d'une méthode, propose des modalités pratiques de caractérisation des performances, en présentant pour chaque caractéristique des exemples concrets [24].

6.1.6 Approche de process capability :

C'est une nouvelle approche de validation. La capacité du processus compare le résultat d'un processus sous contrôle aux limites de spécification en utilisant des indices de capacité. La comparaison est effectuée en formant le rapport entre la dispersion des spécifications du processus (la « largeur » de la spécification) et la dispersion des valeurs du processus, mesurée par 6 unités d'écart type du processus (la « largeur » du processus) [25].

6.2 Etude critique et comparaison des différentes approches

6.2.1 Spécificité / Sélectivité [22], [23], [24]

Tableau III : Comparaison du critère de spécificité dans les différentes guidelines.

Guidelines	Concept et terminologie	Plan expérimental	Tests & recommandations	Critères d'acceptation
ICH	Spécificité.	Impuretés disponibles : On ajoute à la substance pure (substance médicamenteuse ou produit fini) une quantité adéquate d'impuretés et (ou) d'excipients puis on démontre que les résultats obtenus ne sont pas affectés. Impuretés non disponibles : On compare les résultats obtenus avec des échantillons renfermant des impuretés ou des produits de dégradation aux résultats obtenus avec une autre méthode d'analyse bien connue. Ces comparaisons doivent inclure des échantillons exposés à des conditions de stress.	Démontrer une distinction entre la substance à analyser et les autres substances présentes ; Pour la teneur, comparer les résultats obtenus par les deux méthodes et pour l'analyse des impuretés, comparer les profils des impuretés donnés avec les 2 méthodes ; L'évaluation de pureté des pics peut être utile pour démontrer que le pic chromatographique correspondant à la substance à analyser n'est pas attribuable à plus d'une substance.	Non spécifié
FDA	Sélectivité	- Analyse des échantillons blancs de matrice biologique appropriée (plasma, urine ou autre) obtenue d'au moins six sources et l'interférence doit être testée sur ces échantillons. - La sélectivité doit être assurée au LQI limite inférieure de quantification	- Preuve que la substance quantifiée est l'analyte prévu. - Chaque échantillon doit être testé pour vérifier l'interférence.	Non spécifié
ISO 17025	Spécificité	Non précisé	Non précisé	Non spécifié

Le premier critère à évaluer pour une méthode analytique est la spécificité ou sélectivité. Différents guides et référentiels proposent des définitions qui portent confusion. Il est admis que la spécificité (notion absolue) est quelque chose d'exceptionnel, or que pour les méthodes

séparatives, il est plus opportun de parler de sélectivité (notion relative). Seul l'ICH utilise le terme « spécificité », les autres documents parlent de « sélectivité ».

6.2.2 Fonction de réponse [22], [23], [24]

Tableau IV Comparaison du critère de fonction de réponse dans les différentes guidelines.

Guidelines	Concept & terminologie	Plan expérimental & recommandations	tests	Critères d'acceptation
ICH	Linéarité	L'ICH exige 5 concentrations.	-L'Examen visuel ; -Le Coefficient de corrélation, ordonnée à l'origine, pente, courbe de régression, ainsi que la somme des carrés des résidus.	Non spécifié
FDA	Courbe d'étalonnage	La courbe d'étalonnage doit être préparée par dosage de la matrice par des concentrations connues de la substance à analyser : - Blanc : matrice sans standard interne SI. - Un échantillon zéro (matrice + SI) - 6-8 échantillons non zéro couvrant l'intervalle de dosage incluant LQI.	Non spécifié	A LQI : $\leq 20\%$ d'écart de la valeur cible. Plus que LQI : 15% d'écart Au moins 4 de 6 échantillons non zéro devrait être conformes aux critères incluant LQI et la concentration maximale.
ISO 17025	fonction de répons	Non précisé	Non précisé	Non spécifié

En règle générale, la fonction de réponse d'une procédure d'analyse traduit, à l'intérieur de l'intervalle de dosage, la relation existante entre la réponse (signal) et la concentration (quantité) en substance à examiner dans l'échantillon. La fonction de réponse monotone la plus simple qui exprime cette relation est appelée « courbe d'étalonnage », tandis que 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.

Le critère de linéarité se réfère à la relation entre la **quantité introduite** et la **quantité calculée** (résultat) d'analyte à partir de la courbe d'étalonnage tandis que la fonction de réponse se réfère à la relation entre la **réponse instrumentale** et la **concentration**.

Le document de l'ICH confond entre les 2 termes (linéarité et fonction de réponse) alors que désormais celui de la FDA garde seulement le terme courbe d'étalonnage en précisant qu'on doit utiliser le modèle le plus simple qui décrit adéquatement la relation concentration – réponse".

6.2.3 Exactitude : [22] [23] [24]

Tableau V : Comparaison du critère d'exactitude dans les différentes guidelines.

Guidelines	Concept & terminologie	Plan expérimental & recommandations	Tests	Critères d'acceptation
ICH	Exactitude	▪ Application de la méthode à une substance de pureté connue (ex : substance de référence). ▪ Comparaison des résultats obtenus de la méthode à valider avec ceux obtenus par une méthode bien caractérisée, dont l'exactitude est indiquée et (ou) définie. ▪ Déduction de l'exactitude après avoir établi la fidélité, la linéarité et la spécificité de la méthode en question.	- Pourcentage de recouvrement de la substance dont une quantité connue a été ajoutée à l'échantillon, - La différence entre la valeur moyenne et la valeur considérée comme vraie avec les intervalles de confiances correspondants.	Non spécifié
FDA	Confondue avec la justesse	Déterminée par la reproduction de l'analyse d'échantillons contenant des quantités connues de l'analyte Trois niveaux de concentrations couvrant tout l'intervalle d'étude ▪ Concentration basse (5 fois) ▪ Concentration intermédiaire (5fois)	Comparer la moyenne à la vraie valeur	▪ A la LIQ : la valeur moyenne doit se situer à moins de $\pm 20\%$ de la valeur réelle ▪ Autre que la LIQ : la valeur moyenne doit se situer à moins de $\pm 15\%$ de la

		▪ Concentration maximale (5 fois)		valeur réelle
ISO 17025	Exactitude	Non précisé	Ecart type (relatif ou absolu) Biais (relatif ou absolu) Profil d'exactitude comme outil de décision	Non spécifié

L'estimation de l'erreur totale n'est pas définie d'une manière spécifique dans les documents étudiés. Dans la première partie de l'ICH Q2R1, l'exactitude est définie comme la combinaison des erreurs aléatoires (fidélité / écart type) et des erreurs systématiques (justesse / biais).

Cependant dans la section correspondante aux recommandations relatives à l'exactitude « Pour exprimer l'exactitude, il est recommandé de déclarer le pourcentage de recouvrement de la substance dont une quantité connue a été ajoutée à l'échantillon, ou la différence entre la valeur moyenne et la valeur considérée comme vraie avec les intervalles de confiance correspondants." Donc ce n'est plus la définition de l'exactitude (erreurs totales) mais celle de la justesse (erreurs systématiques) qui est la valeur moyenne de plusieurs résultats (par opposition à un seul résultat pour l'exactitude) qui est comparée à la vraie valeur.

De même, dans le document FDA l'exactitude est confondue avec la justesse.

6.2.4 Linéarité [22] [23] [24]

Tableau VI : Comparaison du critère de linéarité dans les différentes guidelines.

Guidelines	Concept & terminologie	Plan expérimental	Tests	Critères d'acceptation
ICH	Linéarité	Pour le calcul de linéarité, le plan expérimental est de 5 concentrations dans l'ICH	– L'Examen visuel – Le Coefficient de corrélation, ordonnée à l'origine, pente, courbe de régression, ainsi que la somme des carrés des résidus.	Non spécifiés

FDA	NA			
ISO 17025	Linéarité	Non précisé	Non précisé	Non précisé

6.2.5 Fidélité [22] [23] [24]

Tableau VII : Comparaison du critère de fidélité dans les différentes guidelines.

Guidelines	Concept & terminologie	Plan expérimental	Tests	Critères d'acceptation
ICH	Fidélité	En règle générale, il est recommandé d'estimer la fidélité à 3 niveaux de concentrations différents. Seul le nombre total de répétitions est donné, sans aucune précision relative au plan expérimental en termes de nombre de jours (3 à 10 répétitions) - La répétabilité : Doit être évaluée en utilisant : a. Au moins neuf mesures englobant l'écart d'utilisation de la méthode (c.-à-d. trois concentrations avec trois échantillons chacune); ou b. Au moins six mesures d'une concentration à 100 % de la teneur escomptée. - La fidélité intermédiaire : La mesure dans laquelle la fidélité intermédiaire doit être établie dépend des circonstances dans lesquelles la procédure est censée être utilisée. Le demandeur doit établir les effets d'événements aléatoires sur la précision de la procédure analytique. Typique les variations à étudier comprennent les jours, les analystes, l'équipement, etc.	Il est recommandé d'indiquer l'écart-type, l'écart-type relatif (coefficient de variation) et l'intervalle de confiance pour chaque type de précision évaluée.	Non spécifiés

		- La reproductibilité :est évaluée au moyen des essais inter laboratoires.		
FDA	Fidélité	La procédure analytique est appliquée à plusieurs reprises à plusieurs aliquotes d'un seul volume homogène de matrice biologique. Trois niveaux de concentration couvrant toute la gamme. – Faible concentration de la gamme 5 répétitions ; – Concentration moyenne de la gamme 5 répétitions – Concentration élevée de la gamme 5 répétitions ➤ Intralaboratoires : (répétabilité) Mesure la fidélité pendant un seul chrono de temps ➤ Inetrlaboratoires : (reproductibilité) Mesure la fidélité avec changement de facteur temps.	Il est recommandé d'indiquer l'écart-type, l'écart-type relatif (coefficient de variation).	➤ A la limite de quantification : CV $\leq$ 20% ➤ Hors la limite de quantification : CV $\leq$ 15 %
ISO 17025	Fidélité	Il est recommandé d'estimer la fidélité à 3 niveaux de concentrations différents, avec 3 répétions pour chaque niveau de concentration	Non précisé	Non précisé

-L'estimation de la fidélité est exigée par tous les documents, définitions homogènes de la fidélité dans presque tous les documents ;

-la FDA exige l'estimation de la répétabilité et la fidélité intermédiaire ainsi que l'ISO 17025 ;

- ICH exige l'estimation de la répétabilité, la fidélité intermédiaire et la reproductibilité, la méthode à valider doit être normalisée ;

- la FDA distingue aussi entre la fidélité intra-série (appelé aussi répétabilité), qui évalue la fidélité pendant un seul jour d'analyse et "la fidélité inter-série (appelé aussi fidélité intermédiaire) ;

- Dans l'ISO 17025 l'estimation de la reproductibilité ne sera pas envisagée pour la validation intra-laboratoires des méthodes analytiques, et sera réservée pour la standardisation inter-laboratoires.

6.2.6 Justesse

Tableau VIII : Comparaison du critère de justesse dans les différentes guidelines [22], [23], [24].

Guidelines	Concept & terminologie	Plan expérimental	Tests	Critères d'acceptation
ICH	Justesse	Minimum 9 déterminations à partir de 3 concentrations (n = 3) couvrant l'intervalle de linéarité	- Application de la méthode à des mélanges synthétiques avec une pureté connue - Comparaison des résultats avec ceux obtenus par une méthode de référence ; - Déduction de la justesse après avoir établi la précision, la linéarité et la spécificité de la méthode en question. - Pourcentage de recouvrement de la substance dont une quantité connue a été ajoutée à l'échantillon ; - Différence entre la valeur moyenne et la valeur considérée comme véritable avec les intervalles de confiance correspondants.	
FDA	Exactitude	Trois niveaux de concentrations couvrant l'écart d'utilisation : - concentration basse de l'écart $\times$ 5 répétitions ; - concentration intermédiaire de l'écart $\times$ 5 répétitions ; - concentration maximale de l'écart $\times$ 5 répétitions des échantillons contenant des quantités	La différence entre la valeur moyenne et la valeur considérée comme vraie avec l'intervalle de confiance correspondant (moyenne - valeur vraie) justesse = Moyenne - valeur vraie	➤ A la LQI : CV $\leq$ 20% ➤ Hors LQI: CV $\leq$ 15 %

		connues de l'analyte		
ISO 17025	justesse		- La différence entre la valeur moyenne et la valeur considérée comme vraie avec l'intervalle de confiance correspondant (moyenne - valeur vraie) ; - Le pourcentage de recouvrement.	Non précisé

- L'estimation de la justesse est requise par tous les guidelines, Cependant, dans les trois documents étudiés, nous constatons une confusion entre le terme « exactitude » et le terme « Justesse ». Il y a une incohérence dans la définition de la justesse à travers les trois guidelines ;
- La mesure de la justesse est souvent exprimée en termes de biais (absolu et /ou relatif).
- Dans l'ISO17025 elle a été appelée « exactitude de la moyenne ». Cependant il précise également que cette utilisation de la terminologie « exactitude de la moyenne » doit être évitée ;
- ICH & FDA parlent d'écart entre la valeur réelle et la valeur trouvée ou la valeur calculée ; alors que l'ISO 17025 se focalise sur la distance entre la valeur moyenne et la valeur réelle ;
- La justesse est liée à des erreurs systématiques des méthodes d'analyse contrairement à l'exactitude qui se réfère à la qualité des résultats ;
- Les trois documents utilisent une seule substance de référence certifiée en comparant la valeur mesurée avec la vraie valeur. En plus l'ICH et l'ISO 17025 proposent aussi de comparer le résultat obtenu par la méthode à valider avec le résultat d'une méthode de référence dont la justesse est connue ;
- Les 3 guidelines proposent les mêmes tests pour calculer la justesse à savoir le calcul du biais.

6.2.7 Limite de détection [22] [23] [24]

Tableau IX : Comparaison du critère de limite de détection dans les différentes guidelines.

Guidelines	Concept & terminologie	Plan expérimental	Tests	Critères d'acceptation
ICH	Limite de détection	▪ Evaluation visuelle ▪ Approche du rapport signal /bruit : applicable aux méthodes avec un bruit de fond. On compare le signal obtenu avec des échantillons contenant de faibles concentrations connues de la substance à analyser avec des blancs. ▪ Approche de s/P : $LD = 3.3 s / P$. Où : ➤ S : écart-type de la réponse (écart-type des valeurs obtenues par des blancs ou à partir d'une courbe d'étalonnage) P : pente de la courbe d'étalonnage ➤ on peut utiliser l'écart-type résiduel d'une courbe de régression ou l'écart-type de l'ordonnée à l'origine de courbes de régression	▪ Si la limite de détection est déterminée par l'évaluation visuelle ou le rapport signal /bruit, on doit présenter les chromatogrammes correspondants comme justificatif acceptable. ▪ Lorsqu'elle est estimée par calcul ou extrapolation, on peut valider l'estimation en analysant par une méthode indépendante un nombre suffisant d'échantillons dont la teneur en substance à analyser est proche de la limite de détection ou coïncide avec cette limite.	Le rapport signal /bruit $> 2-3$ est, considéré comme acceptable. Non spécifié pour les autres méthodes

		.		
FDA	Limite de détection	Non spécifié	Non spécifié	Non spécifié
ISO 17025	Limite de détection	Non spécifié	Non spécifié	Non spécifié

La limite de détection est définie presque dans tous les documents sauf celui de la FDA qui donne une définition pas trop explicite. La définition générale donnée est comme suit : la limite de détection est la concentration la plus basse d'analyte qui peut être détectée en utilisant la méthode analytique, mais sans nécessairement être quantifiée avec un degré d'exactitude acceptable. La LD doit être établie tôt dans le processus de validation.

6.2.8 Limite de quantification [22] [23] [24]

Tableau X : Comparaison du critère de limite de quantification dans les différentes guidelines.

Guidelines	Concept & terminologie	Plan expérimental	Tests	Critères d'acceptation
ICH	Limite de quantification	Analyse d'un nombre suffisant d'échantillons dont la teneur en substance à analyser est proche de la limite de dosage ou coïncide avec cette limite.	1-Par l'évaluation visuelle : peut être utilisée pour des méthodes non instrumentales. 2-Basée sur une approche signal-bruit : cette approche ne peut être appliquée qu'aux procédures analytiques qui présentent un bruit de base. 3-Basée sur : l'écart type de la réponse et de la pente.	Non spécifié
FDA	Limite de quantification	La FDA recommande 5 mesures de différents échantillons pour déterminer la limite de quantification.	Rien n'est précisé sur la façon exacte de mesurer la LQ. La FDA propose une méthode d'estimation : LQI= 5× réponse du blanc le pic de l'analyte doit être identifié	Non spécifié

			avec une précision de 20% et exactitude de 80– 120%	
ISO 17025	Limite de quantification	Non recommandé; recommande uniquement d'exprimer l'incertitude de mesure en fonction de la concentration	Non précisé	Non spécifié

- La limite de quantification est définie presque dans tous les documents réglementaires ;
- Le document ICH définit une seule limite de quantification alors que la FDA Bioanalytical Method Validation distingue deux limites et définit la limite inférieure et la limite supérieure de quantification ;
- Sur le plan expérimental le nombre de mesures pour évaluer la LQ n'est pas défini dans les documents ICH, la FDA recommande 5 mesures ;
- Aucun document parmi les trois n'adresse un plan expérimental pour estimer la LQ, en termes de répétitions par jour.

6.2.9 Robustesse [22] [23] [24]

Tableau XI : Comparaison du critère de robustesse dans les différentes guidelines.

Guidelines	Concept & définitions	Plan expérimental & recommandations	tests	Critères d'acceptation
ICH	Robustesse	L'évaluation de la robustesse se fait durant la phase de mise au point de la méthode ; elle dépend du type de méthode considérée. cette évaluation doit démontrer que la méthode demeure fiable lorsqu'on introduit des variations planifiées de paramètres .	Test de résolution : permet de garantir la validité de la méthode ; quelques soient les conditions d'utilisation	Non spécifié

FDA	NA			
ISO 17025	Robustesse	Non spécifié	Non spécifié	Non spécifié

Le guide de la FDA ne propose pas une définition de la robustesse. Tandis que celui de l'ICH propose même quelques exemples de variations des caractéristiques comme : la stabilité des solutions d'analyse, et le temps d'extraction. Et en ce qui concerne les chromatographies en phase liquide (ce qui nous importe dans notre étude) : variations du pH et /ou composition de la phase mobile, température et débit.

7 Etude statistique de la validation analytique :

7.1 Selon les recommandations de la commission SFSTP 2006 :

L'évaluation des différents critères de validation va être effectuée en utilisant le profil d'exactitude, qui va intégrer dans un seul graphique l'ensemble des critères de la validation d'une façon statistiquement correcte.

Cette contenance permet d'améliorer l'approche de la validation d'une procédure analytique tout en prenant en considération le risque associé à son utilisation. Selon le logigramme des protocoles proposés par la SFSTP 2003, nous avons pu sélectionner le protocole adéquat pour notre étude, sachant que la méthode est connue antérieurement et qu'il y a absence d'effet matrice, nous avons donc adopté le protocole V2 en utilisant cinq niveaux de concentration pour les SE et les SV.

7.1.1 Spécificité

Protocole :

L'étude de la spécificité nécessite la préparation et l'analyse des solutions suivantes :

- Une solution standard à 100% (par rapport à la concentration théorique) ;
- Une solution échantillon à 100% (par rapport à la concentration théorique).

Le signal donné à partir de la solution placebo doit être normalement nulle.

Les signaux obtenus par les deux solutions : standard 100% et échantillon 100% doivent être comparables [28].

Étude statistique

Soit par la comparaison des signaux instrumentaux obtenus à partir des solutions préparées : les spectres obtenus à partir de la solution standard 100% et la solution échantillon 100% doivent être systématiquement superposables.

Soit en comparant la droite obtenue avec la gamme matrice (forme reconstituée) avec celle obtenue à partir de la gamme standard.

Test t de Student

Si les pentes sur standard et sur la forme reconstituée sont comparables, leur différence ne doit pas être différente de zéro.

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

$$t_{\text{calculé}} = \frac{|a_1 - a_2|}{\sqrt{\sigma a_1^2 + \sigma a_2^2}}$$

- a_1 et a_2 : pentes respectives des droites de régression D1 (obtenue à partir de la gamme standard) et D2 (obtenue à partir de la gamme placebo chargé).

- σ_{a1} et σ_{a2} : variances respectives des pentes a_1 et a_2 .
- α : risque d'erreur acceptée (5%).
- n_1 et n_2 : nombre d'échantillon réalisé pour la forme standard et la forme placebo chargé.
- $n_1 + n_2 - 4$: degré de liberté (ddl).

La valeur du $t_{\text{calculé}}$ est comparée à la valeur t° (α ; $n_1 + n_2 - 4$) lue sur la table de Student.

- Si $t_{\text{calculé}} < t^\circ \rightarrow$ les pentes sont comparables $\Leftrightarrow$ pas d'effet matrice donc la méthode est spécifique.
- Si $t_{\text{calculé}} > t^\circ \rightarrow$ les pentes ne sont pas comparables $\Leftrightarrow$ la méthode n'est pas spécifique.

Après avoir vérifié la spécificité de la méthode analytique on travaille sur deux ensembles d'échantillons [28].

Standard d'étalonnage (SE)

Les standards d'étalonnage sont des échantillons, avec ou sans matrice, de concentrations connues qui permettent d'établir les « points de la courbe d'étalonnage » ou « point de la gamme d'étalonnage ».

Standards de validation (SV)

Les standards de validation sont des échantillons, reconstitués dans la matrice ou tout autre analyte référence, dont la valeur vraie a pu être établie par consensus et qui sont utilisés pour la validation de la procédure d'analyse.

En ce qui concerne la préparation de SE et SV, celle-ci dépend de protocole de validation choisi. Le logigramme de la figure 02 suivant, présente la démarche proposée dans le guide SFSTP 2003 pour sélectionner un protocole expérimental de validation en fonction des contraintes ou des spécificités liées à la procédure de dosage sous épreuve.

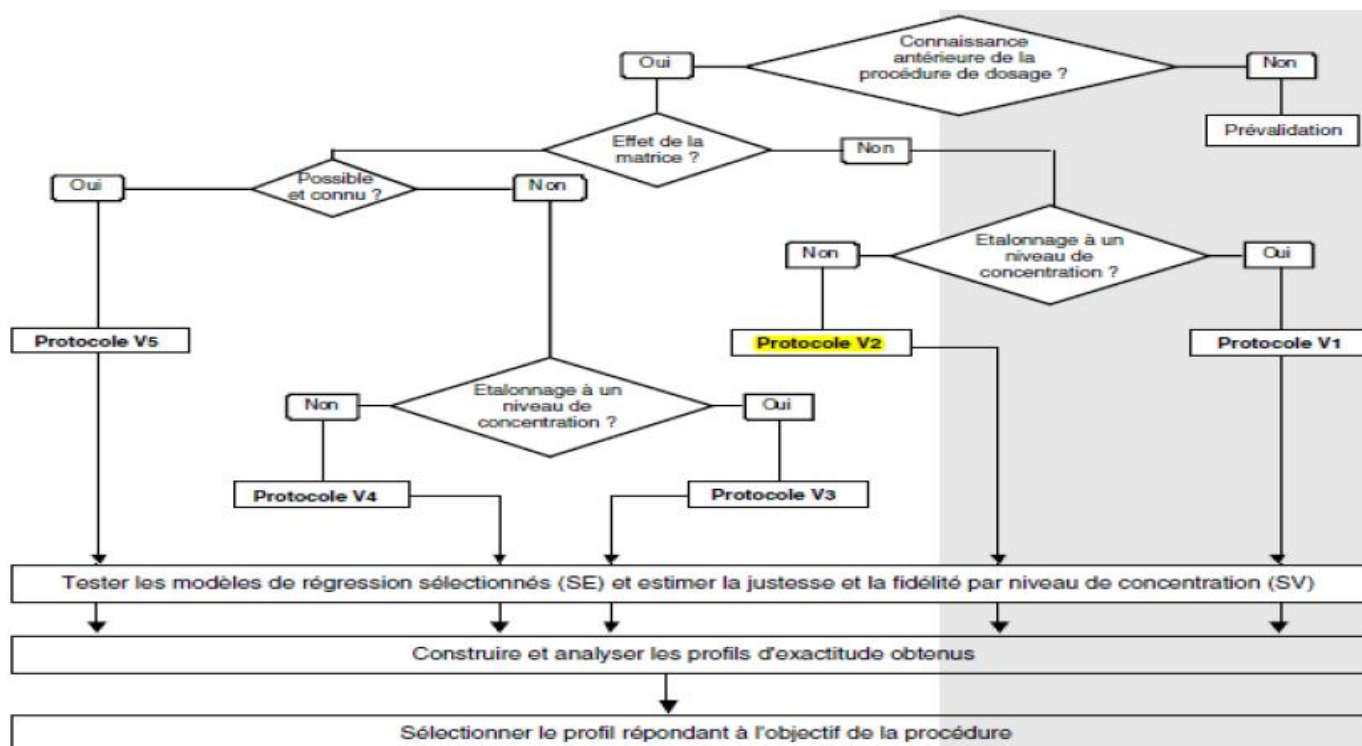


Figure 02 : logigramme permettant de sélectionner un protocole de validation.

Tableau XII : Choix du nombre de standards d'étalonnage et de validation en fonction du protocole choisi.

Standards	Niv de conc	Protocole				
		V1	V2	V3	V4	V5
SE. Etalonnage sans la matrice	Bas	2		2		
	Médian	2	2 ⁽²⁾	2	2 ⁽²⁾	
	Haut	2 ⁽¹⁾	2	2 ⁽¹⁾	2	
SE. Etalonnage avec la matrice	Bas				2	2
	Médian				2 ⁽²⁾	2 ⁽²⁾
	Haut				2	2
	Addit					2 ⁽³⁾
SV. Validation avec la matrice	Bas	3	3	3	3	3
	Médian	3	3	3	3	3

	Haut	3	3	3	3	3
Nbre minimum séries		3	3	3	3	3
Nbre total essais (min)		33	45	39	63	45

7.1.2 . Fonction de réponse

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

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

Où $\varepsilon \sim N(0, \sigma^2)$ 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. Deux familles de fonctions se dégagent de cet ensemble : les fonctions dites linéaires en leurs paramètres et les fonctions non linéaires. Une fonction est dite linéaire si elle est une combinaison linéaire de ses paramètres.

Différentes fonctions de réponse peuvent être envisagées lors de la validation de la méthode, comme illustré par le tableau XIII Le choix dépend du type de méthode (méthode physicochimique, bioanalytique, immuno- dosage).

TableauXIII : Exemples de fonctions de réponse[29].

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

La plupart des méthodes physico-chimiques auront recours à la droite (passant par 0 ou non).

7.1.3 Alignement des observations

Si, pour un niveau de concentration, les quantités introduites ne sont pas identiques pour toutes les séries (souvent pour de raisons de pesées qui doivent être indépendantes), il est indispensable de procéder à un alignement sur la concentration moyenne dès lors qu'un calcul de variance doit être effectué (estimation de la répétabilité et de la fidélité intermédiaire). Cela consiste à transformer les réponses observées ($y_{ijk} \rightarrow y_{ijk, c}$) afin de les aligner sur cette concentration moyenne.

Cet alignement s'effectue par interpolation en ajoutant à la réponse observée la différence entre la valeur de la fonction de réponse considérée à la concentration moyenne et la valeur de cette fonction à la concentration introduite [29].

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

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

En résumé, pour les différentes fonctions de réponse :

Tableau XIV : Règle d'alignement pour différentes fonctions de réponse[29].

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

7.1.4 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.

Les prédictions inverses pour les différents modèles de régression s'obtiennent comme suit :

TableauXV : Calcul des prédictions inverses pour différentes fonctions de réponses [29].

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	$x_{ijk,calc} = \frac{-\hat{\beta}_i + \sqrt{\hat{\beta}_i^2 - 4\hat{\gamma}_i(\hat{\alpha}_i - y_{ijk})}}{2\hat{\gamma}_i}$
Fonction logistique à 4 paramètres	$x_{ijk,calc} = \hat{\gamma}_i \left(\frac{\hat{\delta}_i - \hat{\alpha}_i}{y_{ijk} - \hat{\alpha}_i} - 1 \right)^{\frac{1}{\hat{\beta}_i}}$
Fonction logistique à 5 paramètres	$x_{ijk} = \hat{\gamma}_i \left[\left(\frac{\hat{\delta}_i - \hat{\alpha}_i}{y_{ijk} - \hat{\alpha}_i} \right)^{\frac{1}{\hat{\psi}_i}} - 1 \right]^{\frac{1}{\hat{\beta}_i}}$

7.1.5 Calcul de la justesse et de la fidélité[29]

7.1.5.1 Modèle

La justesse d'une méthode analytique (par opposition à celle d'un résultat) exprime l'étroitesse de l'accord entre la moyenne (par opposition à celle d'une observation unique) des résultats d'essai avec la méthode et la valeur de référence acceptée, aussi appelée valeur conventionnellement vraie.

L'estimation de la justesse et de la fidélité de la méthode s'effectue avec les concentrations calculées provenant des standards de validation en phase de validation (ou des standards d'étalonnage eux-mêmes en phase de pré-validation).

Cette estimation est réalisée à chacun des j niveaux de concentration considérés à l'aide du modèle statistique suivant :

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

Où : X_{ijk} est la k-ième concentration calculée du niveau j de la i-ème série,

μ_j est la moyenne des concentrations calculées du niveau de concentration j,

α_{ij} est au niveau j l'écart entre la moyenne de la i -ème série et la moyenne μ_j ;

ϵ_{ijk} est considéré comme une variable aléatoire ayant une distribution normale de moyenne 0 et de variance $\sigma^2_{r,j}$

ϵ_{ijk} est l'erreur expérimentale, considérée comme une variable aléatoire ayant une distribution normale de moyenne 0 et de variance.

L'erreur expérimentale est supposée indépendante de la série.

Les variances σ^2_B et σ^2_w représentent les variances inter-série et intra-série, respectivement. La méthode du maximum de vraisemblance restreint est utilisée pour estimer à chaque niveau de concentration j les paramètres μ_j , σ^2_B , et σ^2_r du modèle.

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

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

Où

MSM_j : maximum de vraisemblance.

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

$\bar{x}_{ij,calc}$: Moyenne des concentrations calculées au niveau j ;

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

$x_{ijk,calc}$: Concentrations calculées au niveau j de la série i répétition k ;

n : Nombre de répétition ;

p : Nombre de séries.

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

Si $MSE_j < MSM_j$ alors :

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

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

Sinon :

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

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

7.1.5.2 Justesse :

La justesse (ou le biais) de la méthode au niveau de concentration est obtenue en calculant la différence entre la moyenne arithmétique des concentrations introduites et la moyenne des concentrations calculées. Le biais peut s'exprimer en termes absolu, relatif ou de recouvrement par rapport aux quantités introduites, comme suit : [29]

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

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

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

Où :

$\hat{\mu}_j$: Moyenne des concentrations calculées du niveau j ;

$\bar{x}_j$: Moyenne des concentrations introduites au niveau j.

7.1.5.3 Fidélité :

L'estimation de la variance intra-série donne une estimation de la variance de répétabilité tandis que la somme des estimations des variances intra- et inter-série donne une estimation de la variance de fidélité intermédiaire : [29]

Répétabilité : $\hat{\sigma}^2_r, j = \hat{\sigma}^2_w, j$

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

7.1.6 Calcul de l'exactitude :

Pour chaque mesure : X_{ijk}

Exactitude = $X - \mu$

Pour chaque modèle et chaque observation l'exactitude de la mesure en valeur relative :

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

L'erreur maximale relative observée pour chaque modèle sur l'ensemble des séries montre l'impact du choix de la fonction de réponse sur l'exactitude des résultats. [29]

7.1.6.1 Erreur totale et profil de l'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 :

$$\begin{aligned}
 X &= \mu + |\text{Biais}|_{\text{procédure}} + \text{Fidélité intermédiaire procédure} \\
 &\quad \updownarrow \\
 X - \mu &= |\text{Biais}|_{\text{procédure}} + \text{Fidélité intermédiaire procédure} \\
 &\quad \updownarrow \\
 X - \mu &= \text{Erreur Totale procédure}
 \end{aligned}$$

L'erreur totale observée avec chaque modèle et pour chaque niveau de concentration est étroitement liée aux erreurs maximales observées correspondantes.

7.1.7 Calcul de l'intervalle de tolérance :

L'important en validation, ce n'est pas la validité des résultats que nous obtenions avec l'erreur totale, mais plutôt la garantie de ce que la même procédure analytique pourra donner comme résultat dans le futur, c'est le rôle de l'intervalle de tolérance.

L'estimation des paramètres de justesse et fidélité μ_j , $\sigma^2_{B,j}$, $\sigma^2_{w,j}$, et à chaque niveau de concentration j n'est pas une fin en soi, mais 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 et pour chaque modèle mathématique.

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

Où :

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

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

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

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

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

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

Avec :

n : nombre de répétitions ;

P : nombre de séries.

$$\left[\text{biais}(\%)_j - Q_t \left(v; \frac{1 + \beta}{2} \right) \sqrt{1 + \frac{1}{pnB_j^2} CV_{FI,j}}; \text{biais}(\%)_j + Q_t \left(v; \frac{1 + \beta}{2} \right) \sqrt{1 + \frac{1}{pnB_j^2} CV_{FI,j}} \right]$$

Le même intervalle en échelle relative devient :

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 probabilité β pour le niveau de concentration en question, si l'intervalle de tolérance est inclus dans les limites $[-\gamma ; +\gamma]$ définies a priori en fonction des objectifs de la méthode [21].

7.1.8 Profil d'exactitude et décision

7.1.8.1 Calcul

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.

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

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

Si le profil d'exactitude est entièrement inclus dans les limites d'acceptation $[-\lambda, +\lambda]$ alors on peut affirmer que, en routine, le pourcentage de résultats dont la différence entre la valeur déterminée X et la valeur vraie V est inférieure, en valeur absolue à λ sera au moins égale à β . [21]

$$\text{Prob } (|X - V| < \lambda) \geq \beta$$

7.1.8.2 Choix de la fonction de réponse

L'utilisation de certaines fonctions ne permet pas à la procédure analytique d'atteindre ses objectifs vus que pour certaines concentrations, les limites de tolérances sortent des limites d'acceptation (- 5%, + 5%) retenues pour cet exemple. 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. Nous attirons également l'attention sur le fait, que pour l'ensemble de ces modèles, le coefficient de détermination R^2 est toujours supérieur à 0.99 et pas en rapport ici avec la qualité des résultats.

Une fois de plus nous tenons à souligner ici que ce coefficient n'est pas une indication fiable de la qualité des résultats que la procédure rendra [29].

7.2 Selon le guideline ICH Q2 (R1)

Les quantités de la substance à tester doivent être pesées individuellement et mélangées à une quantité la plus constante possible de mélange des autres composants. Il est possible d'introduire dans le mélange la substance à tester sous forme d'une partie aliquote d'une solution mère, mais les observations étant supposées indépendantes, chaque solution mère ne doit être utilisée que pour une seule observation.

Linéarité, exactitude [27]

- L'intervalle de concentration validé est couvert par une série de cinq concentrations régulièrement espacés et positionnés par exemple autour de 60, 80, 100, 120 et 140% de la concentration théorique.
- Effectuer au minimum trois séries indépendantes de ces cinq concentrations à raison d'une série par jour. Ce protocole doit être réalisé sur la forme pharmaceutique reconstituée (standard de validation) et sur la substance à doser seule.

Fidélité [27]

- Effectuer au minimum trois séries de six pesées à 100% de la concentration théorique sur la forme pharmaceutique ou à partir d'un homogène de produit fini à raison d'une série par jour.

- Les mesures individuelles Y_{jk} sont supposées être indépendantes, de caractère aléatoire et de distribution normale.

Les principaux critères de l'étude statistique suivant le guide ICH Q2(R1) sont présentés dans le tableau ci-dessous. [ICH Q2R1]

Tableau XV: Principaux critères d'étude statistique de la validation analytique selon l'ICH Q2(R1).

Linéarité	Calcul de la pente b
	Calcul de l'ordonnée à l'origine a
	Calcul du coefficient de corrélation
	Test de comparaison des pentes et des ordonnées à l'origine avec 0
	Test de l'homogénéité des variances : test de Cochran
	Graphique des résidus
	Test de l'existence d'une pente significative
	Test de la validité de la droite de régression
Exactitude	Test d'homogénéité des variances : test de Cochran
	Test de la validité des moyennes
	Calcul du recouvrement moyen et des intervalles de confiance
Fidélité	Test d'homogénéité des variances : test de Cochran
	Test de Dixon
	Etude des variances de la répétabilité, de la fidélité intermédiaire, et les intervalles de confiance correspondants.

Protocole d'étude :

Linéarité, exactitude

Effectuer N pesées X_{ij} réparties en k groupe de n répétitions chacun, de telle sorte qu'elles soient peu différentes à l'intérieur d'un groupe mais qu'il existe entre eux, autant que possible, une progression arithmétique. Les pesées du groupe médian doivent être proches de la pesée qui sera utilisée en routine. À chacune des pesées x_{ij} correspond une observation y_0 . Il est recommandé de faire au minimum cinq groupes de trois répétitions.

Réaliser selon ce protocole, deux gammes :

- Une gamme avec la forme pharmaceutique reconstituée, soit D1 d'équation $y = b_1x + a_1$, la droite de régression linéaire correspondante.

- Une gamme avec le principe actif seul (étalon), soit, D2 d'équation $y = b_2 x + a_2$ la droite de régression linéaire correspondante.

7.2.1 Spécificité

Pour évaluer la spécificité on compare les pentes des droites D1 et D2 et les ordonnées à l'origine.

7.2.1.1 Comparaison des pentes des droites D1 et D2.

Calcul de la statistique t test :

$$t_{\text{test}} = |b_1 - b_2| / \sqrt{S^2_{b_1} + S^2_{b_2}}$$

Soient $S^2_{b_1}$ et $S^2_{b_2}$ les variances respectives des pentes b_1 et b_2 des droites D1 et D2. La comparaison des pentes b_1 et b_2 s'effectue avec un test t de student :

Si $t_{\text{test}} < t^\circ (\alpha; n_1 + n_2 - 4)$ lu dans la table de Student, on peut affirmer que les pentes ne sont pas significativement différentes au risque α considéré, les droites seront donc comparables.

7.2.1.2 Comparaison des ordonnées à l'origine des droites D1 et D2

La comparaison des ordonnées à l'origine a_1 et a_2 s'effectue avec un test t :

$$t_{\text{test}} = |a_1 - a_2| / \sqrt{S^2_{a_1} + S^2_{a_2}}$$

Avec $S^2_{a_1}$ et $S^2_{a_2}$ les variances respectives des ordonnées à l'origine a_1 et a_2 des droites D1 et D2.

Si $t_{\text{test}} < t^\circ (\alpha; n_1 + n_2 - 4)$ tabulé, on peut conclure que les ordonnées à l'origine des droites D1 et D2 ne sont pas significativement différentes au risque.

Si les pentes et les ordonnées à l'origine des droites D1 et D2 sont comparables, on peut conclure que les droites sont superposables donc la méthode est spécifique [27].

7.2.2 Linéarité

7.2.2.1 Étude statistique

7.2.2.1.1 Estimation d'une droite de régression linéaire

Elle est déterminée à partir des couples (X_{ij}, Y_{ij}) , soit $Y = Bx + A$ l'équation de la droite de régression réelle inconnue. b est la pente, a est l'ordonnée à l'origine. Les estimations recherchées a et b de A et B correspondent à une droite d'équation $y = bx + a$ qui est l'estimation de la droite réelle inconnue.

7.2.2.1.2 Calcul de la pente (b)

L'estimation de b s'obtient en appliquant la méthode des moindres carrés, le but est de rendre minimale la somme des carrés $(y_{ij} - y^*_{ij})$ entre les valeurs expérimentales y_{ij} et les valeurs estimées y^*_{ij} .

$$b = \frac{\sum_{j=1}^k \sum_{n=1}^{n_i} (x_{ij} - \bar{x}) \cdot (y_{ij} - \bar{y})}{\sum_{j=1}^k \sum_{n=1}^{n_i} (x_{ij} - \bar{x})^2}$$

Soit b_1 et b_2 les coefficients de régression respectifs des droites D_1 et D_2 .

7.2.2.1.3 Calcul de l'ordonnée à l'origine (a)

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

$$a = \frac{\bar{y} - b\bar{x}}{\bar{x}}$$

Soient a_1 et a_2 les ordonnées à l'origine des droites D_1 et D_2 .

7.2.2.1.4 Calcul du coefficient de corrélation :

Bien que les informations fournies par le coefficient de corrélation soient limitées, sa détermination est aisée. Soient :

- S_{xij} et S_{yij} : les écarts types respectifs des variables x_{ij} et y_{ij} :
- $S_{xij yij}$ la covariance des variables x_{ij} et y_{ij} .

Le calcul statistique de la covariance est le suivant :

$$S_{xij yij} = \sum_j^1 \sum_j^{n_i} (x_{ij} - \bar{x}) \cdot (y_{ij} - \bar{y})$$

Le calcul du coefficient de corrélation s'effectue comme suit :

$$r = S_{xij yij} / S_{xij} \cdot S_{yij}$$

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

7.2.2.1.5 Tests de comparaison de l'ordonnée à l'origine avec 0

$$\frac{|a|}{S_a} < t(\alpha; N-2)$$

Avec $t(\alpha, N-2)$ lu dans la table de student. Si celle-ci est vérifiée, on peut affirmer que l'ordonnée à l'origine n'est pas significativement différente de 0 au seuil de signification α .

Soient S_{a1} et S_{a2} les écarts types respectifs des ordonnées à l'origine des droites D_1 et D_2 .

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

La comparaison des ordonnées à l'origine a_1 et a_2 s'effectue avec un test t :

$$t_{\text{test}} = |a_1 - a_2| / \sqrt{S^2_{a_1} + S^2_{a_2}}$$

Avec $S^2_{a_1}$ et $S^2_{a_2}$ les variances respectives des ordonnées à l'origine a_1 et a_2 des droites D_1 et D_2 .

Si $t_{\text{test}} < t(\alpha; n_1 + n_2 - 4)$ lu dans la table de Student, on peut conclure que les ordonnées à l'origine des droites D_1 et D_2 ne sont pas significativement différentes au risque α .

7.2.2.1.7 Test d'homogénéité des variances

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

$$C_{\text{test}} = \frac{S^2_{\text{max}}}{\sum_{j=1}^p S_j^2}$$

Où :

S_j^2 = variance du groupe j ;

S^2_{max} = variance la plus élevée des k groupes j

Si $C < C^0(\alpha ; p ; n-1)$: l'ensemble des variances des différents groupes j peut être considéré comme homogène au risque α .

Si $C > C^0(\alpha ; p ; n-1)$: les variances des différents groupes j présentent des variations aberrantes.

7.2.2.1.8 Test de l'existence d'une pente significative

Ce test consiste à comparer les variations dues à la régression et aux erreurs (expérimentales et d'ajustement) :

$$F_1 = \frac{s_l^2}{s_R^2}$$

Avec :

- variance due à la régression linéaire : S_l^2 ;

- variance résiduelle S_R^2 , qui représente la différence entre la valeur théorique et la valeur réelle ;

- variance totale : S_T^2 .

On compare le F_1 avec le $F^0(1 ; \alpha ; n-2)$ lue sur la table de Fisher.

La vérification de l'existence d'une pente significative est établie à l'aide du test de Fisher F_1 en montrant que les variances S_l^2 et S_R^2 sont significativement différentes au risque α choisi.

7.2.2.1.9 Test de la validité de la droite de régression

Ce test permet de comparer les erreurs d'ajustement (SL^2) et expérimentale (SE^2).

$$F_2 = \frac{S_L^2}{S_E^2}$$

Avec :

- S_L^2 : variance de l'erreur de régression, erreur du modèle ;
- S_E^2 : variance de l'erreur expérimentale (variation à l'intérieur de chaque niveau).

On compare F_2 avec $F^\circ (\alpha ; k-2 ; N-k)$ lu sur la table de Fisher.

Si F_2 n'est pas significatif, l'ajustement est considéré comme valide au seuil de probabilité considéré α .

7.2.2.2 Méthode de linéarisation [27]

Il arrive que l'on ne puisse utiliser le modèle de régression linéaire simple. La représentation graphique de couple d'observations peut suggérer un modèle autre que le modèle linéaire simple.

Dans la plupart des cas, on peut linéariser ces modèles à l'aide de simples transformations sur les variables.

Les modèles suivants peuvent être linéarisés :

- Modèle de forme expérimentale par une transformation logarithmique, racine ;
- Modèle de forme réciproque ($x' = \frac{1}{x}$).

7.2.3 Exactitude

On considère le recouvrement, également désigné Y_{ij} , correspondant au rapport entre la masse calculée à partir du résultat de la mesure, grâce au système de référence choisi, et la masse pesée.

Si le système de référence est l'étalon 100% (centre de gamme) : $Y_{ij} = y_{ij} \times 100 / x_{ij} y_{100}$.

Si le système de référence est la gamme d'étalonnage du principe actif (droite D2) :

$$Y_{ij} = 100 (y_{ij} - a_2) / x_{ij} b_2$$

Tests : homogénéité des variances (groupes par niveau de concentration), et homogénéité des moyennes.

Si les variances et les moyennes sont reconnues homogènes, on calcule alors le recouvrement moyen et son intervalle de confiance.

Système de référence :

a) Système de référence considéré : Droite D2 :

Effectuer le changement de variable suivant :

$$Y_{ij} = 100. (y_{ij} - a_2) / b_2.x_{ij}$$

Nous disposons ainsi de N valeurs Y_{ij} réparties en K groupes de n valeurs.

b) Système de référence considéré : Etalon 100%

Soient x_{100} et y_{100} respectivement la pesée et l'observation correspondant à la solution de référence. Effectuer le changement de variable suivant :

$$Y_{ij} = y_{ij} \cdot x_{100} / x_{ij} \cdot y_{100}$$

Cette méthode permet d'évaluer l'exactitude dans les conditions de dosage routinières.

7.2.3.1 Vérification de l'homogénéité des variances liées :

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

$$C_{\text{test}} = \frac{S^2_{\text{max}}}{\sum_{j=1}^p S_j^2}$$

Où :

S_j^2 = variance de chaque groupe j .

S_{max}^2 = variance la plus élevée des k groupes j .

Si $C_{\text{test}} < C^0(\alpha ; p ; n-1)$: l'ensemble des variances des différents groupes j peut être considéré comme homogène au risque α .

Si $C_{\text{test}} > C^0(\alpha ; p ; n-1)$: présence de valeurs suspectes au sein des différents groupes j au risque considéré α .

7.2.3.2 Test de validité des moyennes

Ce test consiste à comparer les erreurs inter-groupes et intra-groupes :

$$F_{\text{calculé}} = S_C^2 / S_E^2$$

$F_{\text{critique}}(\alpha, k-1, n-k)$

Si $F_{\text{calculé}} < F_{\text{critique}}$, on peut dire qu'au risque considéré α les variations des observations entre les différents groupes sont dues aux erreurs expérimentales.

TableauXVII : test de validité des moyennes

Variations	DDL	Somme des carrés	Variances	Fcalculé
Variation totale	n-1	$\sum_{j=1}^{jk} \sum_{i=1}^{i=n} (Y_i - \bar{Y})^2$	$S_T^2 = \sum T^2 / (N - 1)$	
Variation intra-groupe	n-k	$\sum_{j=1}^{jk} \sum_{i=1}^{i=n} (Y_i - \bar{Y})^2$	$S_E^2 = \sum E^2 / (N - k)$	$F_2 = S_C^2 / S_E^2$
Variation inter-groupe	k-1	$\sum C^2 = \sum T^2 - \sum E^2$	$S_C^2 = \sum C^2 / (k - 1)$	

Avec :

S_T^2 : La variation totale ;

S_E^2 : La variation intra-groupe ;

S_C^2 : La variation intergroupe

7.2.3.3 Estimation du recouvrement moyen :

Il est possible de déterminer le recouvrement moyen ainsi que l'intervalle de confiance.

$$RM = \sum_{j=1}^k (1/k_{nj}) \sum_{i=1}^{nj} Y_{ij}$$

Avec : k = nombre de groupes.

7.2.3.4 Estimation de l'intervalle de confiance :

L'intervalle de confiance est exprimé par la formule ci-après :

$$I_{RM} = RM \pm \frac{t_{(\alpha; N-1)} \cdot S_T}{\sqrt{N}}$$

7.2.4 Fidélité

7.2.4.1 Test d'homogénéité des variances (test de Cochran)

Il convient tout d'abord d'effectuer le test de Cochran comme décrit précédemment (voir 2.3.1).

Si $C < C^\circ(\alpha; p; n-1)$: l'ensemble des variances des différents groupes j peut être considéré comme homogène au risque α ;

Si $C > C^\circ(\alpha; p; n-1)$, il existe des valeurs suspectes → effectuer le test de Dixon à la recherche de valeurs aberrantes.

7.2.4.2 Test de Dixon :

On commence par classer les observations par ordre croissant : $Y_1, Y_2, \dots, Y_n$ la mesure incriminée est soit Y_1 ou Y_n . Parmi ces 2 valeurs, on choisit celle qui s'écarte le plus de la médiane.

a) Le critère à utiliser est :

- $Q = Y_2 - Y_1 / Y_n - Y_1$: si la mesure incriminée est Y_1
- $Q = Y_n - Y_{n-1} / Y_n - Y_1$; si la mesure incriminée est Y_{n-1} .

b) Le critère calculé Q peut se trouver dans l'un des cas de figure suivants :

- $Q <$ la valeur critique de la table au seuil 5% : le test de Dixon n'est pas significatif ; aucune valeur ne peut-être suspectée ;

- Q est compris entre les valeurs critiques de la table aux seuils 5 et 1% ; dans ce cas, la valeur incriminée est dite « suspecte » ;

- $Q >$ la valeur critique de la table au seuil 1% ; dans ce cas, la valeur incriminée est dite « aberrante »

c) Dans le cadre visant à estimer les critères de la fidélité, le test Q de Dixon ne devrait être appliqué que lorsque le test de Cochran sur les variances a déjà indiqué une anomalie sur l'une d'entre elles.

7.2.4.3 Moyennes des groupes :

La moyenne m_j des n_j répétitions à l'intérieur du groupe j est donnée par :

$$M_j = \frac{\sum_{i=1}^{n_j} Y_{ij}}{n_j}$$

7.2.4.4 Étude des variances

Les variances prises en compte pour l'étude de la fidélité sont les suivantes :

- Calcul des variances de répétabilité

$$S_r^2 = \sum_{j=1}^3 \frac{S_j^2}{3}$$

- Calcul des variances de fidélité intermédiaire

$$S_g^2 = \frac{\sum_{j=1}^3 (M_j - \bar{M})^2}{p-1} - \frac{S_r^2}{n}$$

Avec :

M_j = moyenne des groupes ;

$\bar{M}$ = Moyenne des moyennes des groupes.

7.3 Étude statistique de la validation analytique selon la guidelines FDA [23]

Les paramètres fondamentaux pour garantir l'acceptabilité de la performance d'une validation de méthode bioanalytique sont l'exactitude, la sélectivité, la fidélité, la sensibilité, et la stabilité.

7.3.1 Sélectivité :

La sélectivité est la capacité d'une méthode d'analyse à différencier et à quantifier l'analyte en présence d'autres composés dans l'échantillon.

Pour des raisons de sélectivité, les analyses d'échantillons blancs d'une matrice biologique appropriée (plasma, urine ou autre matrice) doit être obtenue à partir d'au-moins six sources.

Les substances interférentes potentielles dans une matrice biologique comprennent les

composants endogènes de la matrice. Si la méthode est destinée à quantifier plus d'un analyte, chaque analyte doit être testé pour s'assurer qu'il n'y a pas d'interférence.

- Étude statistique

$$\text{LOQ} = \text{X blanc} + 10 \text{ S blanc}$$

X blanc : valeur moyenne de n mesures* de blancs indépendants,

S blanc : écart-type des mesures des blancs,

10 facteur numérique (parfois choisi selon le niveau de confiance exigé).

- Chaque échantillon blanc doit être testé pour les interférences, et la sélectivité doit être assurée à la limite inférieure de quantification (LOQ).

7.3.2 Exactitude

L'exactitude d'une méthode d'analyse décrit la proximité des résultats moyens obtenus par la méthode par rapport à la valeur réelle (concentration) de l'analyte. Elle est souvent confondue avec la justesse.

- Étude statistique

L'exactitude est déterminée par l'analyse répétée d'échantillons contenant des quantités connues de l'analyte.

L'exactitude doit être mesurée en utilisant un minimum de trois déterminations par concentration.

1- moyenne des groupes :

$$m_j = \frac{\sum_{j=1}^{n_j} y_j}{n_j}$$

La valeur moyenne devrait se situer à 15 % près de la valeur réelle, sauf au LLOQ, où elle ne devrait pas s'écarter de plus de 20 %. L'écart de la moyenne par rapport à la valeur réelle sert de mesure de l'exactitude.

2- l'écart de la moyenne :

$$\text{EM} = \frac{\sum |x_i - \bar{x}|}{n}.$$

Avec, $\bar{x}$: la moyenne

7.3.3 Fidélité

C'est le degré d'accord des mesures individuelles de l'analyte quand la méthode est appliquée avec répétabilité sur plusieurs prélèvements d'un même échantillon homogène de la matrice biologique.

- Étude statistique

Calcul d'écart type :

$$s = \sqrt{\frac{\sum (x - \bar{x})^2}{n}}$$

Calcul de la moyenne des groupes :

$$m_j = \frac{\sum_{j=1}^{n_j} y_j}{n_j}$$

Calcul du coefficient de variation :

$$CV = (\text{l'écart-type} / \text{la moyenne})$$

- À la limite de quantification CV inférieur ou égal à 20% ;
- Hors la LOQ le CV inférieur ou égal à 15%.

PARTIE PRATIQUE

Matériel & méthodes

Le présent travail relatif à l'étude des différentes approches de validation analytique, il a été réalisé au laboratoire de Chimie Analytique du Département de Pharmacie de Tizi Ouzou, il a pour objet, une analyse critique des différents protocoles de validation analytique avec une étude comparative des trois protocoles les plus rencontrés en analyse pharmaceutique.

1 Matériel et méthodes

1.1 Matériel

1.1.1 Matières premières

Dans le tableau ci-après sont mentionnées les matières premières utilisées dans notre travail.

Tableau XVIII : Matières premières utilisées.

Matières premières	Source
Piroxicam	Disponible au laboratoire de Chimie Analytique de Tizi Ouzou
placebo	Préparés au laboratoire de chimie analytique

1.1.2 Réactifs

Le tableau suivant résume les différents réactifs utilisés pour la préparation des solutions

Tableau XIX : Réactifs utilisés.

Acétonitrile	Chromasolv grade HPLC
Na ₂ HPO ₄	Biochem
Méthanol	Honywell grade HPLC
Acide chlorhydrique	Biochem
Eau distillée	Préparée par distillation au laboratoire de Chimie Analytique

1.1.3 Appareillages et équipements

Les appareils et équipements utilisés afin de réaliser ce travail sont résumés ci-dessous :

Tableau XX : Appareillages utilisés.

Désignation	Spécification	Usage
HPLC (SHIMADZU LC20)	Pompe	LC 20 at
	Injecteur Automatique	SIL 20 A
	Contrôleur	CBM-20
	Compartiment de la colonne	CTO-20 A
	Colonne	C18 (25 cm)
	Détecteur	Spectrophotomètre UV visible
		Analyse

	Logiciel D'exploitation	LC-solution	
	Distillateur	Nuve	Eau distillée
	Sonicateur	Advantage-LAB	Solubilisation
	Balances analytiques	KEREN	Pesée
		OHAUS	
	Etuve	MEMMERT	Séchage



Figure 3 : HPLC (SHIMADZU LC20).

1.1.4 Verrerie et autres

La verrerie utilisée est résumée dans le tableau suivant :

Tableau XXI :Verreries et autres matériels utilisés

Verreries	Autres
Fioles jaugées 20ml, 50ml, 100ml, 1000ml, 2000ml Béchers Eprouvette : 1000ml Pipettes jaugées : 2ml Entonnoirs Viales Verre de montre Erlenmeyer	Micropipette : 1ml Poires Pissettes Spatules Bavettes Papier filtre

1.2 Méthodes

Afin d'optimiser notre méthode de dosage du Piroxicam par HPLC, nous nous sommes référés à la pharmacopée européenne dans sa partie monographie du Piroxicam, où ils ont décrit le dosage des principes actifs par HPLC. Ils ont proposé d'utiliser un mélange d'acétonitrile, méthanol et tampon phosphaté comme phase mobile avec différentes proportions, nous avons essayé différentes proportions de phase organique (acétonitrile + méthanol) et tampon. A la fin, nous avons opté pour une proportion de 30/15/55v/v. Quant au temps d'analyse, il est de 6 min car le temps de rétention est obtenu à 4.27 min. Nous avons fixé la longueur d'onde à 248 nm après avoir effectué un balayage par spectromètre d'absorption UV Visible,

1.2.1 Méthodologie de la validation

Il existe de nombreux documents officiels décrivant les critères de la validation à tester, mais ne proposent pas de protocole expérimental et se limitent le plus souvent aux concepts généraux. Si ces premiers guides ont largement contribué à faire appliquer et progresser les validations analytiques, ils présentent toutefois des faiblesses quant aux conclusions des tests réalisés et quant à l'aide à la prise de décision au regard de limites d'acceptation définies pour l'usage d'une procédure analytique. Sur ce, le présent travail est basé sur :

- Les recommandations de la commission SFSTP publiées en 2003 complétées en 2006 qui propose de revoir les bases mêmes de la validation analytique pour une démarche harmonisée, en distinguant notamment les règles de diagnostic et les règles de décision. Ces dernières reposent sur l'utilisation du profil d'exactitude, basé sur la notion d'erreur totale (biais + écart type), permettant de simplifier l'approche de la validation d'une procédure analytique tout en contrôlant le risque associé à son utilisation ;
- Les recommandations de guide l'ICH.

1.2.2 Choix du protocole de validation

Selon les recommandations de la commission SFSTP publiées en 2003 complétées en 2006 :

Suivant le logigramme de la figure 2 qui permet de sélectionner un protocole de validation et le tableau XII et sachant que : la procédure de dosage est connue ultérieurement, 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 utilisant 5 niveaux de concentration pour les SE et les SV.

1.2.3 Choix des paramètres de la validation

1.2.3.1 Domaines d'application et niveaux de concentration

Le choix des niveaux de concentration pour le dosage d'une substance chimique (principe actif) dans le cadre du dosage d'une matière première de piroxicam.

Dans notre travail, nous avons opté pour cinq niveaux de concentration qui englobent la plage des concentrations dissoutes de piroxicam de 25mg lors de la validation selon le profil

d'exactitude de la commission SFSTP (2006) ; de 80% jusqu'à 120% (Cmax) en passant par trois niveaux intermédiaires.

1.2.3.2 Limites d'acceptabilité (λ)

Elle signifie que pour une concentration de 25 mg /L le résultat sera compris au maximum entre 23.75 et 26.25mg/L ; $\lambda = \pm 5\%$.

1.2.3.3 Probabilité de confiance (β)

$\beta = 95\%$, on choisit $\geq 95\%$ dans le domaine pharmaceutique.

1.2.3.4 Conditions expérimentales

A. Le choix de la dilution

Pour réaliser un dosage direct, effectuer des dilutions 1/10 à toutes les solutions mères de tous les niveaux de concentration des standards d'étalonnage et de validation

B. Le choix de diluant

Selon la pharmacopée européenne, le piroxicam se dissout dans des solvants acides. Pour cela, nous avons choisi d'utiliser l'HCl mélangé avec méthanol a une proportion 60/40 v/v.

1.2.3.5 Préparation des solutions

A. Préparation du diluant (0.05 N)

Dans une fiole jaugée de 2 L, mettre 8.7 ml d'HCl à 37%, ajouter 800 mL de méthanol et compléter au trait de jauge avec l'eau pure.

B. Préparation des solutions mères

Dans des fioles jaugées de 50 ml, peser les différentes masses correspondantes à chaque niveau de concentration du piroxicam, dissoudre dans des volumes suffisants du diluant, mettre à l'ultrason pour une dissolution totale puis compléter au trait de jauge avec le diluant.

Tableau XXII : Masses correspondantes pour chaque niveau de concentration des solutions mères Masse correspondante

Niveau %	Masse correspondante (mg)
80	20,0
90	22.5
100	25,0
110	27.5
120	30,0

C. Préparation des standards d'étalonnage

Effectuer une dilution à 1/10^{ème} en prélevant 2ml à partir de chacune des solutions mères obtenues dans des fioles de 20 ml complétées au trait de jauge avec le diluant afin d'obtenir les solutions filles.

D. Préparation des standards de validation

Prélever 2 mL à partir de chacune des solutions mères obtenues, dans des fioles de 20 mL, ajouter 2 mL d'une solution des excipients déjà préparée et filtrée (solution placebo), compléter au trait de jauge avec le diluant afin d'obtenir nos solutions filles.

E. Préparation de la solution placebo

Dans une fiole jaugée de 100 ml peser 100 mg du placebo préalablement préparé (contenant les excipients du médicament dans les proportions définies par la formule quantitative du produit fini). Dissoudre dans un volume suffisant du diluant, ajuster jusqu'au trait de jauge puis filtrer à l'aide d'un papier filtre.

F. Préparation de solution de Na_2HPO_4 (0.1M)

Dans un Erlenmeyer de 1L, peser 17.9 g Na_2HPO_4 , compléter avec l'eau distillée jusqu'au trait de jauge. A l'aide d'un papier filtre, on filtre la solution obtenue.

G. Préparation de la phase mobile

A partir de la solution filtrée de Na_2HPO_4 on a versé 550ml dans une éprouvette de 1000ml, ainsi que 300 ml d'acétonitrile et 150 ml de méthanol.

H. Préparation des solutions pour l'étude de la fidélité selon l'ICH

a) Préparation de la solution mère

Dans des fioles jaugées de 50 ml, peser la masse correspondante au niveau 100 %de concentration du Piroxicam (25 mg), dissoudre dans un volume suffisant du diluant, mettre à l'ultrason pour une dissolution totale puis compléter au trait de jauge avec le diluant.

La préparation de la solution mère est réalisée en 3 séries, chaque série comporte 6 répétitions indépendantes.

b) Préparation de la solution à analyser (Standard de validation 100%)

Prélever 2 mL à partir de chacune des solutions mères obtenues précédemment, dans des fioles de 20 mL, ajouter 2 mL d'une solution des excipients déjà préparée et filtrée (solution placebo), mélanger par retournement, puis compléter au trait de jauge avec le diluant afin d'obtenir les solutions à analyser.

1.2.3.6 Conditions chromatographiques

Les conditions chromatographiques sont résumées dans le tableau suivant :

Tableau XXIII : Conditions chromatographiques de la méthode de dosage

Colonne	Longueur	25 cm
	Diamètre	4,6 mm
	Taille des particules	5 μm
	Phase stationnaire	Gel de silice octadecylesilyle (C18)
Détection	Spectrophotomètre UV-visible : Longueur d'onde =248nm	
Volume d'injection	20 μl	
Temps d'analyse	6 min	
Débit	1 ml/min	
Temperature	Ambiante	

Phase mobile	Mélange de : • 55% de tampon phosphaté (Na_2HPO_4) • 30% d'acétonitrile • 15% méthanol
---------------------	---

1.2.4 Préparation de la feuille de calcul

En utilisant le logiciel Excel de Microsoft office 2016 enregistré, installé sur le système d'exploitation Windows 7.

L'ensemble des équations rentrant dans l'étude statistique de la validation sont introduites dans les tableaux, 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.

Résultats

2 Résultats

Toutes les données brutes obtenues sont mentionnées en annexe V :

2.1 Selon le rapport de la commission SFSTP 2006 :

2.1.1 Spécificité et effet matrice

2.1.1.1 Comparaison des chromatogrammes

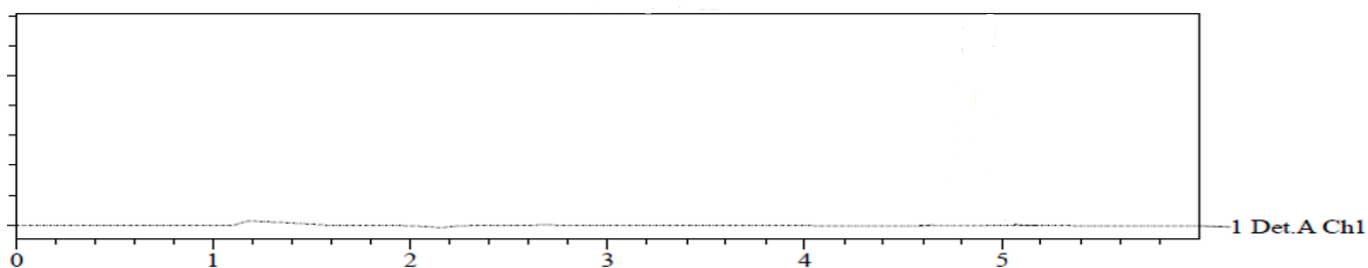


Figure 9 : Chromatogramme du diluant non chargé de PA.

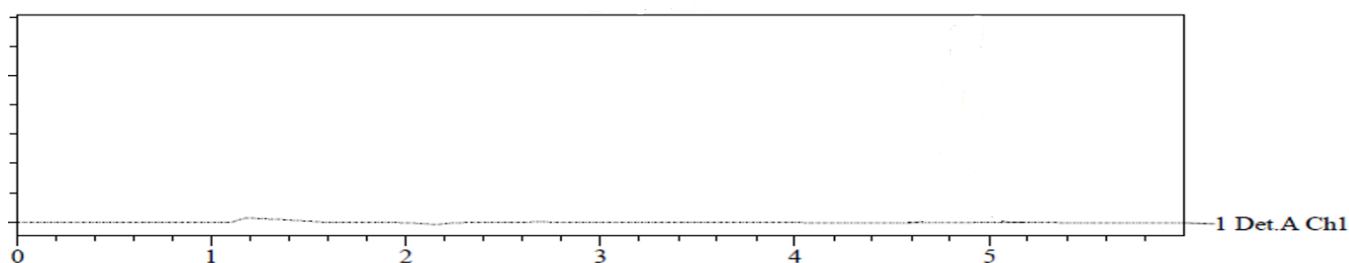


Figure 10 : Chromatogramme du diluant avec placebo non chargé de PA.

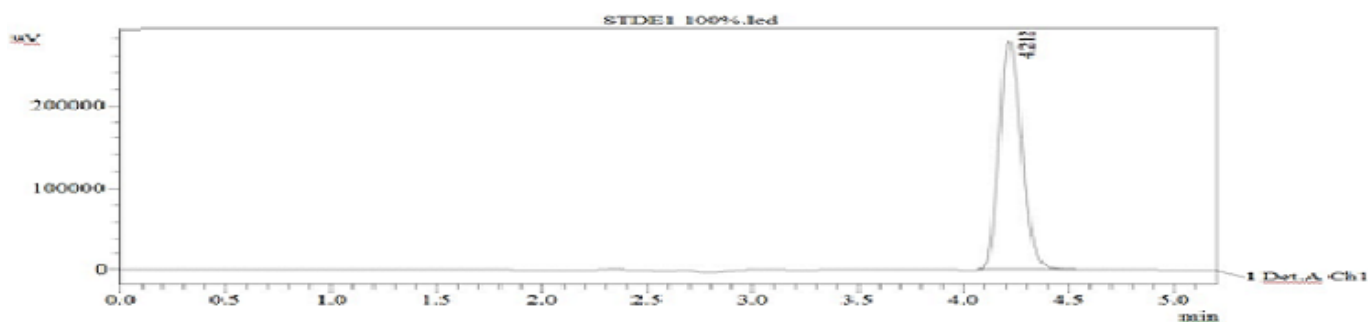


Figure 11 : Chromatogramme du standard d'étalonnage.

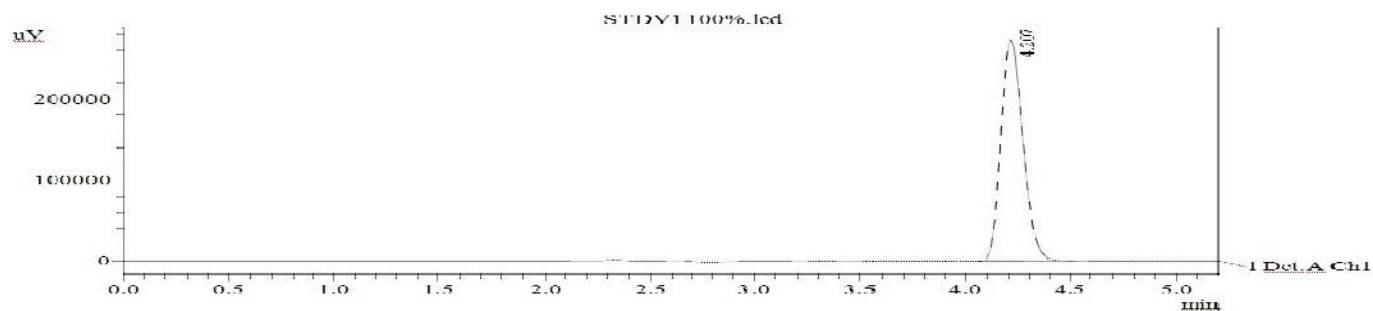


Figure 12 : Chromatogramme du standard de validation.

2.1.1.2 Confirmation de la spécificité sur les deux gammes d'étalonnage et de validation

Les résultats de la comparaison de deux pentes de la droite de régression sur la gamme sans matrice et la droite obtenue sur la gamme avec matrice sont évalués dans les tableaux Suivants :

Tableau XXIV : Résultats obtenus sur la gamme SE (Annexe IV).

STANDARD D'ETALONNAGE			
Niveau conc (j)	Rep (k)	Série 1	
		Quantités introduites	Réponse instrumentale
J	k	x	y
1	1	20,00	1679062,00
	2	19,96	1647438,00
2	1	22,47	1917522,00
	2	22,51	1917522,00
3	1	24,98	2116027,00
	2	24,90	2182922,00
4	1	27,49	2387276,00
	2	27,50	2393691,00
5	1	30,04	2643336,00
	2	30,05	2658622,00
Ord Org			Pente
-279564,53			97395,21
Erreur (SD)	47412,29242		1878,34186

Tableau XXV : Résultats obtenus sur la gamme SV (Annexe IV).

STANDARD D'ETALONNAGE			
Niveau conc (j)	Rep (k)	Série 1	
		Quantités introduites	Réponse instrumentale
j	k	x	y
1	1	19,96	1680716,00
	2	20,06	1707313,00
	3	19,96	1698861,00
2	1	22,47	1853450,00
	2	22,47	1857069,00
	3	22,48	1867851,00
3	1	25,08	2151747,00
	2	25,10	2146090,00
	3	25,04	2101705,00
4	1	27,50	2393691,00
	2	27,53	2408828,00
	3	27,49	2324623,00
5	1	30,05	2683174,00
	2	30,04	2636676,00
	3	30,02	2621182,00
Ord Org			Pente
-267598,98			96327,68
Erreur (SD)	67857,92243		2685,56237

2.1.1.3 Vérification de l'absence d'effet matrice et d'erreur systématique :

Tableau XXVI : Comparaison de deux pentes.

Comparaison des pentes a1 et a2 des deux droites de régression	t calculé	0.038
	t° (0.05;21)	2,07
	Condition	t calculé < t° (0.05;21)
	Résultat	Non Significatif
Comparaison des ordonnées à l'origine b1 et b2 des deux droites de régression	t calculé	0.006
	t° (0.05;21)	2,08
	Condition	t calculé < t° (α;21)
	Résultat	Non Significatif

2.1.2 Fonction de réponse

La relation existante entre l'aire du pic (réponse instrumentale) et la masse introduite dans les standards d'étalonnage (concentration), obtenue sur chacune des trois séries est représentée pour cinq modèles mathématiques comme suit :

2.1.2.1 Modèle : $y = ax$

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

DONNEES BRUTES OBTENUES (STANDARD D'ETALONNAGE)							
Niveau de conc (j)	Rep (k)	SERIES i					
		Série 1		Série 2		Série 3	
		Quantités introduites	Réponse instrumentale	Quantités introduites	Réponse instrumentale	Quantités introduites	Réponse instrumentale
j	k	x	y	x	y	x	y
1	1	20	1679062	20,05	1689844	20,06	1661615
	2	19,96	1647438	20,03	1678458	19,99	1639697
2	1	22,47	1917522	22,46	1900597	22,52	1918724
	2	22,51	1912882	22,56	1942862	22,47	1908891
3	1	24,98	2116027	24,98	2124199	24,9	2101943
	2	24,9	2182922	25,05	2177075	25,01	2165853
4	1	27,49	2387276	27,5	2326065	27,5	2330520
	2	27,5	2393691	27,47	2316946	27,55	2354514
5	1	30,04	2643336	29,98	2630987	29,98	2625456
	2	30,05	2658622	30,03	2663776	30,02	2652029
		Pente	86413,6401		85915,1165		85649,4346

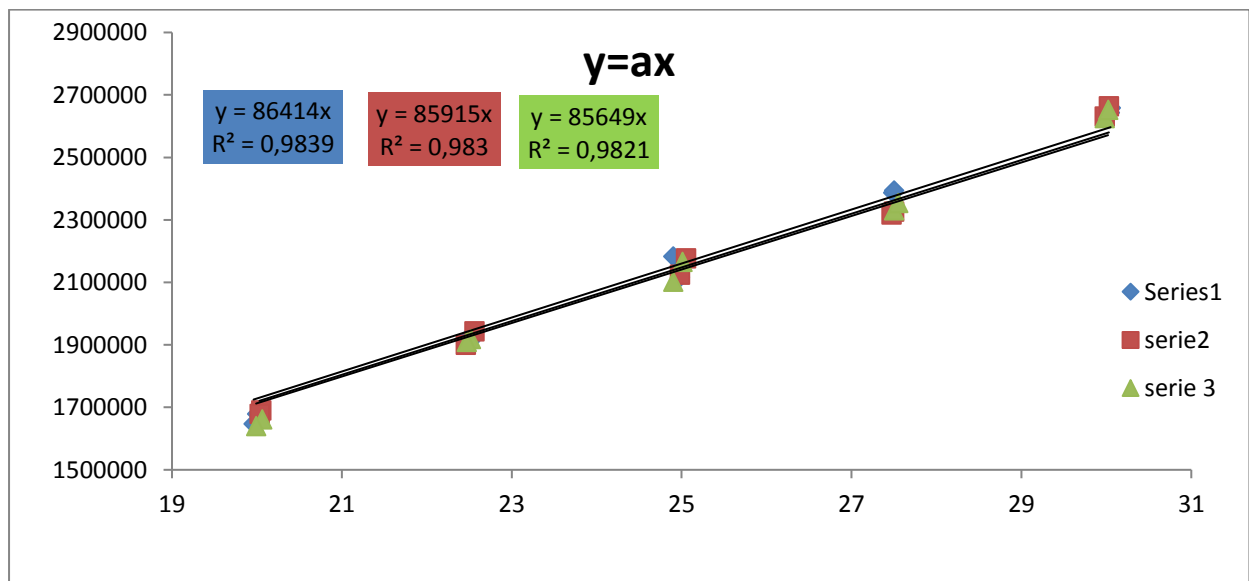


Figure 13 : Courbe de la fonction de réponse $y=ax$.

RESULTATS

2.1.2.2 Modèle : $y = ax + b$

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

DONNEES BRUTES OBTENUES (STANDARD D'ETALONNAGE)							
Niveau de conc (j)	Rep (k)	SERIES i					
		Série 1		Série 2		Série 3	
		Quantités introduites	Réponse instrumentale	Quantités introduites	Réponse instrumentale	Quantités introduites	Réponse instrumentale
j	k	x	y	x	y	x	Y
1	1	20	1679062	20,05	1689844	20,06	1661615
	2	19,96	1647438	20,03	1678458	19,99	1639697
2	1	22,47	1917522	22,46	1900597	22,52	1918724
	2	22,51	1912882	22,56	1942862	22,47	1908891
3	1	24,98	2116027	24,98	2124199	24,9	2101943
	2	24,9	2182922	25,05	2177075	25,01	2165853
4	1	27,49	2387276	27,5	2326065	27,5	2330520
	2	27,5	2393691	27,47	2316946	27,55	2354514
5	1	30,04	2643336	29,98	2630987	29,98	2625456
	2	30,05	2658622	30,03	2663776	30,02	2652029
		Pente	97486,27		93459,14		96288,22
		origine	-282304,18		-192425,89		-271281,30

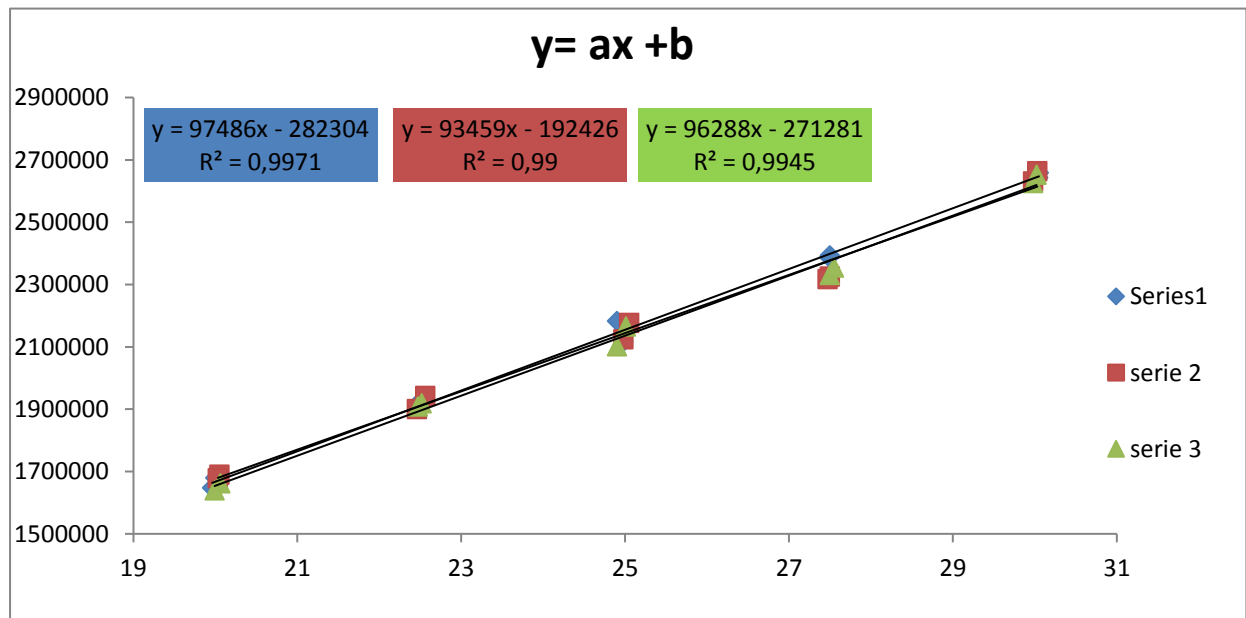


Figure 14 : Courbe de la fonction de réponse $y=ax+b$.

RESULTATS

2.1.2.3 Modèle : $\sqrt{y} = f(\sqrt{x})$

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

DONNEES BRUTES OBTENUES (STANDARD D'ETALONNAGE)							
Niveau de conc (j)	Rep (k)	SÉRIES i					
		Série 1		Série 2		Série 3	
		Quantités introduites	Réponse instrumentale	Quantités introduites	Réponse instrumentale	Quantités introduites	Réponse instrumentale
j	k	x	y	x	y	x	Y
1	1	4,47213595	1295,78625	4,47772264	1299,94	4,47883914	1289,03646
	2	4,46766158	1283,52561	4,4754888	1295,55316	4,47101778	1280,50654
2	1	4,74025316	1384,74619	4,73919824	1378,62141	4,74552421	1385,18013
	2	4,74447047	1383,06977	4,74973683	1393,86585	4,74025316	1381,62622
3	1	4,9979996	1454,657	4,9979996	1457,46321	4,98998998	1449,80792
	2	4,98998998	1477,47149	5,0049975	1475,49144	5,0009999	1471,68373
4	1	5,24309069	1545,08123	5,24404424	1525,14426	5,24404424	1526,60407
	2	5,24404424	1547,15578	5,24118307	1522,15177	5,24880939	1534,44257
5	1	5,48087584	1625,83394	5,47539953	1622,03175	5,47539953	1620,32589
	2	5,48178803	1630,52814	5,4799635	1632,10784	5,47905101	1628,50514
		pente	332,473913			318,261053	329,490151
		origine	-195,006175			-127,431551	-186,524952

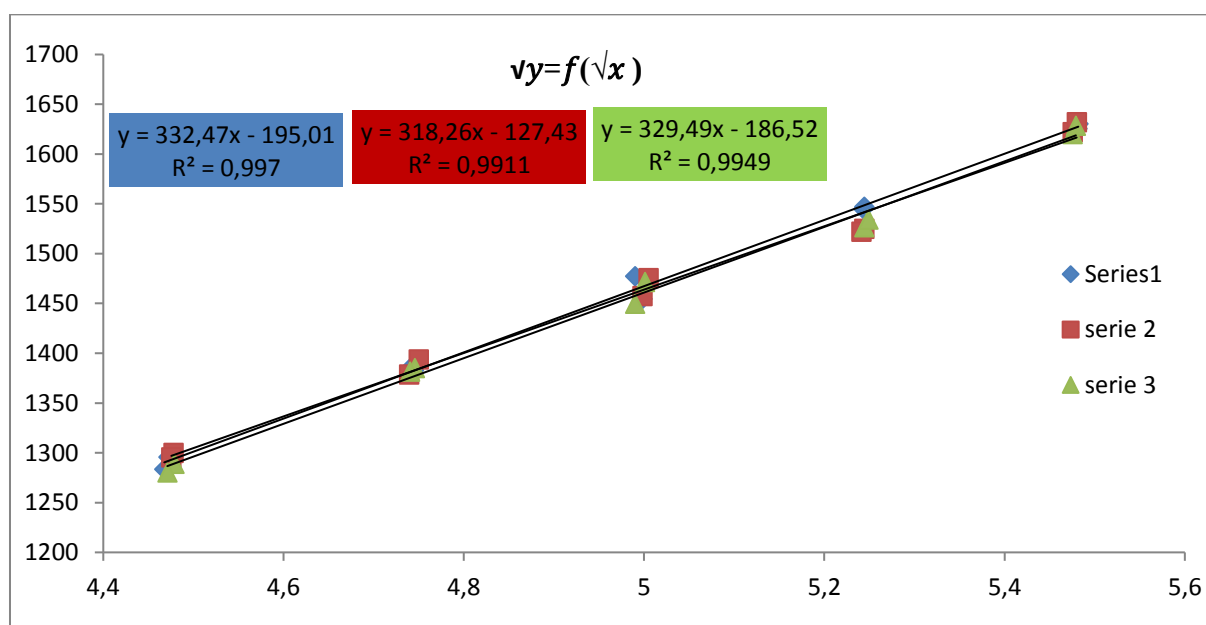


Figure 15 : Courbe de fonction de réponse $y=f(\sqrt{x})$.

RESULTATS

2.1.2.4 Modèle : $\ln y = f(\ln x)$

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

DONNEES BRUTES OBTENUES (STANDARD D'ETALONNAGE)							
Niveau de conc (j)	Rep (k)	SÉRIE i					
		Série 1		Série 2		Série 3	
		Quantités introduites	Réponse instrumentale	Quantités introduites	Réponse instrumentale	Quantités introduites	Réponse instrumentale
j	k	x	y	x	y	x	y
1	1	2,99573227	14,3337459	2,99822915	14,3401468	2,99872778	14,3233006
	2	2,99373027	14,3147319	2,99723115	14,3333861	2,99523215	14,310022
2	1	3,11218109	14,4665443	3,11173595	14,4576786	3,1144038	14,4671709
	2	3,11395966	14,4641216	3,11617843	14,4796727	3,11218109	14,462033
3	1	3,21807551	14,5650508	3,21807551	14,5689054	3,2148678	14,5583727
	2	3,2148678	14,5961749	3,22087383	14,5934928	3,21927575	14,5883248
4	1	3,3138223	14,6856635	3,31418601	14,6596886	3,31418601	14,661602
	2	3,31418601	14,6883471	3,3130945	14,6557605	3,31600254	14,6718449
5	1	3,40252983	14,7875523	3,40053049	14,7828696	3,40053049	14,7807652
	2	3,40286266	14,7933185	3,40219688	14,7952552	3,40186383	14,7908356
		pente	1,1352753		1,08508266		1,12917842
		origine	10,9273408		11,0844023		10,9382017

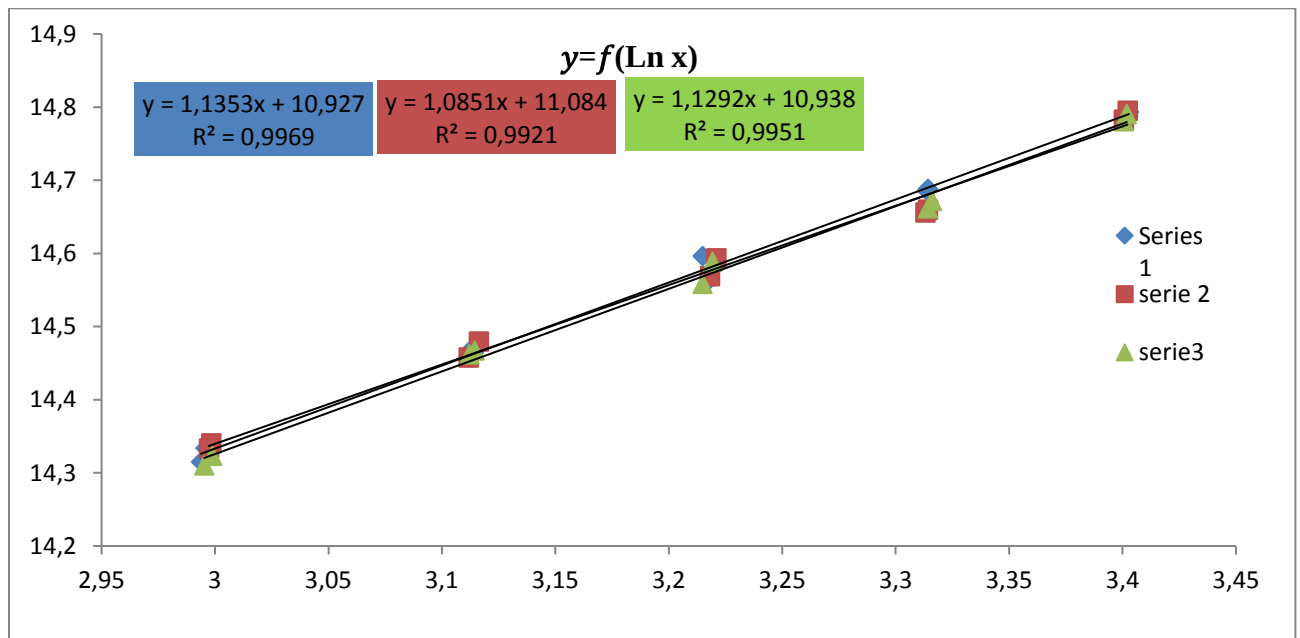


Figure 16 : Courbe de fonction de réponse $\ln y = f(\ln x)$.

2.1.2.5 Critères de choix de la fonction de réponse

Pour le choix de la fonction de réponse, qui est capable de produire une proportion suffisante des futurs résultats qui se situeront à l'intérieur de la zone d'acceptabilité

$[-5, +5]$:

Pour SFSTP 2006 :

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

Le choix du profil d'exactitude est basé sur l'objectif de trouver des biais plus proches à zéro, avec un intervalle de tolérance le plus étroit et situé à l'intérieur des limites d'acceptabilité, pour avoir une méthode valide dans l'intervalle de concentration étudiée.

Après avoir examiné soigneusement les profils d'exactitude des différents modèles et en fonction de ces motifs de choix, nous avons sélectionné :

- Le modèle régression linéaire $y = ax + b$ (voir 2.10)

2.1.3 Alignement des observations

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 des réponses obtenues avec les échantillons de validation est résumé dans le tableau suivant :

RESULTATS

Tableau XXXI : Alignement des observations (Annexe IV).

Niveaux de concertations (j)	Répétitions (k)	Quantité introduite (mg) (Série i)			Moyen Quantité Introduite Uj	Réponses alignées		
		Série 1	Série 2	Série 3		Série 1	Série 2	Série 3
		yijk,c	yijk,c	yijk,c		Yijk,c	Yijk,c	Yijk,c
80%	1	19,96	20,00	20,06	20,01	1683962,51	1684308,02	1702694,47
	2	20,06	20,03	20,00		1700819,99	1712575,48	1684782,76
	3	19,96	20,01	20,00		1702107,51	1703186,50	1692215,76
90%	1	22,47	22,46	22,47	22,49	1853774,65	1914384,55	1855395,76
	2	22,47	22,56	22,51		1857393,65	1903355,41	1933674,24
	3	22,48	22,47	22,49		1867201,70	1889092,04	1868569,00
100%	1	25,08	24,90	25,02	25,02	2151097,70	2104407,09	2092449,96
	2	25,1	24,98	25,05		2143492,79	2175144,97	2189643,31
	3	25,04	25,00	25,00		2104951,51	2195001,94	2186997,73
110%	1	27,5	27,50	27,47	27,51	2394340,30	2394141,03	2311577,61
	2	27,53	27,55	27,50		2406555,45	2348010,46	2327333,96
	3	27,49	27,51	27,54		2326246,25	2322398,51	2410938,43
120%	1	30,05	30,02	29,98	30,01	2681875,40	2628971,50	2693222,88
	2	30,04	29,98	29,97		2636351,35	2621029,55	2623383,76
	3	30,02	30,05	30,02		2622805,25	2640200,95	2655733,35

2.1.4 Prédiction inverses

Les quantités prédites avec la fonction de réponse choisie sont présentées dans le tableau ci-dessous :

RESULTATS

Tableau XXXII : Prédiction inverses obtenues avec le SV.

Niveaux de concertations (j)	Répétitions (k)	Quantité introduite (mg) (Série i)			Moyen Quantité Introduite	Prédiction inverses $x_{ijk,calc}$		
		Serie 1	Serie 2	Serie 3		Serie 1	Serie 2	Serie 3
j	k	$Y_{ijk,c}$	$Y_{ijk,c}$	$Y_{ijk,c}$	U_j	$x_{ijk,calc}$	$x_{ijk,calc}$	$x_{ijk,calc}$
80%	1	19,96	20	20,06	20,01	20,16	20,14	20,5
	2	20,06	20,03	20		20,33	20,44	20,31
	3	19,96	20,01	20		20,35	20,34	20,39
90%	1	22,47	22,46	22,47	22,49	21,9	22,59	22,09
	2	22,47	22,56	22,51		21,94	22,47	22,9
	3	22,48	22,47	22,49		22,04	22,32	22,22
100%	1	25,08	24,9	25,02	25,02	24,96	24,61	24,55
	2	25,1	24,98	25,05		24,88	25,36	25,56
	3	25,04	25	25		24,48	25,57	25,53
110%	1	27,5	27,5	27,47	27,51	27,45	27,69	26,82
	2	27,53	27,55	27,5		27,58	27,2	26,99
	3	27,49	27,51	27,54		26,76	26,93	27,86
120%	1	30,05	30,02	29,98	30,01	30,41	30,19	30,79
	2	30,04	29,98	29,97		29,94	30,1	30,06
	3	30,02	30,05	30,02		29,8	30,31	30,4

RESULTATS

2.1.5 Justesse

Comme indiqué dans le tableau ci-dessous, la justesse est exprimée en termes de biais relatif (%) ou de taux de recouvrement (%) pour chaque niveau de concentration des standards de validation.

Tableau XXXIII : Justesse calculée pour chaque niveau de concentration des standards de validation.

Niveau de concentration (ratio)	Moyenne des concentrations introduites (unit)	Moyenne des concentrations calculées (unit)	Biais absolu (unit)	Biais relatif (%)	Taux de recouvrement (%)
1.0	20.01	20.331	0.322	1.611	101.616
2.0	22.49	22.276	-0.211	-0.939	99.061
3.0	25.05	25.056	0.037	0.147	100.147
4.0	27.51	27.253	-0.257	-0.934	99.066
5.0	30.01	30.222	0.207	0.69	100.69

2.1.6 Fidélité

La fidélité de notre méthode est évaluée dans de conditions de répétabilité et de fidélité intermédiaire. Elle est calculée pour chaque niveau de concentration, exprimée en écart type et en termes de coefficient de variation est résumée dans le tableau suivant :

Tableau XXXIV : Fidélité calculée pour chaque niveau de concentration des standards de validation.

Niveau de concentration (ration)	MSM	MSE	Ecart type de la répétabilité	Ecart type inter-série	Ecart type Fidélité intermédiaire	CV de répétabilité %	CV de fidélité intermédiaire %
80%	0,012	0,014	0,117	0,000	0,117	0,587	0,587
90%	0,223	0,071	0,266	0,225	0,349	1,184	1,552
100%	0,181	0,217	0,456	0,000	0,456	1,823	1,823
110%	0,002	0,218	0,405	0,000	0,405	1,473	1,473
120%	0,103	0,081	0,285	0,085	0,297	0,949	0,990

2.1.7 Erreur totale et profil d'erreur totale

L'erreur totale et l'erreur totale relative calculées pour chaque niveau de concentration sont présentées dans le tableau suivant :

Tableau XXXV : Calcul de l'erreur totale pour chaque niveau de concentration des standards de validation.

Erreur Totale		
Niveau	Erreur Absolue	Erreur Relative
1	0,44	2,197
2	0,56	2,49
3	0,493	1,971
4	0,662	2,407
5	0,504	1,679

2.1.8 Intervalle de tolérance

Les limites de tolérance sont calculées pour chaque niveau de concentration, les résultats obtenus sont dans le tableau ci-dessous :

Tableaux XXXVI : Calcul des limites de tolérance pour chaque niveau de concentration j.

Niveau de concentration (mg)	20,01	22,49	25,05	27,51	30,01
Biais (%)	1.611	-0.939	0.147	-0.934	0.69
Limite intervalle tolérance basse	0,448	-4,119	-3,443	-3,834	-1,275
Limite intervalle tolérance haute	2,773	2,241	3,738	1,966	2,654
Limite d'acceptation basse	-5,00	-5,00	-5,00	-5,00	-5,00
Limite d'acceptation haute	+5,00	+5,00	+5,00	+5,00	+5,00

2.1.9 Profil d'exactitude

Les différentes figures ci-après, représente les différents modèles de profile d'exactitude obtenu avec les différentes fonctions :

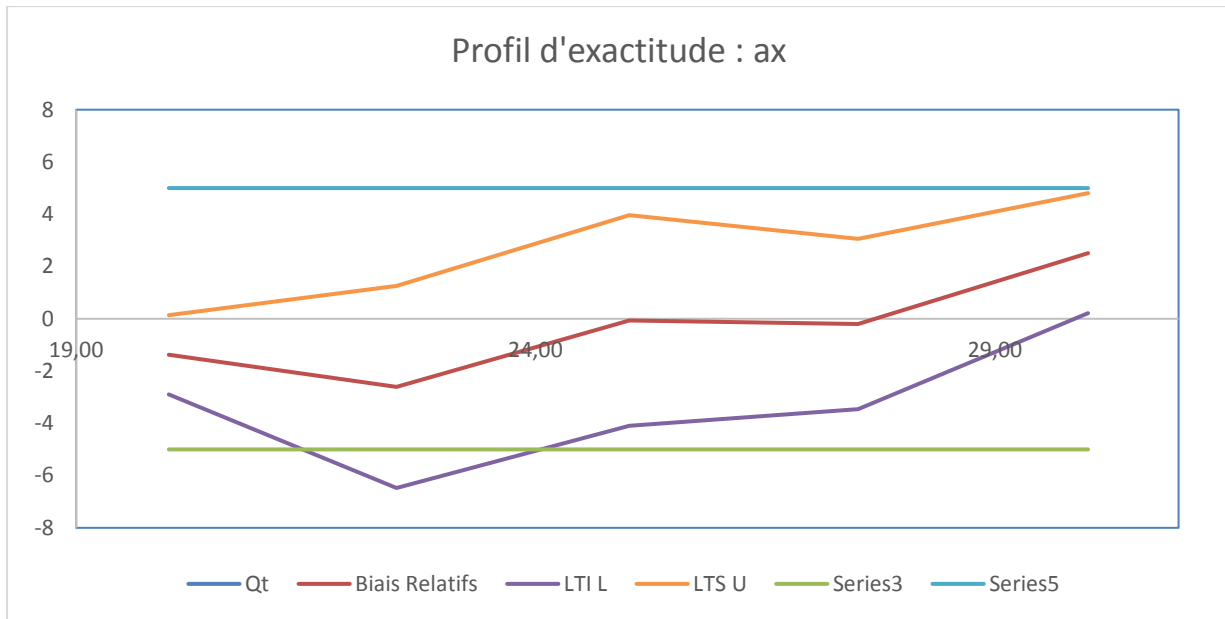


Figure 17 : Courbe du profil d'exactitude obtenue avec la fonction $y = ax$.

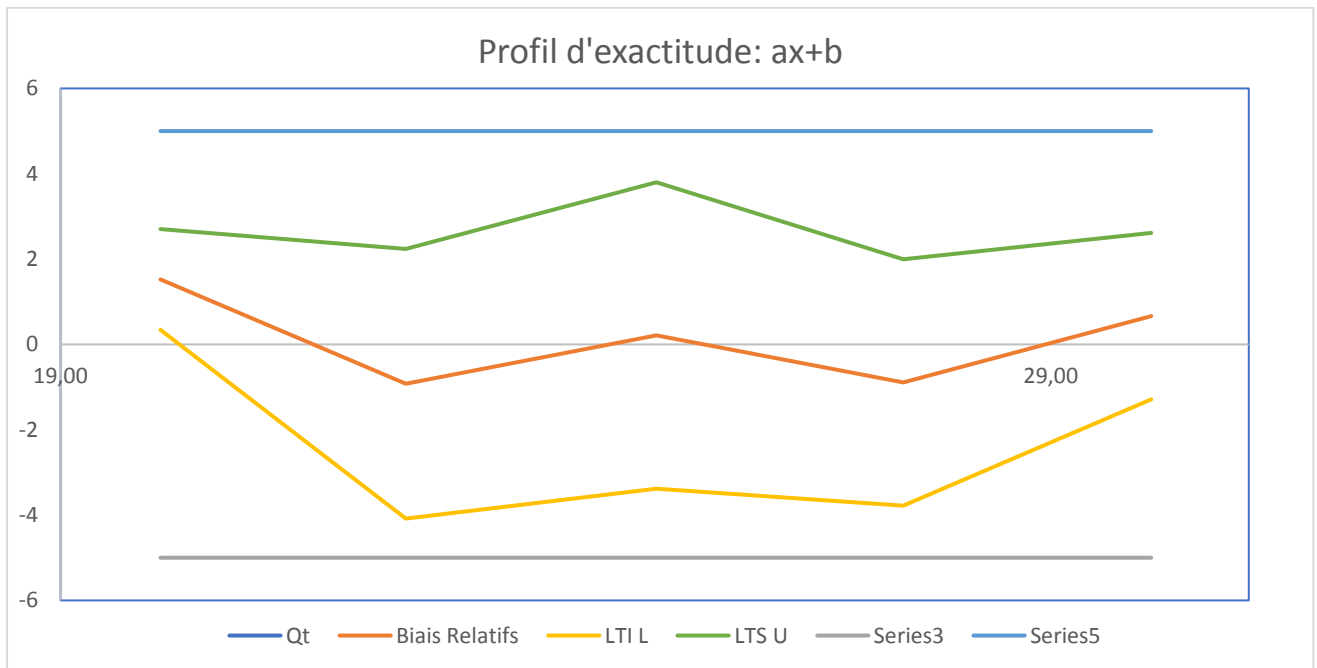


Figure 18 : Courbe du profil d'exactitude avec la fonction $y = ax+b$.

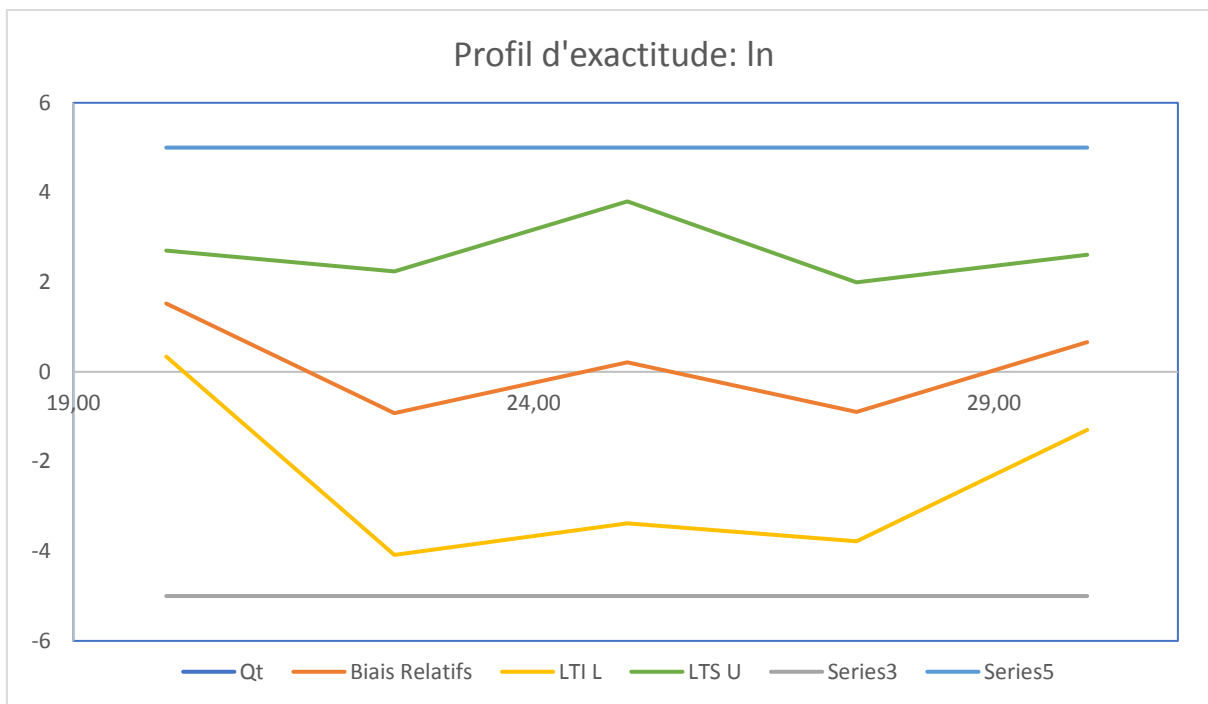


Figure 19 : Courbe du profil d'exactitude obtenue avec la fonction $\ln y = f(\ln x)$.

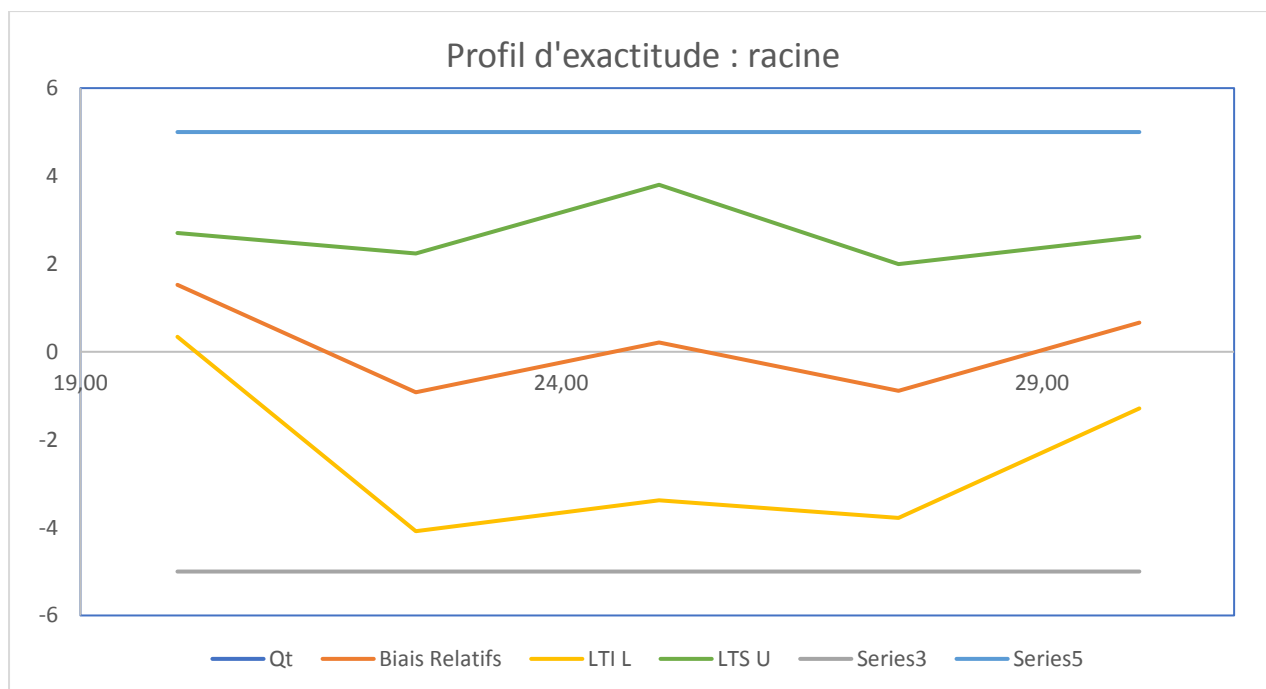


Figure 20 : Courbe du profil d'exactitude obtenue avec la fonction $\sqrt{Y} = f(\sqrt{X})$.

RESULTATS

Parmi les différents modèles, nous avons opté pour le modèle de régression linéaire ($y = ax + b$) pour la validation de la méthode de dosage de Piroxicam, Vu sa simplicité et sa facilité de mise en œuvre dans l'analyse de routine le modèle régression linéaire est le plus adéquat.

2.1.10 Linéarité

Un modèle de régression linéaire a été ajusté sur les concentrations calculées en fonction des concentrations introduites dans le but d'obtenir l'équation suivante :

Tableau XXXVII : Masses prédites en fonction des masses introduites.

Niveau	Rep	Serie 1		Serie 2		Serie 3	
		Quant intro	Quant Préd	Quant intro	Quant Préd	Quant intro	Quant Préd
1	1	19,96	20,15	20,00	20,11	20,06	20,49
	2	20,06	20,32	20,03	20,42	20,00	20,30
	3	19,96	20,34	20,01	20,32	20,00	20,38
2	1	22,47	21,91	22,46	22,59	22,47	22,09
	2	22,47	21,95	22,56	22,47	22,51	22,91
	3	22,48	22,05	22,47	22,32	22,49	22,23
3	1	25,08	24,97	24,90	24,62	25,02	24,56
	2	25,10	24,90	24,98	25,38	25,05	25,57
	3	25,04	24,50	25,00	25,59	25,00	25,55
4	1	27,50	27,46	27,50	27,71	27,47	26,84
	2	27,53	27,59	27,55	27,22	27,5	27,00
	3	27,49	26,77	27,51	26,94	27,54	27,86
5	1	30,05	30,38	30,02	30,20	29,98	30,77
	2	30,04	29,92	29,98	30,11	29,97	30,05
	3	30,02	29,79	30,05	30,31	30,02	30,38

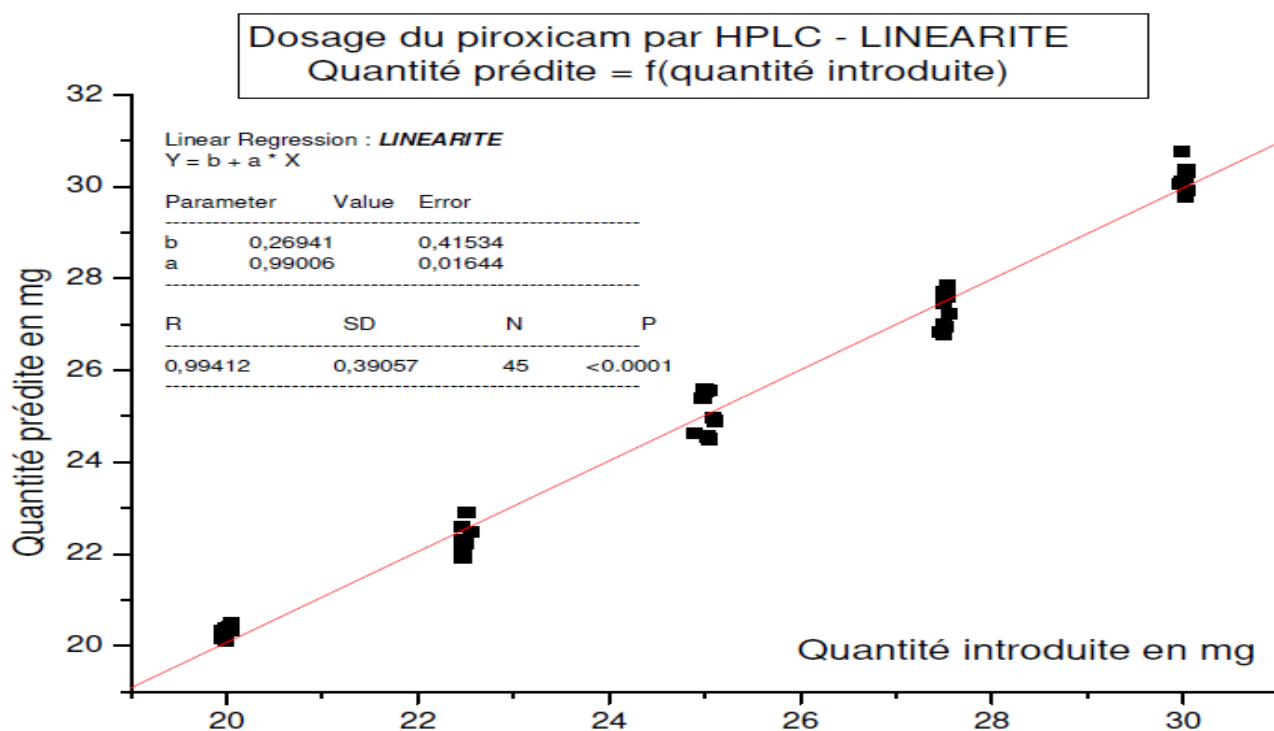


Figure 21 : Courbe de linéarité obtenue avec la fonction $y=ax+b$.

2.2 Selon ICH

2.2.1 Spécificité

Comparaison des deux pentes b1 et b2 :

t calculé= 0.038

$t^0(\alpha ; 21)$ lu sur la table de student = 2,07. (Annexe II)

Comparaison des deux ordonnées à l'origine a1 et a2 :

t calculé= 0,006

$t^0(\alpha ; 21)$ lu sur la table de student = 2,08. (Annexe II)

2.2.2 Linéarité :

Le but de cette étude est de définir si cette méthode est linéaire sur les domaines de dosage prédéfinis selon ICH et confirmé par les tests statistiques adéquats selon la stratégie SFSTP 1992

Les données brutes sont résumées dans l'annexe V

Avant de commencer l'estimation des différents critères, il faut s'assurer qu'il y'a une homogénéité des variances entre les 5 niveaux, avec les 3 répétitions.

2.2.2.1 Test d'homogénéité des variances

Ceci est réalisé par le test de Cochran :

Tableau XXXVIII : test de Cochran.

Test de Cochran			
Variance maximale	Somme des variances	C _{Calculé}	C ⁰ (0,01 ; 5 ;2)
2.61	5.12	0,51	0,68

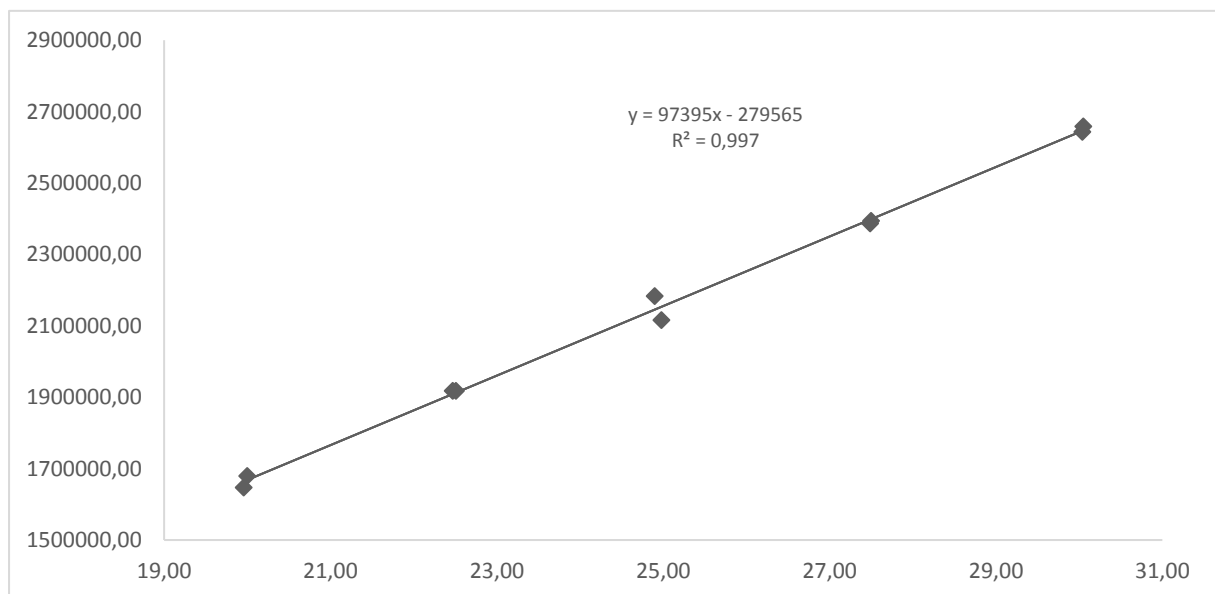


Figure 22 : droit de régression.

2.2.2.2 Estimation des critères de la droite de régression

L'équation de la droite a été calculée par la méthode des moindres carrés.

Tableau XXXIX : critères de la droite de régression.

Pente de la droite	a	97395
Ordonnée à l'origine	b	-279565
Coefficient de corrélation	R^2	0,997
Equation de la droite de régression $y = 97395 x - 279565$		

2.2.2.3 Test de l'existence d'une pente significative

Tableau XL : Test de l'existence d'une pente significative.

Origine de la variation	ddl	Somme des carrés	Variances	F Calculé	F°(0,05 ;1 ;8)
Variation due à la régression	1	1,20093E+12	1,2009 10 ¹²	2713,01	5,32
Variation résiduelle	8	3541253759	442656720		
Variation totale	9	1,20447E+12			

2.2.2.4 Test de validité de la droite de régression

Tableau XLI : Test de la validité de la droite de régression.

Origine de la variation	ddl	Somme des carrés	Variances	F Calculé	F°(0,05 ;3;5)
Erreur expérimentale	(n-k) 5	3327577783	665515556,6	0,11	5,41
Erreur d'ajustement	(k-2) 3	213675975,6	71225325,21		

2.2.2.5 Test de comparaison de l'ordonnée à l'origine avec 0

On a deux hypothèses H_0 et H_1 à vérifier en effectuant le test de Student.

H_0 : pas de différence significative entre a et 0.

H_1 : il existe une différence entre a et 0.

RESULTATS

Tableau XLII : test de Student.

$ a $	S_a	t calculé = $ a / S_a$	t table (0,05 ; 8)
282304 ,18	47242,66	5,97	21039,41

2.2.2.6 Test de comparaison de la pente avec 0 :

TableauXLIII : test de Student.

$ b $	S_b	t calculé = $ b / S_b$	t table (0,05 ; 8)
97486,2737	1871,62	52,08	21039,41

2.2.2.7 Test des graphes des résidus

Le graphe des résidus est illustré dans la figure suivante :

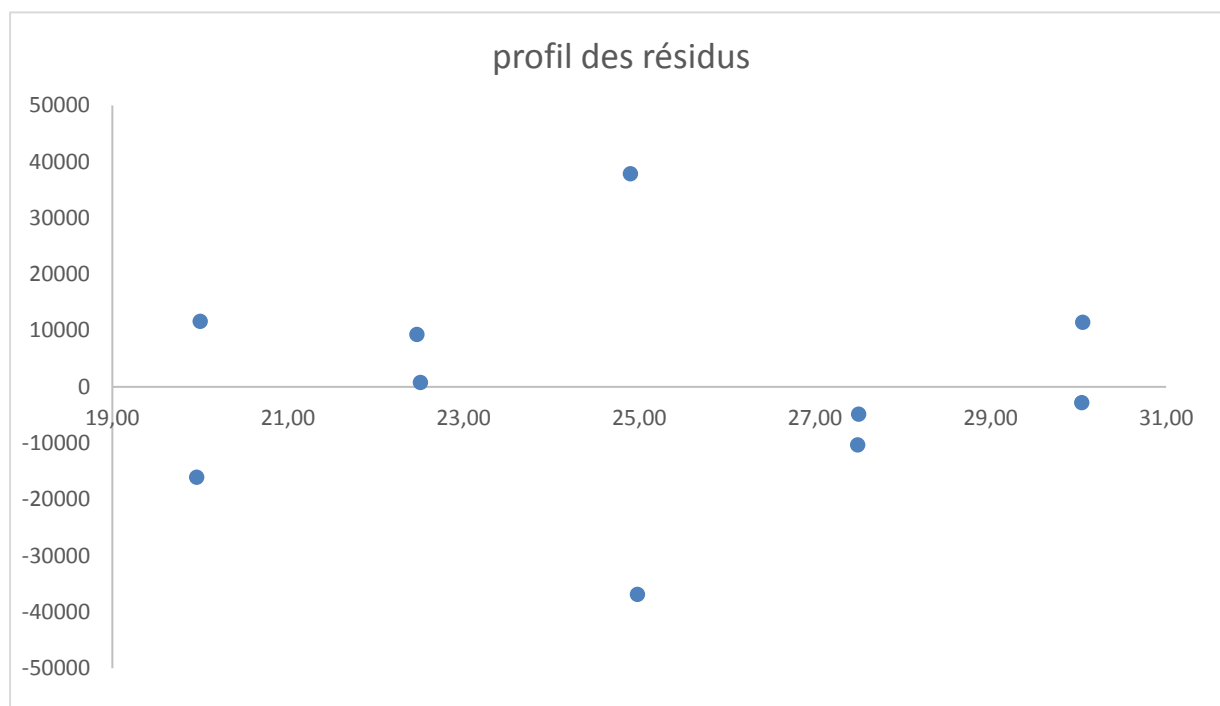


Figure 23 : graphe des résidus.

2.2.3 Exactitude

Pour le modèle qui a été choisi, nous avons vérifié la significativité de la pente, l'ajustement sur l'ordonnée à l'origine : donc l'équation qui sera utilisée pour calcul ultérieur est : $y=bx+a$ donc, cette équation va nous permettre de calculer la quantité retrouvée.

Les données brutes obtenues par la méthode sont résumées dans le tableau suivant :

RESULTATS

Tableau XLIV : Les données brutes de la procédure d'analyse.

Niveau	Répétition	Quantité introduite	Réponse instrumentale	Quantités prédites (mg)	Recouvrement (en %)	Recouvrement moyen
80%	1	19,96	1680716,00	20,14	100,88	101,48
	2	20,06	1707313,00	20,41	101,74	
	3	19,96	1698861,00	20,32	101,82	
90%	1	22,47	1853450,00	21,91	97,50	97,76
	2	22,47	1857069,00	21,95	97,67	
	3	22,48	1867851,00	22,06	98,11	
100%	1	25,08	2151747,00	24,97	99,55	98,82
	2	25,10	2146090,00	24,91	99,24	
	3	25,04	2101705,00	24,45	97,66	
110%	1	27,50	2393691,00	27,45	99,82	99,12
	2	27,53	2408828,00	27,61	100,27	
	3	27,49	2324623,00	26,74	97,28	
120%	1	30,05	2683174,00	30,42	101,23	100,03
	2	30,04	2636676,00	29,94	99,68	
	3	30,02	2621182,00	29,78	99,21	

2.2.3.1 Test d'homogénéité des variances

Tableau XLV : test de Cochran.

Test de Cochran			
Variance maximale	Somme des variances	C _{Calculé}	C ⁰ (0,01 ; 5 ;2)
2.61	5.12	0,50906922	0,6836

2.2.3.2 Test de validité des moyennes

Ce test consiste à comparer les moyennes des 5niveaux.

Tableau XLVI : Test de Fisher.

Origine de la variation	Ddl	Somme des carrés	Variances	F _{calculé}	F ⁰ (0,05 ;4 ;10)
Variation intragroupe	(N-K) 10	10,24	1,02	5,73	14,55
Variation intergroupe	(k-1) 4	23,48	5,87		
Variation totale	(n-1) 14	33,73	6,29		

2.2.3.3 Estimation du recouvrement moyen :

On le calcule par application numérique de la formule donnée (section)

$$I_{RM} = 99,44\%$$

2.2.3.4 Calcul de l'intervalle de confiance de recouvrement moyen :

L'intervalle de confiance du pourcentage de recouvrement moyen est calculé à partir des résultats de l'application numérique de la formule donnée. Intervalle de confiance est :

$$\text{Intervalle de confiance de } I_{RM} = [98,58\% - 100,30\%]$$

2.2.4 Fidélité

Les données brutes pour l'étude de la fidélité sont résumées dans le tableau suivant

RESULTATS

Tableau XLVII : les données brutes de l'étude de la fidélité.

Séries	Essai	Quantités introduits	Moyenne Quantités introduits	Réponses alignées	Quantités prédites	Moyen Des prédictions inv	Variance
Serie1	1	25,08	25,03	2120807,73	24,65	24,84	0,81
	2	25		2134153,63	24,79		
	3	25,04		2127232,18	24,72		
	4	25,00		2111325,63	24,55		
	5	25,05		2154604,32	25,00		
	6	24,99		2187520,49	25,34		
Série 2	1	25,02	25,03	2172773,12	25,31	25,16	0,08
	2	25,03		2175765,53	25,34		
	3	25,03		2135090,53	24,90		
	4	25,03		2172878,53	25,31		
	5	25,00		2181118,30	25,40		
	6	25,09		2117127,98	24,71		
Série 3	1	25,05	25,04	2082688,15	24,45	24,31	0.08
	2	25,04		2046912,03	24,08		
	3	24,98		2106619,33	24,70		
	4	25,05		2085157,15	24,47		
	5	25,05		2066334,15	24,28		
	6	25,05		2026848,15	23,87		

2.2.4.1 Test d'homogénéité des variances :

Tableau : XLVIII : Test de Cochran.

Variance maximale	0,089206259
Somme des variances	0,250086964
C_{ech}	0,356700955
$C^{\circ} (0,05 ; 3 ; 5)$	0,7071

Estimation des moyennes de groupes et des variances

L'ensemble des résultats obtenus est illustré dans le tableau ci-après :

Tableau XLIX : Données calculées de la fidélité.

	CV	Ecartype	$T_{student}$	Intervalle de confiance
Répétabilité	1,166	0,289	2,13	[24,154 - 25,38]
Fidélité intermédiaire	2,043	0,416	2,10	[23,89 - 25,68]

Après calcul des variances de la répétabilité et de la fidélité intermédiaire, on déduit leurs coefficients de variations correspondants qui sont respectivement (CV_r et CV_{FI}) ; qu'on compare avec la norme 2%.

2.2.4.2 La répétabilité

Elle est évaluée par le calcul du coefficient de variation.

Compte tenu de la valeur du $CV_r = 1,16\%$ ($< 2\%$ valeur fixée par les normes pharmaceutiques).

On a aussi la moyenne des quantités introduites $m=25,03$ est incluse dans l'intervalle de confiance : [24,154 - 25,384] → la répétabilité de la méthode est jugée très satisfaisante.

2.2.4.3 Fidélité intermédiaire

On a $CV_{FI} = 2,04\% \approx 2\%$,

Et aussi la moyenne des quantités introduites $m=25,03$ est incluse dans l'intervalle de confiance [23,892 - 25,646] → la fidélité intermédiaire de notre méthode est jugée acceptable.

Discussions

3 Discussion

3.1 Selon le rapport de la commission SFSTP 2006

3.1.1 Spécificité

3.1.1.1 Comparaison des deux pentes a1 et a2

$t_{calculé} = 0.038$

$t^{\circ}(\alpha; 21)$ lu sur la table de Student = 2,07. (Annexe II)

$t_{calculé} < t^{\circ}(\alpha; 21) \rightarrow$ les deux pentes ne sont pas significativement différentes au risque 5% considéré, donc nous concluons l'absence d'effet matrice.

3.1.1.2 Comparaison des deux ordonnées à l'origine b1 et b2

$t_{calculé} = 0,006$

$t^{\circ}(\alpha; 21)$ lu sur la table de Student = 2,08. (Annexe II)

$t_{calculé} < t^{\circ}(\alpha; 21) \rightarrow$ Les deux ordonnées à l'origine ne sont pas significativement différentes au risque $\alpha = 5\%$ considéré, ce qui explique une absence d'erreur systématique.

Selon les résultats nous pouvons dire qu'avec un risque de 5%, statistiquement la méthode est spécifique ainsi qu'une absence d'effet matrice et d'erreurs systématiques confirmée.

3.1.2 Choix de la fonction de réponse

D'après les profils d'exactitude représentés dans les figures précédentes (n° :11, 12, 13, 14) le modèle d'étalonnage sélectionné est soit :

Régression linéaire avec une équation : $y = a x + b$

Ou :

Fonction logarithmique népérien : $\ln y = (\ln x)$

Ou :

Fonction racine carrée : $\sqrt{y} = f(\sqrt{x})$

En raison de la simplicité du modèle nous avons opté pour la fonction linéaire $y = a x + b$.

3.1.3 Critères de performance de la fonction de réponse choisie

3.1.3.1 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 considérée comme étant la valeur de référence est assez étroit pour les cinq niveaux. En tenant compte que les biais relatifs de ces derniers sont inférieurs à 2%, donc la méthode est juste.

3.1.3.2 Fidélité

La fidélité de la méthode de dosage est exprimée par le coefficient de variation (% CV) obtenu en effectuant le rapport entre l'écart-type et la moyenne des réponses prédites.

La répétabilité et la fidélité intermédiaires ont été observées à tous les niveaux de concentration. La méthode sera considérée comme acceptable si les coefficients de variation de la fidélité intra-série sont inférieurs à 2%.

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

3.1.4 Critères de décision sur la validité de la méthode

3.1.4.1 Erreur totale

Selon le tableau XXXV montrant les résultats de l'erreur totale, nous jugeons que tous les niveaux de concentration sont inclus dans l'intervalle d'acceptabilité.

3.1.4.2 Profil d'exactitude

Les limites de tolérance supérieure et inférieure n'interceptent pas avec les limites d'acceptabilité supérieure et inférieure, donc la méthode est considérée comme valide pour l'intervalle de dosage où le profil d'exactitude est compris dans les limites d'acceptation fixées a priori à $[\pm 5, -5]\%$;

Cela signifie que l'analyste peut garantir que la méthode est capable de produire une proportion de 95% des résultats acceptables et seulement 5% des futures mesures d'échantillons inconnus peuvent être en dehors de ces limites ;

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

3.2 Selon l'approche de l'ICH

3.2.1 Spécificité

3.2.1.1 Comparaison des deux pentes b_1 et b_2

$$t_{\text{calculé}} = 0,038$$

$t^0(\alpha ; 21)$ lu sur la table de Student = 2,07. (Annexe II)

$t_{\text{calculé}} < t^0(\alpha ; 21) \rightarrow$ les deux pentes ne sont pas significativement différentes au risque $\alpha = 5\%$ considéré.

3.2.1.2 Comparaison des deux ordonnées à l'origine a_1 et a_2

$$t_{\text{calculé}} = 0,006$$

$t^0(\alpha ; 21)$ lu sur la table de Student = 2,08. (Annexe II)

$t_{\text{calculé}} < t^0(\alpha ; 21) \rightarrow$ Les deux ordonnées à l'origine ne sont pas significativement différentes au risque $\alpha = 5\%$ considéré, ce qui explique une absence d'erreur systématique.

Selon les résultats nous pouvons dire qu'avec un risque de 5%, statistiquement la méthode est spécifique ainsi qu'une absence d'effet matrice et d'erreurs systématiques confirmées.

3.2.2 Linéarité

3.2.2.1 Test d'homogénéité des variances

C'est un prérequis pour effectuer les tests suivants : nous devons s'assurer qu'il y ait une homogénéité entre les variances des différents niveaux.

Les résultats du test de Cochran résumés dans le tableau XXXVIII montrent que :

$$C_{\text{calculé}}(0,50) < C^0(0,68) \rightarrow \text{les variances sont considérées comme homogènes au risque } 5\%$$

Etant donné que la cohérence des résultats d'essais est prouvée et qu'il n'existe pas de variance aberrante entre les 5 niveaux, nous pouvons procéder à la validité de la linéarité.

3.2.2.2 Estimation des critères de droite de régression

L'équation de droite de régression est calculée par la méthode des moindres carrés

Nous avons : $y = 97395x - 279565$

D'après le tableau XXXIX, le coefficient de corrélation ($r^2 = 0,997 > 0,99$) est jugé acceptable, et nous permet dans un premier temps, de pouvoir affirmer qu'il existe bien une liaison significative (type croissante) entre la réponse instrumentale et la concentration.

Mais le test de validité de la régression (test de Fisher) s'impose dans la démarche statistique adoptée pour vérifier que la droite obtenue par la méthode des moindres carrés est linéaire en ses paramètres.

Nous procédons donc, à la vérification de la significativité de la pente et l'ajustement du modèle.

3.2.2.3 Test de l'existence d'une pente significative

En utilisant le test de Fisher, et à partir des résultats obtenus dans le tableau XL, nous avons :

$$F_{\text{calculé}} = 2713,00.$$

$$F^0(0,05 ; 1 ; 8) = 5,32$$

→ $F_{\text{calculé}} > F^0(0,05 ; 1 ; 8)$ lu sur la table de Fisher, nous pouvons conclure l'existence d'une pente significative → donc une dépendance linéaire au seuil 5%.

3.2.2.4 Test de validité de la droite de régression

En effectuant le test de Fisher, et d'après les résultats du tableau XLI, nous obtenons :

$$F_{\text{calculé}} = 0,11$$

$$F^0(0,05 ; 3 ; 10) = 5,41$$

$F_{\text{calculé}} < F^0(0,05 ; 3 ; 10) \rightarrow$ l'ajustement est valide au seuil de probabilité considéré 5%.

3.2.2.5 Test de comparaison de l'ordonnée à l'origine avec 0

Nous avons deux hypothèses H_0 et H_1 à vérifier en effectuant le test de Student.

H_0 : pas de différence significative entre a et 0.

H_1 : il existe une différence entre a et 0.

D'après le tableau XLII :

$t_{\text{table}} = (21039,41) < t_{\text{calculé}} = (5,97)$. Nous rejetons l'hypothèse nulle ; la droite ne passe pas par l'origine.

L'ordonnée à l'origine est significativement différente de 0, au seuil de probabilité 5%.

3.2.2.6 Test de comparaison de la pente avec 0

En effectuant le test de Student et d'après les résultats du tableau XLIII, nous avons :

$$t_{\text{table}} = (21039,41) < t_{\text{calculé}} = (52,08) .$$

On rejette l'hypothèse nulle. La pente est significativement différente de 0, au seuil de probabilité 5%.

3.2.2.7 Test des graphes des résidus

D'après le graphe des résidus de la figure 23.

Nous remarquons que les points sont éparpillés d'une manière aléatoire, et qu'ils ne suivent pas un motif précis, nous pouvons conclure que le modèle de régression linéaire choisi est valide.

3.2.3 Exactitude :

3.2.3.1 Test d'homogénéité des variances

D'après les résultats obtenus dans le tableau XLV

Nous avons : $C_{\text{Calculé}}(0,5) < C^0(0,68)$.

L'analyse de l'homogénéité des variances à chaque concentration démontre que l'ensemble des variances des différents groupes sont considérés comme homogène au risque 5%.

3.2.3.2 Test de validité des moyennes

Ce test consiste à comparer les moyennes des 5niveaux. En effectuant le test de Fisher.

D'après le tableau XLVI :

Nous avons : $F_{\text{Calculé}} < F^0(0,05 ; 4 ; 10)$ lu sur la table de Fisher.

Etant donné que $F_{\text{calculé}}$ est non significatif → au risque 5%, les variations des observations entre les différents groupes sont dues aux erreurs expérimentales.

3.2.3.3 Estimation du recouvrement moyen

RM = 99,44%

3.2.3.4 Calcul de l'intervalle de confiance de recouvrement moyen :

Intervalle de confiance est :

$$I_{RM} = [98,58\% ; 100,30\%]$$

→ la valeur 100% est incluse dans cet intervalle, nous concluons que la méthode est exacte sur tout l'intervalle de dosage prédéterminé.

3.2.4 Fidélité

3.2.4.1 Test d'homogénéité des variances :

On a d'après les résultats du tableau XLVIII :

$C_{\text{cal}} = (0,35) < C^0(0,05 ; 3 ; 5) = (0,70)$, le test de Cochran n'est pas significatif → les variances sont considérées homogènes au risque 5%.

3.2.4.2 Estimation des moyennes de groupes et des variances

Après calcul des variances de la répétabilité et de la fidélité intermédiaire, nous déduisons leurs coefficients de variations correspondants qui sont respectivement (CV_r et CV_{FI}) comme résumé dans le tableau XLIX ; que nous comparons avec la limite 5%.

3.2.4.3 La répétabilité :

Elle est évaluée par le calcul du coefficient de variation.

Compte tenu de la valeur du $CV_r = 1,16\%$ ($< 5\%$ valeur fixée par les normes pharmaceutiques).

Nous avons aussi la moyenne des quantités introduites $m = 25,03$ mg est incluse dans l'intervalle de confiance : $[24,154\text{mg} - 25,384\text{mg}]$ → la répétabilité de la méthode est jugée très satisfaisante.

3.2.4.4 Fidélité intermédiaire :

On a $CV_{F.I.} = 2,04\% < 5\%$,

Et aussi, la moyenne des quantités introduites $m = 25,03\text{mg}$ est incluse dans l'intervalle de confiance $[23,892 - 25,646]$ → la fidélité intermédiaire de notre méthode est jugée acceptable.

L'approche ICH propose une méthode de validation classique, qui est basée sur l'évaluation individuelle des différents critères de validation via des outils statistiques prédéfinis, ce qui fait que la validité de la méthode dépend systématiquement de la validité de l'ensemble de ces paramètres de performance : Spécificité, linéarité, exactitude et fidélité.

L'ICH ne propose pas de méthode d'analyse des résultats des critères de validation. Aucun exemple n'est proposé pour illustrer une validation de méthode de dosage. Cette approche présente une liste de critères de performance devant permettre la validation d'une méthode de dosage, leurs définitions, et un mode de calcul de ces critères, basé sur un nombre minimal de séries d'essais et de concentrations. Cependant, il ne permet pas de savoir comment valider tous ces critères, pour cela on a fait appel au protocole proposé par la commission SFSTP 1992.

En effet, cette commission propose un protocole complet rassemblant les plans de préparation des échantillons. Pour chaque paramètre, elle définit des formules de calculs statistiques ainsi que leurs critères d'acceptabilité quoique l'application de ces tests semble complexe et peu aisée.

Et vu les résultats obtenus au cours de cette validation, nous avons pu confirmer que cette méthode est spécifique, linéaire, exacte et fidèle. Nous pouvons donc conclure que notre méthode est valide pour le dosage de Piroxicam dans des comprimés de 20 mg dans l'intervalle $[20 - 30]$ mg.

Contrairement à l'approche SFSTP 2006, elle est globale utilisant le profil d'exactitude comme outil décisionnel objectif qui comprend deux notions essentielles qui sont : l'écart λ et la proportion β qui limitent l'intervalle de dosage optimal, dans lequel se situe le résultat de dosage par rapport à la vraie valeur inconnue, ce qui permet de vérifier que le résultat ne sort pas des limites fixées par cet intervalle.

Et d'après le profil d'exactitude obtenu à partir du modèle $y = a x + b$, nous concluons que la méthode est valide ce qui implique systématiquement la validité de l'ensemble des critères de validation. La spécificité, la linéarité de la méthode de dosage de Piroxicam dans des comprimés dosés à 20 mg par HPLC mise au point dans le présent travail sont démontrés dans l'intervalle de dosage $[20 - 30]$ mg avec une probabilité de confiance de 95%, dans les limites d'acceptation définies $\pm 5\%$, c'est-à-dire nous avons 95% de chance d'avoir la vraie valeur incluse dans les limites d'acceptabilité et les limites de dosage.

Conclusion générale

Les résultats issus des méthodes analytiques ont un rôle essentiel dans de nombreux domaines suite aux décisions qui sont prises sur leur base telles que la détermination de la qualité des principes actifs, des spécialités pharmaceutiques, des études pharmacocinétiques, et de biodisponibilité.

La fiabilité des résultats analytiques est primordiale dans ce contexte, et surtout ils doivent être en accord avec les besoins des utilisateurs finaux. Pour s'assurer de la fiabilité des résultats qui seront fournis lors des analyses de routine, la validation des méthodes analytiques est un élément crucial du cycle de vie d'une méthode analytique.

On est confronté dans la littérature comme dans la pratique à plusieurs textes réglementaires et normatifs divergents qui décrivent la validation des méthodes analytiques sans qu'il y ait une démarche harmonisée.

En effet, l'approche classique proposée par l'ICH et la FDA consiste à évaluer chaque critère de performance seul. Entre autres, la nouvelle approche globale publiée par SFSTP 2006 basée sur l'ISO 5725 pour évaluer la validité des méthodes analytiques quantitatives a été proposée et détaillée d'un point de vue pratique. Elle se base sur l'utilisation d'une méthodologie statistique utilisant un intervalle de tolérance de type « β expectation » qui a été transposée en un outil de décision final appelé profil d'exactitude considéré comme outil décisionnel.

L'objectif principal de notre travail est de réaliser une étude détaillée, comparative et critique de l'approche classique versus la nouvelle approche concernant leurs définitions, leurs interprétations, les plans expérimentaux et les critères d'acceptation de chaque critère et ce en raison des nombreuses incohérences disponibles dans ces documents réglementaires.

En outre, nous avons consolidé notre travail avec un exemple pratique de la méthode de dosage de Piroxicam par HPLC dans une spécialité pharmaceutique.

Les résultats expérimentaux montrent que les conditions décrites par ICH 94-SFSTP 92 ont satisfait les exigences préétablies, et nous avons pu montrer que la méthode de dosage de Piroxicam dans des comprimés de 20 mg est valide selon l'approche classique.

De même, la méthode a été validée selon la nouvelle approche comme le montre les résultats obtenus et le confirme le profil d'exactitude. Ce profil permet de garantir que 95% des futurs résultats qui seront fournis par la méthode lors de son utilisation en routine, sera bien incluse dans des limites d'acceptation fixées a priori $\lambda = \pm 5\%$, donc dans l'intervalle de dosage [20-30]mg.

Perspectives

PERSPECTIVE

Les résultats présentés dans le cadre de ce travail sont une petite partie de ce qui pourrait être fait dans le cadre de l'évaluation de la fiabilité des résultats obtenus par des méthodes analytiques. Il faut savoir que la validation de la méthode est le socle d'un système d'assurance qualité intégral. Néanmoins, il existe plusieurs autres questions qui n'ont pas été traitées et qui pourraient sans aucun doute faire l'objet de recherches futures.

Dans le même contexte général, d'autres perspectives potentielles de recherches peuvent être envisagées :

- Application de l'approche émergente << process capability>> pour la validation des méthodes analytiques au sein des industries pharmaceutiques ;
- Ressortir avec des protocoles standards optimisés de la validation des méthodes analytiques, des différents tests dans l'industrie pharmaceutique (tests des impuretés et de dissolution) ;
- Arriver à proposer des limites d'acceptation de ces méthodes corrélées avec les objectifs fixés et le domaine d'application, dans le but de déceler les incohérences et proposer une démarche harmonisée ;
- Etude critique des différentes pratiques, parfois erronées, rencontrées dans les laboratoires de contrôle qualité.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- [1] Agence Française de Sécurité Sanitaire des Produits de Santé. 2009. Bonnes Pratiques de Fabrication. Paris: Bulletin Officiel, 2009. p. 143. Vol. 2009/9bis.
- [2] Arling E.R. 2004. Beyond GMPs: The latest approaches to Good Manufacturing Practices. The BioPharm International Guide. 2004, pp. 26-25.
- [3] Calnan N., Redmond A., O'Neil S. 2009. The FDA's Draft Process Validation Guidance - A perspective from Industry. Pharmaceutical Engineering. 2009, Vol. 29, 3, pp. 8-16.
- [4] <https://www.doctissimo.fr/medicament-PIROXICAM-MYLAN.htm>
- [5] <http://basedonneespublique.medicaments.gouv.fr/affichageDoc.php?specid=69482905&typedoc=N>
- [6] https://www.chemsrc.com/en/cas/36322-90-4_832340.html
- [7] Caubel D. 1997. Validation et inspection : tendances pour le futur. S.T.P. Pharma Pratiques. 1997, Vol. 7, 5, pp. 378-382.
- [8] Chao A.Y., Forbes F.S., Johnson R.F., Doehren P.V. 2003. Prospective process validation. 3e éd. Dekker Inc. Pharmaceutical Process Validation. New York: 2003. pp. 47-70.
- [9] Christensen J.R. 2004. Why GMPs? What are GMPs and why do we need them? The Biopharm International Guide. 2004, pp. 4-7.
- [10] Food and Drug Administration. 2009. White Paper: FDA Guidance for Industry Update - Process Validation. [En ligne] 2009. [Citation : 27 06 2010.] <http://www.pharmout.com>.
- [11] D'Eramo P., McNally G. 2009. The draft process validation guidance - A perspective from the FDA. Pharmaceutical Engineering. 2009, Vol. 29, 3, pp. 18-22.
- [12] Code of Federal Regulations. 2010. 21CFR211.180 Current Good Manufacturing Practice for Finished Pharmaceuticals. 2010. Vol. 4.
- [13] Commission Européenne. 2001. Annexe 15 Qualification and Validation. EU Guide to Good Manufacturing Process. Bruxelles: s.n., 2001, p. 11.
- [14] Commission Européenne. 2005. EU Guidelines to Good Manufacturing Practice Medicinal Products for Human and Veterinary Use. 2005. Part I, Chapter 1, Section 1.5.
- [15] Commission Européenne. 2010. EU Guidelines to Good Manufacturing Practice Medicinal Products for Human and Veterinary Use. Bruxelles: 2010. p. 3. Vol. 4.
- [16] European Medicines Agency. 2010. Concept paper on the Revision of the Guideline on Process Validation. Londres: 2010. EMA/CHMP/CVMP/QWP/809114/2009.
- [17] Dietrick J.M., Loftus B.T. 2003. Regulatory basis for process validation. 3e éd. Dekker Inc. Pharmaceutical Process Validation. New York: s.n., 2003. pp. 41-46.
- [18] Drakulich A. 2008. New draft Guidance on Process Validation. The Electronic Newsletter of Pharmaceutical Technology. [En ligne] 20 11 2008. <http://pharmtec.findpharma.com>.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- [19] Hwang R., Kowalski D.L. 2005. Design of Experiments for Formulation Development. Pharmaceutical Technology. 2005.
- [20] France G. 2009. ICH Q8, Q9, Q10, 3 guidelines qui sont en train de changer l'approche industrielle pour le développement pharmaceutique, l'approche qualité et sa mise en œuvre industrielle. Lille : 2009. Master Pharmacie Galénique Industrielle, Laboratoire de Pharmacotechnie Industrielle, Faculté des Sciences Pharmaceutiques et Biologiques.
- [21] ICH Harmonised Tripartite Guideline. 2000. Good Manufacturing Practice Guide for Active Pharmaceutical: Q7. 2000.
- [22]: ICH Topic Q 2 (R1) Validation of Analytical Procedures: Text and Methodology. NOTE FOR GUIDANCE ON VALIDATION OF ANALYTICAL PROCEDURES:TEXT AND METHODOLOGY(CPMP/ICH/381/95).
- [23]: Guidance for Industry: Bioanalytical Methods Validation for Human Studies (Draft guidance), U.S. Department of Health and Human Services, Food and Drug Administration, Center for Drug Evaluation and Research (CDER), Décembre 1998.
- [24] : NF EN ISO 17025 (2005) Prescriptions générales concernant la compétence des laboratoires d'étalonnage et d'essais, ISO, Genève.
- [25]. <https://www.itl.nist.gov/div898/handbook/pmc/section1/pmc16.htm>
- [26] : Hubert Ph, Nguyen JJ, Boulanger B, Chapuzet E, Chiap P, Cohen N, et al. SFSTP. Validation des procédures analytiques quantitatives, Harmonisation des démarches. Partie II ; Statistiques ; 2006.
- [27] : J. Caporal-Gautier, J.M. Nivet, P. Algranti, M. Guilloteau, M. Histe, M. Lallier, J.J. N'guyen-Huu, R. Russoto, Guide de validation analytique : Rapport d'une commission SFSTP, STP Pharma Prat., 2, 205-226 (1992).
- [28] : Mimoun N, Sahraoui N. Validation analytique d'une méthode de dosage du diclofénac de sodium dans les suppositoires de 100 mg par HPLC [thèse]. Tizi Ouzou, université Mouloud Mammeri ; 2016.
- [29] : Hubert Ph, Nguyen JJ, Boulanger B, Chapuzet E, Chiap P, Cohen N, et al. SFSTP. Validation des procédures analytiques quantitatives, Harmonisation des démarches. Partie II ; Statistiques ; 2006.

ANNEXE I : table de Student

table de student

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

table de fisher

v ₂ (dén.)	v ₁ (numérateur)																			
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	20	30	40	50	60	80	100	200	500	1 000
1	161.45	199.50	215.71	224.58	230.16	233.99	236.77	238.88	240.54	241.88	248.02	250.10	251.14	251.77	252.20	252.72	253.04	253.68	254.06	254.19
2	18.51	19.00	19.16	19.25	19.30	19.33	19.35	19.37	19.38	19.40	19.45	19.46	19.47	19.48	19.48	19.48	19.49	19.49	19.49	19.49
3	10.13	9.55	9.28	9.12	9.01	8.94	8.89	8.85	8.81	8.79	8.66	8.62	8.59	8.58	8.57	8.56	8.55	8.54	8.53	8.53
4	7.71	6.94	6.59	6.39	6.26	6.16	6.09	6.04	6.00	5.96	5.80	5.75	5.72	5.70	5.69	5.67	5.66	5.65	5.64	5.63
5	6.61	5.79	5.41	5.19	5.05	4.95	4.88	4.82	4.77	4.74	4.56	4.50	4.46	4.44	4.43	4.41	4.41	4.39	4.37	4.37
6	5.99	5.14	4.76	4.53	4.39	4.28	4.21	4.15	4.10	4.06	3.87	3.81	3.77	3.75	3.74	3.72	3.71	3.69	3.68	3.67
7	5.59	4.74	4.35	4.12	3.97	3.87	3.79	3.73	3.68	3.64	3.44	3.38	3.34	3.32	3.30	3.29	3.27	3.25	3.24	3.23
8	5.32	4.46	4.07	3.84	3.69	3.58	3.50	3.44	3.39	3.35	3.15	3.08	3.04	3.02	3.01	2.99	2.97	2.95	2.94	2.93
9	5.12	4.26	3.86	3.63	3.48	3.37	3.29	3.23	3.18	3.14	2.94	2.86	2.83	2.80	2.79	2.77	2.76	2.73	2.72	2.71
10	4.96	4.10	3.71	3.48	3.33	3.22	3.14	3.07	3.02	2.98	2.77	2.70	2.66	2.64	2.62	2.60	2.59	2.56	2.55	2.54
20	4.35	3.49	3.10	2.87	2.71	2.60	2.51	2.45	2.39	2.35	2.12	2.04	1.99	1.97	1.95	1.92	1.91	1.88	1.86	1.85
30	4.17	3.32	2.92	2.69	2.53	2.42	2.33	2.27	2.21	2.16	1.93	1.84	1.79	1.76	1.74	1.71	1.70	1.66	1.64	1.63
40	4.08	3.23	2.84	2.61	2.45	2.34	2.25	2.18	2.12	2.08	1.84	1.74	1.69	1.66	1.64	1.61	1.59	1.55	1.53	1.52
50	4.03	3.18	2.79	2.56	2.40	2.29	2.20	2.13	2.07	2.03	1.78	1.69	1.63	1.60	1.58	1.54	1.52	1.48	1.46	1.45
60	4.00	3.15	2.76	2.53	2.37	2.25	2.17	2.10	2.04	1.99	1.75	1.65	1.59	1.56	1.53	1.50	1.48	1.44	1.41	1.40
70	3.98	3.13	2.74	2.50	2.35	2.23	2.14	2.07	2.02	1.97	1.72	1.62	1.57	1.53	1.50	1.47	1.45	1.40	1.37	1.36
80	3.96	3.11	2.72	2.49	2.33	2.21	2.13	2.06	2.00	1.95	1.70	1.60	1.54	1.51	1.48	1.45	1.43	1.38	1.35	1.34
90	3.95	3.10	2.71	2.47	2.32	2.20	2.11	2.04	1.99	1.94	1.69	1.59	1.53	1.49	1.46	1.43	1.41	1.36	1.33	1.31
100	3.94	3.09	2.70	2.46	2.31	2.19	2.10	2.03	1.97	1.93	1.68	1.57	1.52	1.48	1.45	1.41	1.39	1.34	1.31	1.30
200	3.89	3.04	2.65	2.42	2.26	2.14	2.06	1.98	1.93	1.88	1.62	1.52	1.46	1.41	1.39	1.35	1.32	1.26	1.22	1.21
300	3.87	3.03	2.63	2.40	2.24	2.13	2.04	1.97	1.91	1.86	1.61	1.50	1.43	1.39	1.36	1.32	1.30	1.23	1.19	1.17
500	3.86	3.01	2.62	2.39	2.23	2.12	2.03	1.96	1.90	1.85	1.59	1.48	1.42	1.38	1.35	1.30	1.28	1.21	1.16	1.14
1 000	3.85	3.00	2.61	2.38	2.22	2.11	2.02	1.95	1.89	1.84	1.58	1.47	1.41	1.36	1.33	1.29	1.26	1.19	1.13	1.11
2 000	3.85	3.00	2.61	2.38	2.22	2.10	2.01	1.94	1.88	1.84	1.58	1.46	1.40	1.36	1.32	1.28	1.25	1.18	1.12	1.09

ANNEXE III : table de cochrane

Table de cochrane

DF	r																
	2	3	4	5	6	7	8	9	10	12	15	20	24	30	40	60	120
1	-	0,98	0,91	0,85	0,79	0,72	0,68	0,64	0,59	0,55	0,48	0,39	0,34	0,28	0,23	0,17	0,10
2	0,98	0,89	0,76	0,69	0,63	0,57	0,52	0,48	0,45	0,395	0,34	0,28	0,24	0,20	0,16	0,115	0,067
3	0,96	0,82	0,68	0,61	0,55	0,50	0,44	0,42	0,38	0,335	0,285	0,23	0,20	0,16	0,13	0,092	0,053
4	0,92	0,77	0,63	0,56	0,495	0,44	0,39	0,37	0,34	0,295	0,245	0,20	0,17	0,14	0,11	0,078	0,043
5	0,90	0,73	0,58	0,52	0,455	0,40	0,36	0,335	0,31	0,27	0,22	0,18	0,15	0,125	0,098	0,068	0,038
6	0,86	0,70	0,56	0,48	0,42	0,37	0,335	0,31	0,29	0,245	0,20	0,165	0,135	0,11	0,087	0,06	0,033
7	0,85	0,68	0,53	0,46	0,40	0,355	0,32	0,295	0,27	0,23	0,19	0,155	0,13	0,105	0,083	0,057	0,031
8	0,83	0,65	0,52	0,44	0,38	0,34	0,305	0,28	0,255	0,22	0,18	0,145	0,12	0,098	0,076	0,052	0,039
9	0,81	0,63	0,50	0,42	0,37	0,325	0,29	0,27	0,245	0,21	0,17	0,135	0,115	0,092	0,07	0,049	0,038
10	0,79	0,61	0,48	0,41	0,355	0,31	0,28	0,26	0,235	0,20	0,16	0,13	0,11	0,088	0,067	0,047	0,036
12	0,77	0,58	0,46	0,39	0,34	0,29	0,27	0,245	0,225	0,19	0,15	0,122	0,105	0,082	0,063	0,043	0,034
14	0,75	0,56	0,445	0,375	0,33	0,28	0,255	0,235	0,215	0,18	0,145	0,115	0,098	0,078	0,058	0,041	0,033
16	0,73	0,54	0,43	0,365	0,315	0,27	0,25	0,225	0,205	0,175	0,138	0,11	0,092	0,075	0,055	0,040	0,032
18	0,72	0,53	0,42	0,355	0,305	0,26	0,245	0,22	0,20	0,17	0,133	0,105	0,09	0,072	0,053	0,038	0,031
20	0,70	0,52	0,41	0,35	0,295	0,255	0,235	0,215	0,195	0,165	0,13	0,10	0,087	0,07	0,051	0,037	0,0305
25	0,68	0,51	0,395	0,34	0,29	0,245	0,23	0,205	0,185	0,155	0,122	0,098	0,083	0,067	0,050	0,036	0,03
30	0,67	0,49	0,38	0,33	0,28	0,235	0,215	0,20	0,175	0,145	0,118	0,092	0,08	0,063	0,048	0,034	0,03
40	0,65	0,47	0,365	0,31	0,265	0,22	0,205	0,185	0,16	0,135	0,11	0,085	0,074	0,058	0,045	0,032	0,029
50	0,63	0,44	0,35	0,295	0,25	0,21	0,195	0,175	0,15	0,125	0,105	0,08	0,07	0,055	0,043	0,03	0,028
60	0,61	0,43	0,34	0,285	0,24	0,205	0,185	0,165	0,145	0,12	0,098	0,075	0,065	0,052	0,04	0,028	0,027
90	0,58	0,41	0,32	0,265	0,225	0,19	0,17	0,15	0,13	0,11	0,09	0,07	0,058	0,047	0,037	0,026	0,025
120	0,56	0,39	0,30	0,25	0,215	0,175	0,16	0,14	0,125	0,10	0,085	0,065	0,055	0,044	0,035	0,024	0,024
240	0,53	0,37	0,28	0,225	0,19	0,16	0,14	0,13	0,11	0,09	0,075	0,055	0,048	0,038	0,03	0,02	0,022
∞	0,49	0,33	0,25	0,19	0,17	0,135	0,12	0,11	0,095	0,075	0,065	0,049	0,042	0,032	0,025	0,018	0,01

ANNEXE IV : chromatographie liquide haute performance

HPLC

La chromatographie est un ensemble de procédés applicables à des mélanges moléculaires, ioniques, matériaux organiques, inorganiques et biologiques, en vue de leur identification et de leur quantification, basés sur des différences de distribution des solutés entre une phase stationnaire et une phase mobile. La chromatographie en phase liquide a permis de réaliser des analyses qui n'étaient auparavant pas possible avec les techniques sur couche mince ou en phase gazeuse.

A l'origine la chromatographie en phase liquide se faisait sur des colonnes en verre. Le liquide traversait la phase stationnaire par gravité ou sous faible pression. Puis pour augmenter le débit, des manipulations ont été réalisées sous pression P plus forte. C'est ce que l'on a appelé la chromatographie liquide sous haute pression (HPLC). Très rapidement le P de pression est devenu le P de performance lorsque l'on a optimisé la technique.

1. Principe

HPLC utilise une phase mobile (liquide) contenant un échantillon constitué d'un mélange de solutés à séparer, ce mélange de molécules est introduit dans cette phase qui vont interagir plus ou moins avec la phase stationnaire dans un tube appelé colonne chromatographique

La phase mobile parcourt le système chromatographique sous haute pression. Le mélange à séparer sera dilué dans la phase mobile qui l'entraîne à travers la colonne et ceci après qu'il soit injecté à l'entrée de cette dernière. Suite à un phénomène appelé rétention, il résulte que les constituants du mélange injectés se déplacent tous plus vite que la phase mobile et que leur vitesse de déplacement sont différentes. Ils sont ainsi élués de la colonne les uns après les autres et donc séparés. Afin d'obtenir un tracé appelé chromatogramme un détecteur couplé à un enregistreur sont placés à la sortie de la colonne.

Le temps de rétention qui est le temps au bout duquel un composé est élué de la colonne et détecté caractérise qualitativement une substance et ceci dans des conditions chromatographiques données

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

2. Conception général d'un appareil de l'HPLC

Pour assurer le bon fonctionnement de la chromatographie liquide haute performance, il faut qu'elle se dispose de plusieurs parties principales.

ANNEXE IV : chromatographie liquide haute performance HPLC

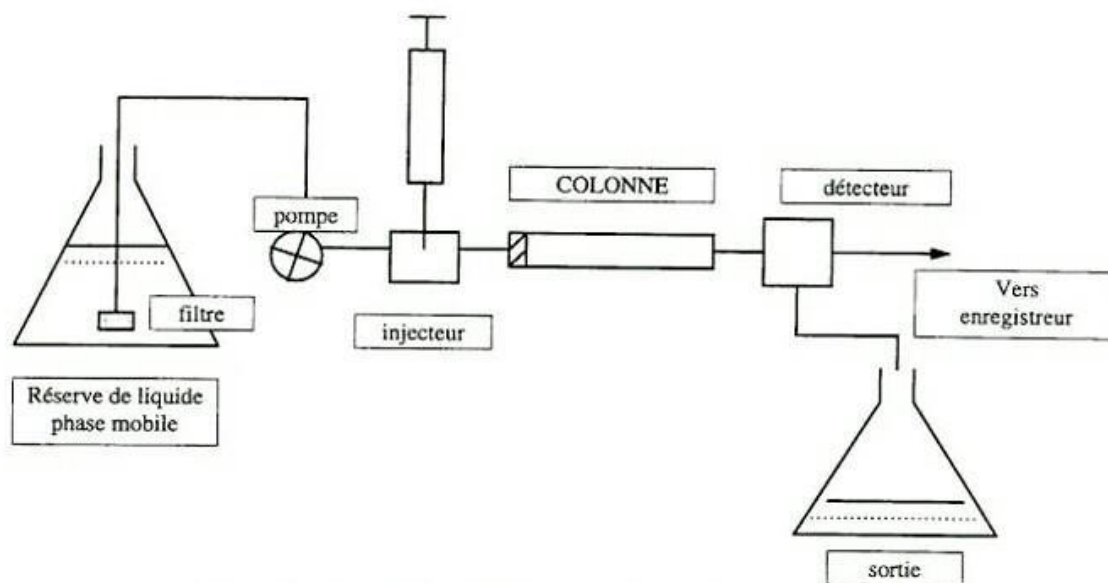


Figure : Appareillage de l'HPLC.

2.1. Réservoir de la phase mobile (éluant) :

Les appareils HPLC sont équipés d'un ou plusieurs réservoirs qui vont contenir les solvants, ils sont soit en acier inoxydable résistant à la corrosion, soit en verre. Il peut y'avoir des perturbations lors de la détection, séparation, ou gêne le bon fonctionnement des pompes et des détecteurs ceci suite à la présence de gaz ambiants comme l'oxygène qui peuvent être dissouts dans les solvants et former des bulles dans la colonne, et des poussières en suspension. Afin d'éliminer ces perturbations, il est souhaitable de dégazer et filtrer les solvants. Le dégazage peut s'effectuer par pompage sous vide, ultrasons , par chauffage et agitation , ou réaction catalytique qui transforme l'oxygène en formaldéhyde ou acide formique en présence de méthanol , ou encore par barbotage d'hélium qui permet de retenir environ 85% d'oxygène en 10minutes , les solvants sont exempts d'hélium après barbotage du fait de sa faible solubilité dans les solvants ordinaires d'où son intérêt .Pour éviter la redissolution des gaz un barbotage constant d'hélium peut être effectué.

2.2. Système de pompage

Tout appareil HPLC doit contenir au minimum une pompe qui va délivrer en continu la phase mobile et forcer son passage à travers la colonne et provoquer un écoulement compatible avec la séparation chromatographique

Les pompes requises doivent répondre à des exigences rigoureuses :

- Atteindre des pressions élevées : -200bars (20000KPa) ou plus
- Être exempt d'impulsions
- Imposer des débits reproductibles de 0,1 à 10ml/minutes
- Résister à la corrosion et aux solvants
- Permettre de délivrer un éluant de composition fixe en mode isocratique ou de composition variable pour travailler en gradient d'élution

Elles permettent de travailler :

ANNEXE IV : chromatographie liquide haute performance HPLC

- En mode isocratique : c'est à dire l'élution est effectuée avec un seul solvant ou un mélange de composition fixe et constante.
- En mode gradient : élution avec programmation des solvants de polarité différente

Les pompes actuelles ont un débit variable de quelques ml à plusieurs ml/minutes.

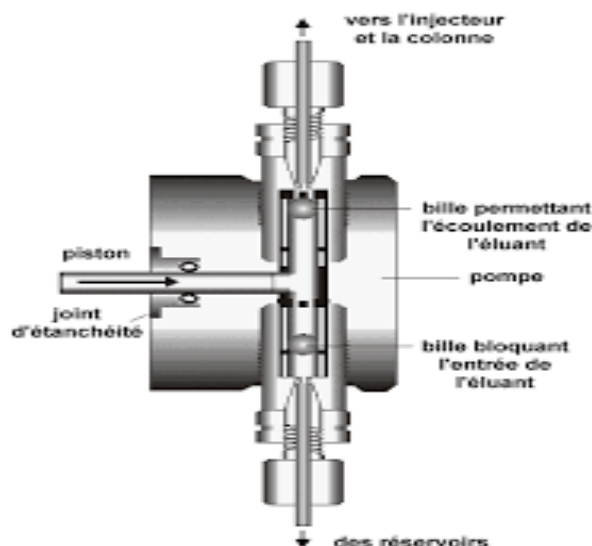


Figure : Exemple d'une pompe HPLC

2.3. Système d'injection

En HPLC, on injecte souvent l'échantillon à l'aide d'une seringue à travers un septum en élastomère (à dépôt direct), toutefois cette procédure n'est pas très reproductible et reste limitée aux pressions inférieures à environ 100bars.

La méthode d'introduction de loin la plus utilisée emploie des boucles d'échantillonnage. Ces dispositifs font généralement partie intégrante de l'appareillage de HPLC moderne qui possède des boucles interchangeables permettant de choisir des volumes d'échantillons compris entre 5 et 500 μ l.

Avec ce système la reproductibilité des volumes injectés est de quelques dixièmes de pour cent.

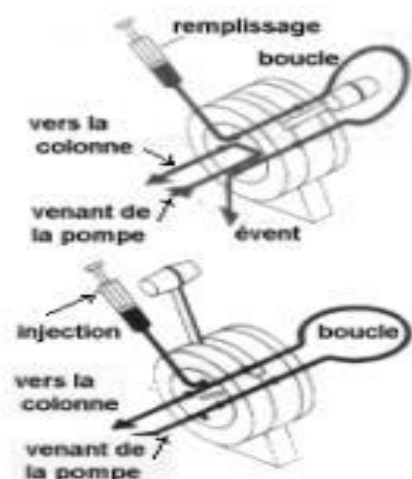


Figure : Remplissage d'une boucle d'injection

2.4. Colonnes

La colonne est l'endroit où s'effectue la séparation des composés, elle est usuellement en acier inoxydable quoiqu'on utilise parfois des tubes de verre à paroi épaisse dans le domaine de basses pressions inférieur à 40 bars. Elle a une longueur qui varie de 5 à 25 cm avec un diamètre interne de 4 à 4,6mm, ces colonnes sont remplies de la phase stationnaire dont le diamètre des particules varie de 3 à 10µm. On place souvent une 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 et d'éviter ainsi l'obstruction et la détérioration des colonnes.

2.5. Phase stationnaire

2.5.1. Phase normale

La phase normale est constituée de gel de silice, cette phase est très polaire et nécessite donc un éluant apolaire. Ainsi lors de l'injection d'une solution ce sont les composés polaires qui sont retenus dans la colonne contrairement aux produits apolaires qui sortent en tête. L'inconvénient d'une telle phase c'est la détérioration rapide au cours du temps du gel de silice ce qui entraîne un manque de reproductibilité des séparations.

2.5.2. Phase inverse

Elle est généralement composée de silice greffée par des chaînes linéaires de 8 à 18 atomes de carbones (C8 et C18), ce matériau est apolaire, il faut donc utiliser un éluant polaire (ACN, MeOH, H₂O). Dans ce cas ce sont les composés polaires qui seront élués en premier.

Contrairement à la phase normale, la qualité de la séparation est maintenue constante et il n'y a pas d'évolution de la phase stationnaire au cours du temps.

2.6. Phase mobile

En fonction de la polarité de la phase stationnaire, on a deux situations :

On utilise une phase mobile peu polaire, si la phase stationnaire est polaire, la chromatographie est dite en phase normale.

On choisit une phase mobile polaire, si la phase stationnaire est très peu polaire, c'est la chromatographie en phase inverse.

Avec un éluant polaire, les composés polaires migrent plus vite que les composés apolaires. Dans ces conditions les hydrocarbures sont fortement retenus.

Ainsi avec une phase greffée, l'ordre d'élution est opposé à celui auquel on est habitué avec les phases normales, et ces silices greffées conduisent en général à une perte importante de polarité.

2.7. Détecteurs

Permettant à la fois, de mettre en évidence la sortie des solutés de la colonne et de donner un signal proportionnel à la quantité de chacun de ces solutés.

Les principaux caractères d'un détecteur idéal sont :

- Une sensibilité appropriée, en générale les sensibilités des détecteurs utilisés de nos jours sont comprises entre 10-8 et 10-15 grammes de soluté
- Une bonne stabilité et une bonne reproductibilité

ANNEXE IV : chromatographie liquide haute performance HPLC

- Une réponse linéaire
- Un temps de réponse rapide indépendant de la vitesse d'écoulement
- Une grande fiabilité et facilité d'emploi
- Une réponse uniforme à tous les solutés ou, au contraire, réponse sélective limitée à une ou plusieurs classes de solutés
- La préservation de l'intégrité de l'échantillon
- Le volume du détecteur HPLC devrait être le plus faible possible afin de diminuer l'élargissement des bandes

2.7.1. Détecteur d'absorption dans l'U.V visible

Ces détecteurs mesurent l'absorbance d'une lumière monochromatique du soluté à une longueur d'onde dans le domaine UV-visible [31]. Ils sont les plus utilisés en HPLC. Cette détection suit la loi de Beer Lambert.

$$A = \epsilon \cdot l \cdot C$$

Avec :

-A : absorbance

- ϵ : le coefficient d'absorption molaire en L.mol⁻¹.cm⁻¹ -l : épaisseur de la solution traversée ou de la cellule en cm

-c : la concentration de la solution en mol/L

Exemple de détecteur à barrette de diodes qu'est un détecteur spectrophotométrique basé sur l'absorption des composés dans le domaine de longueur d'onde appartenant à l'UV/Visible. Il permet d'obtenir des renseignements spectraux pouvant servir à l'identification des composés séparés

2.7.2. Détecteurs d'absorption dans l'infrarouge

Il existe deux types de ces détecteurs, le premier avec un domaine s'étend de 2.5 à 14.5 μ m (ou de 4000 à 690 cm⁻¹). Le second type à transformée de Fourier

2.7.3. Détecteurs à indice de réfraction

Le détecteur mesure l'indice de réfraction du liquide sortant de la colonne. C'est un détecteur universel puisque l'indice de réfraction de l'éluant est modifié lorsqu'un composé, quel qu'il soit, sort de la colonne. De plus, il est fiable et indépendant du débit, et il est thermosensible

2.7.4. Détecteurs de fluorescence

Ces détecteurs utilisent le même principe que ceux des fluorimètres ou spectrofluorimètres, en mesurant la fluorescence des solutés suite à des réactions pré ou post colonne. La fluorescence est observée à l'aide d'un détecteur photoélectrique situé à 90 degrés de rayonnement d'excitation

2.7.5. Détecteurs électrochimiques

Leur fonctionnement est basé sur l'ampérométrie, la polarographie, la coulométrie et la mesure de conductivité

2.7.6. Détecteur de spectrométrie de masse

Le couplage HPLC/SM est plus difficile à réaliser qu'avec la CPG car il faut éliminer le solvant d'éluion soit par une évaporation sélective du soluté, ou par l'utilisation des micro-

ANNEXE IV : chromatographie liquide haute performance

HPLC

colonnes (L=10 cm, d_{int}=1mm) à faible débit (quelque µl/min) et un volume d'injection voisinage de 1µL

2.8. Enregistreurs

Les détecteurs sont munis de logiciels appropriés qui permettent d'acquérir et d'enregistrer simultanément sur un ordinateur le chromatogramme à chaque molécule éluée. L'enregistreur reçoit un signal électrique qui sera traité pour tracer un chromatogramme. Parmi ces logiciels on citera à titre d'exemple le logiciel utilisé en CPG le Millenium.

3. Champs d'application de l'HPLC

Vue sa sensibilité et sa facilité d'adaptation, l'HPLC est utilisé plus en analyse quantitative qu'en analyse qualitative. Cette technique est appliquée dans plusieurs domaines, elle permet : [En biochimie, le dosage de l'hémoglobine A1c, les acide aminés, les protéines, les hydrates de carbones, hormones, les acides nucléiques, vitamines etc.

- En hématologie, le dosage qualitative et quantitative des hémoglobines anormales
- En toxicologie, la mise en évidence et le dosage des substances responsable d'une intoxication volontaires ou non, des drogues, des amphétamines, de la méthadone, etc.
- En pharmacologie, le dosage de nombreux médicaments pour un suivi thérapeutique.

L'HPLC a marqué sa place dans tous les secteurs de l'industrie pharmaceutique (R et D, contrôle qualité, validation du nettoyage).

4. Place de l'HPLC dans l'analyse

4.1. Chromatogramme

Un chromatogramme est un diagramme résultant d'une chromatographie, montrant l'évolution du signal du détecteur en fonction du temps d'élution.

4.1.1. Notions fondamentales

Le pic chromatographique a une allure gaussienne

- La largeur d'une courbe de Gauss est définie par :
 - σ = écarttype = 1/2 largeur du pic à la hauteur des points d'inflexion, à 60,6% de la hauteur.
 - $\delta = 2,35 \sigma$ = largeur à mi-hauteur
 - $\omega = 4\sigma = 1,7\delta$ = largeur mesurée à 13, 5% de la hauteur = largeur à la base du pic
 - A: aire du pic
 - H: hauteur de pic chromatographique
 - RSD : Relative Standard Déviation :

$$\%RSD = 100\sigma/A'$$

Avec : A' : Moyenne des aires du pic.

4.1.2. Grandeurs de rétention

4.1.2.1 Temps mort t₀ ou t_M

Temps nécessaire à l'éluant non retenu pour qu'il arrive au détecteur.

$$t_M = \frac{L}{v}$$

ANNEXE IV : chromatographie liquide haute performance HPLC

Avec :

L : la longueur de la colonne.

v : la vitesse de la phase mobile.

4.1.2.2 Temps de rétention t_R (min)

Temps écoulé entre l'injection et le moment où le constituant sort de la colonne et celui correspondant sur le chromatogramme au maximum du pic.

4.1.2.3 Temps de rétention réduit ou corrigé t_R'

$$t_R' = t_R - t_M$$

4.1.2.4 Volume de rétention V_R (mL)

C'est le volume de la phase mobile nécessaire pour éluer un composé d'un mélange à analyser. Ce volume est caractéristique d'un seul composé dans des conditions opératoires données,

$$V_R = t_R \times D$$

Avec :

D : débit d'écoulement de la phase mobile en ml/min

4.1.2.5 Facteur de rétention K'

Le facteur de rétention K' représente l'affinité d'un composé vis-à-vis de la phase stationnaire

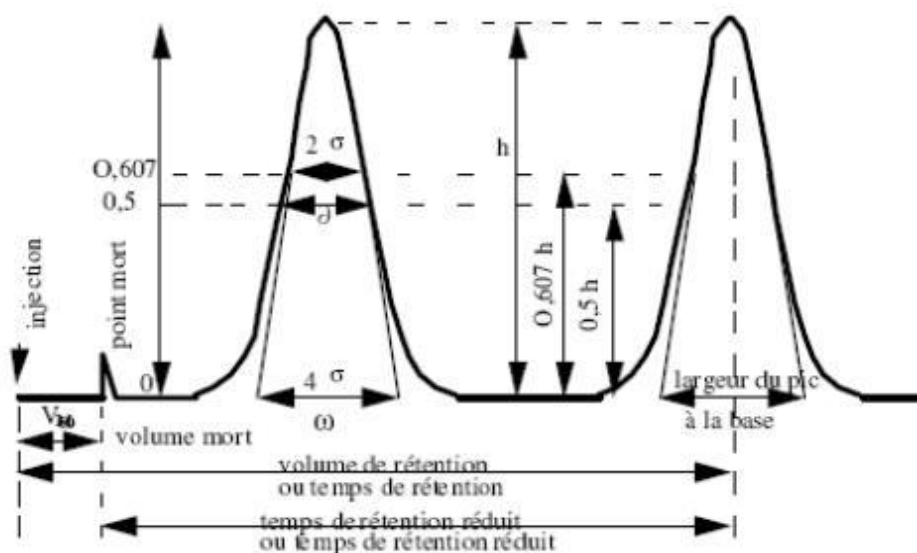


Figure : principaux paramètres d'un chromatogramme

4.2. Analyse qualitative

4.2.1. Notion de Concentration

4.2.1.1 Coefficient de partage K

ANNEXE IV : chromatographie liquide haute performance

HPLC

Le coefficient de partage K_S est le rapport entre la concentration C_m de la phase mobile et la concentration C_s de la phase stationnaire. il dépend de :

- L'affinité du soluté avec la phase mobile
- L'affinité du soluté avec la phase stationnaire
- L'affinité de la phase stationnaire avec la phase mobile

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

4.2.1.2 Facteur de capacité K'

C'est le rapport de la quantité du soluté dans la phase mobile et la quantité du soluté dans la phase stationnaire, cela se traduit par le rapport entre le temps de rétention de la phase stationnaire et le temps de rétention de la phase mobile

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

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

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

V_s : volume de la phase stationnaire

V_m : volume de la phase mobile ou volume mort

4.2.2. Notion d'efficacité et de performance

Elle se traduit par la finesse des pics. Plus le pic est fin plus la colonne est efficace. Elle dépend du nombre de plateaux théoriques N et la hauteur équivalente à un plateau théorique H ou HEPT

4.2.2.1 Le nombre de plateaux théoriques N

t_r : temps de rétention

δ : largeur du pic à mi-hauteur

$$N = \frac{16 t_r^2}{w^2}$$

$$N = \frac{5.54 t_r^2}{\delta^2}$$

N est caractéristique d'un système chromatographique

Plus N est grand, plus la colonne est efficace, plus le pic est fin.

4.2.2.2 La hauteur équivalente à un plateau théorique H

$$H = \frac{L}{N}$$

L : longueur de la colonne

N : nombre de plateau théoriques

N' est le nombre de plateaux efficace ou nombre de plateaux théoriques effectifs N_{eff}

$$N' = 16 \left(\frac{t_r - t_m}{w} \right)^2 = 5.54 \left(\frac{t_r - t_m}{\delta} \right)^2$$

4.2.3. Qualité de séparation

4.2.3.1 La sélectivité α

Est exprimée par la formule suivante

$$\alpha = \frac{t_{rA}}{t_{rB}}$$

ANNEXE IV : chromatographie liquide haute performance

HPLC

Pour préciser la position relative de deux pics chromatographiques adjacents. Plus α est élevé plus la séparation est facile

$\alpha = 1$: pas de séparation

$\alpha > 1$: séparation

4.2.3.2 Facteur de résolution R_s

Est calculé par la formule suivante :

$$R_s = \frac{t_{r2} - t_{r1}}{w_1 + w_2}$$

t_r : temps de rétention de chaque pic

w : largeur des pics à la base

Plus R_s est grand, plus la séparation est meilleure

$R_s \leq 0.8$: séparation insuffisante

$R_s \leq 1$: chevauchement des pics

$R_s = 1$: 2% de chevauchement des pics

$R_s \geq 1.5$: bonne séparation

4.3. Analyse quantitative

Il a été prouvé que la surface des pics est proportionnelle à la concentration ou la quantité de l'analyte dosé.

La surface est exprimée par la formule suivante :

$$A = K_c \times C$$

Avec :

A : l'aire du pic

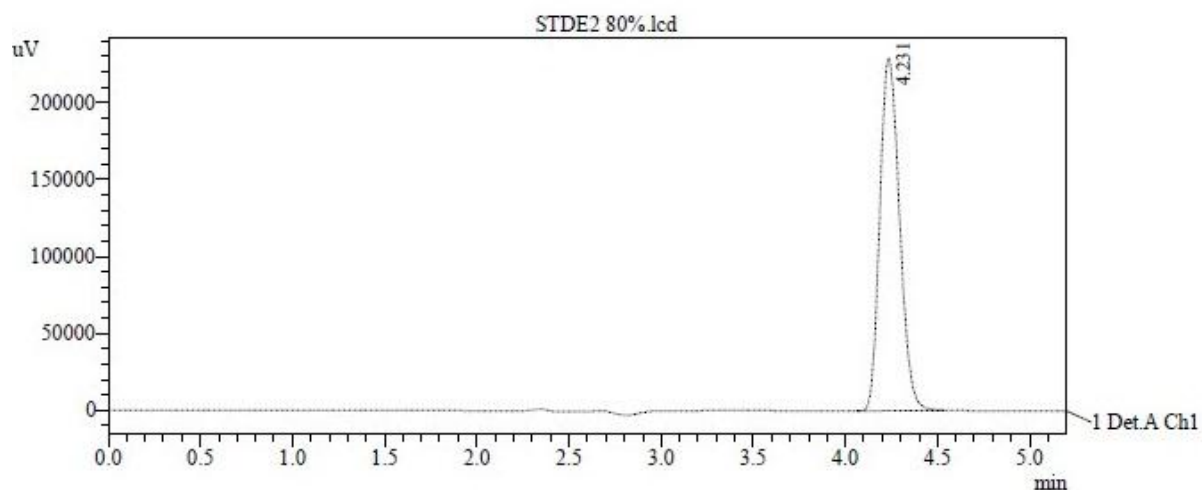
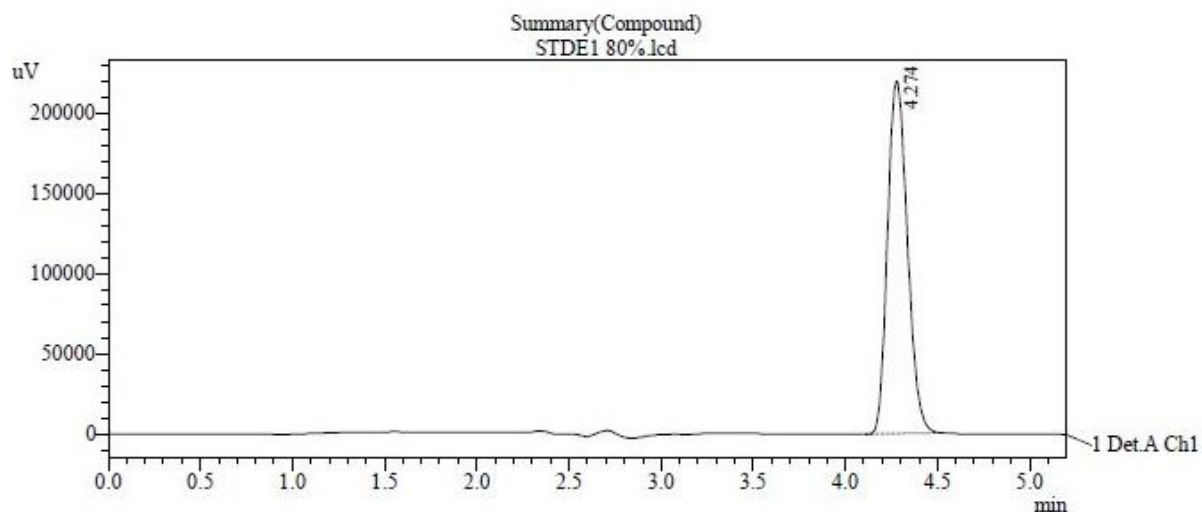
C : concentration du composé injecté

K_c : coefficient de la réponse du détecteur

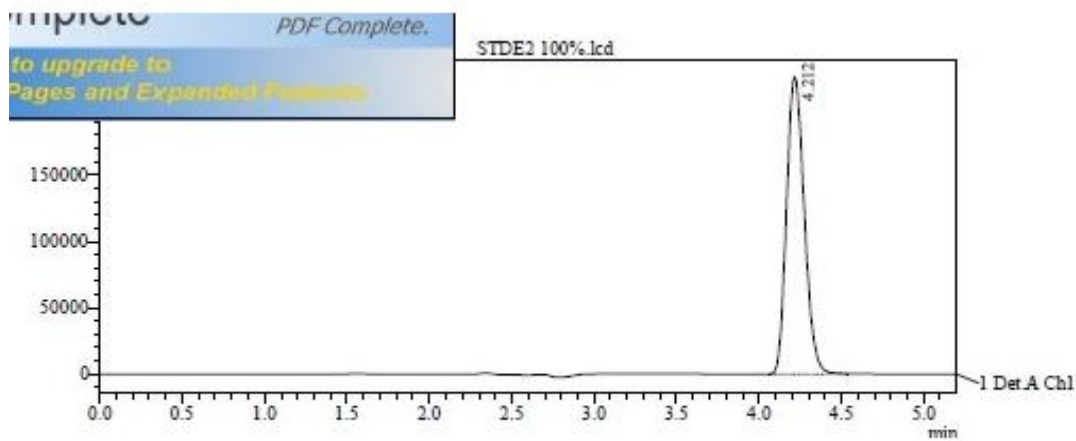
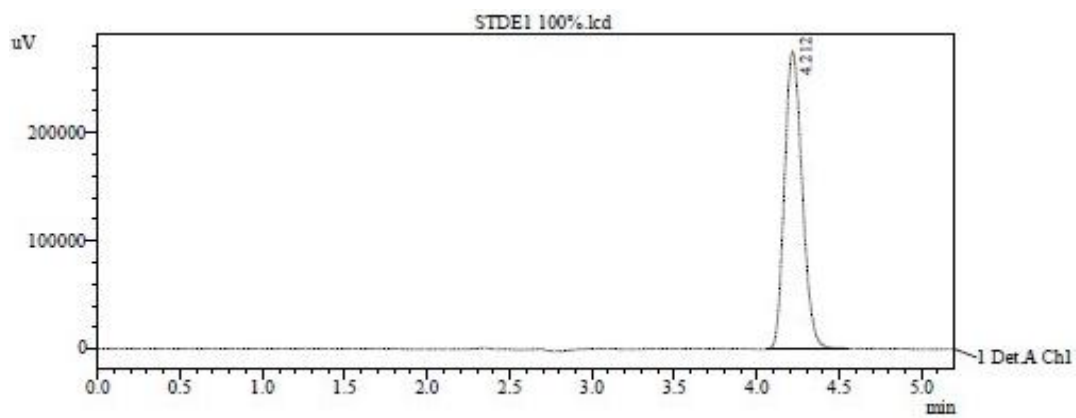
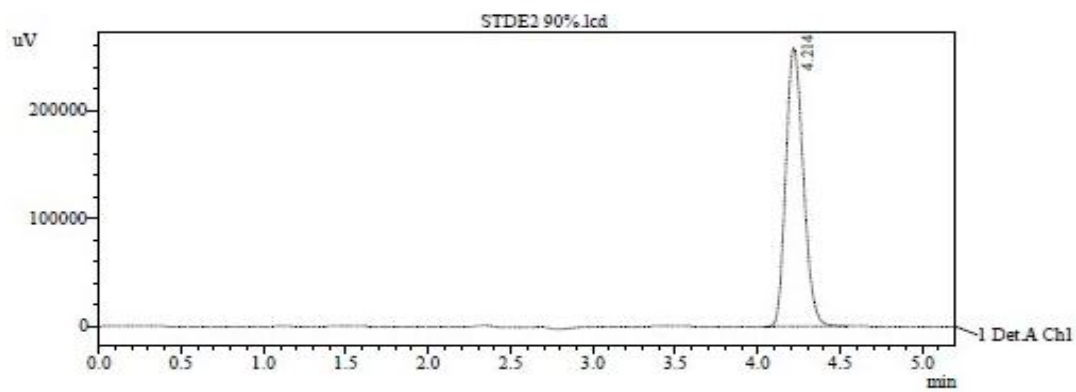
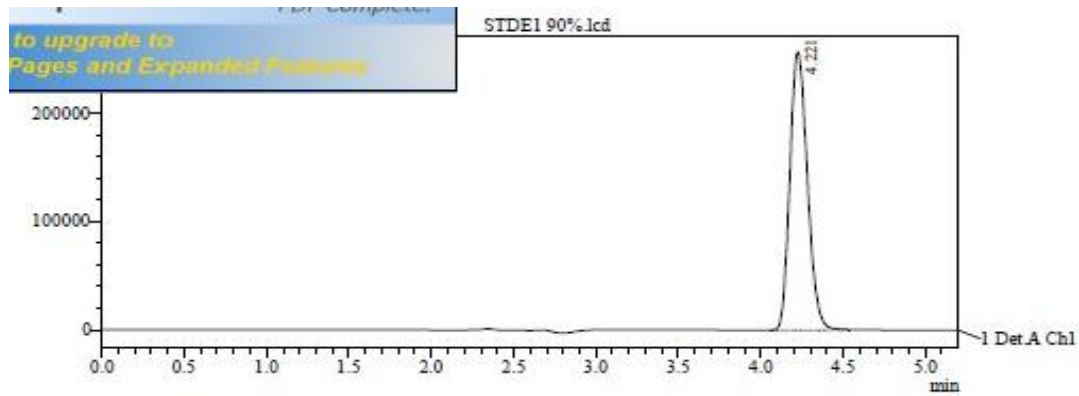
ANNEXE V : Chromatogrammes

• Série 1

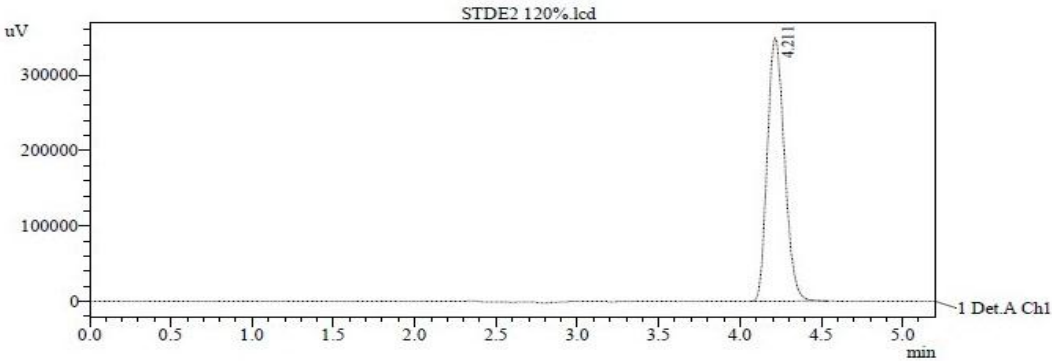
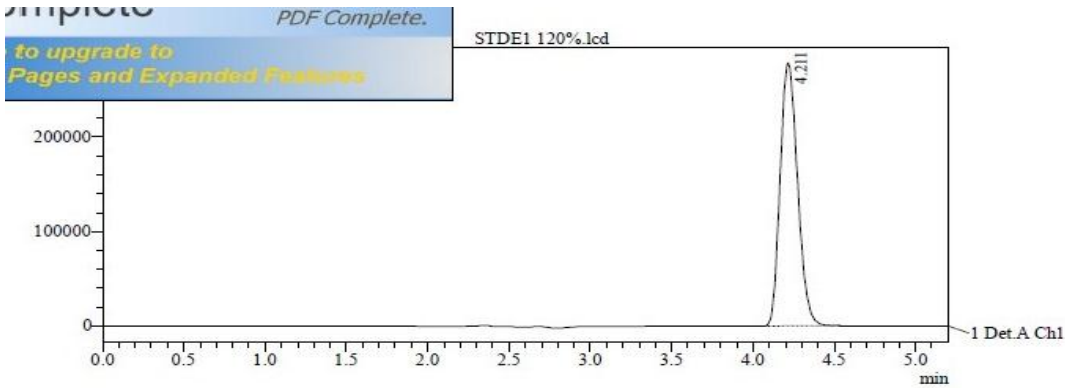
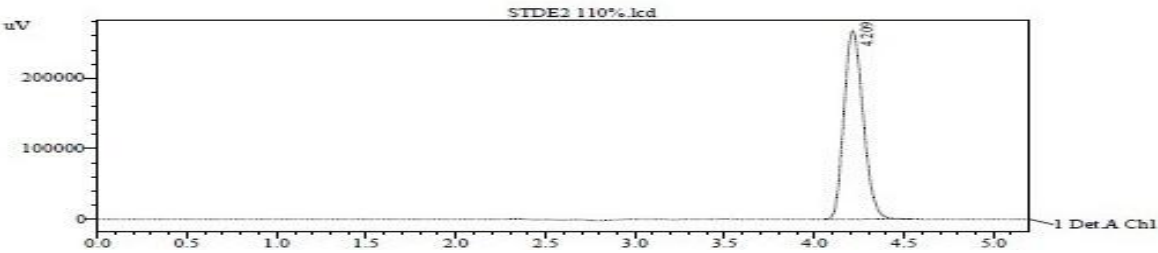
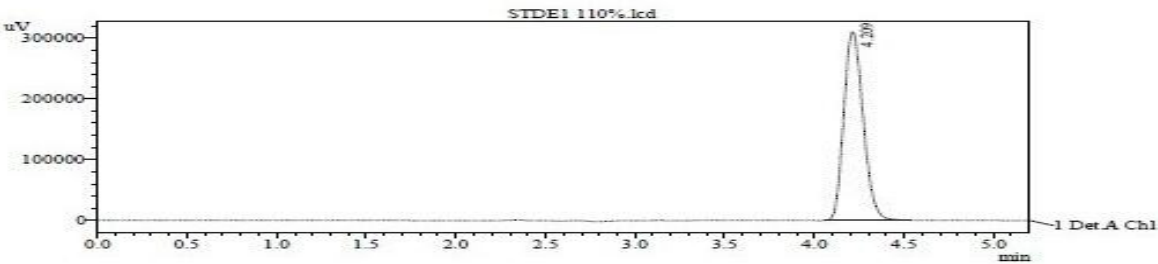
Acquired by : Admin
Sample Name : STDE1 80%
Sample ID : STDE1 80%
Tray# : 1L
Vial # : 31
Injection Volume : 20 uL
Data File Name : STDE1 80%.lcd
Method File Name : Piroxicam.lcm
Batch File Name : Piroxicam.lcb
Report File Name : Default.lcr
Data Acquired : 01/01/2006 02:33:34
Data Processed : 01/01/2006 02:38:50



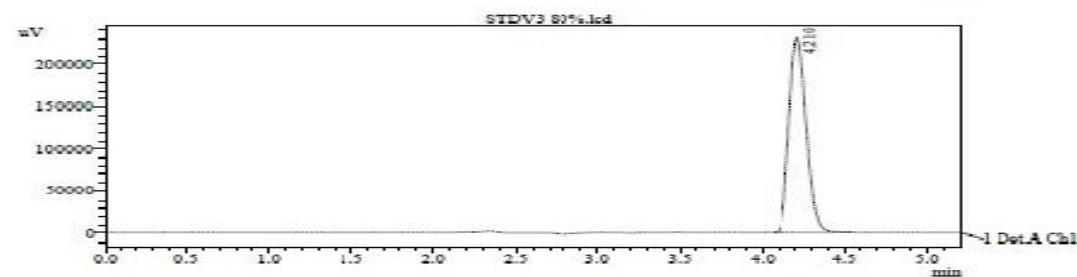
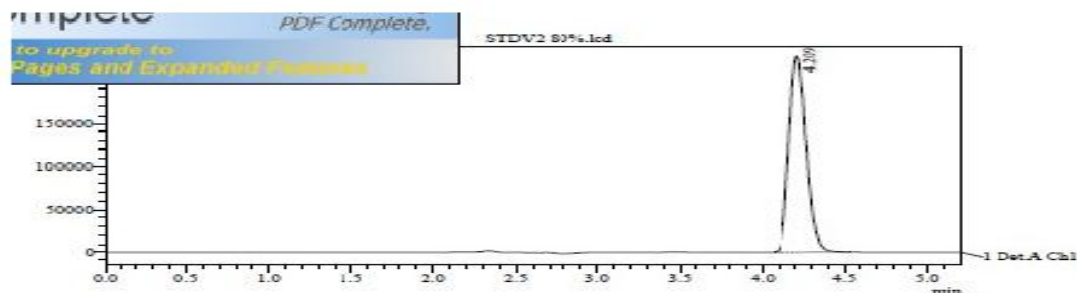
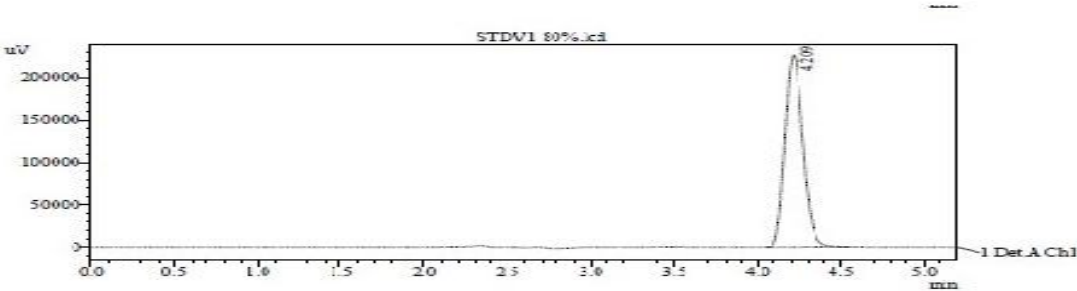
ANNEXE V : Chromatogrammes



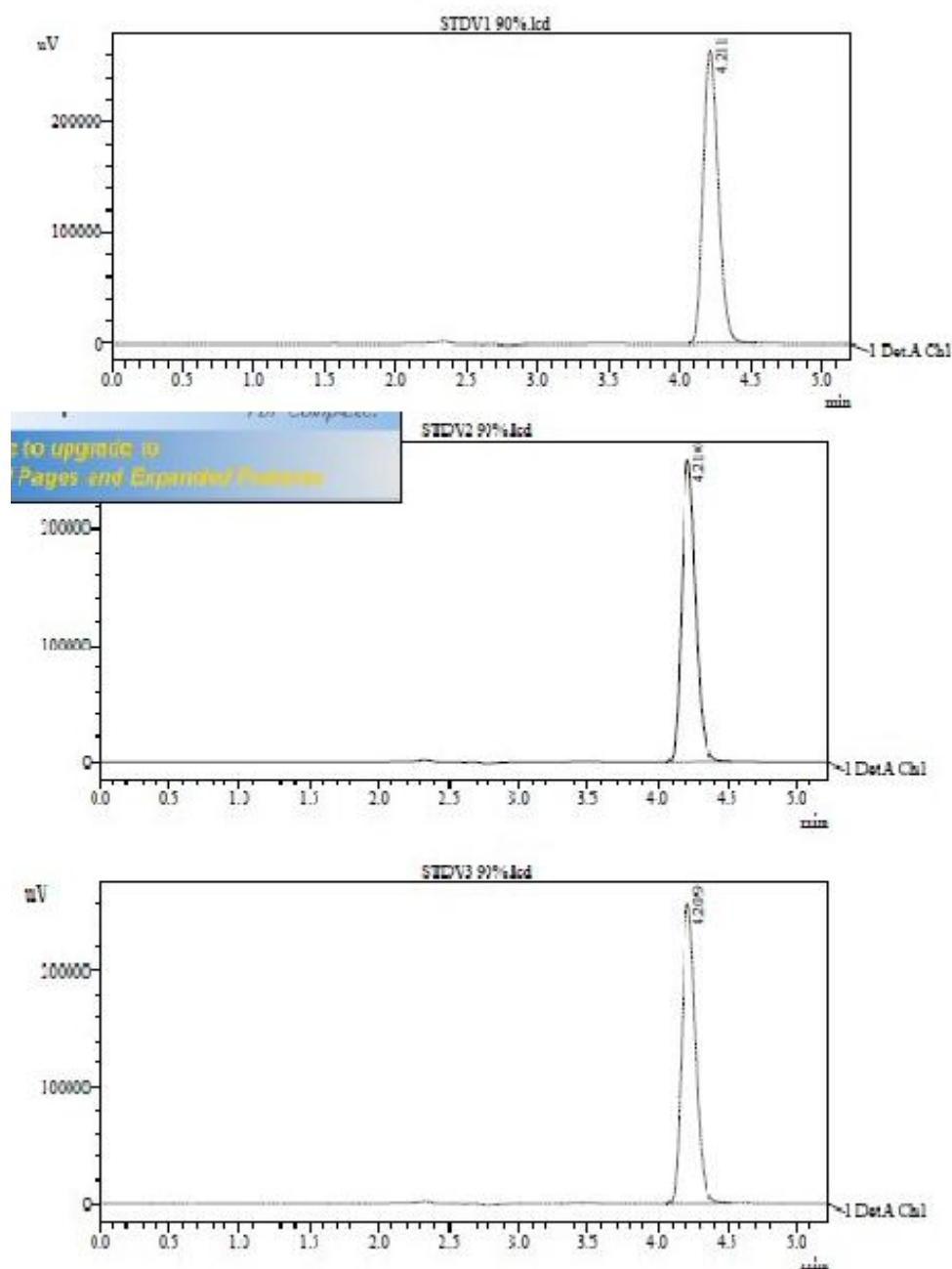
ANNEXE V : Chromatogrammes



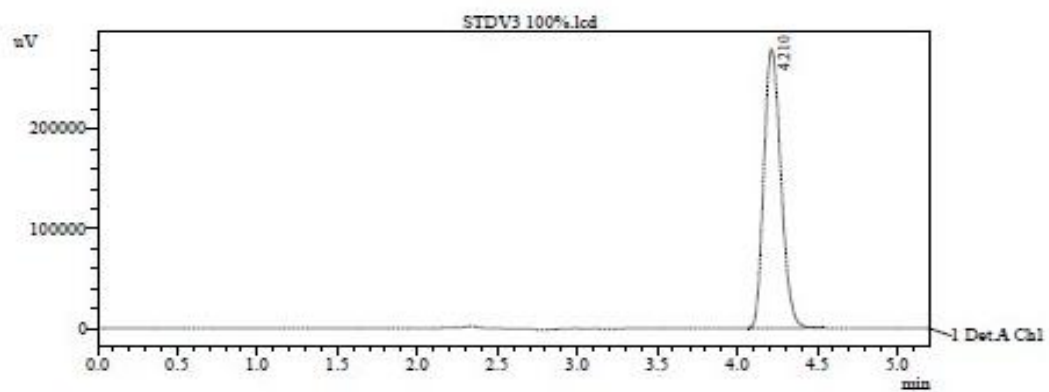
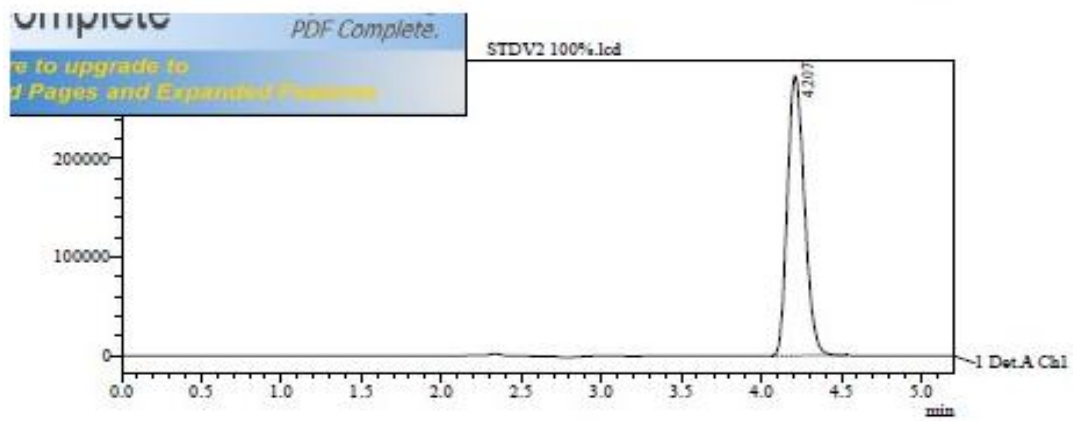
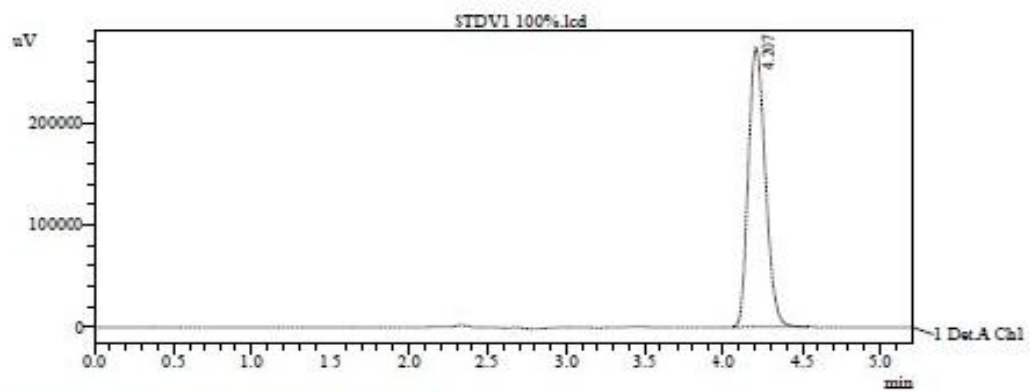
ANNEXE V : Chromatogrammes



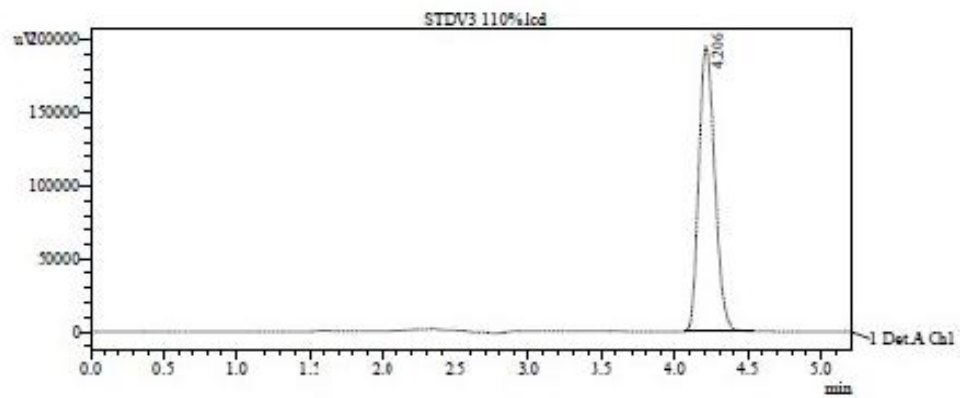
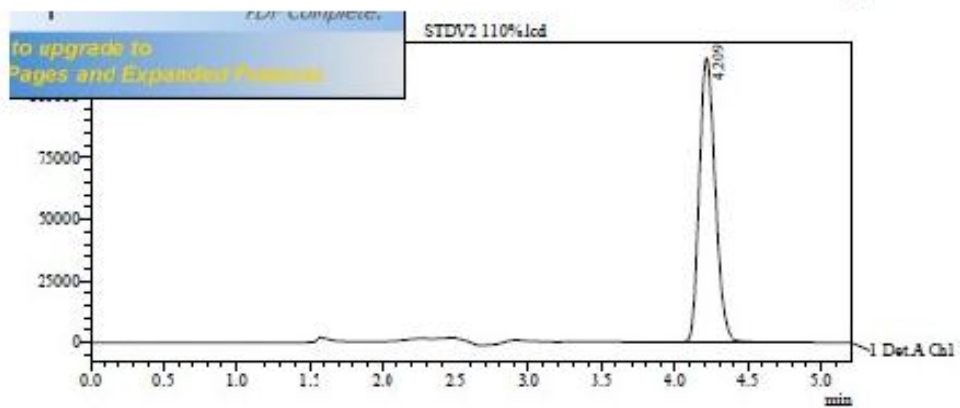
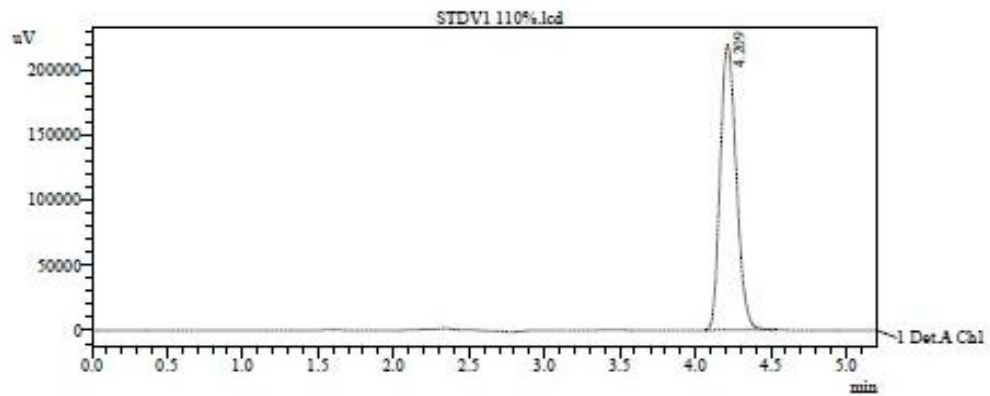
ANNEXE V : Chromatogrammes



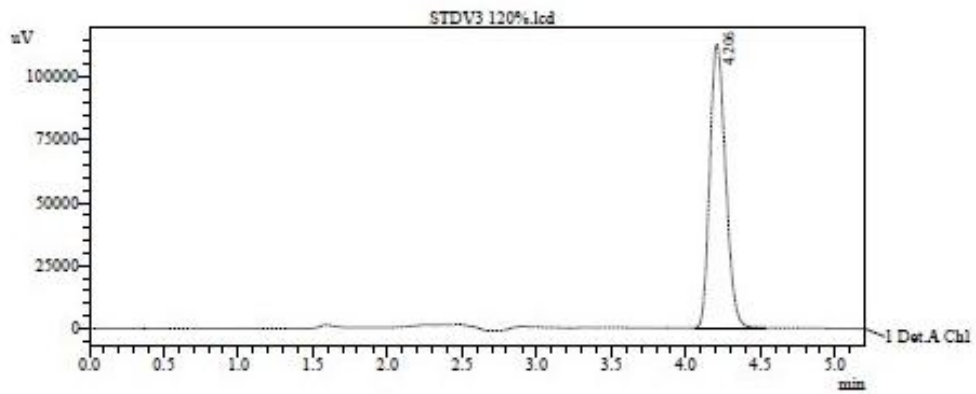
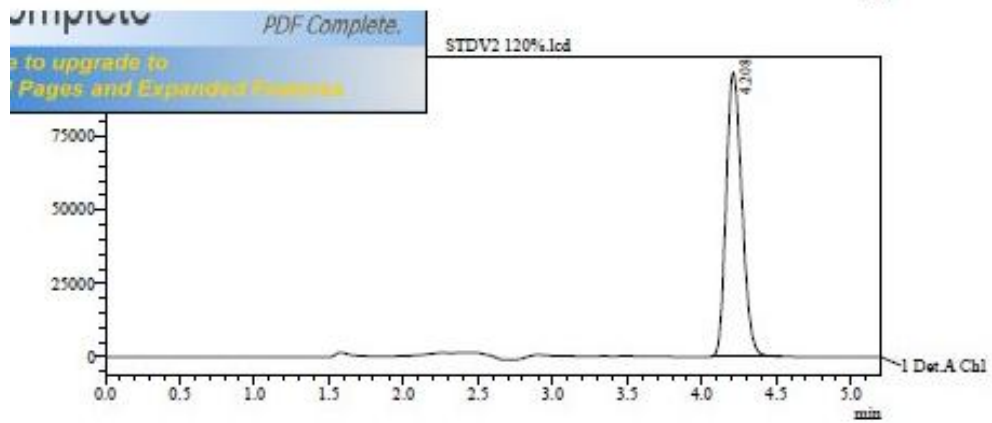
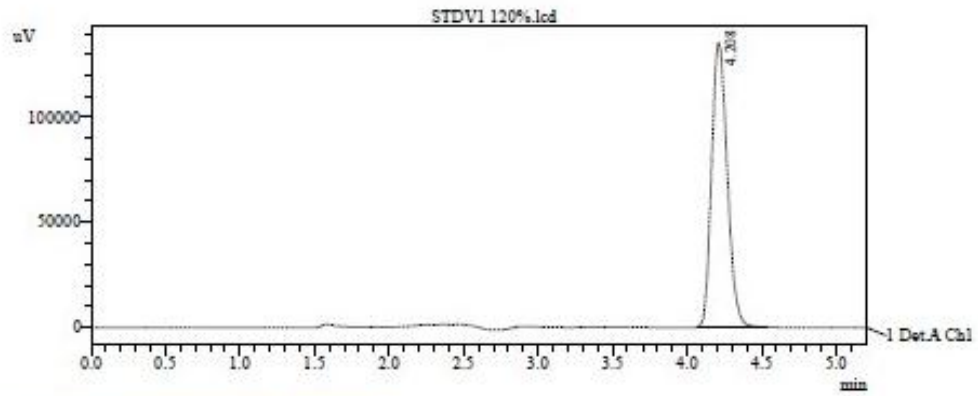
ANNEXE V : Chromatogrammes



ANNEXE V : Chromatogrammes



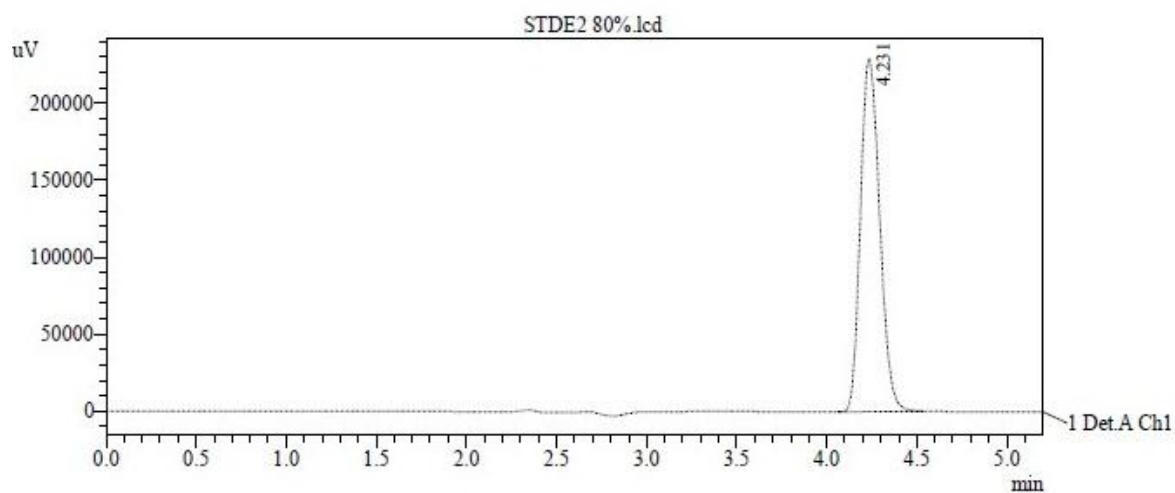
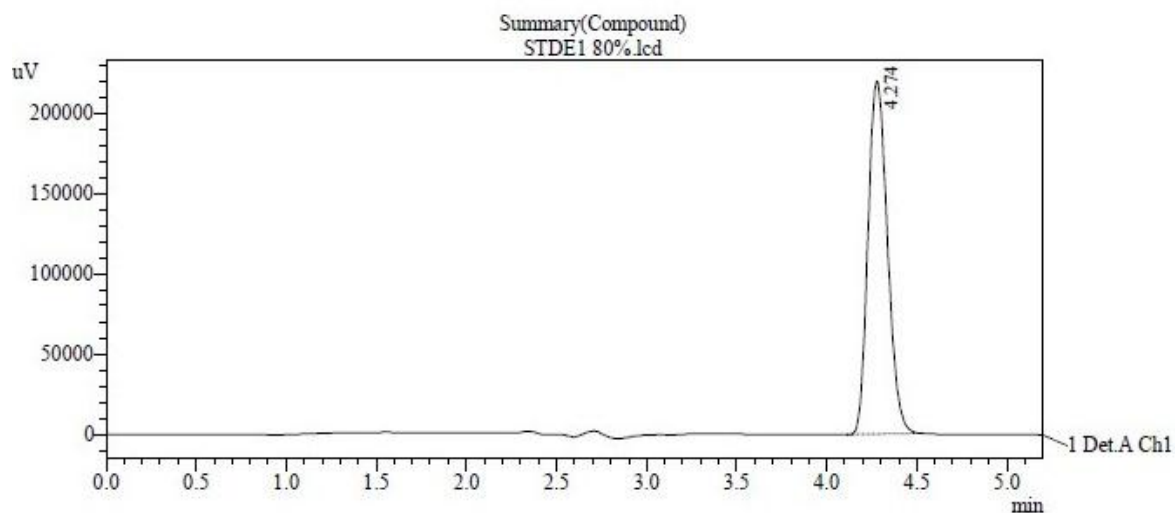
ANNEXE V : Chromatogrammes



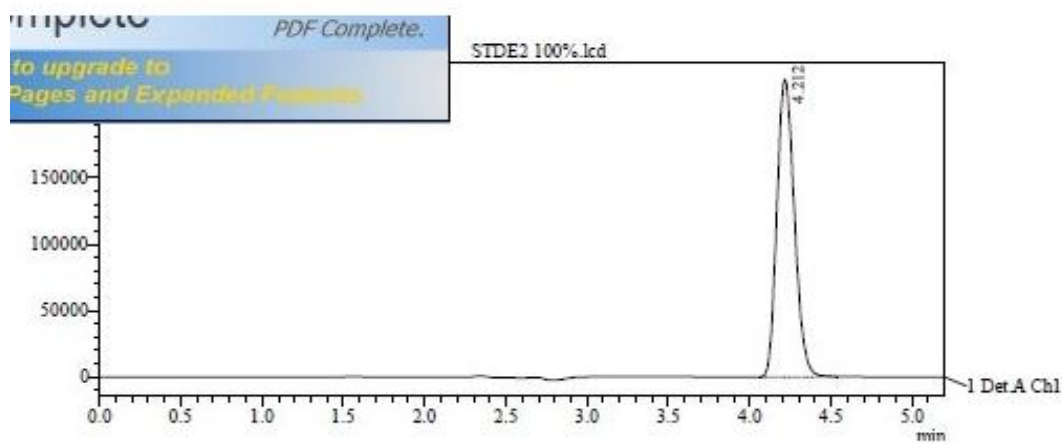
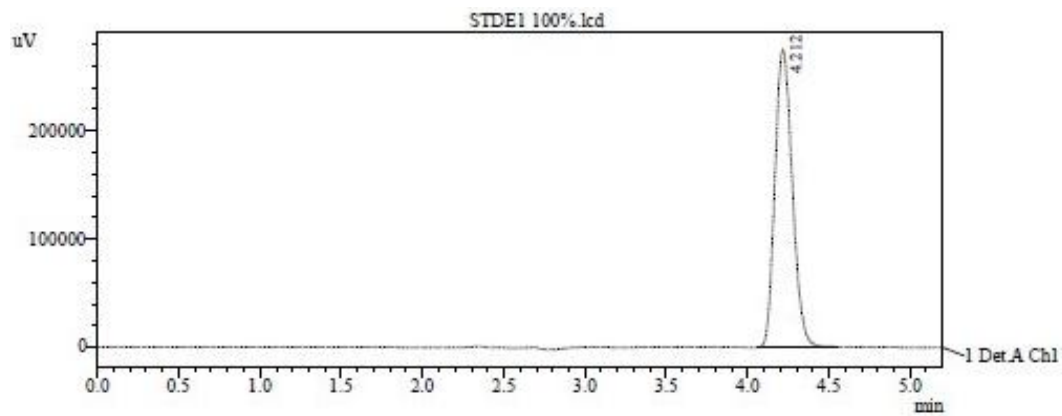
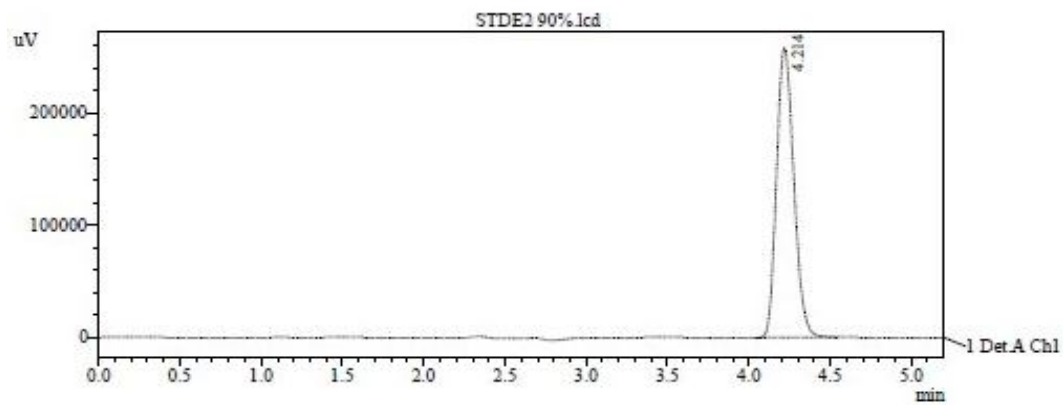
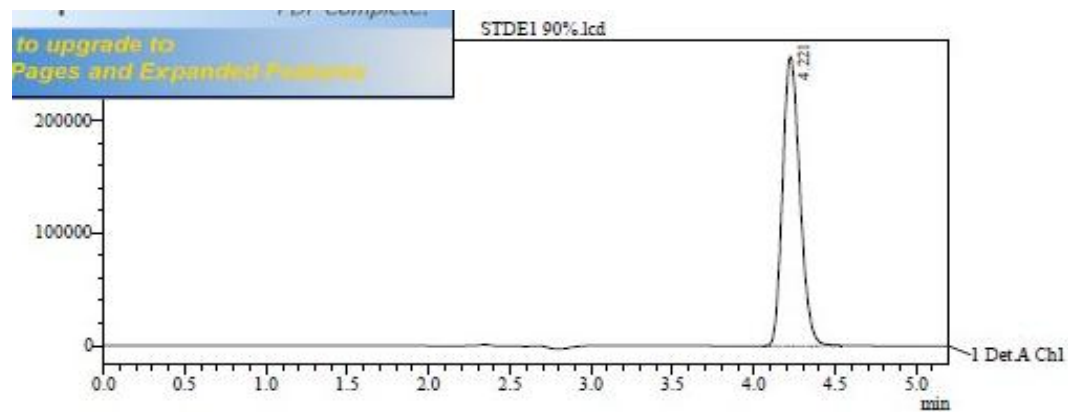
ANNEXE V : Chromatogrammes

- Serie 2

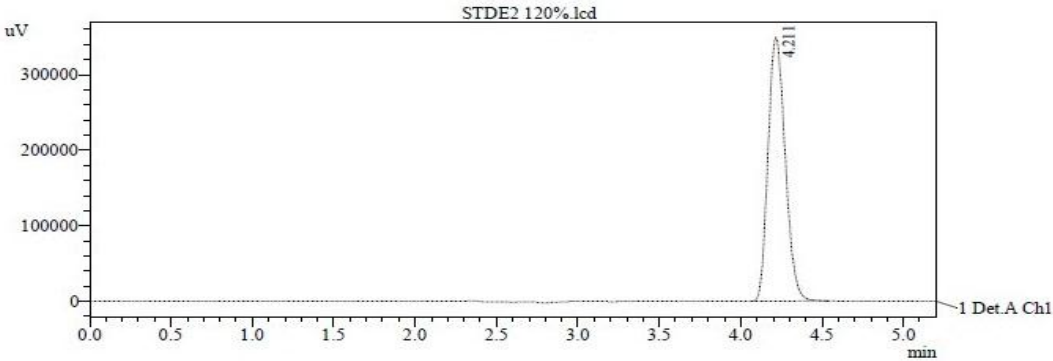
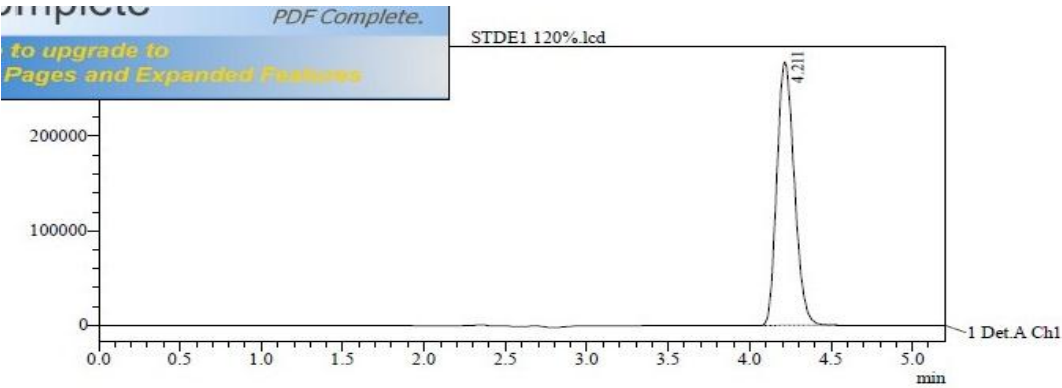
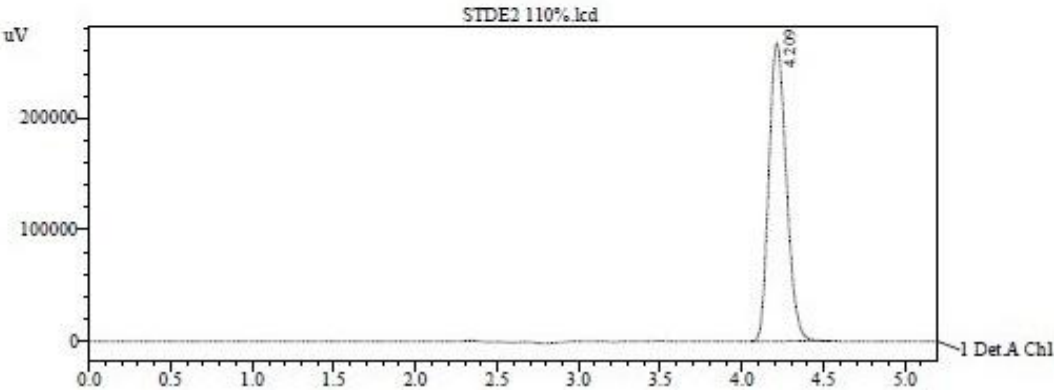
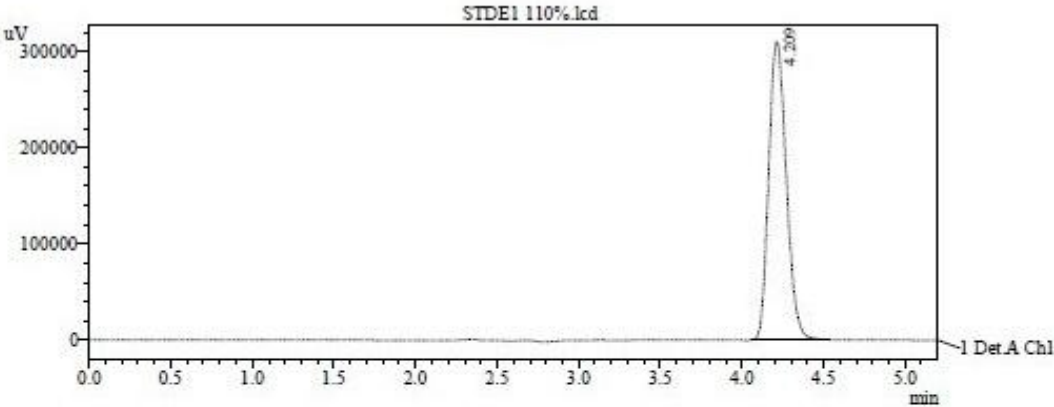
Acquired by : Admin
Sample Name : STDE1 80%
Sample ID : STDE1 80%
Tray# : 1L
Vial # : 31
Injection Volume : 20 uL
Data File Name : STDE1 80%.lcd
Method File Name : Piroxicam.lcm
Batch File Name : Piroxicam.lcb
Report File Name : Default.lcr
Data Acquired : 01/01/2006 02:33:34
Data Processed : 01/01/2006 02:38:50



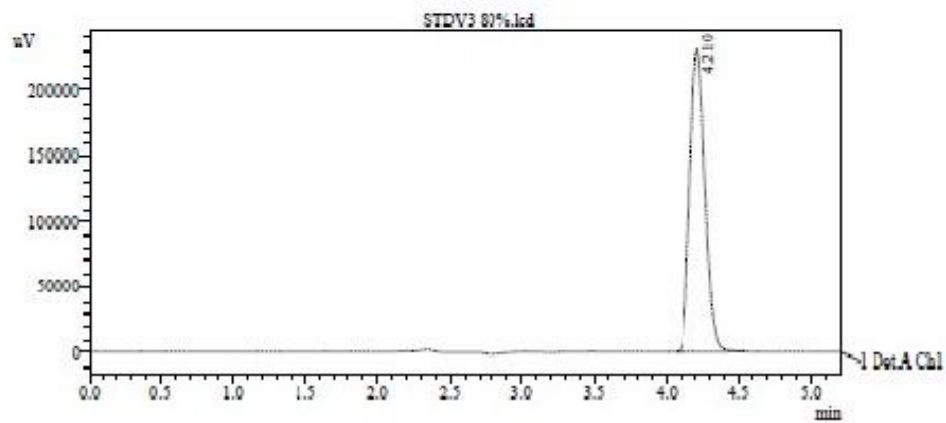
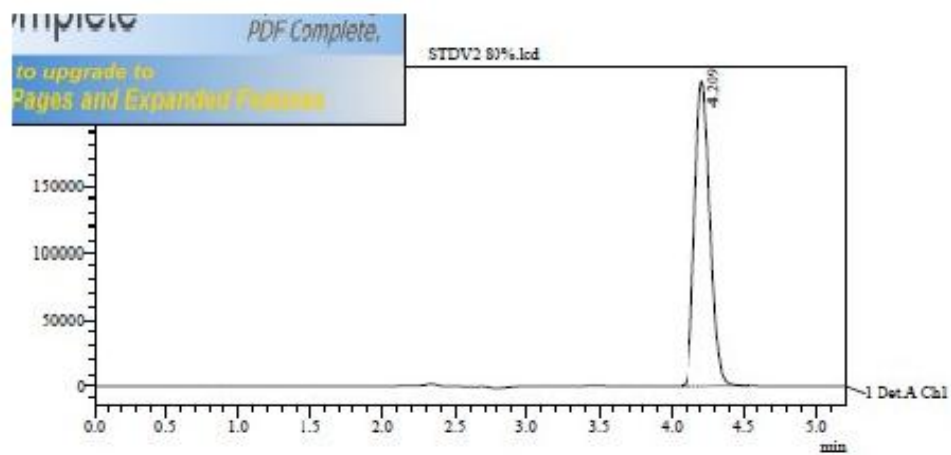
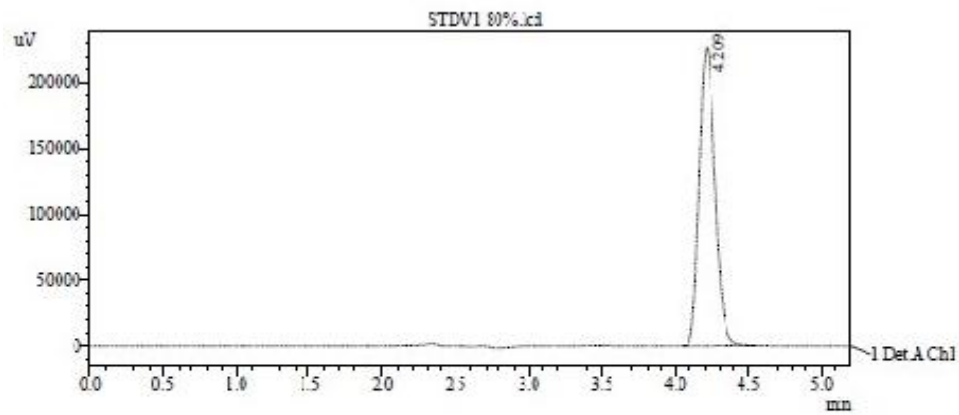
ANNEXE V : Chromatogrammes



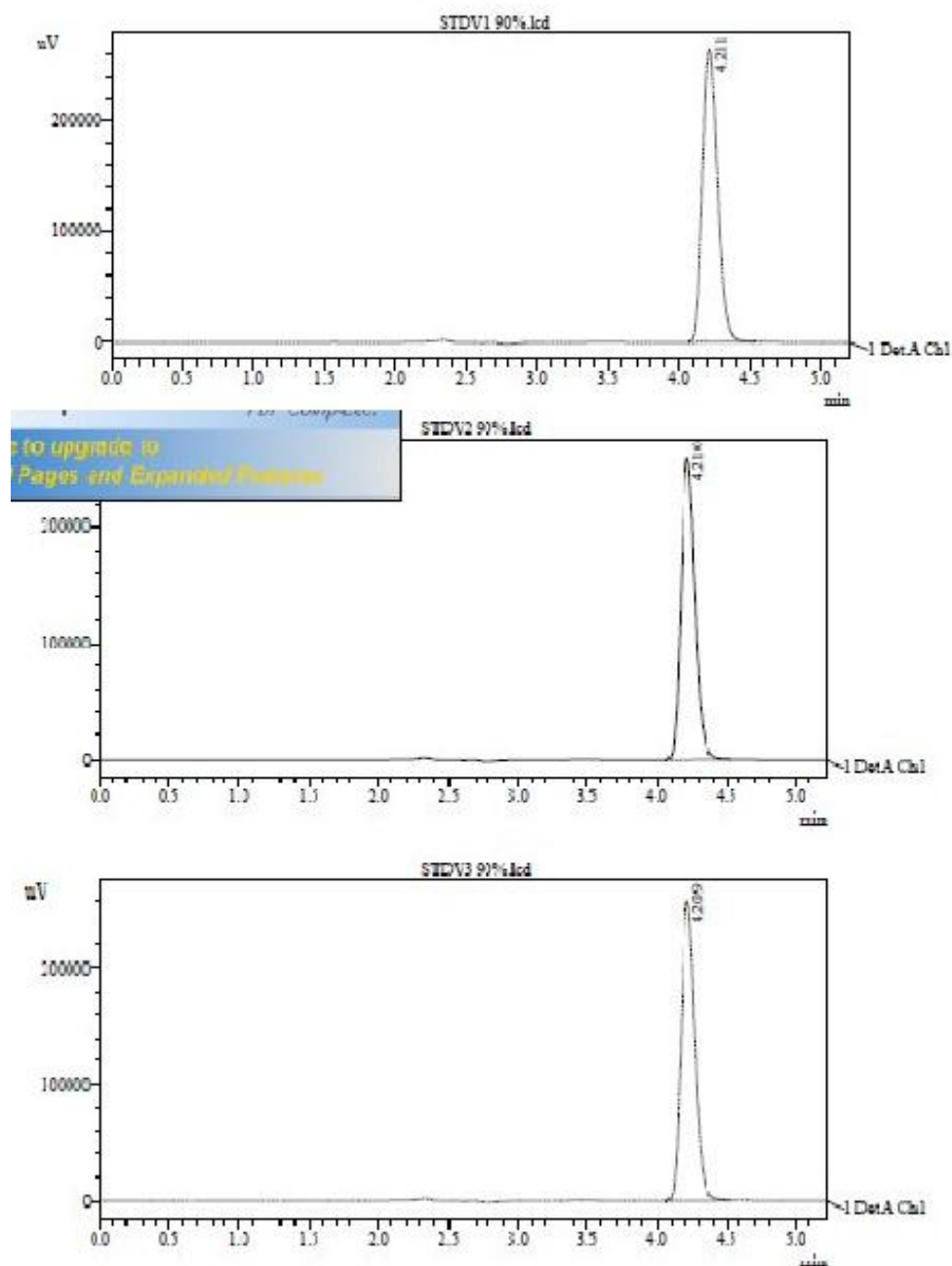
ANNEXE V : Chromatogrammes



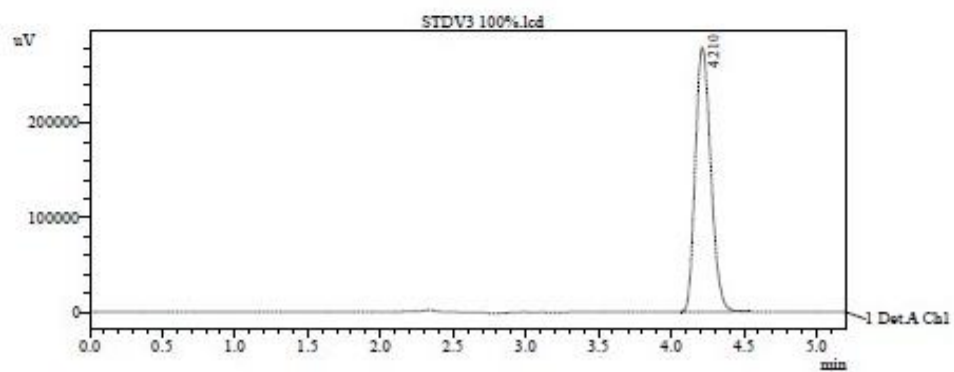
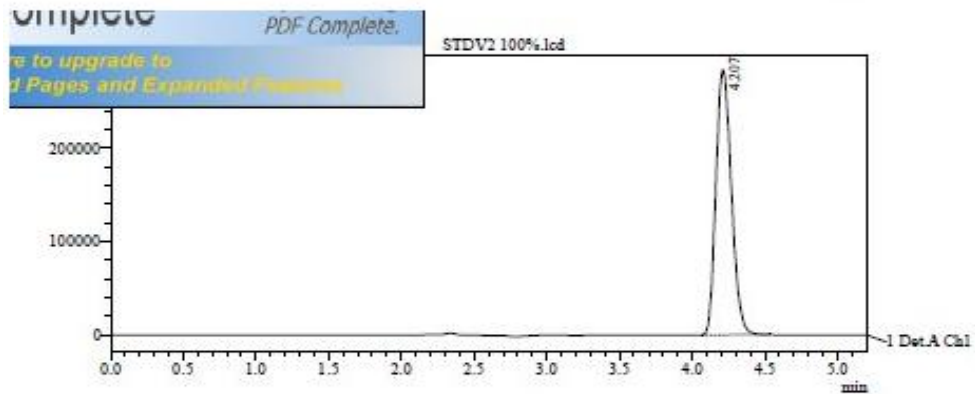
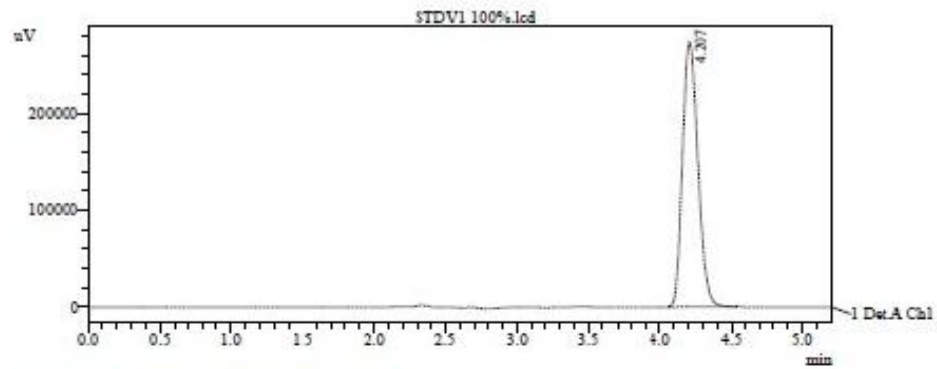
ANNEXE V : Chromatogrammes



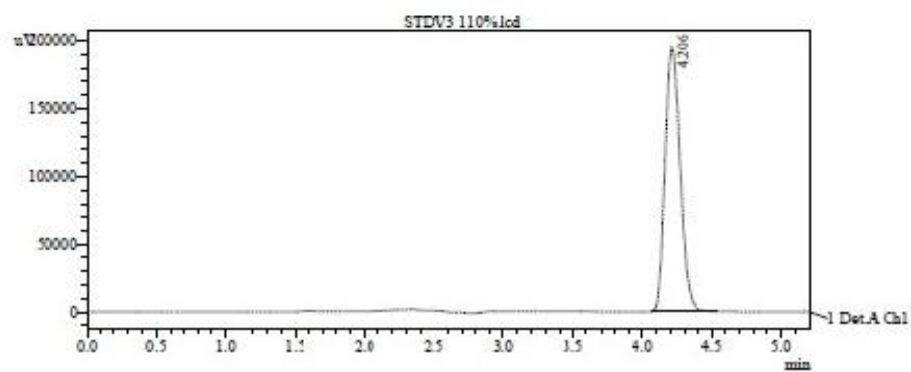
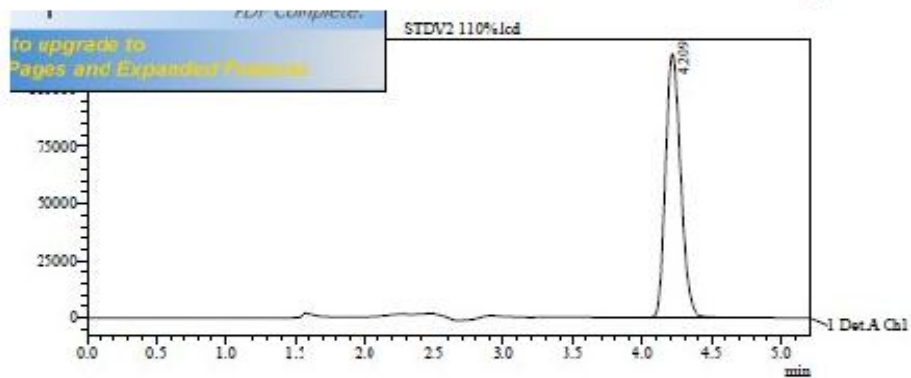
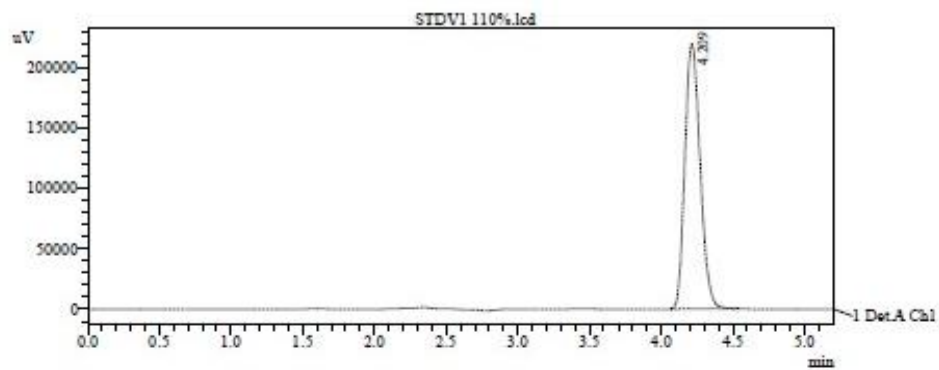
ANNEXE V : Chromatogrammes



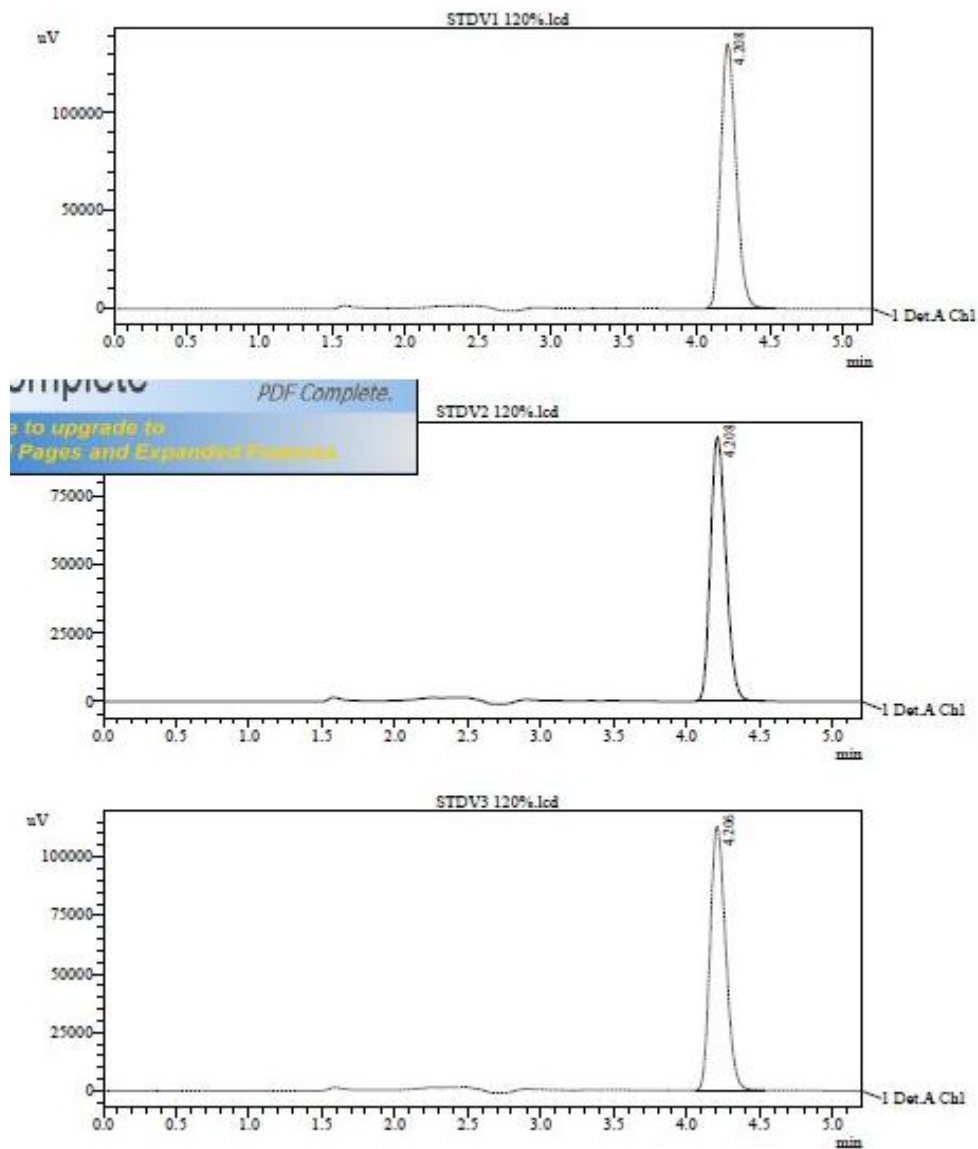
ANNEXE V : Chromatogrammes



ANNEXE V : Chromatogrammes



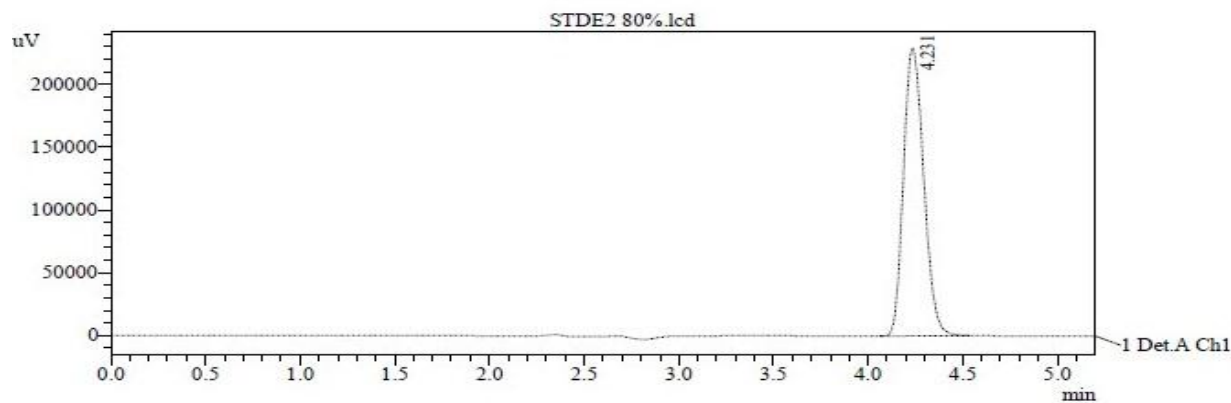
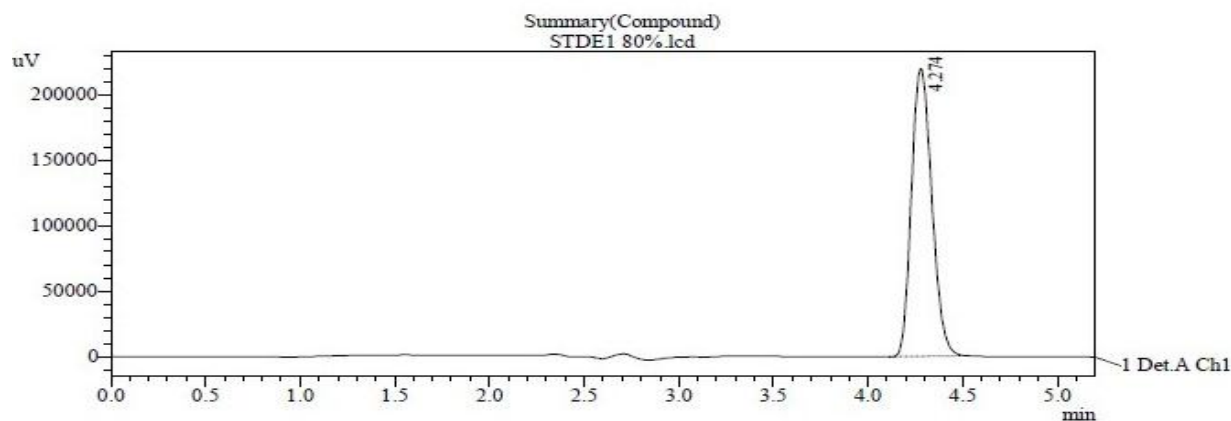
ANNEXE V : Chromatogrammes



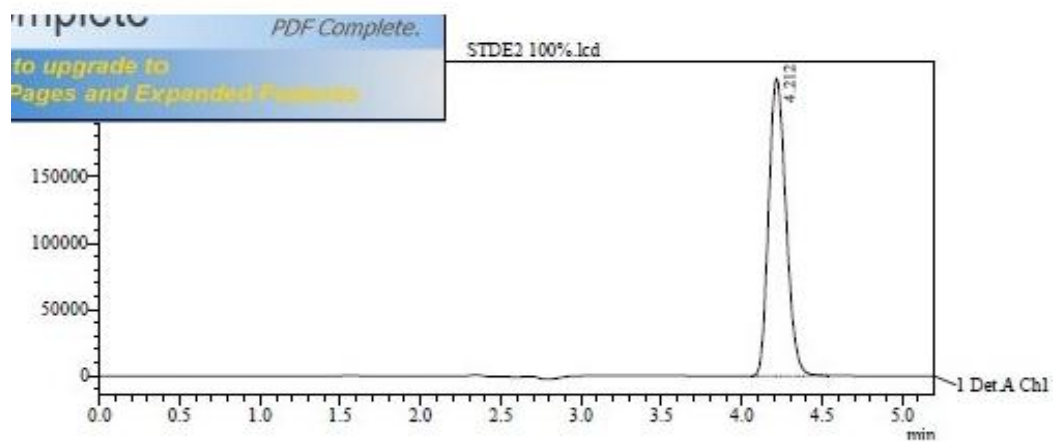
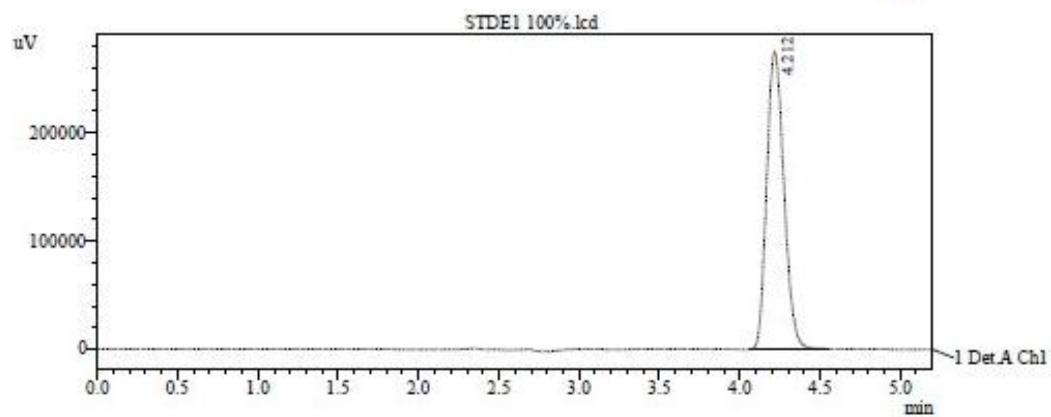
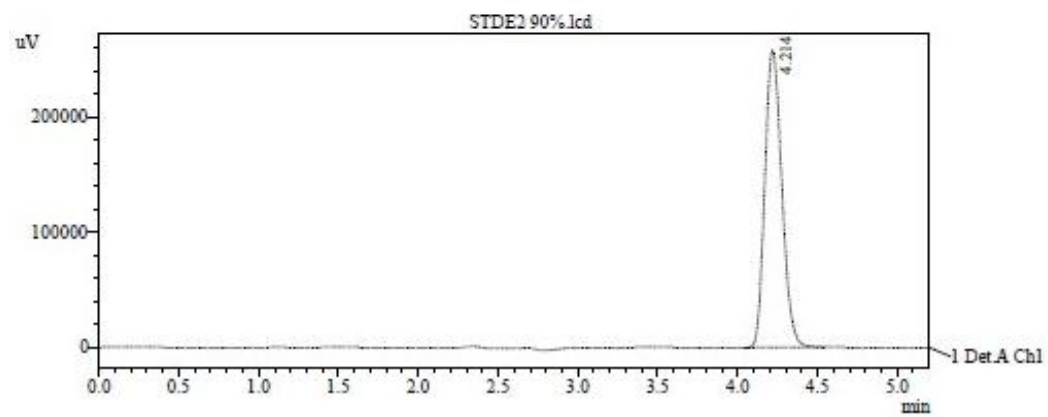
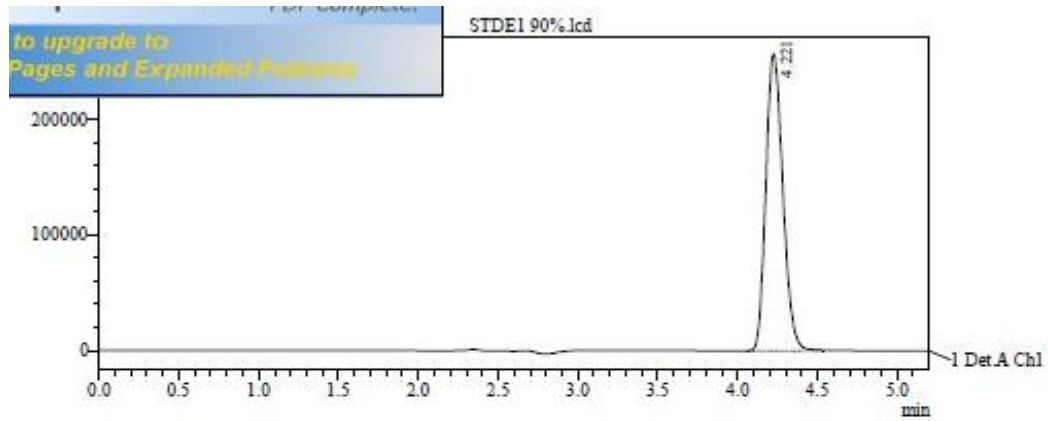
ANNEXE V : Chromatogrammes

- Serie 3

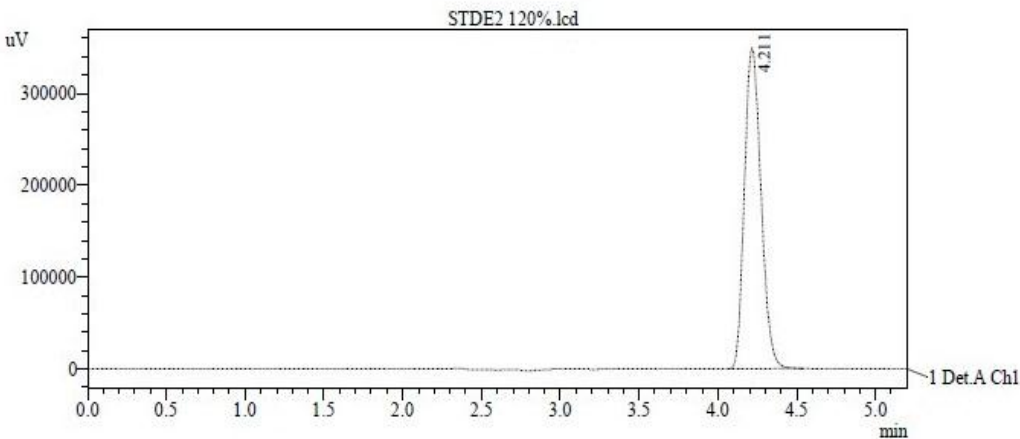
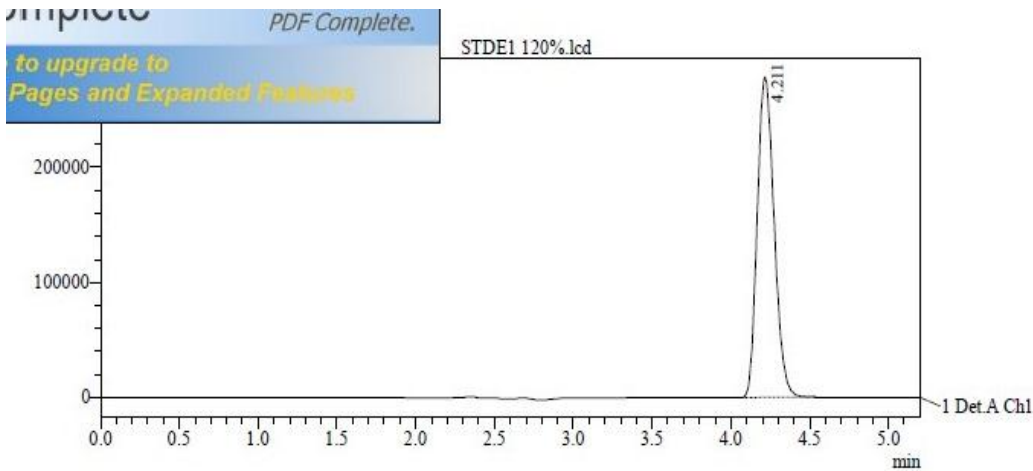
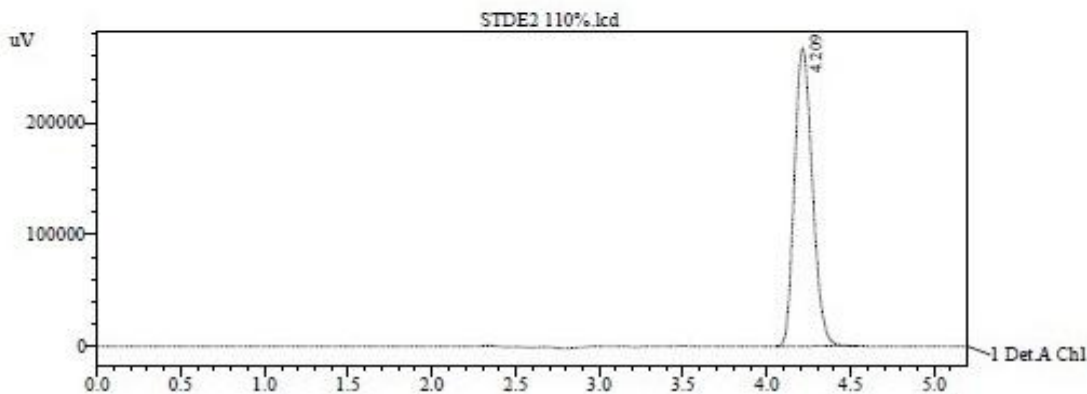
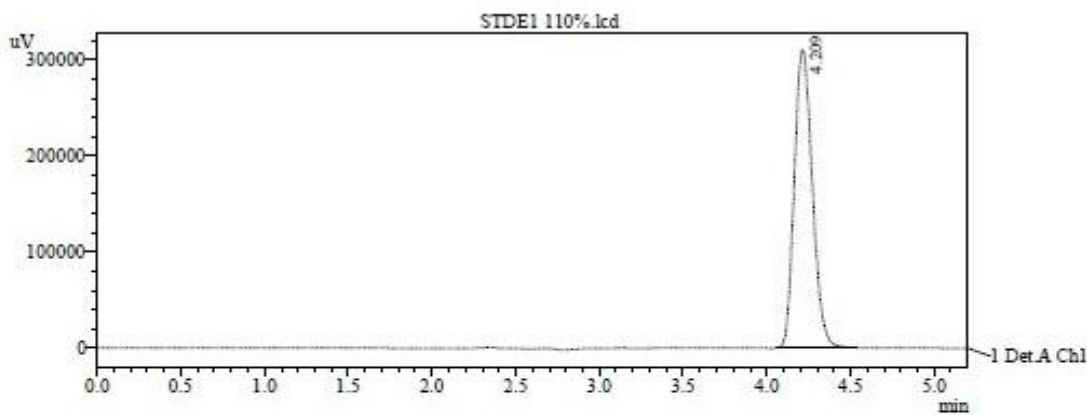
Acquired by : Admin
Sample Name : STDE1 80%
Sample ID : STDE1 80%
Tray# : 1L
Vial # : 31
Injection Volume : 20 uL
Data File Name : STDE1 80%.lcd
Method File Name : Piroxicam.lcm
Batch File Name : Piroxicam.lcb
Report File Name : Default.lcr
Data Acquired : 01/01/2006 02:33:34
Data Processed : 01/01/2006 02:38:50



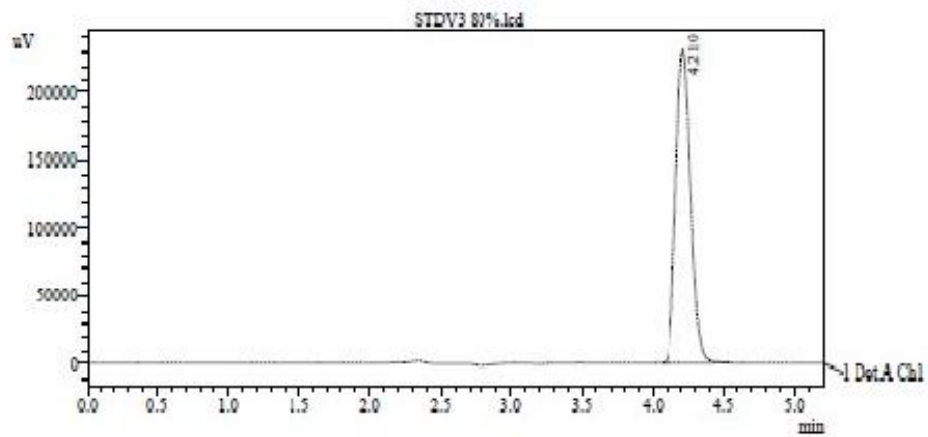
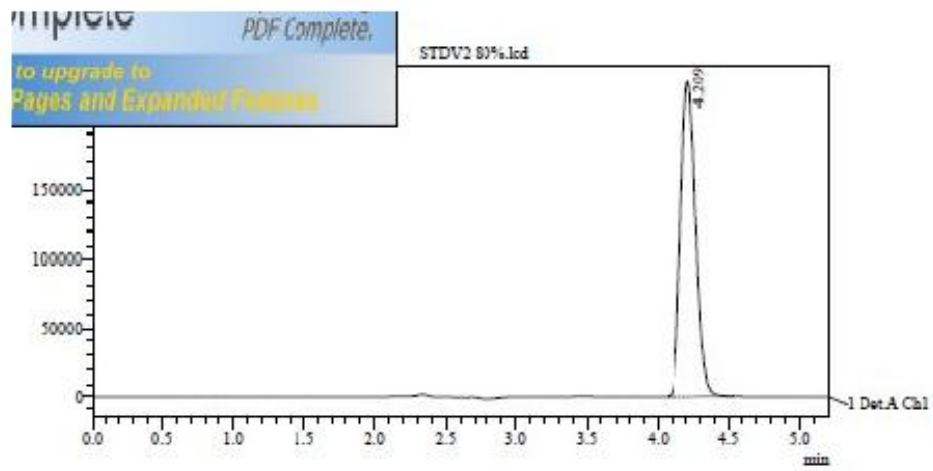
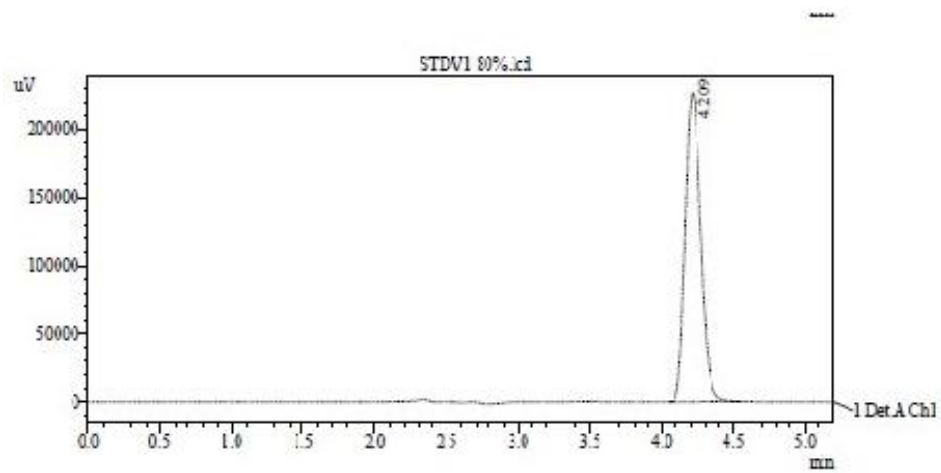
ANNEXE V : Chromatogrammes



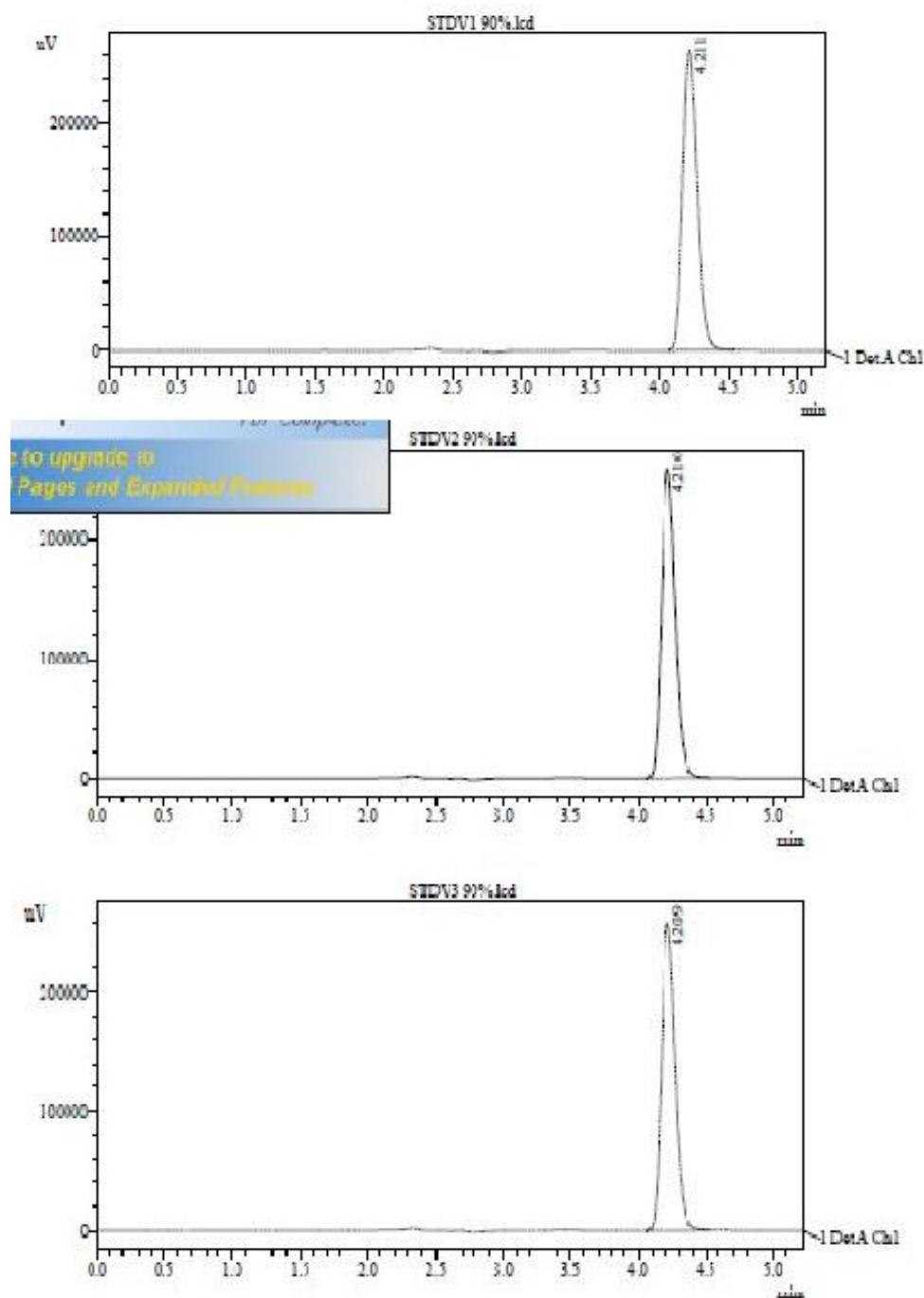
ANNEXE V : Chromatogrammes



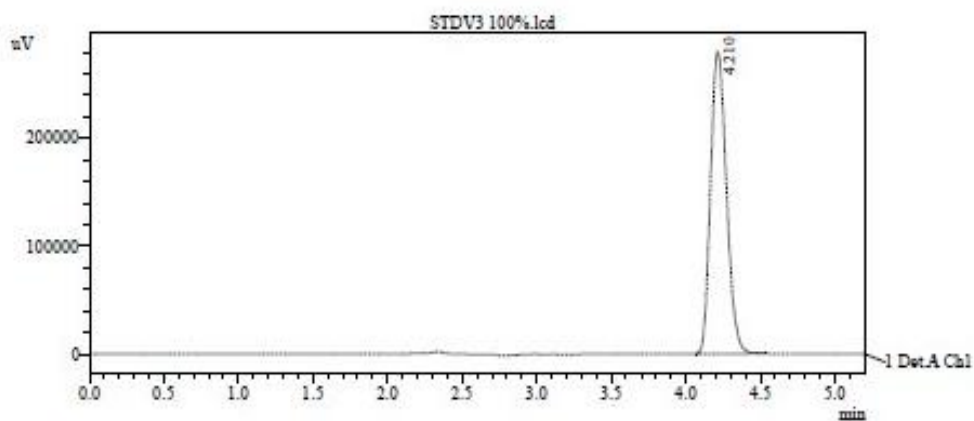
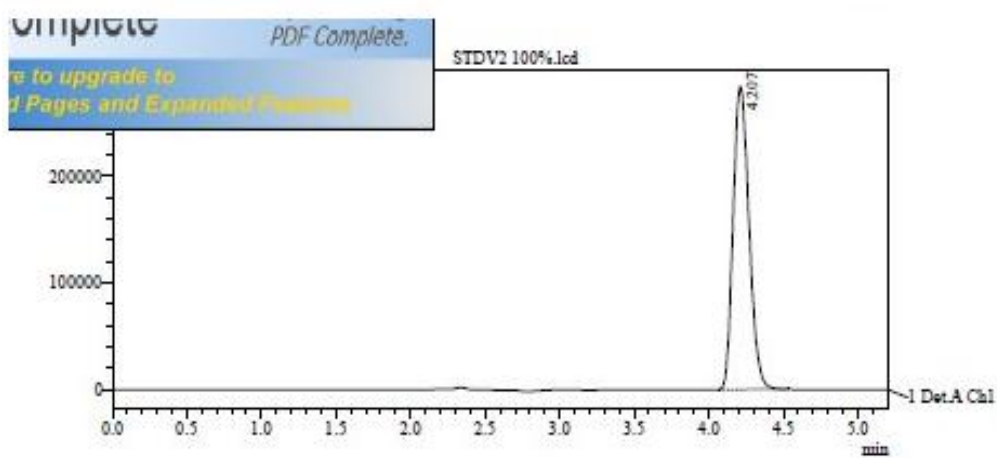
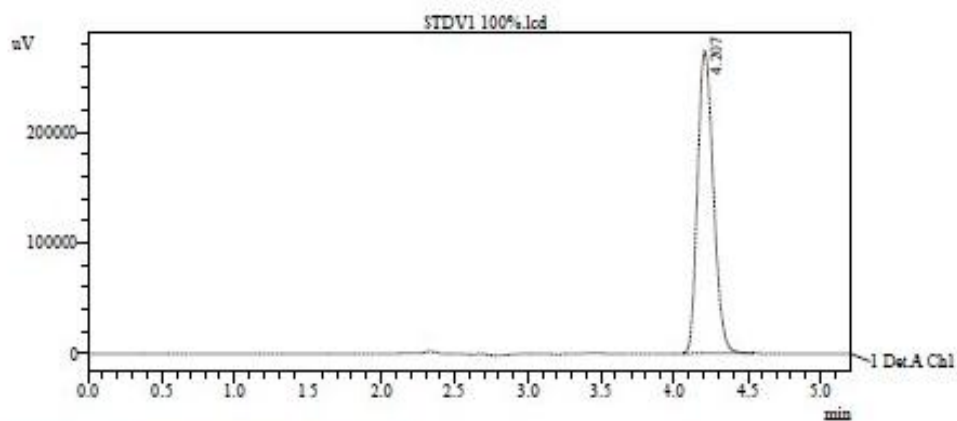
ANNEXE V : Chromatogrammes



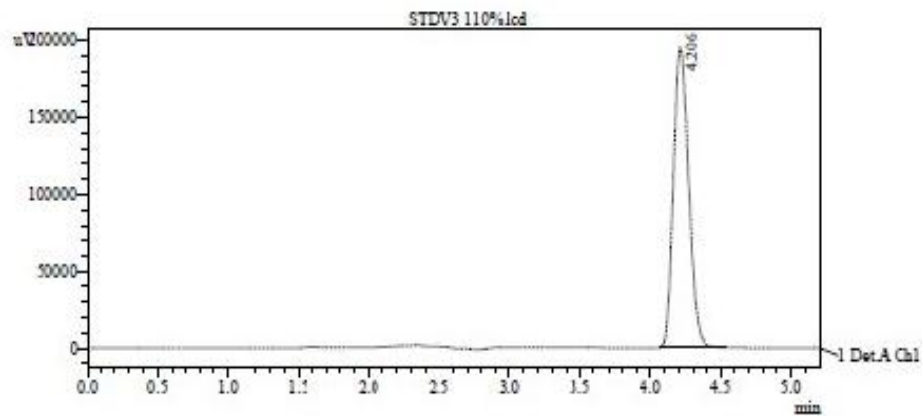
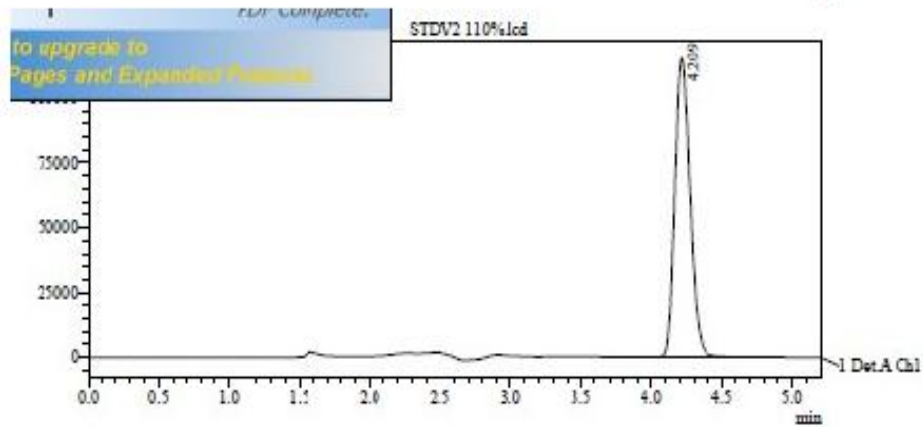
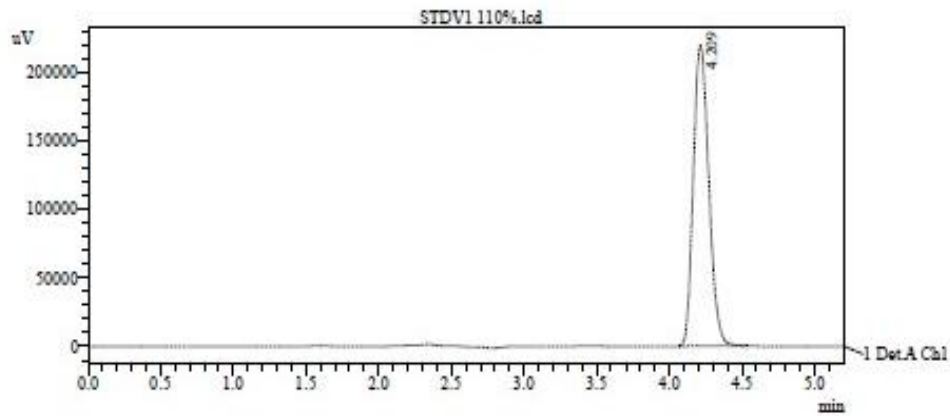
ANNEXE V : Chromatogrammes



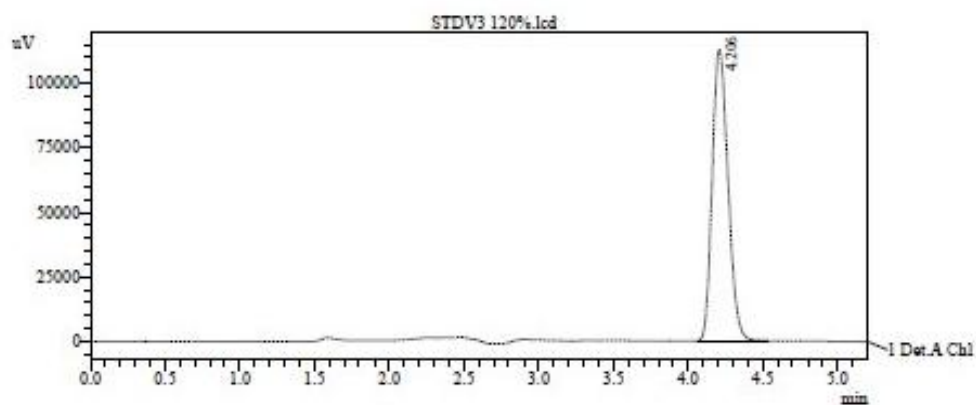
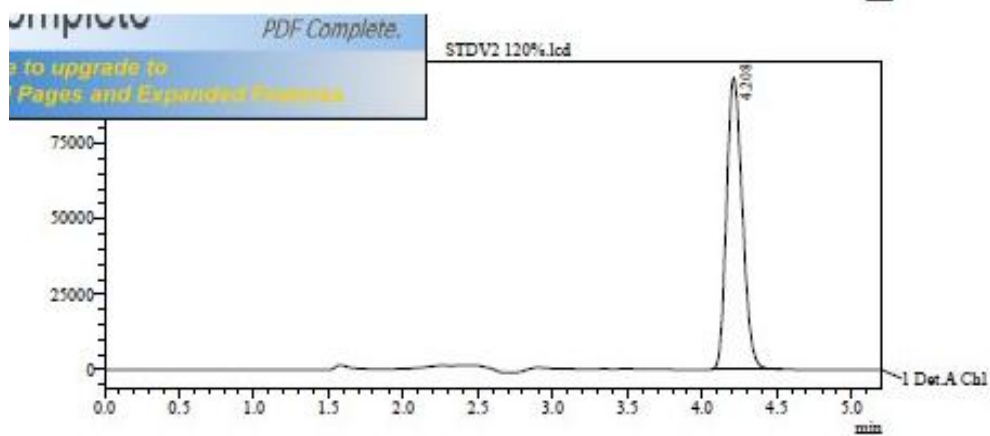
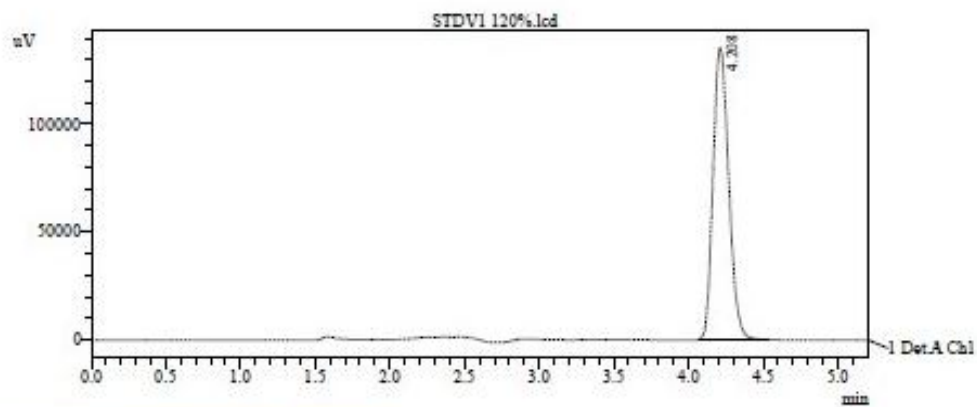
ANNEXE V : Chromatogrammes



ANNEXE V : Chromatogrammes



ANNEXE V : Chromatogrammes



Résumé

La validation des méthodes analytiques constitue l'étape clé du système d'assurance qualité. La fiabilité des résultats qui découlent de ces méthodes utilisées en routine est conditionnée par une validation préalable basée sur des protocoles expérimentaux et des tests statistiques bien définis corrélés à des critères d'acceptation pour atteindre les objectifs fixés.

En effet, il existe plusieurs guides, référentiels et textes réglementaires émanant de différents organismes qui régissent le domaine du médicament : guide de l'ICH, guide de la FDA et les rapports des commissions SFSTP.

Les lacunes existantes entre les différents documents portent confusion quant à la démarche de la validation adoptée. De ce fait, une étude comparative et critique a été réalisée entre les approches classiques et la nouvelle approche publiée par la SFSTP 2006. Ainsi, un exemple d'illustration a été réalisé sur le dosage quantitatif du Piroxicam par HPLC.

La validation de la méthode selon SFSTP92 a permis de conclure que celle-ci est spécifique, linéaire, exacte et fidèle. La méthode étant jugée valide car tous les critères de performances sont remplis.

La validation selon la nouvelle démarche SFSTP 2006, basée sur le profil d'exactitude qui prend en compte l'erreur totale constitue un outil de décision incontournable du fait de sa facilité d'interprétation et de son objectivité.

Mots clés : Comparaison, Validation, SFSTP, ICH, Piroxicam, HPLC.

Abstract

The validation of analytical methods is the key step of the quality assurance system. The reliability of the results obtained from these methods used routinely is conditioned by prior validation based on experimental protocols and well-defined statistical tests correlated with acceptance criteria to achieve the set objectives.

In fact, there are several guides, references and regulatory texts from different organizations that govern the field of drugs: ICH guide, FDA guide and SFSTP commission reports.

The gaps between the different documents lead to confusion as to the validation approach adopted. As a result, a comparative and critical study was conducted between the classical approaches and the new approach published by SFSTP 2006. Thus, an illustrative example was carried out on the quantitative assay of Piroxicam by HPLC.

The validation of the method according to SFSTP 92 allowed to conclude that the method is specific, linear, accurate and faithful. The method was considered valid as all performance criteria were met.

The validation according to the new SFSTP 2006 approach, based on the accuracy profile which takes into account the total error, is an essential decision-making tool due to its ease of interpretation and objectivity.

Keywords: Comparison, Validation, SFSTP, ICH, Piroxicam, HPLC.