



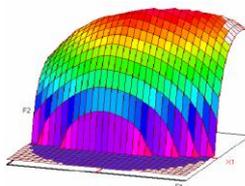
Université Sidi Mohammed Ben Abdellah

Faculté des Sciences et Techniques

www.fst-usmba.ac.ma



Année Universitaire : 2016-2017



Master Sciences et Techniques CAC Ageq

Chimométrie et Analyse Chimique : Application à la gestion de la qualité

MEMOIRE DE FIN D'ETUDES

Pour l'Obtention du Diplôme de Master Sciences et Techniques

**Développement et validation d'une nouvelle méthode
de dosage de paroxétine et ses impuretés par
chromatographie liquide à haute performance dans
une forme pharmaceutique**

Présenté par:

- BERKANI Oumaima

Encadré par:

- Dr. M. ELKARBANE (LNCM Rabat)
- Pr. B. IHSSANE (FSTF)

Soutenu Le 12 Juin 2017 devant le jury composé de:

- Pr. B. IHSSANE (FSTF)
- Pr. A. LHASSANI (FSTF)
- Pr. T. SAFFAJ (FSTF)
- Dr. M. ELKARBANE (LNCM Rabat)

**Stage effectué au Laboratoire National de Contrôle des Médicaments
(LNCM)**



Université Sidi Mohammed Ben Abdellah

Faculté des Sciences et Techniques

www.fst-usmba.ac.ma



Remerciements

C'est pour moi un réel plaisir de remercier toutes les personnes qui m'ont, de près ou de loin, d'une manière ou d'une autre, permis par leur collaboration, leur soutien et leur avis judicieux, de mener à bien ce travail.

Je tiens à remercier dans un premier temps, l'ensemble du corps enseignant du département de chimie, pour avoir porté un vif intérêt à ma formation, et pour avoir accordé la plus claire de leur temps, leur attention et leur énergie, dans un cadre très agréable de complicité et de respect.

Je tiens à remercier mes encadrants Pr. B. IHSSANE, Dr. M. ELKARBANE pour l'aide et les conseils concernant les missions évoquées dans ce rapport qu'ils m'ont apportés lors des différents suivis, et pour leurs orientations, leurs disponibilités tout au long de la période de stage et durant la rédaction du rapport.

Je tiens à remercier vivement Pr. EL. EL HADRAMI le responsable de Master Chimiométrie et Analyse Chimique.

Mes sincères remerciements s'adressent également aux Dr. Badia et Dr. K. KARROUCHI pour leurs conseils et leurs soutiens.

Mes remerciements particuliers s'adressent au Dr. Saadiya. Le chef de service physico-chimie.

Je tiens à remercier et à témoigner toute ma reconnaissance à l'ensemble de l'équipe du service physicochimie du LNCM pour leur convivialité, leur disponibilité ainsi que leur gentillesse, aussi pour avoir facilité mon intégration et pour la bonne ambiance qu'ils ont maintenue au sien du laboratoire.

Pr. T. SAFFAJ et Pr. A. LHASSANI. . C'est un grand honneur que vous me faites en jugeant mon travail, veuillez trouver l'expression de mon admiration, ma grande gratitude, ma profonde reconnaissance, et ma haute considération.

Enfin, je tiens à adresser mes vifs remerciements à mes collègues du Master Chimiométrie et Analyse Chimique.



Liste des Abréviations

CM : Carrée moyenne

CV : Coefficient de Variance

DDL : degré de liberté

DMP : Direction du Médicament et de la Pharmacie

DP : Division de la Pharmacie

EDQM : Direction Européenne de la qualité du Médicament

FPR : Forme Pharmaceutique Reconstituée

HPLC : Chromatographie Liquide à Haute Performance

ICH : International Conférence on Harmonisation

ISO : International Organisation for Standardisation

LNCM : Laboratoire National de Contrôle des Médicaments

LOD : Limite de détection

LOQ : Limite de Quantification

N : Nombre de plateaux Théoriques

F_s : Facteur de symétrie

PA : Principe Actif

PAS : Principe Actif Seul

SA : Substance Apparenté

USP: United State Pharmacopoeia

SCE : somme des Carres des Ecart

SPE : somme des Produits des Ecart

Tr : Temps de Rétention



Liste des Tableaux

Tableau 1 : Conditions chromatographique de la méthode de dosage du PA.....16

Tableau 2: Les pesées du PAs de paroxetine pour l'étude de la linéarité.....18

Tableau 3: Les pesées du PAS pour l'étude de la justesse.....19

Tableau 4: Les pesées de paroxetine pour la FPR niveau 100% pour l'étude de la fidélité...19

Tableau 5: Conditions chromatographique de la méthode de dosage du PA19

Tableau 6: Les données du PA pour l'étude de la conformité de système.....22

Tableau 7: Les données de paroxetine pour l'étude de la linéarité.....23

Tableau 8: Les données pour l'étude de la justesse de PAS24

Tableau 9: résultats de test de Fisher pour le dosage de PA24

Tableau 10: Les données pour l'étude de la justesse de PA.....25

Tableau 11: Les données de PA pour la vérification d'homogénéité des variances.....25

Tableau 12: Test de Cochran pour le calcul d'homogénéité des variances de PA.....25

Tableau 13: Les données de test de Fisher pour la validité des moyennes.....26

Tableau 14: Résultats du test de Fisher pour la validité des moyennes26

Tableau 15: L'intervalle de confiance pour l'étude de la justesse du PA.....26

Tableau 16: Les résultats bruts de l'étude de la fidélité pour le PA.....27

Tableau 17: Résultats du test de Cochran pour l'homogénéité des variances de PA27

Tableau 18: Les résultats du test de GRUBBS pour la vérification d'homogénéité des moyennes.....28

Tableau 19 : analyse de variance de l'étude de fidélité pour le PA.....28

Tableau 20 : Les résultats pour l'étude de fidélité pour le dosage de PA28

Tableau 21: Les données pour l'étude de la conformité de système des impuretés29

Tableau 22: Les données de dosage des impuretés pour l'étude de la linéarité.....30



Tableau 23: Les Résultats d'une régression linéaire.....	31
Tableau 24: les résultats de test de Fisher pour les impuretés	31
Tableau 25: Les données pour l'étude de la justesse des impuretés	31
Tableau 26: Les résultats pour l'étude de fidélité pour le dosage des impuretés.....	32
Tableau 27: Test de Cochran pour le calcul d'homogénéité des variances des impuretés.....	32
Tableau 28: Les données du test de Fisher pour la validité des moyennes.....	32
Tableau 29: Les Résultats du test de Fisher pour la validité des moyennes	33
Tableau 30 : L'intervalle de confiance pour l'étude de la justesse des impuretés	33
Tableau 31 : Les résultats bruts de l'étude de la fidélité pour les impuretés.....	33
Tableau 32: Les résultats de test de Cochran pour l'homogénéité des variances des impuretés.....	34
Tableau 33 : Les résultats de test de Grubbs pour la vérification d'homogénéité des moyennes.....	34
Tableau 34 : Analyse de variance de l'étude de linéarité pour le dosage des impuretés.....	34
Tableau 35 : les résultats de l'étude de fidélité pour le dosage des impuretés	34
Tableau 36 : Les résultats bruts de limite de quantification pour les impuretés	35



Liste des figures

Figure 1: Structure chimique de paroxetine.....5

Figure 2 : Appareillage de HPLC.....7

Figure 3: Superposition des chromatogrammes de PAS, FPR, Placebo et le blanc pour le dosage du PA.....22

Figure 4 : droite de linéarité pour le dosage de paroxetine24

Figure 5: Superposition des chromatogrammes de PAS, FPR, Placebo et le blanc pour le dosage des impuretés29

Figure 6 : droite de linéarité pour le dosage des impuretés.....30



Sommaire

Avant-propos

Introduction générale.....	1
Chapitre I : Etude bibliographique.....	2
I- Généralité sur les médicaments.....	3
1- Définition.....	3
2- Médicaments princeps.....	3
3- Médicaments génériques.....	3
4- Composition d'un médicament.....	3
a- Principe actif.....	3
b- Excipients.....	3
c- Additif.....	4
5- Quelques termes relatifs aux médicaments.....	4
a- Pharmacopée.....	4
b- Spécialité.....	4
c- Les impuretés.....	4
d- Les substances chimiques de références.....	4
e- Le lot.....	4
f- Produit fini.....	4
II- Généralité sur paroxetine.....	5
1- Propriétés chimiques.....	5
2- Solubilité.....	5
3- Effet thérapeutiques.....	5
4- Effet secondaires.....	5
III- Chromatographie liquide à haute performance HPLC.....	6
1- Définition.....	6
2- Principe.....	6
3- Les différents types de chromatographie liquide à haute performance	6
4- Appareillage.....	7
a- Réservoir de solvant (diluent).....	7
b- Pompe.....	7



c- Injecteur.....	8
d- Colonne.....	8
e- La phase stationnaire.....	8
f- La phase mobile.....	8
g- Détecteurs.....	8
h- Intégrateur.....	9
IV- Validation d'une méthode d'analyse.....	9
1- Définition.....	9
2- Objectif.....	9
3- Critère de validation d'une méthode de dosage selon la norme ICH.....	9
a- Sélectivité.....	9
b- Linéarité.....	9
c- Justesse.....	10
d- Fidélité.....	10
e- Robustesse.....	10
f- Limite de détection et de quantification.....	10
4- Démarche pour la validation d'une méthode de dosage selon la norme ICH.....	11
a- Sélectivité.....	11
i. Identification.....	11
ii. Dosage des impuretés.....	11
b- Linéarité.....	12
c- Ecart d'utilisation.....	12
d- Justesse.....	13
i. Impuretés (détermination quantitative).....	13
ii. Recommandations concernant les données.....	13
e- Fidélité.....	13
i. Répétabilité.....	13
ii. Précision intermédiaire.....	13
iii. Reproductibilité.....	14
iv. Recommandation concernant les données.....	14
Chapitre II : conditions expérimentale : matériels et méthode.....	15



I-	Méthode de dosage de PA dans une forme pharmaceutique par HPLC.....	15
1-	Appareillage.....	16
2-	Réactifs et solvants.....	16
3-	Conditions chromatographiques.....	16
4-	Optimisation de la méthode.....	17
5-	Préparations des solutions.....	18
a-	Préparations des solutions standards.....	18
b-	Préparations des solutions de a FPR.....	18
c-	Préparations des solutions de placebo.....	18
d-	Préparations des solutions pour l'étude de la sélectivité.....	18
e-	Préparations des solutions pour l'étude de la linéarité, justesse et fidélité.....	18
II-	Méthode de dosage des impuretés dans une forme pharmaceutique par HPLC.....	19
1-	Conditions chromatographiques.....	19
2-	Optimisation de la méthode.....	19
3-	Préparations des solutions.....	19
a-	Préparations des solutions standards.....	19
b-	Préparations des solutions de a FPR.....	20
c-	Préparations des solutions de placebo.....	20
d-	Préparations des solutions pour l'étude de la sélectivité.....	20
e-	Préparations des solutions pour l'étude de la linéarité, justesse et fidélité.....	20
f-	Préparations des solutions pour l'étude de la limite de détection et de quantification...20	
	Chapitre III : Résultats et Discussion.....	21
I-	Résultats de validation analytique pour le dosage du paroxetine par HPLC.....	22
1-	Sélectivité.....	22
2-	Conformité de système.....	22
3-	Linéarité.....	23
a-	Droite de linéarité.....	23
b-	Droite de régression.....	24
c-	Vérification de l'existence d'une pente significative.....	24
4-	Justesse.....	25



a- Vérification d'homogénéité des variances des niveaux.....	25
b- Test de validité des moyennes.....	26
c- Estimation de taux de recouvrement moyen de son intervalle de confiance.....	26
5- Fidélité.....	26
a- Répétabilité.....	27
b- Fidélité intermédiaire.....	27
i. Vérification de l'homogénéité des variances et des moyennes des niveaux.....	28
ii. Vérification de l'homogénéité des moyennes des niveaux test de Grubbs.....	28
iii. Analyse de variance	28
II- Résultats e validation analytique de dosage par HPLC des impuretés de paroxetine...28	
1- Sélectivité.....	28
2- Conformité de système.....	29
3- Linéarité.....	30
a- Droite de linéarité.....	30
b- Droite de régression.....	31
c- Vérification de l'existence d'une pente significative.....	31
4- Justesse.....	31
a- Vérification d'homogénéité des variances des niveaux.....	32
b- Test de validité des moyennes.....	32
c- Estimation de taux de recouvrement moyen de son intervalle de confiance.....	33
5- Fidélité.....	33
a- Vérification de l'homogénéité des variances et des moyennes des niveaux.....	33
b- Vérification de l'homogénéité des moyennes des niveaux test de Grubbs.....	34
c- Analyse de variance.....	34
6- Vérification de l'exactitude de la limite de quantification.....	35
Conclusion générale	36



Avant-Propos

Le laboratoire National de contrôle des Médicaments (LNCM) est une division de la Direction des Médicaments et de la Pharmacie (DMP) du ministre de la sante créée en 1669. Il est régi par le Décret 2/72/374 du 24 Avril 1974. Membre associé à la commission de la pharmacopée européenne, inscrit sur la liste des laboratoires officiels de l'organisme mondiale de la santé (OMS). Il est considéré comme le laboratoire de référence de la ligne arabe, membre du réseau des laboratoires officiels européennes de contrôle des médicaments (réseau OMCL).

Ses principales missions sont :

- Contrôle des médicaments (matière première et produit fini), des dispositifs médicaux, des articles de puériculture et de tout autre article destiné à l'usage de la médecine humaine.
- Evaluation de la documentation chimique, biologique et pharmaceutique.
- Contribution à l'enseignement médico-pharmaceutique et à la recherche scientifique.

Le LNCM est composé de quatre services:

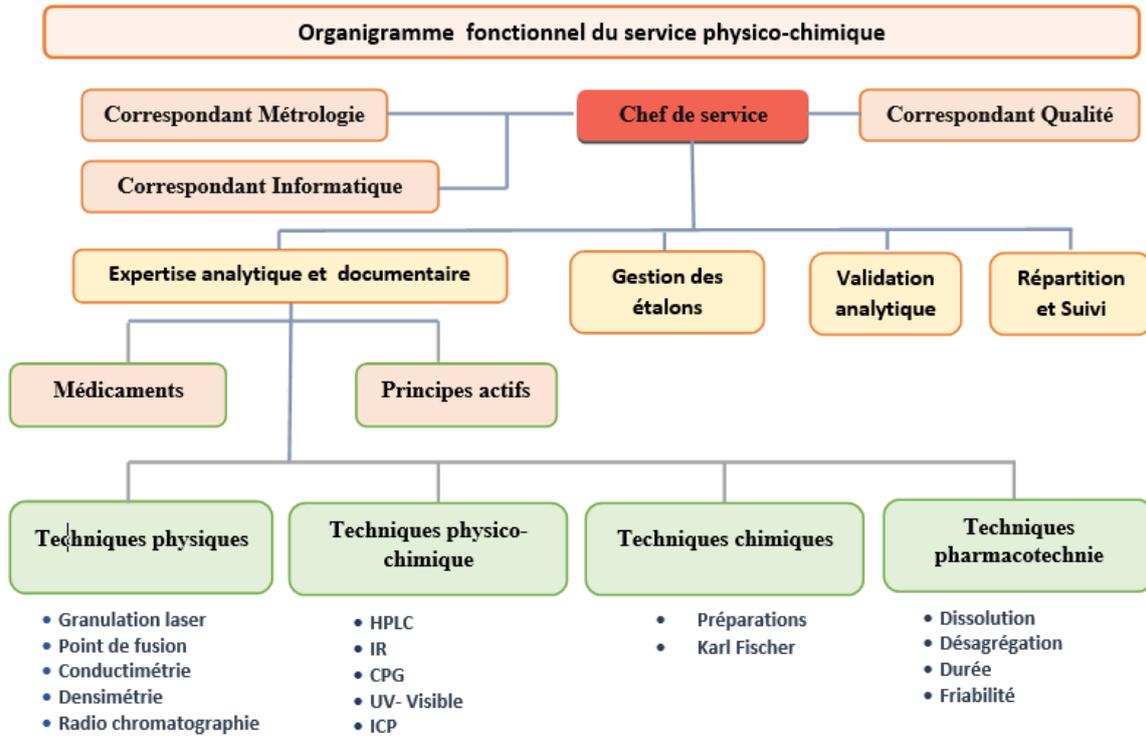
1. Service assurance qualité
2. Service des essais biologiques
3. Service de normalisation et de contrôle des dispositifs médicaux
4. **Service physico-chimie**

➤ Service physico-chimie :

L'objectif principal est de Contrôle analytique et documentaire des spécialités pharmaceutiques (matières premières, produits finis). Les activités de ce service sont :

- ✓ Exécution des essais physico-chimiques et des tests galéniques et le contrôle par rapport aux normes de qualité avec l'objectif de fournir une base scientifique à toute décision d'ordre technique, administratif ou juridique.
- ✓ Formulation des résultats des tests dans des procès-verbaux, analyse des anomalies constatées et formulation des recommandations concernant les suites à donner.

❖ *Organigramme du service physico-chimie*





Introduction générale

Le stage est un champ d'application des acquis théoriques qui permet d'acquérir des connaissances, des expériences pratiques et des compétences professionnelles mais aussi d'approfondir les connaissances dans les sciences et techniques. Ainsi, c'est une occasion de confronter et de se familiariser avec le domaine professionnel. Dans ce sens, j'ai eu l'occasion d'effectuer un stage pour une durée de 4 mois au sein du Laboratoire National de Contrôle des Médicaments (LNCM) à Rabat.

Dans ce cadre, le sujet traité concerne le développement et la validation d'une nouvelle méthode de dosage de paroxetine par chromatographie liquide à haute performance (HPLC) dans une forme pharmaceutique (comprimé).

Des médicaments à base de paroxetine est disponibles sous différentes formes pharmaceutiques. Actuellement, le dosage de cette molécule dans les produits finis se fait par des méthodes variées.

Développer une méthode de dosage de principe actif dans les différentes formes pharmaceutiques ne peut être que bénéfique pour les laboratoires de contrôle des médicaments ou pour les laboratoires de contrôle qualité dans l'industrie pharmaceutique. L'objectif d'une telle démarche est d'aider les laboratoires de contrôle des médicaments et les spécialistes en industrie pharmaceutique, de réduire le temps et le coût de l'analyse et par la suite de minimiser les rejets chimiques.

Le but de ce travail est de développer et valider une nouvelle méthode analytique simple rapide et économique permettant le dosage du paroxetine dans une forme pharmaceutique.

La validation de cette méthode proposée repose sur une analyse statistique basée sur la norme ICH en vérifiant un certain nombre de critères aboutissant à une méthode analytique permettant de donner des résultats fiable et de montrer qu'elle correspond à l'utilisation pour laquelle elle est proposée.

Notre travail est présenté sous forme de trois chapitres:

- Le premier chapitre est consacré à une étude bibliographique.
- Le deuxième chapitre est consacré aux conditions expérimentales : matériels et méthode
- Le troisième chapitre est consacré au traitement des résultats et discussions.



Université Sidi Mohammed Ben Abdellah

Faculté des Sciences et Techniques

www.fst-usmba.ac.ma



Chapitre I

Etude bibliographique



Introduction

Dans ce chapitre nous allons, tout d'abord, présenter des généralités sur les médicaments, et le principe actif puis la technique de dosage par chromatographie liquide à haute performance (HPLC) et enfin nous présentons la démarche suivie selon la norme ICH pour la validation de cette méthode de dosage.

I- Généralités sur les médicaments

1. Définition

Un médicament est toute substance ou composition présentée comme possédant des propriétés curatives ou préventives à l'égard des maladies humaines ou animales. Il est administré en vue d'établir un diagnostic médical ou de restaurer, de corriger ou de modifier leurs fonctions physiologiques en exerçant une action pharmacologique, immunologique ou métabolique [1]

Il existe deux types de médicaments tels que les génériques et les princeps.

2. Médicament princeps

Un médicament princeps ou médicament d'origine est un médicament mis au point par un laboratoire pharmaceutique qui en garde l'exclusivité jusqu'à expiration du brevet (environ 20 ans d'exploitation) [2].

3. Médicament générique

Un médicament générique est une copie d'un médicament original rendu possible par la chute du brevet initial dans le domaine public à la fin de la période légale de protection [3].

En effet, le médicament générique doit contenir la même quantité en principe actif et doit être de même forme pharmaceutique que le médicament original. Il ne peut pas avoir de nouvelles indications que la molécule princeps qu'il copie. De même, sa notice scientifique ne peut être transformée qu'après modification de la notice de la molécule princeps.

Un générique est donc conforme à la spécialité de référence, et présente les mêmes effets, même fabrication et même forme pharmaceutique. En revanche, le goût, la couleur, les excipients utilisés peuvent être différents [2].

4. Composition d'un médicament

Un médicament est un mélange de nombreuses espèces chimiques. Il contient un ou plusieurs principes actifs et des excipients [4].

a. Principe actif

Le principe actif est la substance responsable de l'action pharmacologique. Son dosage est établi en fonction de la puissance et l'âge du patient [5]

b. Excipients

Les excipients désignent toute substances autre que le principe actif dans un médicament, destinée à faciliter la mise en forme du médicament, lui conférer un goût particulier et diminuer certains effets indésirables (conservateurs, aromatisants...) [5]



c. Additifs

D'après le comité FAO-OMS, un additif est défini comme une substance dotée ou non d'une valeur nutritionnelle, ajoutée internationalement à un aliment dans un but technologique, sanitaire, organoleptique ou nutritionnel. Son emploi doit améliorer les qualités du produit fini sans présenter de danger pour la santé, aux doses utilisées [6]

5. Quelques termes relatifs aux médicaments

a. Pharmacopée

D'après l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS), une pharmacopée est une norme pharmaceutique destinée à assurer dans une entité politique donnée, l'uniformité de la nature, de la qualité, de la composition et de la concentration des médicaments.

Il existe plusieurs pharmacopées : Française, Britannique, américaine (USP), Japonaise, Chinoise et internationale. Chaque pharmacopée est constituée de plusieurs parties : Les monographies, les prescriptions générales, les réactifs et les méthodes générales d'analyses [7].

b. Spécialité

La réglementation précise que la spécialité pharmaceutique, est tout médicament préparé à l'avance, présenté sous un conditionnement particulier et caractérisé par une dénomination spéciale portant sa composition, le nom et l'adresse du fabricant [2].

c. Les impuretés

Les impuretés apparaissent pendant la synthèse du principe actif, elles peuvent comprendre les produits de dégradation, de synthèse, stéréochimique, des produits de réaction secondaires, etc. Elles devraient être identifiées, qualifiées et étudiées sur le plan toxicologique.

Les impuretés sont classées dans les catégories suivantes :

- Impuretés organiques (liées au procédé et au médicament) ;
- Impuretés inorganiques ;
- Solvants résiduels [8].

d. Les substances chimiques de référence (SCR):

La substance chimique de référence est définie comme un matériau prévu pour être utilisé dans des essais chimiques et physiques spécifiques, dans lesquels ces propriétés sont comparées aux propriétés des échantillons à examiner. Le degré de pureté d'une telle substance dépend du but de son utilisation. Ils sont classés en étalon primaire et secondaire [9].



4. Effets secondaires

Beaucoup de médicaments peuvent provoquer des effets secondaires. Un effet secondaire est une réponse indésirable à un médicament lorsqu'il est pris à des doses normales. Il peut être léger ou grave, temporaire ou permanent. Les effets secondaires énumérés ci-après ne sont pas ressentis par toutes les personnes qui prennent ce médicament.

Les effets secondaires de la paroxétine se manifestent généralement entre la première et la quatrième semaine qui suit la première prise, il s'agit de la période pendant laquelle le corps s'adapte au médicament.

Au moins 1 % des personnes prenant paroxétine ont signalé les effets secondaires ci-après. Un grand nombre de ces effets secondaires peuvent être pris en charge et quelques-uns peuvent disparaître d'eux-mêmes avec le temps [12]

III- Chromatographie liquide à haute performance (HPLC)

La chromatographie liquide à haute performance (HPLC) est devenue un outil analytique performant utilisé dans des domaines variés comme les laboratoires pharmaceutique, afin de vérifier la conformité des médicaments avant leur mise sur le marché. Comme cette méthode analytique occupe un pourcentage très important dans le contrôle qualité des médicaments, nous avons réalisé notre étude en utilisant une méthode chromatographique à haute performance.

1- Définition

L'HPLC est fondamentalement une forme très améliorée de la chromatographie sur colonne, le solvant au lieu d'être autorisé à goutte par goutte sur une colonne par gravité, il est forcé sous une pression qui facilite l'écoulement du solvant.

L'HPLC est une technique d'analyse quantitative, qualitative et séparative des molécules d'un composé ou d'un mélange de composés. Elle est principalement dans le domaine de la chimie analytique comme outil scientifique majeur mais aussi dans des domaines aussi variés que la chimie organique, la biochimie, l'industrie agroalimentaire et cosmétique, et sans oublier l'industrie pharmaceutique. [14]

2- Principe

Ce type de chromatographie repose sur la séparation des composés dans un liquide (appelé phase mobile) qui progresse dans un support (colonne) contenant un matériau de fine granulométrie appelé phase stationnaire. La séparation s'opère suivant les interactions chimiques ou physiques des analytes avec la phase mobile ainsi qu'avec la phase stationnaire.

Le débit d'écoulement de la phase mobile est élevé, ce qui entraîne une augmentation de la pression dans le système. Ce débit élevé diminue le temps nécessaire pour séparer les composants le long de la phase stationnaire. La fine granulométrie de la phase stationnaire permet par ailleurs, une meilleure séparation des composantes. En effet, pour un même volume de phase stationnaire, la surface d'échange augmente si « les grains » qui la composent sont de diamètre plus petit. Les pics obtenus sont plus étroits donc la résolution est améliorée (les pics sont bien séparés, on peut donc les différencier), le seuil de détection est

également plus bas (des pics étroits et hauts sont plus facile à isoler du bruit de fond que des pics larges et bas). La combinaison de ces attributs-rapidité et résolution élevée-conduit à l'appellation « haute performance ». [14]

3- Les différents types de chromatographie liquide à haute performance

Selon les interactions avec la phase stationnaire, on peut classer la chromatographie en phase liquide à des principaux types suivants :

- La chromatographie de partage (liquide/liquide) sur phase normale ou inverse ;
- La chromatographie d'adsorption (liquide/liquide) ;
- La chromatographie d'échange d'ions ;
- La chromatographie de paires d'ions ;
- La chromatographie chirale ;
- La chromatographie d'exclusion stérique ou perméation sur gel....

De nos jours, il existe un nombre très important de molécules qui se différencient par leurs structures, leurs réactivités, leurs comportements, leurs caractères, etc. par conséquent, on trouve différents types d'HPLC selon la molécule à analyser. Dans notre étude, nous avons travaillé avec la chromatographie (liquide/liquide) sur phase inverse. [14]

4- Appareillage

L'appareil HPLC comprend différents éléments : un réservoir à solvant contenant la phase mobile, un système de pompage permettant d'effectuer des éluions graduées, un injecteur, une colonne, un dégazeur, un détecteur et un système d'acquisition de données.

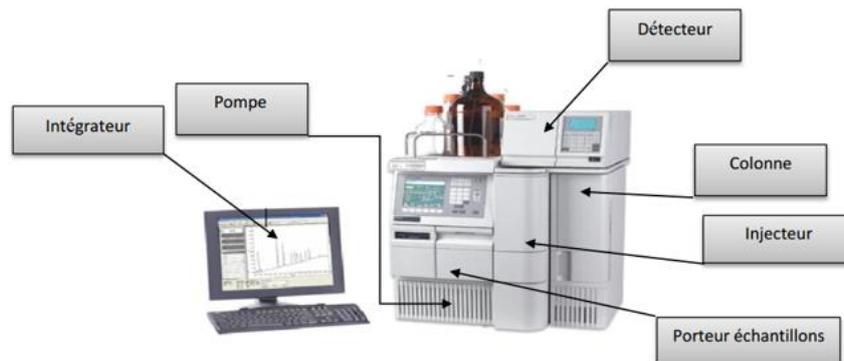


Figure 2: Appareillage de la HPLC

a- Réservoir de solvant (éluant)

Il contient la phase mobile en quantité suffisante. La phase mobile est un solvant où un mélange de solvants qui doit être de pureté analytique et filtré pour éliminer les particules solides qui risqueraient d'endommager la pompe ou de bloquer la colonne. Le filtre, en acier inoxydable d'une porosité de 2 μm , est placé à l'extrémité dans le réservoir à solvant.

Plusieurs flacons d'éluant (solvants de polarités différentes) sont disponibles pour pouvoir réaliser des gradients d'éluion (mélange de plusieurs solvants à des concentrations variables)



à l'aide de la pompe doseuse. L'emploi d'un vase clos permet d'éviter l'évaporation, surtout si l'un des solvants est très volatil et lorsqu'il est nécessaire d'être en présence d'un gaz inerte [16]

Elle existe deux modes de travail isocratique et gradient :

- Mode isocratique, c'est-à-dire la composition de la phase mobile doit rester constante tout au long de l'analyse.
- Mode gradient, c'est-à-dire les constituants du mélange de la phase mobile change avec le temps.

b- Pompe :

Elle délivre en continu la phase mobile. Elle est caractérisée par la pression qu'elle permet d'atteindre dans la colonne, le débit délivré et la stabilité du flux.

- Débit : 0,01 à 10 ml/min,
- Stabilité < 1%
- Pression maximum 5000 psi

c- Injecteur

Injecteur manuel : Le type d'injecteur le plus couramment utilisé comporte une vanne à boucle d'échantillonnage d'une capacité fixe (10, 20,50 μ l...). Cette boucle permet d'introduire l'échantillonnage sans modifier la pression dans la colonne [15].

Injecteur automatique : Il permet de fixer automatiquement le volume d'injection le volume d'injection voulu à l'aide d'un ordinateur et l'injection se fait automatiquement [15].

d- colonne

La colonne est la partie la plus importante du système, puisque c'est à cet endroit que se fait la séparation des composés. Les colonnes sont en acier inoxydable, de longueur variant de 15 à 30cm avec un diamètre interne de 2 à 20 mm. Ces colonnes sont remplies de la phase stationnaire, dont le diamètre des particules varie de 3 à 10 μ m. Des compagnies se spécialisent dans la vente de colonnes pour HPLC [17].

e- La phase stationnaire

- **La phase normale :**

La phase normale est constituée de gel de silice. Ce matériau est très polaire. Il faut donc utiliser un éluant apolaire. Ainsi lors de l'injection d'une solution, les produits polaires sont retenus dans la colonne, contrairement aux produits apolaires qui sortent en tête.

L'inconvénient d'une telle phase, c'est une détérioration rapide au cours du temps du gel de Silice, ce qui entraîne un manque de reproductibilité des séparations.

- **La phase inverse**

La phase inverse est majoritairement composée de silice greffée par des chaînes linéaires de 8 ou 18 atomes de carbones (C8 et C18). Cette phase est apolaire et nécessite donc un éluant polaire (MeCN, MeOH, H₂O). Dans ce cas, ce sont les composés polaires qui seront élués en



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

f- La phase mobile

L'interaction plus ou moins forte entre la phase mobile et la phase stationnaire normale où à polarité inversée se répercute sur les temps de rétention des solutés.

g- Détecteurs :

Les détecteurs ont pour but de fournir un signal électrique reflétant en continu les variations de composition de l'éluant à la sortie de colonne ce qui permet de détecter les différents composés existant dans l'éluant. Dès lors, le dispositif utilisé dépend de la nature de l'échantillon.

IL existe plusieurs détecteurs:

- Détecteur UV –Visible
- Détecteur à indice de réfraction
- Détecteur stéréochimique.
- Détecteur de radioactivité.

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

h- Intégrateur :

Après la détection du signal sous forme d'un pic, l'intégrateur permet d'intégrer l'aire sous ce pic. L'aire sous le pic est proportionnelle à la quantité du produit à doser. L'intégration du pic chromatographique, dépend de 2 paramètres :

La largeur attendue des pics et le seuil d'intégration (sensibilité) La largeur de pic est à peu près prévisible en fonctions de la technique d'analyse et des conditions opératoires.

Le seuil d'intégration est la valeur du signal à partir de laquelle le calculateur repère un début de pic [15].

IV- Validation d'une méthode d'analyse

1- Définition

Selon la norme ICH (the International Conférence on Harmonisation), la validation d'une méthode est définie comme étant l'ensemble des opérations nécessaires pour prouver que le protocole est suffisamment exacte et fiable pour avoir confiance dans les résultats fournis et ceci pour un usage déterminé [16].

2- Objectif

L'objectif de la validation d'une méthode analytique est de démontrer que chaque mesure réalisée ultérieurement en routine sera suffisamment proche de la valeur vraie ou dans les limites acceptables selon le besoin de l'analyse. Les critères de la validation sont fixes en fonction de la finalité de la procédure analytique [18].



3- Critères de la validation d'une méthode de dosage selon la norme ICH

Les critères de validation cités ci-dessous seront donc adaptés à ce type de démarche. Notons qu'il existe des logiciels qui permettent d'effectuer les tests statistiques de vérification de chacun de ces critères.

a- Sélectivité

Une méthode est dite sélective lorsqu'on a la garantie que le signal mesuré provient uniquement de la substance à analyser. La première partie de la validation est donc d'analyser ces différents composés de l'échantillon individuellement et de vérifier que l'on n'observe aucune interférence avec le signal du traceur [19].

b- Linéarité

Il s'agit de la capacité, à l'intérieur d'un certain intervalle, d'obtenir des résultats directement proportionnels à la concentration en traceur à examiner dans l'échantillon.

L'intervalle de concentrations à valider est couvert par une série de 5 concentrations au minimum régulièrement espacées contenant le 100%,

c- Justesse

Elle exprime l'étroitesse de l'accord entre la valeur qui est acceptée soit comme une valeur conventionnellement vraie, soit comme une valeur de référence acceptée, et la valeur trouvée (valeur moyenne) obtenue en appliquant la procédure d'analyse sur un certain nombre de fois [19].

d- Fidélité

La fidélité de la procédure exprime le degré de dispersion entre une série provenant de multiples prises d'un même échantillon homogène dans des conditions prescrites : les essais effectués sur des produits identiques dans des circonstances présumées identiques, ne conduisent généralement pas à des résultats identiques. Cela est dû à l'existence d'erreurs aléatoires, inhérentes à toute méthode d'essai.

Les facteurs contribuant à la variabilité d'une méthode analytique comprennent :

- L'opérateur ;
- L'équipement utilisé ;
- L'étalonnage de l'équipement ;
- L'environnement (température, humidité, pollution de l'air,...) ;
- Les réactifs

La fidélité fournit une explication sur les erreurs liées au hasard. Elle s'exprime par la mesure de la reproductibilité et de la répétabilité. Ces deux mesures extrêmes de la variabilité sont suffisantes pour convenir à la plupart des cas courants :



La répétabilité se rapporte à des essais de la même grandeur, réalisés dans des conditions aussi stables que possible, dans de courts intervalles de temps, dans un même laboratoire, par le même opérateur employant le même équipement.

La reproductibilité a trait à des essais réalisés dans des conditions variables, par différents opérateurs et équipements, et à des jours différents.

Le protocole de détermination de ces critères peut être exprimé sous la forme d'un plan expérimental [19].

e- Robustesse

L'étude de la robustesse permet de définir les variations admissibles de chacun des paramètres opératoires critiques qui sont sans effet sur la validité des résultats fournis, ces paramètres étant étudiés séparément les uns des autres, ou regroupés. Comme pour l'étude de la linéarité, les essais de détermination de la robustesse sont regroupés sous la forme d'un plan d'expérience.

f- Limites de détection et de quantification

La limite de détection (LOD) est la plus petite quantité de la substance ciblée qui peut être détectée, mais pas exactement quantifiée dans un échantillon.

La limite de quantification (LOQ) est la plus petite quantité de la substance ciblée dans un échantillon qui peut être déterminée dans des conditions expérimentales prescrites avec une exactitude bien définie.

4- Démarche pour la validation d'une méthode de dosage selon la norme ICH

a- Sélectivité

Il convient d'évaluer la sélectivité des tests d'identité, de dosage des impuretés. Le choix des moyens utilisés pour démontrer la sélectivité dépend de l'objectif de la méthode d'analyse.

i. Identification

Les tests d'identité acceptables doivent permettre de distinguer les uns des autres les composés de structure très proches susceptibles d'être présents dans un échantillon. Le pouvoir discriminant d'une méthode est confirmé lorsqu'on obtient avec la méthode en question des résultats positifs (peut-être par comparaison à un étalon de référence connu) pour les échantillons renfermant la substance analysée doublés à des résultats négatifs pour les échantillons n'en renfermant aucune. On peut en outre soumettre à l'épreuve d'identification des substances semblables ou très proches de la substance à analyser pour bien vérifier qu'ils ne donnent pas de réaction positive. Le choix des substances apparentées susceptibles d'influencer les résultats de l'analyse doit être fondé sur une appréciation scientifique éclairée dans laquelle on a tenu compte de l'influence que peuvent avoir les substances en question



ii. Dosages des impuretés

Pour démontrer la sélectivité des méthodes chromatographiques, il convient de présenter des chromatogrammes représentatifs où chacune des composantes est adéquatement identifiée. Des considérations semblables s'appliquent aux autres méthodes de séparation.

L'évaluation des séparations chromatographiques déterminantes doit être aussi poussée qu'il est nécessaire. On peut démontrer la spécificité de ces méthodes en les utilisant pour séparer deux des composantes dont les pics d'élution sont les plus proches l'un de l'autre.

- **Lorsque les impuretés sont disponibles**

S'il est possible d'obtenir des impuretés, on doit alors démontrer que la méthode de détermination de la teneur permet de faire la distinction entre la substance à analyser, les impuretés et (ou) les excipients; pour y faire, on enrichit la substance pure (substance médicamenteuse ou produit fini) en y ajoutant une quantité adéquate d'impuretés et (ou) d'excipients, puis on démontre que ces composantes additionnelles n'influencent pas sur les résultats obtenus pour la teneur (par comparaison aux résultats obtenus avec des échantillons non enrichis). Pour le test des impuretés, on peut mettre en évidence les propriétés de discrimination de la méthode en ajoutant à la substance médicamenteuse ou au produit fini une quantité adéquate d'impuretés pour ensuite démontrer que les différentes impuretés présentes sont séparées les unes des autres et (ou) des autres composantes dans la matrice de l'échantillon.

- **Lorsque les impuretés ne sont pas disponibles**

S'il est impossible d'obtenir des étalons d'impuretés ou de produits de dégradation, on peut démontrer la sélectivité de la méthode en comparant 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, par exemple, une méthode de la pharmacopée ou une autre méthode validée (méthode indépendante). S'il y a lieu, un certain nombre d'échantillons analysés par les deux méthodes doivent avoir été exposés à des conditions de stress : lumière, chaleur, humidité, hydrolyse acide-base et oxydation.

Une 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.

b- Linéarité

Il convient de déterminer s'il y a une linéarité dans l'ensemble de l'écart d'utilisation (voir la section c) de la méthode d'analyse. On peut démontrer l'existence d'une relation linéaire en appliquant la méthode proposée directement à la substance médicamenteuse (en diluant une solution-mère étalon) et (ou) en utilisant des portions pesées individuellement de mélanges synthétiques réunissant les composantes du produit fini. Cette dernière approche peut être évaluée dans le cadre de la détermination de l'écart d'utilisation.

On évalue la linéarité par l'examen visuel d'une courbe des valeurs du signal analytique tracées en fonction de la concentration de la substance à analyser. Si la relation est linéaire,



les résultats doivent être évalués au moyen des méthodes statistiques appropriées, comme, par exemple, la régression des moindres carrés. Dans certains cas, pour mettre en évidence la linéarité entre les résultats de teneur et les concentrations, il faut soumettre les données à une transformation mathématique avant de faire l'analyse de régression. Enfin, les paramètres de la courbe de régression peuvent donner une estimation mathématique du degré de linéarité.

Il faut déterminer le coefficient de corrélation, le point d'interception sur l'axe des ordonnées (y), la pente de la courbe de régression, ainsi que la somme des carrés des résidus. Un graphique représentant les données doit être inclus. De plus, l'analyse de l'écart entre les valeurs réelles et la courbe de régression peut aussi être utile.

Certaines analyses, comme les tests immunologiques, ne présentent aucune forme de linéarité, quelle que soit la transformation qu'on fait subir aux données. Lorsque c'est le cas, les résultats sont représentés par la fonction appropriée de la concentration (quantité) de la substance à analyser dans l'échantillon.

Il est recommandé d'utiliser au moins cinq concentrations pour la démonstration de la linéarité. Toute autre approche doit être justifiée.

c- Ecart d'utilisation

L'écart d'utilisation de la méthode est habituellement établi d'après la linéarité et dépend de l'usage auquel la méthode est destinée. On détermine l'écart d'utilisation en confirmant que la méthode permet d'atteindre un degré acceptable de linéarité, d'exactitude et de précision lorsqu'elle est appliquée à des échantillons renfermant des quantités de la substance à analyser comprises entre les extrêmes des limites ou aux limites d'utilisation spécifiées pour la méthode d'analyse.

Les valeurs minimums suivantes doivent être évaluées comme valeurs limites de l'écart d'utilisation :

Pour la teneur d'une substance médicamenteuse ou d'un produit fini (pharmaceutique) : normalement de 80 à 120 % de la concentration analysée;

- Pour le dosage d'une impureté : l'écart du niveau de sa teneur à 120 % de la limite établie;
- Pour les impuretés ayant une activité exceptionnelle, une action toxique ou des effets pharmacologiques imprévus, la limite de détection et de teneur doit correspondre au niveau où ces impuretés doivent être contrôlées.

N.B. : pour la validation des méthodes d'analyse des impuretés durant la mise au point, il peut être nécessaire d'évaluer un écart d'application aux alentours d'une valeur limite supposée (probable).

d- justesse

L'exactitude doit être vérifiée dans l'écart d'utilisation de la méthode d'analyse.



i. Impuretés (détermination quantitative)

Pour évaluer l'exactitude de la méthode, on doit utiliser des échantillons (de la substance médicamenteuse ou du produit fini) enrichis de quantités connues d'impuretés.

Lorsqu'il est impossible d'obtenir des échantillons de toutes les impuretés et (ou) de tous les produits de dégradation, il est acceptable de comparer les résultats obtenus avec ceux obtenus par une méthode indépendante, on peut aussi utiliser le facteur de réponse de la substance médicamenteuse.

Il faut décrire clairement comment les impuretés seront dosées, individuellement ou globalement, toujours par rapport à la substance principale.

ii. Recommandations concernant les données

Pour évaluer l'exactitude de la méthode à valider, il est recommandé d'utiliser au moins neuf résultats obtenus par l'analyse d'au moins trois concentrations englobant l'écart d'utilisation (c.-à-d. trois concentrations avec trois échantillons chacune).

Pour exprimer l'exactitude, il est recommandé de déclarer le pourcentage de récupération 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 véritable avec les intervalles de confiance correspondants.

e- Fidélité

i. Répétabilité

Pour évaluer la répétabilité, il faut :

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.

ii. Précision intermédiaire

Il peut être nécessaire de déterminer la précision intermédiaire de la méthode à valider, selon les conditions dans lesquelles elle sera utilisée. Le demandeur doit évaluer l'influence que peuvent avoir les phénomènes aléatoires sur la précision de la méthode. En général, il faut considérer différents jours, différents analystes, différents instruments, etc. Il n'est pas nécessaire d'évaluer individuellement chacun de ces facteurs. Il est recommandé de préparer un plan (matrice) d'expérimentation.

iii. Reproductibilité

On évalue la reproductibilité à l'aide d'une épreuve inter-laboratoire. On doit évaluer ce facteur lorsque la méthode à valider doit être normalisée, par exemple, pour figurer sur la liste des méthodes recommandées dans les pharmacopées. Les données de reproductibilité ne font pas partie de la demande d'approbation.



Université Sidi Mohammed Ben Abdellah

Faculté des Sciences et Techniques

www.fst-usmba.ac.ma



iv. Recommandations concernant les données

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 évalué.



Université Sidi Mohammed Ben Abdellah

Faculté des Sciences et Techniques

www.fst-usmba.ac.ma



Chapitre II

Conditions Expérimentales : Matériels et Méthode



Introduction

Dans la pratique courante, après l'étape d'optimisation, il devient de plus en plus évident et essentiel de démontrer à l'aide de la validation qu'une méthode optimisée correspond à l'usage attendu tout en fournissant, par ailleurs, des résultats fiables et reproductibles.

La validation d'une telle méthode d'analyse, est nécessaire à la prise de décision en rapport avec les résultats fournis et en considérant des limites d'acceptation prédéfinies, à l'usage futur de la méthode.

Dans ce volet, nous allons développer les différentes étapes à réaliser pour valider une méthode de dosage de paroxétine dans différentes formes pharmaceutiques par la technique de chromatographie liquide à haute performance (HPLC).

I- Méthode de dosage de PA dans une forme pharmaceutique par HPLC

1- Appareillage

- Le système chromatographique HPLC-RP utilisé est constitué d'une pompe Waters 2695, un échantillonneur automatique Waters 2695, un mélangeur dégazeur Waters 2695, un détecteur à barrette d'iode (PDA) Water 2998, un logiciel Gestionnaire de Spectre et un enregistreur de données Empower Software.
- Balance : MettlerTolido AG 204
- pH-mètre : Schott Prolab 3000
- Bain à ultra son : SonicaSoltec

2- Réactifs et solvants

- Standard de paroxétine (Etalon de travail d'une société pharmaceutique ayant une pureté de 99,9 % et la teneur en eau de 0,1%).
- Le Produit finis ou médicaments sous forme de comprimé (50 mg) et une masse moyenne de 360,3mg
- Placebo (un mélange des excipients qui ne contient pas le PA)
- HCl (sigma aldrich 37%)
- Triéthylamine (sigma aldrich > 99%)
- Acid acétique (sigma aldrich 99,8%)
- Méthanol (carlo Erba Reagent)

3- Conditions chromatographiques

Les conditions chromatographique utilisées pour le dosage de paroxétine sont résumées dans le tableau suivant :

Tableau 1 : Conditions chromatographique de la méthode de dosage du paroxétine

Colonne	waters symmetry C18 5µm 4,6*150nm
Débit	1mL/min
Volume d'injection	80µL
Détection	295nm
Température	25 °C



Diluent 1	MeOH/eau (50/50 v : v)
Diluent 2	HCl 0,1M

4- Optimisation de la méthode

L'objectif principal de cette étude est d'optimiser et valider une nouvelle méthode de dosage du PA et les impuretés de paroxetine par HPLC sous différents formes pharmaceutiques conformément aux recommandations internationales de la conférence harmonisée (ICH) [50]

Pour mettre au point le mode opératoire, nous avons effectué une recherche bibliographique sur le dosage du paroxetine [1-14], nous avons adopté les paramètres suivants :

- **Phase stationnaire**

Pour une bonne résolution et un gain en temps et de réactifs nous avons choisi une colonne symétrique, waters symmetry C18, 150nm de longueur et 4,6 mm de diamètre interne avec une granulométrie de 5 μ m.

- **Débit**

Plusieurs études ont été réalisées sur le débit de la méthode de 1 ml/min à 2 ml/min, pour réduire au maximum le temps de rétention (moins de rejet et plus d'économie) tout en gardant une bonne résolution, nous avons choisi un débit de 1ml/min.

- **Volume d'injection**

Pour une concentration de 0,05 mg/ml de Paroxetine, Le volume d'injection choisi est de 80 μ l et ce dans le but d'obtenir une bonne intégration des pics et avec moins d'erreurs.

- **Longueur d'onde**

Nous avons choisi 295 nm comme valeur de la longueur d'onde de la méthode qui peut être utilisée pour le dosage de paroxetine.

- **Température**

L'étude de la température de la colonne a été testée sur trois gammes de températures 20°C, 25°C et 30°C on a constaté qu'il n'a pas de différence entre ces trois températures. Pour rendre la méthode plus simple nous avons choisi 25°C (température ambiante).

- **Solvant de dilution**

Le paroxetine est assez soluble dans l'eau et méthanol, pour rendre la méthode plus simple et plus économique nous avons adopté eau et méthanol comme solvant de dilution (50% méthanol, 50% eau distillé).

- **Phase mobile**

Dissolvez 3,85 g d'acétate d'ammonium dans 600 ml d'eau, ajustez à pH 5,5 avec de l'acide acétique anhydre, ajoutez 400 ml d'acétonitrile en agitant, et ajoutez lentement 10 ml de triéthyleamine puis ajustez à pH= 5,5 avec de l'acide acétique anhydre.



5- Préparation des solutions

a- Préparation des solutions standards

Une masse de principes Actifs Seule est mise dans une fiole jaugée de 50 ml, 20 ml environ de diluent1 (50% méthanol, 50% eau distillé) est ajoutée puis le mélange est passé à ultrason pendant 10 min jusqu'à ce que toute la substance soit dissoute (éviter une augmentation de la température) puis on complète au volume avec le diluent 1. Diluer 5ml de cette solution à 50ml avec solvant de dilution HCl 0,1M. Enfin toute les solutions sont filtrée sur un filtre en polypropylène de cellulose de porosité 0,45 μm .

b- Préparation des solutions de la Forme Pharmaceutique Reconstituée

C'est la même préparation du PA.

c- Préparation des solutions de placebo

C'est la même préparation que la précédente.

d- Préparation des solutions pour l'étude de la sélectivité

- Solution de dilution 1 : 50% méthanol, 50% eau distillé
- Solution de dilution 2 : HCl 0,1M.
- Solution de placebo: masse pesée environ 180 mg.
- Solution de PAS: masse pesée exactement 27,5 mg de paroxetine.
- Solution de FPR : masse pesée exactement 25,7 mg de paroxetine et 180 mg de placebo.

e- Préparation des solutions pour l'étude de la linéarité, justesse et la fidélité

Selon l'ICH l'étude de la linéarité est faite pour 3 séries sur cinq niveaux (50%,75%, 100%,125%,150%), et l'étude de justesse est faite pour 3 séries de forme pharmaceutique reconstituée FPR sur trois niveaux (50%, 100%,150%).

L'étude de la fidélité est faite 6 fois sur un seul niveau (100%) avec un effet de jour et d'opérateur pour 3 séries de forme pharmaceutique reconstituée.

La préparation des échantillons pour l'étude de la linéarité, exactitude et la fidélité se fait selon le mode opératoire indiqué ci-dessus.

Les pesées de paroxetine pour chaque niveau de concentration pour les trois séries sont regroupées dans le tableau 3 et 4, la quantité du placebo ajoutée est constante pour chaque niveau de la forme pharmaceutique reconstitué, il est de 180 mg.

Tableau 2 : Les pesées de paroxetine pour l'étude de la linéarité.

Séries	Série 1	Série 2	Série 3
Niveaux	PAS en mg	PAS en mg	PAS en mg
50%	13,71	13,69	13,72
75%	20,66	20,68	20,67
100%	27,56	27,54	27,52
125%	34,38	34,42	34,4



150%	41,29	41,3	41,31
------	-------	------	-------

Tableau 3 : Les pesées de paroxétine pour l'étude de la justesse.

Séries	Série 1	Série 2	Série 3
Niveaux	FPR en mg	FPR en mg	FPR en mg
50%	13,14	13,06	13,21
75%	27,26	27,13	27,23
100%	40,08	40,38	40,2

Tableau 4 : Les pesées de paroxétine pour la FPR niveau 100% pour l'étude de la fidélité.

Séries	Série 1 OP1 J1	Série 2 OP2 J1	Série 3 OP1 J2
Nombre de fois	FPR en mg	FPR en mg	FPR en mg
1	27,79	27,67	25,72
2	27,63	27,59	25,6
3	27,51	27,89	26,61
4	27,34	27,67	26,83
5	27,64	27,35	26,86
6	27,38	25,08	26,65

II- Méthode de dosage des impuretés par HPLC

1- Conditions chromatographiques

Les conditions chromatographique utilisées pour le dosage des impuretés de paroxétine sont résumées dans le tableau suivant :

Tableau 5 : Conditions chromatographique de la méthode de dosage des impuretés de paroxétine

Colonne	waters symmetry C18 5µm 4,6*150nm
Débit	0,7 mL/min
Volume d'injection	80µL
Détection	295nm
Température	25 °C
Solvant	MeOH/eau (50/50 v : v)

2- Optimisation de la méthode

Pour optimiser et valider une nouvelle méthode de dosage des impuretés de paroxétine par HPLC, nous avons effectué une recherche bibliographique qui nous a permis d'adopter les paramètres chromatographiques indiqués ci-dessus qui sont les même conditions du dosage de PA sauf que le débit est changé pour réduire au maximum le temps de rétention tout en gardant une bonne résolution, donc nous avons choisi un débit de 0,7 ml/min.



3- Préparation des solutions

a- Préparation des solutions standards

Une masse de PAS est mise dans une fiole jaugée de 50 ml, 25 ml environ de solvant est ajoutée puis le mélange est passé à ultrason pendant 10 min jusqu'à ce que toute la substance soit dissoute (éviter une augmentation de la température) puis on complète au volume avec le solvant de dilution. Diluer 1 ml de cette solution à 100 ml avec solvant de dilution.

Une deuxième dilution est effectuée pour atteindre les concentrations suivantes :

(0,1%, 0,15%, 0,2%, 0,5%, 1%).

b- Préparation des solutions de FPR

C'est la même préparation des standards

c- Préparation des solutions de placebo

C'est la même préparation que la précédente

d- Préparation des solutions pour l'étude de la sélectivité

- Solution blanc: 50% eau distillée / 50% MeOH.
- Solution de placebo: masse pesée environ 180 mg
- Solution de principe actif seul : masse pesée exactement 50 mg de paroxetine pour une concentration de 0,2%.
- Solution de FPR : masse pesée exactement 50 mg de paroxetine, et 180 mg de placebo pour une concentration de 0,2%.

La préparation des solutions pour l'étude de la sélectivité se fait sur une seule concentration 0,2% selon le mode opératoire indiqué ci-dessus.

e- Préparation des solutions pour l'étude de la linéarité, justesse et la fidélité

Selon l'ICH l'étude de la linéarité est faite pour 3 séries sur cinq niveaux (0,1%, 0,15%, 0,2%, 0,5%, 1%), et l'étude de la justesse est faite pour 3 séries de forme pharmaceutique reconstituée sur trois niveaux (0,1%, 0,5%, 1%)

L'étude de la fidélité est faite 6 fois sur un seul niveau (0,2%) pour étudier l'effet de jour et d'opérateur pour 3 séries de forme pharmaceutique reconstituée.

La préparation des échantillons pour l'étude de la linéarité, exactitude et la fidélité se fait selon le mode opératoire indiqué ci-dessus.

f- Préparation des solutions pour l'étude de la limite de détection et de quantification

La validation de la limite de quantification est réalisée en exploitant les résultats de l'étude de la linéarité. En effet l'étude de l'exactitude et de la fidélité à la LOQ est réalisée sur la solution qui a une concentration de 0,2 µg/ml (0,2%) sachant que la concentration d'essai étant de 1 mg/ml.



Université Sidi Mohammed Ben Abdellah

Faculté des Sciences et Techniques

www.fst-usmba.ac.ma



Chapitre III

Résultats et discussions

I- Résultats de validation analytique de dosage du paroxétine par HPLC

1- Sélectivité

L'étude de la sélectivité est essentielle pour la validation analytique. Il est nécessaire de démontrer que la réponse enregistrée correspond bien à celle du principe actif.

La spécificité de la méthode a été vérifiée en comparant des chromatogrammes types du blanc, du placebo, du PAS et de la FPR.

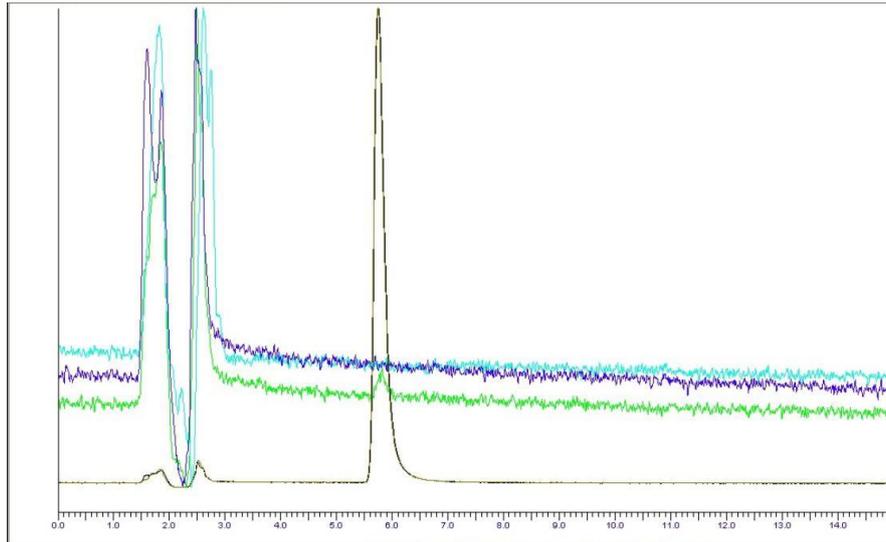


Figure 3 : Superposition des chromatogrammes de PAS, FPR, placebo et le blanc

D'après la figure 3 on remarque qu'il n'y a pas d'interférence au temps de rétention du pic de PA avec les autres solutions. Donc on peut conclure que cette méthode choisie est sélective pour le dosage de PA.

2- Conformité du système

Les performances du système chromatographiques sont évaluées par l'écart type relatif maximum pour une série de 5 injections de la solution témoin de paroxétine.

Il faut avoir un nombre de plateaux théoriques qui doit être supérieure à 3000 et le facteur de symétrie inférieure à 2.

Tableau 6 : les données du PAS pour l'étude de la conformité de système

essai	tr	Aire	N	Fs
1	6,175	3133711,39	4150	1,9
2	5,771	3104199,49	4097	1,84
3	5,771	3095873,74	4068	1,8
4	5,786	3121315,02	4099	1,75
5	5,845	3118653,01	4167	1,74
Moyenne	5,87	3114750,53		
ET	0,17	14878,62		
CV%	2,95	0,48		



D'après le tableau le coefficient de variation (CV) de cinq injections de paroxétine est inférieur à la norme fixée par la pharmacopée européenne (1,5%). Les nombres de plateaux théoriques est largement supérieur à 3000 et les facteurs d'asymétrie sont respectivement inférieur à 2%. Donc, la réponse du système est satisfaisante.

3- Linéarité

La linéarité de la méthode permet de démontrer sa capacité d'obtenir des résultats directement proportionnels aux concentrations de Paroxétine à l'intérieur de l'intervalle de mesure choisi (50%, 75%, 100% ; 125%, 150%).

Préparer 5 solutions de façons à constituer une gamme de 5 concentrations réparties uniformément sur la zone de linéarité à valider.

Les 5 concentrations sont comprises entre 50% et 150% de la concentration nominale. Pour chaque essai déterminer la réponse Y (aire du pic).

a- Droite de linéarité

La méthode statistique de régression des moindres carrés permet d'établir la droite d'étalonnage et de calculer les incertitudes associées à son usage ultérieur.

Selon l'ICH la linéarité a été étudiée sur 5 concentrations (50%- 75%- 100%- 125%- 150%) selon les données suivantes :

Tableau 7 : Les données de paroxétine pour l'étude de la linéarité

Niveau %	X _{ij}	Y _{ij}
50	0,001	75282
	0,001	80823
	0,001	82294
75	0,0015	114503
	0,0015	125912
	0,0015	133221
100	0,002	150238
	0,002	150702
	0,002	150313
125	0,005	412078
	0,005	398081
	0,005	384175
150	0,01	738095
	0,01	758459
	0,01	765905
Moyenne	0,0039	301338,73

La droite de linéarité pour le dosage de paroxetine est suivante :

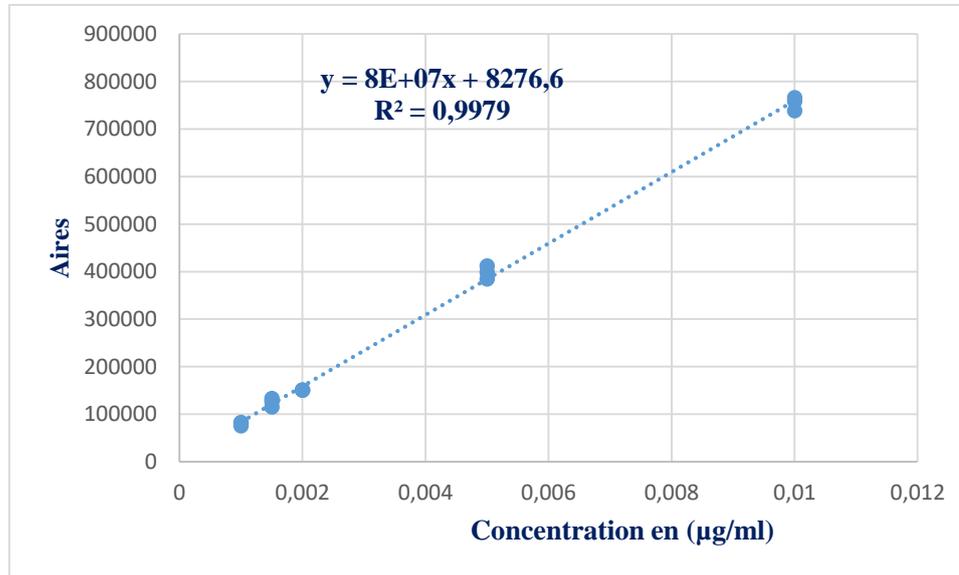


Figure 4 : droite de linéarité pour le dosage de paroxetine

b- Droite de régression

$$\text{Aire} = 8 \cdot 10^7 \text{ Conc} + 8276,6$$

La pente (a) de l'ordonné à l'origine (b), des variances associées (S^2a , S^2b) et R^2 sont regroupés dans le tableau suivant :

Tableau 8 : Les résultats d'une régression linéaire

Pente a	S^2a	Ordonné à l'origine b	S^2b	$R^2\%$
75144146,5	$5,22 \cdot 10^{15}$	8276,56	$1,38 \cdot 10^{11}$	99,8

c- Vérification de l'existence d'une pente significative

Ce test consiste à vérifier l'existence d'une pente (régression acceptable) c'est-à-dire de s'assurer que la pente provient bien de la régression et non pas des erreurs résiduelles.

Les résultats des tests de ficher pour la vérification de l'existence d'une pente significative sont présentes dans le tableau suivant :

Tableau 9 : Résultat du test de ficher pour le dosage de PA

	SCE	DDL	Variances	Fcal	P-value
Résiduelle	1983682990	13	152590999,2	6239,06	8,01E-19
régression	$9,52024E+11$	1	$9,52024E+11$		
totale	$9,54008E+11$	14			



Selon le test de Fischer, puisque P-value < 1%, donc nous pouvons conclure l'existence d'une pente hautement significative pour le PA.

Donc l'étude de la linéarité montre que la méthode de dosage est linéaire pour des concentrations comprises entre 50% et 150% de la valeur théorique.

4- Justesse

Pour chaque solution, les limites de réponses actives calculées à partir de la droite de régression ou celles trouvées à partir des essais des solutions (50%- 100%- 150%) doivent donner des pourcentages entre 98% et 102%.

Selon l'ICH la justesse a été étudiée sur 3 concentrations couvrant le 100% (50%- 100%- 150%) selon les données suivantes :

Tableau 10: les données pour l'étude de la justesse de PA

Niveau %	Aire Essai	Aire STD	Quantité introduite	Quantité Retrouvée	R %	Norme %
50	1497283,08	1546020,8	0,0263	0,0265	100,75	98% - 102%
	1504841,57	1553671,6	0,0261	0,0265	101,38	
	1479339,57	1539002,5	0,0264	0,0263	99,47	
100	2909599,84	2934166,6	0,0545	0,0547	100,25	
	2850111,17	2902750,8	0,0543	0,0541	99,74	
	2846797,37	2878330,5	0,0545	0,0545	100,10	
150	3963529,20	4165184,9	0,0802	0,0786	98,06	
	3994089,60	4054158	0,0808	0,0814	100,76	
	3831242,93	3969323,5	0,0804	0,0797	99,16	

- 98% - 102% c'est l'intervalle fixé par la pharmacopée européenne.

a- Vérification de l'homogénéité des variances des niveaux

Avant d'effectuer les calculs de l'exactitude, il convient de vérifier l'homogénéité des variances entre les différents niveaux selon le test de Cochran.

Tableau 11: les données de PA pour la vérification d'homogénéité des variances

Niveau%	Rij%	\bar{R}_i	s_i^2
50	100,75	100,535	0,948
	101,38		
	99,47		
100	100,25	100,033	0,069
	99,74		
	100,10		
150	98,06	99,327	1,853
	100,76		
	99,16		

Tableau 12: Test de Cochran pour le calcul d'homogénéité des variances de paroxetine

TEST DE COCHRAN			
s^2_{\max}	$\sum_{i=1}^p s_i^2$	C_0 calculé	$C (5\%;3;3)$
1,853	2,871	0,646	0,871

C calculé < $C (5\%)$ donc l'ensemble des variances des différents niveaux peut être considéré comme homogène.

b- Test de validité des moyennes

Ce test consiste à comparer les moyennes des 3 niveaux

Tableau 13: Les données du test de Fisher pour la validité des moyennes

Niveau %	$R_{ij}\%$	\bar{R}_i	$(R_{ij}\% - \bar{R})^2$	$(R_{ij} - \bar{R}_i)^2$
50	100,754	100,535	0,622	0,048
	101,381		2,005	0,716
	99,470		0,245	1,133
100	100,254	100,033	0,083	0,049
	99,743		0,049	0,084
	100,103		0,019	0,005
150	98,055	99,327	3,648	1,617
	100,763		0,637	2,062
	99,162		0,644	0,027
	99,965		7,953	5,742
	\bar{R}		SCEt	SCEr

Tableau 14: Les résultats du test de Fisher pour la validité des moyennes

Source de variation	SCE	DDL	Variances	F_l	$F_{(5\%)}$
Expérimentale	5,742	6	0,957	1,155	5,143
Factorielle	2,211	2	1,105		
Totale	7,953	8			

Selon le test de Fisher F calculée < $F (5\%)$ donc les variances sont homogène au risque de 5%. Au seuil de probabilité de 5%, le facteur niveau n'a pas d'influence sur les moyennes et il n'y a pas de différence statistiquement significative

c- Estimation du recouvrement moyen et de son intervalle de confiance

Tableau 15: L'intervalle de confiance pour l'étude de la justesse du PA

N	\bar{R}	ST	$t(5\%, 8)$	IRM	
9	99,97	0,9970	2,306	min	max
				99,20	100,73

La valeur 100% appartient à l'intervalle de confiance donc **la méthode de dosage est juste.**



5- Fidélité

a- Répétabilité

La répétabilité est la mesure des variations observées au cours d'une même opération d'analyse par un seul analyste

b- Fidélité intermédiaire

La fidélité est la mesure de la variation observée au cours d'une analyse dans conditions normales réalisées par différents analystes.

Deux techniciens différents mesurent six échantillons individuels. On détermine le coefficient de variation pour les 12 mesures.

i. Vérification de l'homogénéité des variances et des moyennes des niveaux

Les données brutes de l'étude de la fidélité pour étudier l'effet d'opérateur et l'effet de jour sont regroupées dans le tableau suivant :

Tableau 16: les résultats bruts de l'étude de la fidélité pour le PA

Séries	Essai	Air Essai	Qté introduite	Qté retrouvée	R%	Rmoyi	s_i^2
1	1	3305847,44	0,05558	0,05598	100,72	100,904	2,649
	2	3203900,28	0,05526	0,05425	98,18		
	3	3298590,45	0,05502	0,05586	101,52		
	4	3309996,94	0,05468	0,05605	102,51		
	5	3342370,11	0,05528	0,05660	102,39		
	6	3237084,57	0,05476	0,05482	100,10		
2	1	3085588,64	0,05534	0,05570	100,65	101,135	4,975
	2	3064908,08	0,05518	0,05532	100,26		
	3	3202255,80	0,05578	0,05780	103,63		
	4	3151955,52	0,05534	0,05690	102,81		
	5	3092968,36	0,05470	0,05583	102,07		
	6	2706446,29	0,05016	0,04885	97,40		
3	1	2947844,01	0,05144	0,05037	97,92	97,935	1,023
	2	2926392,94	0,05120	0,05000	96,00		
	3	3075623,76	0,05322	0,05255	98,75		
	4	3073814,78	0,05366	0,05252	97,88		
	5	3096704,24	0,05372	0,05291	98,50		
	6	3074214,32	0,05330	0,05253	98,56		
					Moyenne	99,99	
					Ecart type	1,785	

Tableau 17: Les résultats du test de Cochran pour l'homogénéité des variances de PA

TEST DE COCHRAN			
s^2_{max}	$\sum_{i=1}^p s_i^2$	C_0 calculé	$C(5\%, 3, 6)$
4,975	8,647	0,575	0,616

La valeur C calculée est inférieure à 0,616 valeur lue sur la table de COCHRAN avec un risque de 5% ; donc l'ensemble des variances des différents niveaux est considéré comme homogène.

ii. Vérification de l'homogénéité des moyennes des niveaux (test de GRUBBS)

Tableau 18: Les résultats du test de GRUBBS pour la vérification d'homogénéité des moyennes

TEST DE GRUBBS	Test des moyennes		G1 calculé	Gtable(5%, 3)
	MAX[y _{i moy}]	101,135	0,65	1,155
	MIN[y _{i moy}]	98,212	1,15	
	Test des valeurs suspectes		G2 calculé	Gtable(5%, 6)
	Série incriminée : 2			1,887
	MAX[y _j]	103,63	1,118	
MIN[y _j]	97,40	1,676		

Les valeurs G1 trouvées sont inférieures à la valeur lue sur la table de GRUBBS, alors les moyennes testées sont considérées comme correctes au seuil de probabilité de 5%.

Les valeurs G2 trouvées sont inférieures à la valeur lue sur la table de GRUBBS avec un risque de 5% ; alors les résultats des deux séries incriminées sont homogènes.

iii. Analyse de variance

Tableau 19 : Analyse de variance de l'étude de la fidélité pour le PA

Source des variations	SCE	DDL	CM	F cal	F cri
Entre Groupes	31,696	2	15,848	6,079	3,682
A l'intérieur des groupes	39,104	15	2,607		
Total	70,800	17			

Tableau 20 : les résultats de l'étude de fidélité pour le dosage de PA

Répétabilité	Variance (Sr ²)	Limite de répétabilité	CVR
	2,61	4,57	1,61

Reproductibilité	n	S _d ²	S _L ²	S _R ²	CVR
	6	15,848	2,207	4,81	
	Limite de reproductibilité				
					6,21

D'après le tableau CVR et CVr sont inférieures à la valeur fixé par la pharmacopée européenne 2,5. Donc **la méthode est fidèle**

➤ Conclusion pour la validation du dosage par HPLC de paroxetine

Au vu des résultats obtenus et compte tenu des paramètres conformes de la validation analytique, la méthode de dosage par HPLC de PA du paroxetine dans le produit fini est déclarée validée.

II- Résultats de validation analytique de dosage par HPLC des impuretés de paroxétine

1- Sélectivité

La sélectivité de la méthode a été vérifiée en comparant des chromatogrammes types du blanc, du placebo, du PAS et de la FPR.

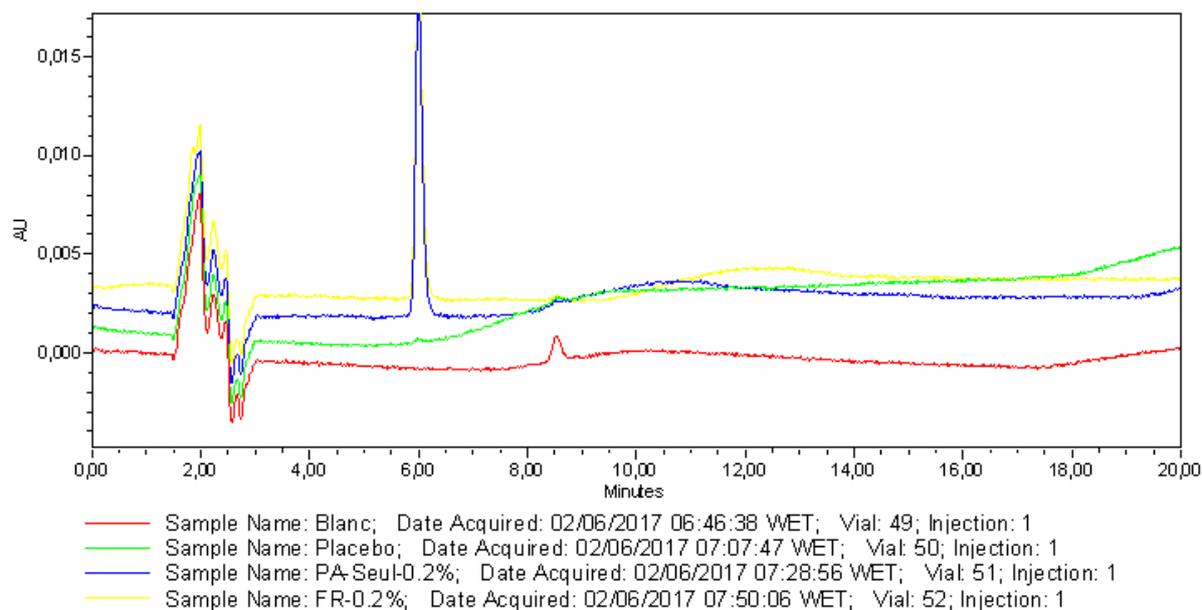


Figure 5 : Superposition des chromatogrammes de PAS, FPR, placebo et le blanc

D'après la figure 3 on remarque qu'il n'y a pas d'interférence au temps de rétention du pic de l'impureté et le PA avec les autres solutions. Donc on peut conclure que cette méthode choisie est sélective pour le dosage des impuretés.

2- Conformité du système

Les performances du système chromatographique sont évaluées par la résolution entre le pic des impuretés et le pic de paroxétine, ainsi que le facteur de symétrie, nombre de plateaux théoriques et par l'écart type relatif maximum pour une série de 5 injections de la solution témoin du paroxétine 0,2%.



Tableau 21 : les données pour l'étude de la conformité se système des impuretés

Essai	tR	Aire	N	Fs
1	5,975	160376	10633	1,232
2	5,977	160956	10656	1,27
3	5,986	161326	10632	1,245
4	5,984	161500	10687	1,25
5	5,981	161604	10611	1,245
Moyenne	5,9806	161152,4		
Ecart type	0,0046152	499,06793		
CV %	0,0771694	0,3096869		

D'après le tableau le coefficient de variation (CV) de cinq injections de paroxetine est inférieur à la norme fixée par la pharmacopée européenne (1,5%). Les nombres de plateaux théoriques est largement supérieur à 10000 et les facteurs d'asymétrie sont respectivement inférieur à 1,5. Donc, la réponse du système est satisfaisante.

3- Linéarité

Préparer 5 solutions de façons à constituer une gamme de 5 concentrations réparties uniformément sur la zone e linéarité à valider.

Les 5 concentrations sont : 0,1% ; 0,15% ; 0,2% ; 0,5% et 1% Pour chaque essai on détermine la réponse (air du pic).

a- Droites de linéarité

La méthode statistique de régression des moindres carrés permet d'établir la droite d'étalonnage et de calculer les incertitudes associées à son usage ultérieur.

Selon l'ICH la linéarité a été étudiée sur 5 concentrations (0,1%- 0,15%- 0,2%- 0,5%- 1%) selon les données suivantes :

Tableau 22 : Les données de dosage des impuretés pour l'étude de la linéarité

niveau %	X _{ij}	Y _{ij}
0,1	0,001	75282
	0,001	80823
	0,001	82294
0,15	0,0015	114503
	0,0015	95912
	0,0015	133221
0,2	0,002	150238
	0,002	150702
	0,002	150313
0,5	0,005	412078
	0,005	378081
	0,005	384175
1	0,01	738095
	0,01	758459
	0,01	765905
Moyenne	0,0039	298005,4

La droite de linéarité pour le dosage de paroxetine est suivante :

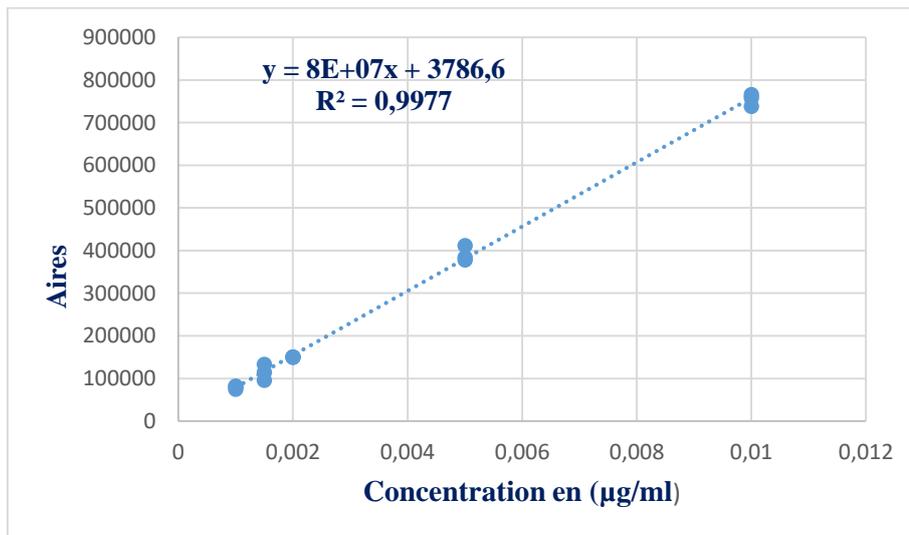


Figure 6 : droite de linéarité pour le dosage des impuretés

b- Droite de régression

$$\text{Aire} = 8.10^7 \text{ Conc} + 3786,6$$

La pente (a) de l'ordonné à l'origine (b), des variances associées (S_a², S_b²) et le R² sont regroupés dans le tableau suivant :

Tableau 23 : Les résultats d'une régression linéaire

Pente a	S ² a	Ordonné à l'origine b	S ² b	R ² %
75440706,4	5,26.10¹⁵	3786,65	1,39.10¹¹	99,77

c- Vérification de l'existence d'une pente significative

Ce test consiste à vérifier l'existence d'une pente (régression acceptable) c'est-à-dire de s'assurer que la pente provient bien de la régression et non pas des erreurs résiduelles.

Les résultats des tests de Fisher pour la vérification de l'existence d'une pente significative sont présentes dans le tableau suivant :

Tableau 24: Résultat du test de Fisher pour les impuretés

	SCE	DDL	Variances	Fcal	P-value
Résiduelle	2243687011	13	172591308,5	5559,68	1,69E-18
régression	9,60E+11	1	9,59553E+11		
totale	9,62E+11	14			

Selon le test de Fischer, P-value < 1% donc nous pouvons conclure l'existence d'une pente hautement significative pour les impuretés.

Donc l'étude de la linéarité montre que la méthode de dosage des impuretés est linéaire pour des concentrations comprises entre 0,1% et 1% de la valeur théorique.

4- Justesse

Pour chaque solution, les limites de réponses actives calculées à partir de la droite de régression ou celles trouvées à partir des essais des solutions (0,1%- 0,5%- 1%) doivent donner des pourcentages entre 80% et 120%.

Tableau 25 : les données pour l'étude de la justesse des impuretés

Niveau %	Aire Essai	Aire STD	Quantité introduite	Quantité Retrouvée	R %	Norme %
0,1	85258	85276	0,001	0,0010	99,98	80% - 120%
	100186	87327	0,001	0,0011	114,73	
	89559	84204	0,001	0,0011	106,36	
0,5	376665	379859	0,005	0,0050	99,16	
	386012	380300	0,005	0,0051	101,50	
	375695	378270	0,005	0,0050	99,32	
1	762175	762220	0,01	0,0100	99,99	
	814277	759856	0,01	0,0107	107,16	
	731043	761299	0,01	0,0096	96,03	

a- Vérification de l'homogénéité des variances des niveaux

Avant d'effectuer les calculs de l'exactitude, il convient de vérifier l'homogénéité des variances entre les différents niveaux selon le test de Cochran.

Tableau 26: les données pour la vérification d'homogénéité des variances des impuretés

Niveau%	Rij%	\bar{R}_i	s_i^2
0,1	99,98	107,021	54,691
	114,73		
	106,36		
0,5	99,16	99,993	1,713
	101,50		
	99,32		
1	99,99	101,061	31,857
	107,16		
	96,03		

Tableau 27: Test de Cochran pour le calcul d'homogénéité des variances des impuretés

TEST DE COCHRAN			
S^2_{\max}	$\sum_{i=1}^p S_i^2$	C_0 calculé	$C (5\%;3;3)$
54,691	88,261	0,620	0,871

C calculée < $C (5\%)$ donc l'ensemble des variances des différents niveaux peut être considéré comme homogène.

b- Test de validité des moyennes

Ce test consiste à comparer les moyennes des 3 niveaux

Tableau 28: Les données du test de Fisher pour la validité des moyennes

Niveau %	Rij%	\bar{R}_i	$(R_{ij\%} - \bar{R})^2$	$(R_{ij} - \bar{R}_i)^2$
0,1	99,979	107,021	7,360	49,594
	114,725		144,802	59,350
	106,360		13,453	0,438
0,5	99,159	99,993	12,479	0,696
	101,502		1,416	2,276
	99,319		11,374	0,455
1	99,994	101,061	7,277	1,137
	107,162		19,983	37,227
	96,026		44,436	25,350
	102,692		262,579	176,523
	\bar{R}		SCeT	SCeR

Tableau 29: Les résultats du test de Fisher pour la validité des moyennes

Source de variation	SCE	DDL	Variances	F_l	$F_{(5\%)}$
Expérimentale	176,523	6	29,420	1,463	5,143
Factorielle	86,056	2	43,028		
Totale	262,579	8			

Selon le test de Fisher $F_{calculée} < F(5\%)$ donc les variances sont homogène au risque de 5%. Au seuil de probabilité de 5%, le facteur niveau n'a pas d'influence sur les moyennes et il n'y a pas de différence statistiquement significative.

c- Estimation du recouvrement moyen et de son intervalle de confiance

Tableau 30: L'intervalle de confiance pour l'étude de l'exactitude des impuretés

N	\bar{R}	ST	t(5%)	IRM	
9	102,69	5,73	2,31	min	max
				98,29	107,10

La valeur 100% appartient à l'intervalle de confiance donc **la méthode de dosage des impuretés est juste.**

5- Fidélité

Deux techniciens différents mesurent six échantillons individuels. On détermine le coefficient de variation pour les 12 mesures.

a- Vérification de l'homogénéité des variances et des moyennes des niveaux :

Les données brutes de l'étude de la fidélité pour étudier l'effet d'opérateur et effet de jour sont regroupées dans le tableau suivant :

Tableau 31: les résultats bruts de l'étude de la fidélité pour les impuretés

Séries	Essai	Aire Essai	Qté introduite	Qté retrouvée	R%	Rmoyi	s_i^2
1	1	155275,00	0,0020	0,00204	101,82	103,044	6,204
	2	164679,00	0,0020	0,00216	107,98		
	3	156828,00	0,0020	0,00206	102,83		
	4	156362,00	0,0020	0,00205	102,53		
	5	155537,00	0,0020	0,00204	101,99		
	6	154215,00	0,0020	0,00202	101,12		
2	1	151672,00	0,0020	0,00202	100,88	103,154	20,016
	2	151298,00	0,0020	0,00201	100,63		
	3	168506,00	0,0020	0,00224	112,07		
	4	151186,00	0,0020	0,00201	100,55		
	5	152865,00	0,0020	0,00203	101,67		
	6	155046,00	0,0020	0,00206	103,12		
3	1	144911,00	0,0020	0,00203	101,58	106,094	8,770
	2	152414,00	0,0020	0,00214	106,84		
	3	157749,00	0,0020	0,00221	110,58		
	4	149945,00	0,0020	0,00210	105,11		
	5	150170,00	0,0020	0,00211	105,27		
	6	152875,00	0,0020	0,00214	107,17		
					Moyenne	104,10	
					Ecart type	1,72970712	

Tableau 32: Les résultats du test de Cochran pour l'homogénéité des variances des impuretés

TEST DE COCHRAN			
s^2_{max}	$\sum_{i=1}^p s_i^2$	C_0 calculé	$C_{(5\%,3,6)}$
20,016	34,990	0,572	0,616

La valeur C calculée est inférieure à 0,616 valeur lue sur la table de Cochran avec un risque de 5% ; donc l'ensemble des variances des différents niveaux est considéré comme homogène.

b- Vérification de l'homogénéité des moyennes des niveaux (test de GRUBBS)

Tableau 33: Les résultats du test de GRUBBS pour la vérification d'homogénéité des moyennes

TEST DE GRUBBS	Test des moyennes		$G1_{calculé}$	$G_{table(5\%, 3)}$
	MAX [$y_{i moy}$]	106,094	1,15	1,155
	MIN [$y_{i moy}$]	103,044	0,61	
	Test des valeurs suspectes		$G2_{calculé}$	$G_{table(5\%, 6)}$
	Série incriminée : 2			
MAX [y_j]	112,07	1,994		
MIN [y_j]	100,55	0,581		

Les valeurs G1 trouvées sont inférieures à la valeur lue sur la table de GRUBBS, alors les moyennes testées sont considérées comme correctes au seuil de probabilité de 5%.

Une valeur de G2 trouvée est inférieure à la valeur lue sur la table de GRUBBS et l'autre supérieur avec un risque de 5% ; alors les résultats des deux séries incriminées sont homogènes.

c- Analyse de variance

Tableau 34 : analyse de variance de l'étude de fidélité pour les impuretés

Source des variations	SCE	DDL	CM	Fcal	F cri
Entre Groupes	35,903	2	17,951	1,539	3,682
A l'intérieur des groupes	174,950	15	11,663		
Total	210,853	17			



Tableau 35 : les résultats de l'étude de fidélité pour le dosage des impuretés

Répétabilité	Variance S_r^2		seuil de répétabilité		CVr
	11,663		9,665		

Reproductibilité	n	S_d^2	S_L^2	S_R^2	CVR	
	6	17,951	1,048	12,711		3,565
	Seuil de reproductibilité					
	10,09					

D'après le tableau CVR et CVr sont inférieures à la valeur fixée par la pharmacopée européenne. Donc **la méthode est fidèle**.

6- Vérification de l'exactitude de la Limite de quantification LOQ

Les résultats sont résumés dans le tableau ci-dessous :

Tableau 36: les résultats bruts de limite de quantification pour les impuretés

solution N°	Aire STD	Aire Essai	Concentration ($\mu\text{g/ml}$) calculée	concentration ($\mu\text{g/ml}$) retrouvée	Ectitude (80%-120%)
1	77411	84342	0,001	0,00109	108,95
2	75880	82834	0,001	0,00109	109,16
3	76951	83910	0,001	0,00109	109,04
4	77651	81583	0,001	0,00105	105,06
5	76241	78864	0,001	0,00103	103,44
6	75352	80979	0,001	0,00107	107,47
Moyenne	76581	82085,33			107,189
Ecart type	904,228	2041,360			2,413
CV %	1,181	2,487			2,25 < 7,5%

L'analyse des résultats montre que la méthode est sensible pour le dosage des impuretés.

➤ Conclusion de la validation de la méthode de dosage des substances apparentées par HPLC

Au vu des résultats obtenus et compte tenu des paramètres conformes de la validation analytique, la méthode de dosage des impuretés par HPLC dans le produit fini paroxetine 50 mg comprimés, est déclarée validée.



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 nutriments ou autres échantillons tels que ceux d'origine biologique impliqués dans les études pharmacocinétiques ou de biodisponibilité et bioéquivalence.

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.

Ce travail qui a été réalisé au LNCM, a pour objectif l'optimisation et la validation analytique selon l'ICH, d'une méthode de dosage par HPLC simple et rapide, capable de doser la paroxétine dans la matière première et de doser le PAS et les impuretés dans le produit fini étudiée (comprimé). Nous avons développé une méthode spécifique, linéaire, exacte et fidèle.

L'optimisation des conditions de séparation par la méthode HPLC a été faite selon une approche multi-variantes. Il a été basé sur sept facteurs, le choix de la phase mobile, de la phase stationnaire, du débit, de la température, du volume d'injection, de solvant de dilution et de la longueur d'onde.

La validation de cette méthode est basée sur l'utilisation d'une méthodologie statistique (test Cochran, test de Student, test de Fisher, test de GRUBBS).

La deuxième étape a été consacrée à la validation analytique de cette méthode. La validation classique a été appliquée avec succès pour démontrer la capacité de la méthode à identifier et à quantifier le principe actif (la paroxétine) dans la matière première et le produit fini. Les critères de la validation (spécificité, linéarité...) examinés ont été acceptables.



Références bibliographiques

- [1] Meunier, C. Opinion vis-à-vis des médicaments génériques : enquête auprès de 300 patients de pharmacies seinomarines ; mise en évidence du rôle joué par le médecin traitant. Rouen : Faculté mixte de médecine et de pharmacie, 2013, p116.
- [2] AMIP, le secteur pharmaceutique marocain : réalités sur le prix des médicaments intérêt du secteur, Maroc, 2010.Haut-commissariat au plan.
- [3] Nouhoum T.M., « Etude de stabilité des comprimés sous blister de l'Usine Malienne de Produits Pharmaceutiques: Cas du paracétamol et du chloramphénicol », thèse, Université de Bamako Faculté de Médecine, de Pharmacie et d'Odontostomatologie (FMPOS), 2009.
- [4] TABOULET F., « La politique du médicament générique en France Un environnement en pleine évolution », Thèse, université Paul Sabatier – Toulouse, faculté des sciences pharmaceutiques, France, 2014, p 10.
- [5] G. Dutau, F. Rancé, S. Fejji, A. Juchet, F. Brémont, P.Nouilhan, Intolérance aux additifs alimentaires chez l'enfant : mythe ou réalité. Rev FR Allergol, 1996 ;36 ; 129-42.
- [6] Touraine, M. Ministère des affaires sociales, de la santé et des droits des femmes.2013. disponible sur « médicaments. Gouv.fr », 2013
- [7] Pharmacopée Européenne ;sixième édition ; tome 1 ,01-2008
- [8] Académie national de pharmacie, Rapport, « Médicament générique », p 25, 2012
- [9] Wangani, l'étalonnage, outil d'amélioration des performances dans les organisations publiques, Paris, Juin 2010.
- [10] Haywood A., Beverley D .G, «Pharmaceutical excipients – where do we begin? », vol 34 (4), 2011.
- [11] Pharmacopée Européenne 8.0.
- [12] <http://sante.canoe.ca/drug/getdrug/paxil>, 2017
- [13] <http://www.medisite.fr/dictionnaire-des-medicaments-paroxetine-eg-20-mg-comprime-pellicule-secable.610218.8028.html#vETq9ozVpbjUhWsl.99>, 2017
- [14] Bouchafra Houda,« apport de la chimiométrie pour la qualimétrie des méthodes analytiques : mise au point et validation par l'approche de l'erreur totale des méthodes chromatographiques pour le dosage des médicaments » », thèse, Université sidi mohamed ben abdelah faculté des sciences et techniques,Fes,2016.
- [15] Douglas A. Skoog, F.James Holler, Tiothy A. Nieman-Principes d'analyse instrumentale. 5émeedition.Amerique: de boeck, 2003, p 725.
- [16] R. Chandra1, K. Dutt, Sharma Department of Pharmaceutical Chemistry, Dolphin P.G. Institute of Biomedical and Natural Sciences, Dehradun-248001, Uttarakhand, INDIA, 2013



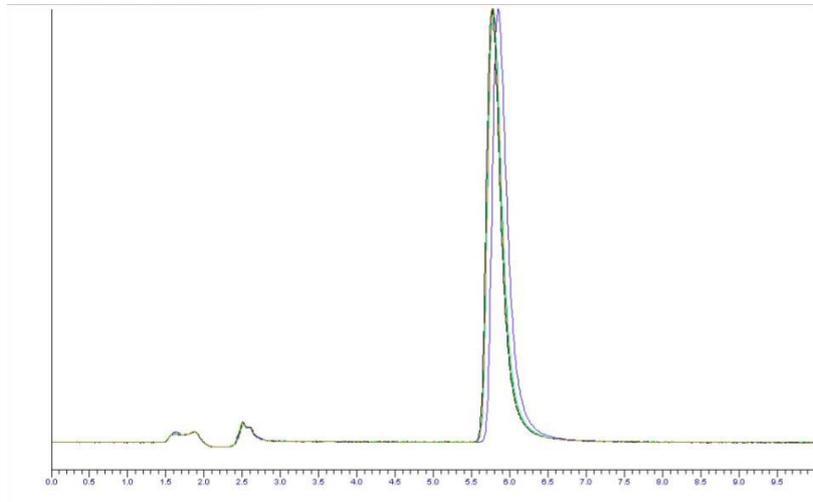
[17] Audigié CL, Dupont G, Zonszain F, «Principes des méthodes d'analyse biochimiques», Doin Editeurs Paris tome 1, 1995, p 44.

[18] S. Nussbaumer, Analyse de médicament produits en milieu hospitalier : application aux composé non-UV absorbant cytotoxique. Centre d'édition des hopitaux universitaire de Genève, N°4332/20011-217.

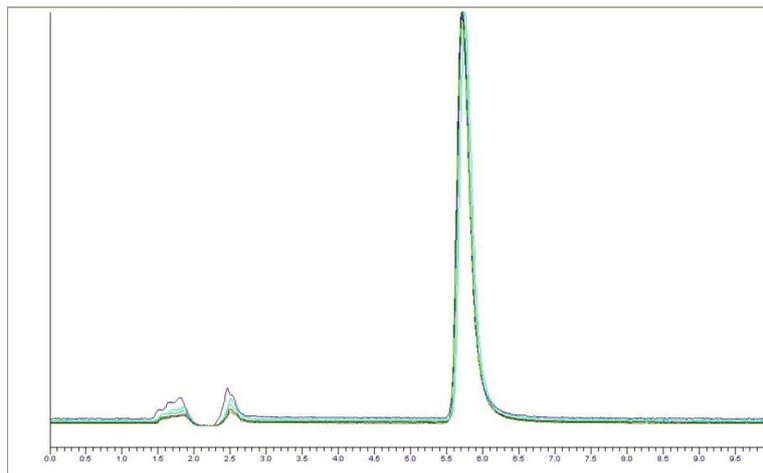
[19] H. Reginald, M. Charles, Biochimie. 2émeedition.Amerique: de boeck, 2000; P 157.

[20] organisation mondial de la santé Genève : assurance de la qualité des produits pharmaceutique. Recueil de directives et autres ducuments, 1989 ; 1 ;278 .

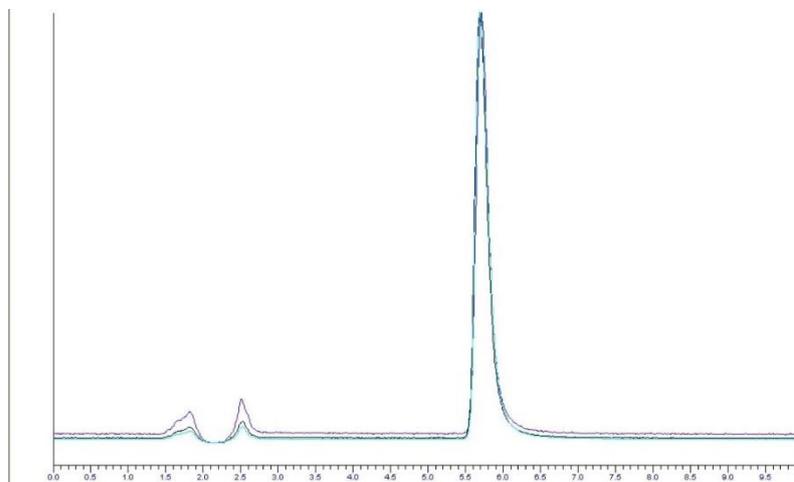
Annexes I



Chromatogramme pour l'étude de conformité de système du PA

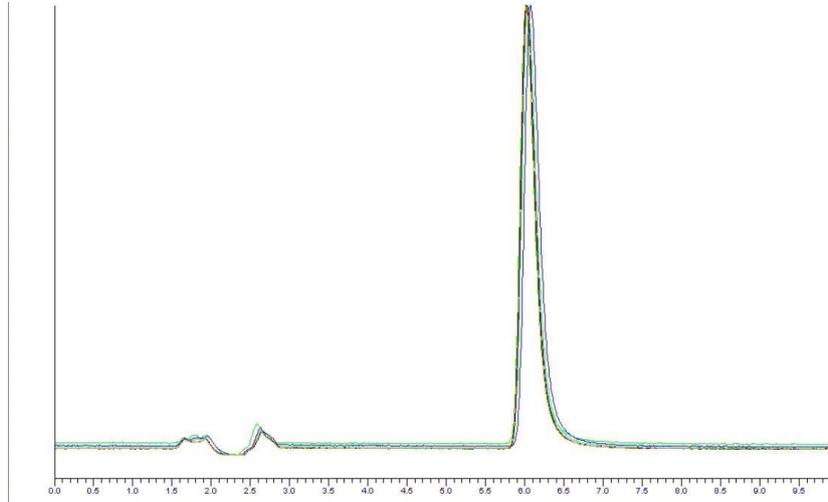


Chromatogramme pour l'étude de linéarité du PA



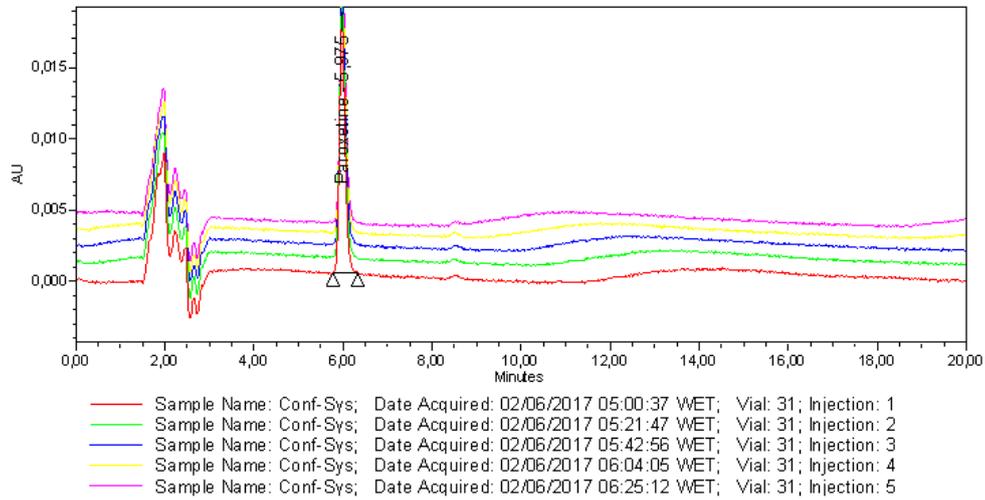
Chromatogramme pour l'étude de l'exactitude du PA

Annexes II

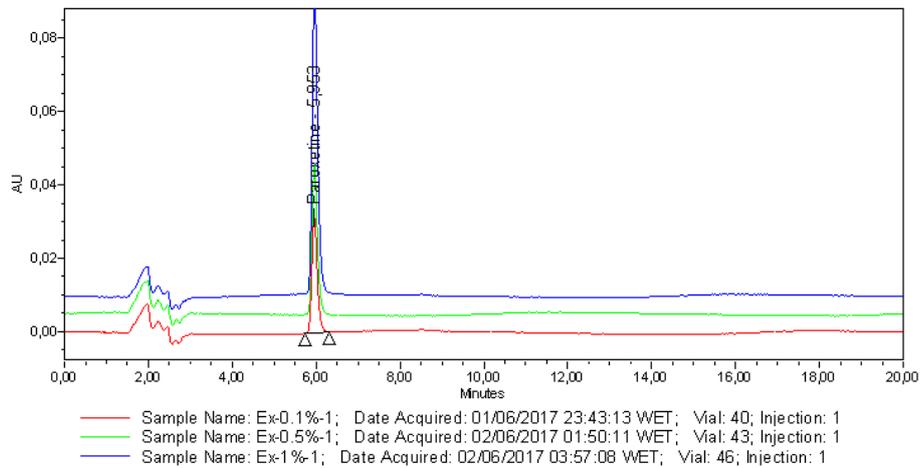


Chromatogramme pour l'étude de fidélité du PA

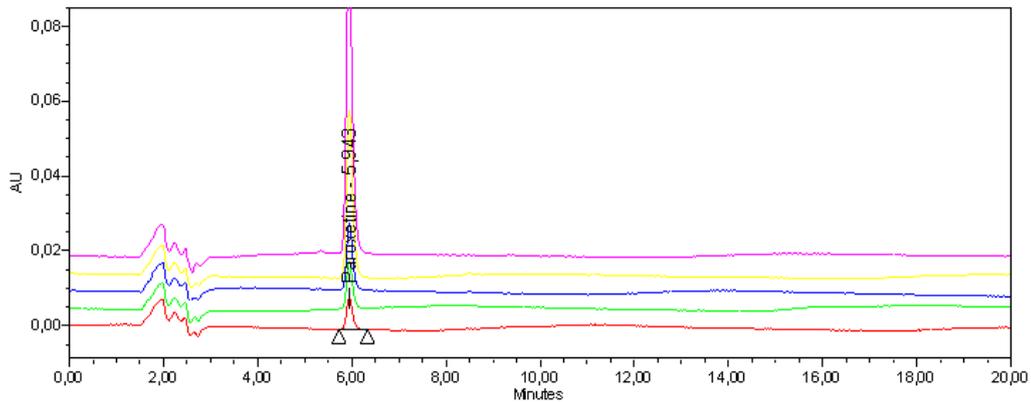
Annexes III



Chromatogramme pour l'étude de conformité de système des impuretés

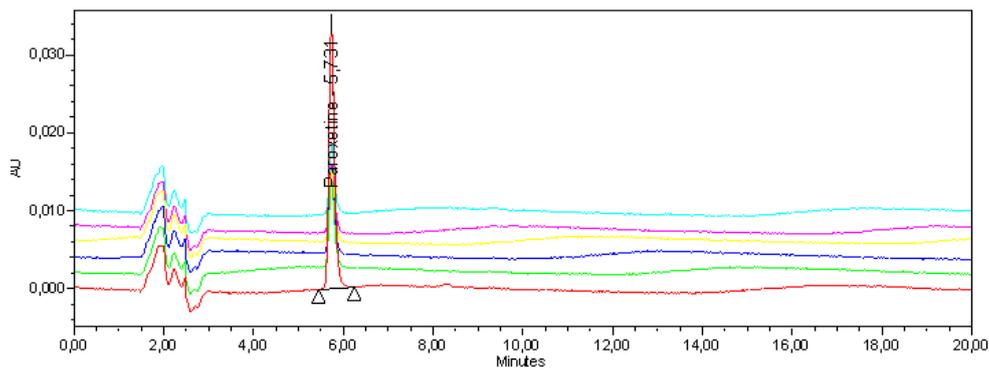


Chromatogramme pour l'étude de l'exactitude des impuretés



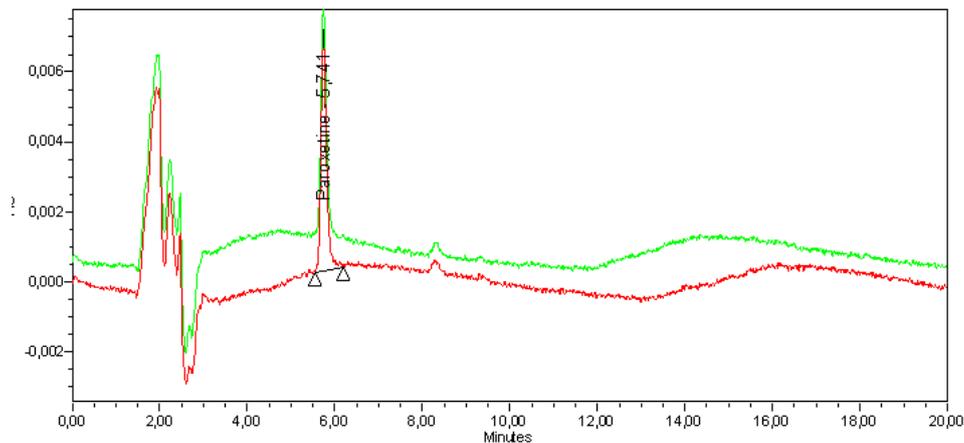
- Sample Name: Lin-0.1%-1; Date Acquired: 01/06/2017 17:22:23 WET; Vial: 25; Injection: 1
- Sample Name: Lin-0.15%-1; Date Acquired: 01/06/2017 18:25:51 WET; Vial: 28; Injection: 1
- Sample Name: Lin-0.2%-1; Date Acquired: 01/06/2017 19:29:20 WET; Vial: 31; Injection: 1
- Sample Name: Lin-0.5%-1; Date Acquired: 01/06/2017 20:32:48 WET; Vial: 34; Injection: 1
- Sample Name: Lin-1%-1; Date Acquired: 01/06/2017 21:36:16 WET; Vial: 37; Injection: 1

Chromatogramme pour l'étude de linéarité des impuretés



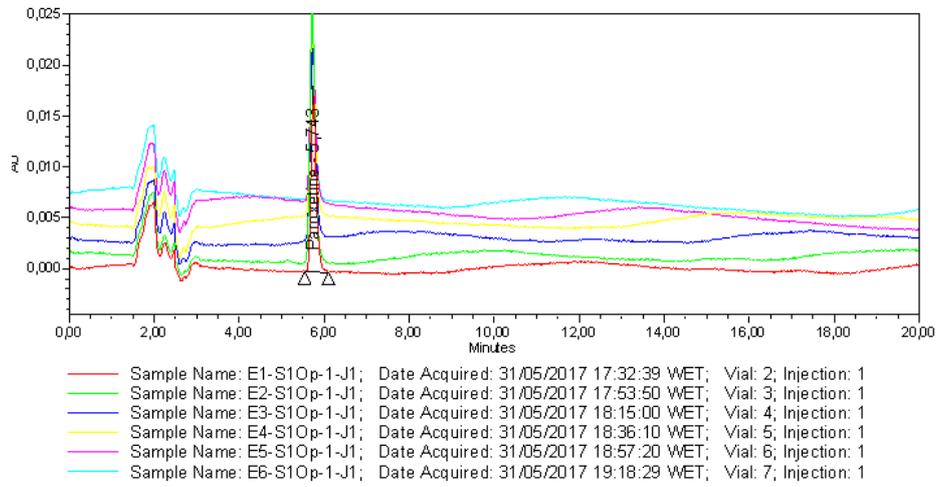
- Sample Name: LQ-E1; Date Acquired: 31/05/2017 23:53:22 WET; Vial: 16; Injection: 1
- Sample Name: LQ-E2; Date Acquired: 01/06/2017 00:14:32 WET; Vial: 17; Injection: 1
- Sample Name: LQ-E3; Date Acquired: 01/06/2017 00:35:42 WET; Vial: 18; Injection: 1
- Sample Name: LQ-E4; Date Acquired: 01/06/2017 00:56:52 WET; Vial: 19; Injection: 1
- Sample Name: LQ-E5; Date Acquired: 01/06/2017 01:18:02 WET; Vial: 20; Injection: 1
- Sample Name: LQ-E6; Date Acquired: 01/06/2017 01:39:12 WET; Vial: 21; Injection: 1

Chromatogramme pour l'étude de limite de quantification des impuretés



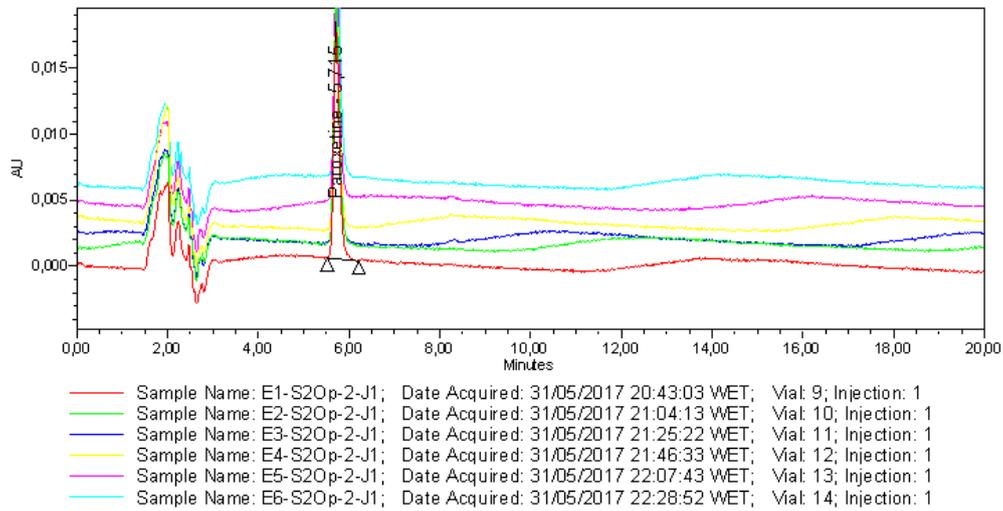
- Sample Name: LD; Date Acquired: 01/06/2017 02:00:22 WET; Vial: 22; Injection: 1
- Sample Name: LD; Date Acquired: 01/06/2017 02:21:31 WET; Vial: 22; Injection: 2

Chromatogramme pour l'étude de limite de détection des impuretés

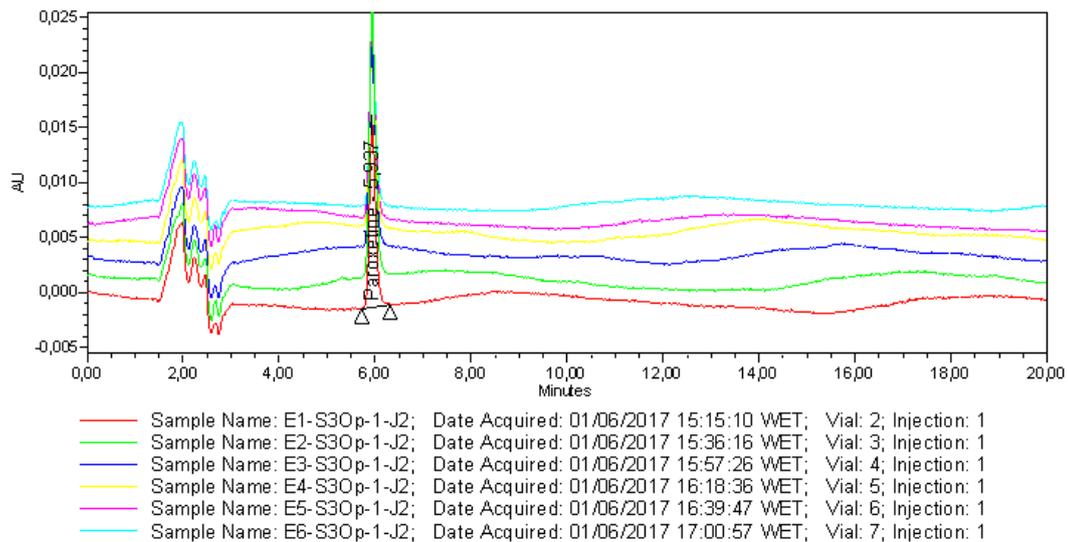


Chromatogramme pour l'étude de fidélité Série 1 Opérateur 1 Jour 1

Annexes IV



Chromatogramme pour l'étude de fidélité Série 2 Opérateur 2 Jour 1



Chromatogramme pour l'étude de fidélité Série 3 Opérateur 1 Jour 2



Annexes V
Table de Fisher

$v_1 \rightarrow$ $v_2 \downarrow$	1	2	3	4	5	6	8	12	24	∞
1	161,4	199,5	215,7	224,6	230,2	234,0	238,9	243,9	249,0	254,3
2	18,51	19,00	19,16	19,25	19,30	19,33	19,37	19,41	19,45	19,50
3	10,13	9,55	9,28	9,12	9,01	8,94	8,84	8,74	8,64	8,53
4	7,71	6,94	6,59	6,39	6,26	6,16	6,04	5,91	5,77	5,63
5	6,61	5,79	5,41	5,19	5,05	4,95	4,82	4,68	4,53	4,36
6	5,99	5,14	4,76	4,53	4,39	4,28	4,15	4,00	3,84	3,67
7	5,59	4,74	4,35	4,12	3,97	3,87	3,73	3,57	3,41	3,23
8	5,32	4,46	4,07	3,84	3,69	3,58	3,44	3,28	3,12	2,93
9	5,12	4,26	3,86	3,63	3,48	3,37	3,23	3,07	2,90	2,71
10	4,96	4,10	3,71	3,48	3,33	3,22	3,07	2,91	2,74	2,54
11	4,84	3,98	3,59	3,36	3,20	3,09	2,95	2,79	2,61	2,40
12	4,75	3,88	3,49	3,26	3,11	3,00	2,85	2,69	2,50	2,30
13	4,67	3,80	3,41	3,18	3,02	2,92	2,77	2,60	2,42	2,21
14	4,60	3,74	3,34	3,11	2,96	2,85	2,70	2,53	2,35	2,13
15	4,54	3,68	3,29	3,06	2,90	2,79	2,64	2,48	2,29	2,07
16	4,49	3,63	3,24	3,01	2,85	2,74	2,59	2,42	2,24	2,01
17	4,45	3,59	3,20	2,96	2,81	2,70	2,55	2,38	2,19	1,96
18	4,41	3,55	3,16	2,93	2,77	2,66	2,51	2,34	2,15	1,92
19	4,38	3,52	3,13	2,90	2,74	2,63	2,48	2,31	2,11	1,88
20	4,35	3,49	3,10	2,87	2,71	2,60	2,45	2,28	2,08	1,84
21	4,32	3,47	3,07	2,84	2,68	2,57	2,42	2,25	2,05	1,81
22	4,30	3,44	3,05	2,82	2,66	2,55	2,40	2,23	2,03	1,78
23	4,28	3,42	3,03	2,80	2,64	2,53	2,38	2,20	2,00	1,76
24	4,26	3,40	3,01	2,78	2,62	2,51	2,36	2,18	1,98	1,73
25	4,24	3,38	2,99	2,76	2,60	2,49	2,34	2,16	1,96	1,71
26	4,22	3,37	2,98	2,74	2,59	2,47	2,32	2,15	1,95	1,69
27	4,21	3,35	2,96	2,73	2,57	2,46	2,30	2,13	1,93	1,67
28	4,20	3,34	2,95	2,71	2,56	2,44	2,29	2,12	1,91	1,65
29	4,18	3,33	2,93	2,70	2,54	2,43	2,28	2,10	1,90	1,64
30	4,17	3,32	2,92	2,69	2,53	2,42	2,27	2,09	1,89	1,62
40	4,08	3,23	2,84	2,61	2,45	2,34	2,18	2,00	1,79	1,51
60	4,00	3,15	2,76	2,52	2,37	2,25	2,10	1,92	1,70	1,39
120	3,92	3,07	2,68	2,45	2,29	2,17	2,01	1,83	1,61	1,25
∞	3,84	2,99	2,60	2,37	2,21	2,09	1,94	1,75	1,52	1,00

Table de Cochran

n	2		3		4		5		6	
	1%	5%	1%	5%	1%	5%	1%	5%	1%	5%
2			0.995	0.975	0.979	0.939	0.959	0.906	0.937	0.877
3	0.993	0.967	0.942	0.871	0.883	0.798	0.834	0.746	0.793	0.707
4	0.968	0.906	0.864	0.768	0.781	0.684	0.721	0.629	0.676	0.590
5	0.928	0.841	0.788	0.684	0.696	0.598	0.633	0.544	0.588	0.506
6	0.883	0.781	0.722	0.616	0.626	0.532	0.564	0.480	0.520	0.445
7	0.838	0.727	0.664	0.561	0.568	0.480	0.508	0.431	0.466	0.397
8	0.794	0.680	0.615	0.516	0.521	0.438	0.463	0.391	0.423	0.360
9	0.754	0.638	0.573	0.478	0.481	0.403	0.425	0.358	0.387	0.329
10	0.718	0.602	0.536	0.445	0.447	0.373	0.393	0.331	0.357	0.303
11	0.684	0.570	0.504	0.417	0.418	0.348	0.366	0.308	0.332	0.281
12	0.653	0.541	0.475	0.392	0.392	0.326	0.343	0.288	0.310	0.262
13	0.624	0.515	0.450	0.371	0.369	0.307	0.322	0.271	0.291	0.243
14	0.599	0.492	0.427	0.352	0.349	0.291	0.304	0.255	0.274	0.232
15	0.575	0.471	0.407	0.335	0.332	0.276	0.288	0.242	0.259	0.220



Annexes VI

Table de Student

α ddl	0,90	0,50	0,30	0,20	0,10	0,05	0,02	0,01	0,001
1	0,158	1,000	1,963	3,078	6,314	12,706	31,821	63,656	636,578
2	0,142	0,816	1,386	1,886	2,920	4,303	6,965	9,925	31,600
3	0,137	0,765	1,250	1,638	2,353	3,182	4,541	5,841	12,924
4	0,134	0,741	1,190	1,533	2,132	2,776	3,747	4,604	8,610
5	0,132	0,727	1,156	1,476	2,015	2,571	3,365	4,032	6,869
6	0,131	0,718	1,134	1,440	1,943	2,447	3,143	3,707	5,959
7	0,130	0,711	1,119	1,415	1,895	2,365	2,998	3,499	5,408
8	0,130	0,706	1,108	1,397	1,860	2,306	2,896	3,355	5,041
9	0,129	0,703	1,100	1,383	1,833	2,262	2,821	3,250	4,781
10	0,129	0,700	1,093	1,372	1,812	2,228	2,764	3,169	4,587
11	0,129	0,697	1,088	1,363	1,796	2,201	2,718	3,106	4,437
12	0,128	0,695	1,083	1,356	1,782	2,179	2,681	3,055	4,318
13	0,128	0,694	1,079	1,350	1,771	2,160	2,650	3,012	4,221
14	0,128	0,692	1,076	1,345	1,761	2,145	2,624	2,977	4,140
15	0,128	0,691	1,074	1,341	1,753	2,131	2,602	2,947	4,073
16	0,128	0,690	1,071	1,337	1,746	2,120	2,583	2,921	4,015
17	0,128	0,689	1,069	1,333	1,740	2,110	2,567	2,898	3,965
18	0,127	0,688	1,067	1,330	1,734	2,101	2,552	2,878	3,922
19	0,127	0,688	1,066	1,328	1,729	2,093	2,539	2,861	3,883
20	0,127	0,687	1,064	1,325	1,725	2,086	2,528	2,845	3,850
21	0,127	0,686	1,063	1,323	1,721	2,080	2,518	2,831	3,819
22	0,127	0,686	1,061	1,321	1,717	2,074	2,508	2,819	3,792
23	0,127	0,685	1,060	1,319	1,714	2,069	2,500	2,807	3,768
24	0,127	0,685	1,059	1,318	1,711	2,064	2,492	2,797	3,745
25	0,127	0,684	1,058	1,316	1,708	2,060	2,485	2,787	3,725
26	0,127	0,684	1,058	1,315	1,706	2,056	2,479	2,779	3,707
27	0,127	0,684	1,057	1,314	1,703	2,052	2,473	2,771	3,689
28	0,127	0,683	1,056	1,313	1,701	2,048	2,467	2,763	3,674
29	0,127	0,683	1,055	1,311	1,699	2,045	2,462	2,756	3,660
30	0,127	0,683	1,055	1,310	1,697	2,042	2,457	2,750	3,646
40	0,126	0,681	1,050	1,303	1,684	2,021	2,423	2,704	3,551
80	0,126	0,678	1,043	1,292	1,664	1,990	2,374	2,639	3,416
120	0,126	0,677	1,041	1,289	1,658	1,980	2,358	2,617	3,373
∞	0,126	0,675	1,037	1,282	1,645	1,960	2,327	2,577	3,293



Annexes VII

Table de Grubbs

n	Level of Significance α	
	0.01	0.05
3	1.155	1.153
4	1.492	1.463
5	1.749	1.672
6	1.944	1.822
7	2.097	1.938
8	2.221	2.032
9	2.323	2.110
10	2.410	2.176
11	2.485	2.234
12	2.550	2.285
13	2.607	2.331
14	2.659	2.371
15	2.705	2.409
16	2.747	2.443
17	2.785	2.475
18	2.821	2.504
19	2.854	2.532
20	2.884	2.557
21	2.912	2.580
22	2.939	2.603
23	2.963	2.624
24	2.987	2.644
25	3.009	2.663
26	3.029	2.681
27	3.049	2.698
28	3.068	2.714
29	3.085	2.730
30	3.103	2.745
31	3.119	2.759
32	3.135	2.773

n	Level of Significance α	
	0.01	0.05
33	3.150	2.786
34	3.164	2.799
35	3.178	2.811
36	3.191	2.823
37	3.204	2.835
38	3.216	2.846
39	3.228	2.857
40	3.240	2.866
41	3.251	2.877
42	3.261	2.887
43	3.271	2.896
44	3.282	2.905
45	3.292	2.914
46	3.302	2.923
47	3.310	2.931
48	3.319	2.940
49	3.329	2.948
50	3.336	2.956

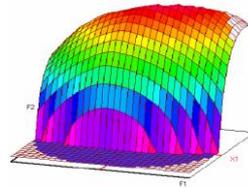
Grubbs Double					
n	g 1%	g 5%	n	g 1%	g 5%
4	0	0,0002	19	0,3398	0,4214
5	0,0018	0,009	20	0,3585	0,4391
6	0,0116	0,0349	21	0,3761	0,4556
7	0,0308	0,0708	22	0,3927	0,4711
8	0,0563	0,1101	23	0,4085	0,4857
9	0,0851	0,1492	24	0,4234	0,4994
10	0,115	0,1864	25	0,4376	0,5123
11	0,1448	0,2213	26	0,451	0,5245
12	0,1738	0,2537	27	0,4638	0,536
13	0,2016	0,2836	28	0,4759	0,547
14	0,228	0,3112	29	0,4875	0,5574
15	0,253	0,3367	30	0,4985	0,5672
16	0,2667	0,3603	35	0,5469	0,6101
17	0,299	0,3822	40	0,5862	0,6445
18	0,32	0,4025	50	0,65	0,7045



Université Sidi Mohammed Ben Abdellah

Faculté des Sciences et Techniques

www.fst-usmba.ac.ma



Master ST CAC Ageq

Mémoire de fin d'études pour l'obtention du Diplôme de Master Sciences et Techniques

Nom et prénom: BERKANI Oumaima

Année Universitaire : 2016/2017

Titre: Développement et validation d'une nouvelle méthode de dosage de paroxetine et ses impuretés par chromatographie liquide à haute performance dans une forme pharmaceutique.

Résumé

Des médicaments à base de paroxetine sont disponibles sous différentes formes pharmaceutiques. Actuellement, le dosage de cette molécule dans les produits finis se fait par des méthodes variées. Nous proposons une nouvelle méthode analytique simple et rapide permettant le dosage de ce principe actif dans toute sa forme pharmaceutique.

L'objectif de telle démarche est d'aider les laboratoires de contrôle des médicaments et les spécialistes en industrie pharmaceutique, de réduire le temps et le cout de l'analyse et par la suite de minimiser les rejets chimiques.

Dans le cadre de ce travail, nous avons pu optimiser les conditions chromatographiques, qui nous ont permis d'identifier, de quantifier et de séparer le principe actif. Ensuite, nous avons validé les deux méthodes chromatographies. Les deux méthodes ont été appliquées avec succès au LNCM, pour le dosage de PA et le dosage des impuretés dans une forme Pharmaceutique (comprimé). Les résultats obtenus ont été dans les normes.

Mots clés : Conditions chromatographiques HPLC, validation analytique, paroxetine, dosage...