

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

**Validation analytique par le profil d'exactitude d'une méthode
HPLC pour le dosage d'Azithromycine**

Présenté par:

◆ **EL-GHALY Wafaa**

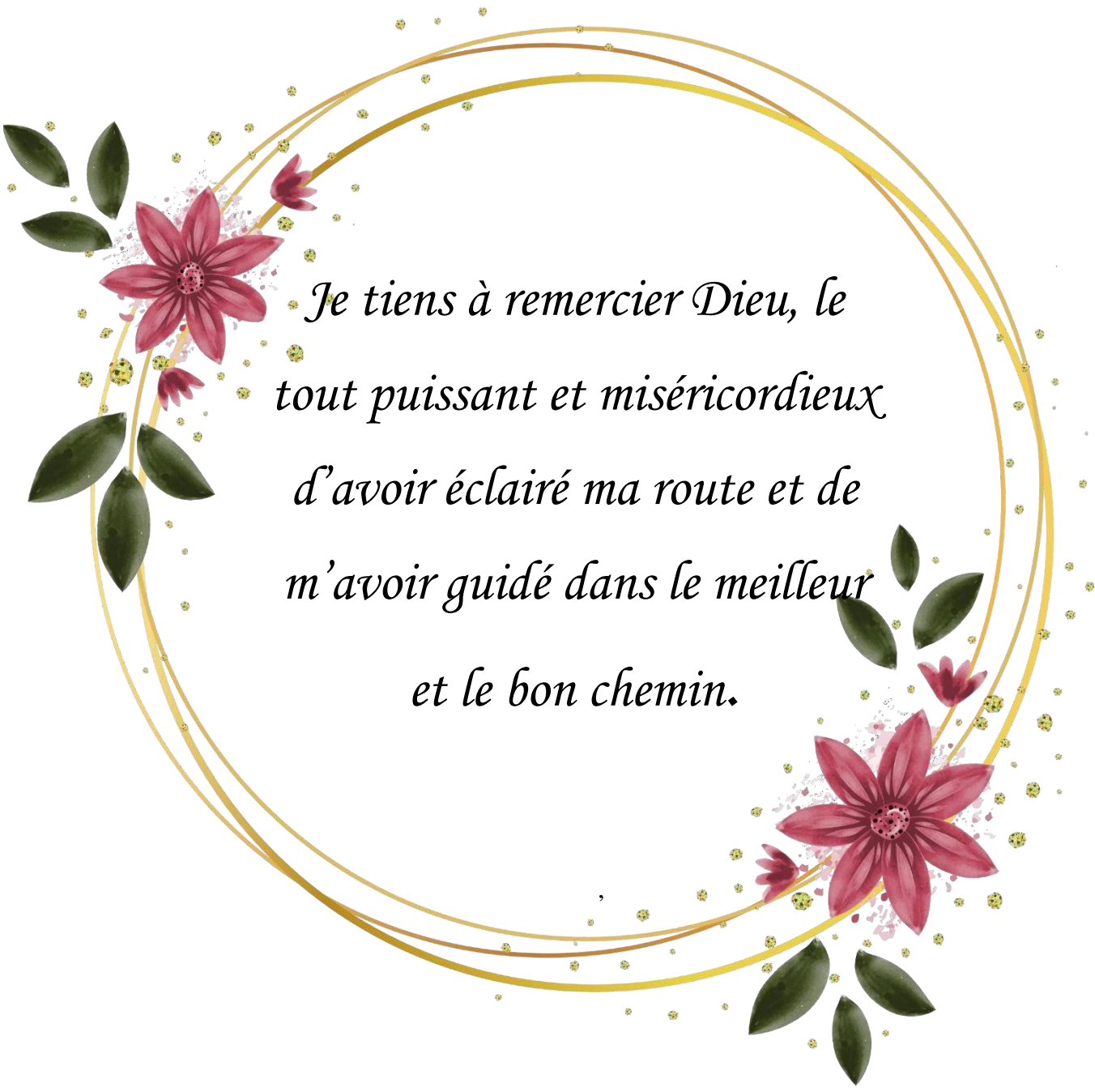
Encadré par:

- ◆ Pr. JHILAL Fayssal UM6SS Casablanca
- ◆ Pr. SAFFAJ Taoufiq FST Fès

Soutenu Le 21 juillet 2022 devant le jury composé de:

- ◆ Pr. JHSSANE Bouchaib FST Fès
- ◆ Pr. SAFFAJ Taoufiq FST Fès
- ◆ Pr. JHILAL Fayssal UM6SS Casablanca

Stage effectué à : Laboratoire de faculté de pharmacie de l'Université Mohamed VI des sciences de la santé Casablanca



*Je tiens à remercier Dieu, le
tout puissant et miséricordieux
d'avoir éclairé ma route et de
m'avoir guidé dans le meilleur
et le bon chemin.*



Dédicaces

A la mémoire de mon père

Tu as toujours été pour moi un exemple du père respectueux, honnête, de la personne méticuleuse, je tiens à honorer l'homme que tu es.

Grâce à toi j'ai appris le sens du travail et de la responsabilité. Je voudrais te remercier pour ton amour, ta compréhension, ta générosité... Ton soutien fut une lumière dans tout mon parcours. Aucune dédicace ne saurait exprimer l'amour l'estime et le respect que j'ai toujours eu pour toi.

Ce modeste travail est le fruit de tous les sacrifices que tu as déployés pour mon éducation et ma formation.

A ma chère mère

Aucune dédicace ne peut suffire pour exprimer la profondeur de mes sentiments de respect, de gratitude, d'amour éternel, et de considération pour les sacrifices déployés pour assurer mon éducation dans les meilleures conditions, pour l'amour dont vous m'avez toujours comblé, pour mon bonheur et ma réussite et pour votre soutien tout au long de mes années d'étude. Je suis assez fière d'y appartenir et vous êtes pour moi un exemple de courage et de sacrifice continu. Je t'aime et j'implore le tout-puissant pour qu'il t'accorde une bonne santé et une vie longue et heureuse.

A mes sœurs

Aucune Langage ne peut exprimer l'amour, l'attachement, et l'affection que je porte pour vous. Je vous remercie pour votre précieux soutien, et votre amour. Que Dieu le tout puissant vous accorde la santé et le bonheur.

A mes formateurs et mes formatrices.

Qui sont la source de ma formation et mon savoir. Je vous remercie pour votre encouragement, vos efforts, et vos conseils

Remerciement

Je tiens à remercier tout particulièrement Pr Samir AHID Doyen de la faculté de pharmacie « UNIVERSITE MOHAMED VI DES SCIENCES DE LA SANTE » pour son soutien ,son accueil et pour tous les efforts fournis pour l'accomplissement de ce travail.

Je tiens à remercier tout particulièrement mon encadrant de stage Monsieur JHILAL FAYSSAL qui ne s'est pas attardée à m'orienter et me donner des conseils fructueux durant toute la période de stage, et pour toutes les heures qu'elle a consacrées à me diriger. Je tiens à lui exprimer tout mon respect et ma plus grande reconnaissance.

Je tiens à exprimer ma profonde reconnaissance à mon encadrant Monsieur SAFFAJ TAOUFIQ, qui m'a accordé de son temps précieux, pour son soutien, sa disponibilité pour mener à bien ce modeste projet.

J'exprime aussi mes sincères remerciements au personnel du laboratoire Monsieur BENADDI MOHAMED, et GHAZZALI ILHAM pour leur gentillesse, leur soutien et leur précieuse assistance avec une agréable ambiance de travail.

Je remercie également aux membres du jury de m'avoir honoré de leur présence et de porter leur jugement sur ce modeste travail

Pour la même occasion, je remercie tout le cadre professionnel et administratif de la Faculté des Sciences et Techniques de Fès qui ont contribué à notre formation tout le long de nos études universitaires.

Sommaire

Introduction générale.....	1
Chapitre 1 : Revue bibliographique	2
1 Généralité sur les médicaments	3
1.1 Définition	3
1.2 Les médicaments princips.....	3
1.3 Les médicaments génériques.....	3
1.4 Comparaison entre médicament générique et princips.....	4
1.5 Composition d'un médicament.....	5
1.6 Les comprimés	7
1.6.1 Définition	7
1.6.2 Les formes des comprimés	7
2 La méthode de dosage par HPLC	8
2.1 Définition	9
2.2 Principe	9
3 Validation des procédures analytiques	11
3.1 Définition	12
3.2 Aspect réglementaire	13
3.3 But de la validation analytique	14
3.4 Critères de validation	14
3.4.1 Spécificité.....	15
3.4.2 Fonction de réponse (courbe d'étalonnage)	16
3.4.3 Exactitude	16
3.4.4 Justesse	16
3.4.5 Fidélité	16
3.4.6 Limite de détection LOD	17
3.4.7 Limite de quantification LOQ	18
3.4.8 Linéarité	19
3.4.9 Intervalle de mesure	19
3.4.10 Robustesse	19
4 Notion de validation par profil d'exactitude	19
4.1 Principe	19
4.2 Avantage de l'approche de l'erreur totale.....	20
4.3 Etapes de validation par l'approche de l'erreur totale	21
4.4 Fonction de réponse.....	21
4.5 Alignement des observations	22
4.6 Calcul des concentrations prédites inverses	22
4.7 L'estimation de la justesse et de la fidélité.....	22

4.7.1	Calcul de la fidélité.....	23
4.7.2	Calcul de la justesse	24
4.8	Calcul des intervalles de tolérance	24
4.9	Construire le profil d'exactitude	25
Chapitre 2 :		26
Matériels et Méthodes		26
1	Méthode de dosage de l'Azithromycine dans une forme pharmaceutique par HPLC.....	27
1.1	Présentation du principe actif.....	27
1.1.1	Azithromycine.....	27
1.1.2	Propriétés physico-chimiques.....	27
1.2	Matériels	28
1.2.1	Appareillage	28
1.2.2	Verreries et autres	28
1.2.3	Réactifs.....	29
1.3	Méthode.....	30
1.3.1	Mode opératoire.....	30
Chapitre 3 : Validation de la méthode de dosage de l'Azithromycine par HPLC		32
1	Validation de la méthode de dosage de l'Azithromycine par HPLC selon le profil d'exactitude	33
1.1	Standards d'étalonnage	33
1.2	Standards de validation.....	34
1.3	Conformité de la spécificité	34
1.4	Linéarité	35
1.5	Fonction de réponse.....	36
1.6	Prédiction inverse	37
1.7	Calcul de la justesse	39
1.8	Calcul de la fidélité.....	40
1.9	Intervalle de tolérance et exactitude	42
1.10	Profil d'exactitude.....	43
1.11	Limites de détection et de quantification	45
Conclusion générale		47

Liste des abréviations

HPLC : *Chromatographie Liquide à Haute Performance.*

PA : *Principe actif.*

ISO : *Organisation internationale de standardisation.*

ICH : *Conférence international d'harmonisation.*

CV : *Coefficient de variation.*

SFSTP : *Société française de sciences et techniques et pharmaceutiques.*

FDA : *Agence fédérale américaine des produits alimentaires et médicamenteux.*

LOQ : *Limite de quantification*

LOD : *Limite de détection*

UIPAC : *Union internationale de chimie pure et appliquée*

Liste des figures

Figure 1 : Appareillage HPLC.....	9
Figure 2 :La détection en HPLC.....	11
Figure 3 :Cycle de vie d'une méthode analytique	12
Figure 4 :Exemple de profil d'exactitude.	25
Figure 5 :Azithromycine.....	27
Figure 6 :Préparation de la gamme du principe actif.....	31
Figure 7 :Courbe d'étalonnage.....	33
Figure 8 :Chromatogramme du blanc.....	34
Figure 9 :Chromatogramme du principe actif seul.....	35
Figure 10 :Chromatogramme de la forme pharmaceutique reconstituée.....	35
Figure 11 :Droite de régression linéaire entre les quantités prédites et les quantités introduites...	36
Figure 12 :Profils d'exactitude de l'Azithromycine ($\beta = 95\%$, $\lambda = \pm 5\%$.) . (1: linéaire 0-max, 2 :linéaire simple ,3 : Racine carré ,4 : Quadratique ,5 : Logarithme ,6 :linéaire pondéré 1/X,7 :Quadratique pondéré 1/X).	44

Liste des Tableaux

Tableau 1: Critères de validation analytique.....	15
Tableau 2: Les différences entre les niveaux de fidélité.....	17
Tableau 3: Exemples de fonction de réponse	21
Tableau 4 : Calcul des prédictions inverses pour différentes fonctions de réponse.....	22
Tableau 5: Equipements utilisés.....	28
Tableau 6: Verreries et autres matériels utilisés.....	29
Tableau 7: Réactifs utilisés et précautions.....	29
Tableau 8: Préparation des standards d'étalonnage	30
Tableau 9: Conditions chromatographiques de l'étude	31
Tableau 10 : Les données des standards d'étalonnage.....	33
Tableau 11 : Les données de standards de validation.....	34
Tableau 12 : Paramètre de régression des différents modèles	37
Tableau 13 : Prédiction inverses des modèles envisagées	39
Tableau 14 : Estimation de la justesse obtenus par différents modèles.....	40
Tableau 15 : Estimateurs de fidélité obtenus avec les principaux modèles	41
Tableau 16 : Intervalles de tolérance des modèles	42
Tableau 17: Limites de détection et de quantification	46

Introduction générale

L'industrie pharmaceutique est l'une des industries les plus importantes par son poids économique dans le monde entier et qui regroupe les activités de recherche, de fabrication et de commercialisation des médicaments en considérant un médicament comme toute substance ou composition 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, corriger ou modifier leurs fonctions physiologiques en exerçant une action pharmacologique, immunologique ou métabolique.

Actuellement, de nouveaux concepts scientifiques apparaissent afin de faire évoluer la validation des méthodes analytiques. Dans ce contexte, la validation d'une méthode d'analyse représente également un des principaux outils de l'assurance qualité, permettant de construire la qualité de produit et d'en conserver les standards depuis sa conceptions jusqu' à la fin de sa commercialisation ainsi elle est fondée sur une analyse statistique basée sur un certain nombre de critères permettant de donner des résultats fiables et traçables. Donc, le principe de la validation des procédures analytiques quantitatives est largement répondu dans tous les domaines d'activité où des mesures sont réalisées. Le champ d'application de la validation analytique s'étend à toute procédure d'analyse utilisée dans le secteur de contrôle de la matière première, le développement galénique, le contrôle en cours de fabrication, le contrôle des produits et les essais de stabilité dont l'objectif d'aider les spécialistes du médicament à appliquer les recommandations réglementaires concernant la validation. C'est dans ce cadre que se situe ce projet effectué au laboratoire de l'université Mohamed VI des sciences de santé de CASABLANCA dont l'objectif principal de ce travail est la validation analytique d'une méthode de dosage par chromatographie liquide à haute performance de l'Azithromycine afin de démontrer que la procédure correspond à l'usage pour lequel elle est prévue et qu'elle donne régulièrement des résultats escomptés et fiables. Ce travail comporte trois chapitres :

- Le premier est consacré à l'étude bibliographique du projet dans laquelle nous présentons une généralité sur les médicaments, le dosage par chromatographie liquide à haute performance HPLC et la validation analytique par l'approche de l'erreur total.
- Le deuxième chapitre est dédié à la présentation de la méthodologie de travail et du matériel utilisé au cours de l'étude.
- Dans le troisième chapitre, les résultats obtenus au cours de la validation de la méthode de dosage de l'Azithromycine inclus dans les comprimés à libération conventionnelle.

Chapitre 1 :
Revue bibliographique

1 Généralité sur les médicaments

1.1 Définition

D'après la loi 17-04, portant code du médicament et de la pharmacie [1]: « On entend par médicament toute substance ou composition présentée comme possédant des propriétés curatives ou préventives à l'égard des maladies humaines ou animales, ainsi que tout produit pouvant être administré à l'homme ou à l'animal en vue d'établir un diagnostic médical ou de restaurer, corriger ou modifier leurs fonctions organiques » ,on est aujourd'hui confrontés à deux grandes catégories de médicament sur le marché : les médicaments génériques et les autres, qu'on appelle les princeps.

1.2 Les médicaments princeps

Un médicament original ou princeps est un médicament découvert par un laboratoire qui en garde l'exclusivité. Après plusieurs années, d'autres laboratoires ont le droit de produire un médicament identique à ce princeps : Fabriqué avec la même molécule, ce médicament est appelé générique.

1.3 Les médicaments génériques

La première définition juridique en France du médicament générique fut donnée par la Commission de la Concurrence à l'occasion d'une décision du 21 mai 1981 : « On entend par médicament générique, toute copie d'un médicament original dont la production et la commercialisation sont rendues possibles par la chute du brevet dans le domaine public, une fois écoulée la période légale de protection. Peuvent être considérés comme des génériques aussi bien des médicaments vendus sous nom de marque ou appellation de fantaisie que des médicaments sous dénomination commune internationale ou des principes actifs qu'ils renferment, dénomination qui doit être assortie d'une marque ou du nom du fabricant ».

Suite à la loi 17-04 au Maroc portant code de médicament et de pharmacie définit le générique dans l'article 2 comme « La spécialité générique d'une spécialité de référence qui est considérée comme une spécialité qui a la même composition qualitative et quantitative en principes actifs et la même forme pharmaceutique que la spécialité de référence et dont la que la spécialité de référence, et dont la bioéquivalence avec cette dernière a été démontrée par des études appropriées de biodisponibilité. La spécialité de référence et la ou les spécialités qui en sont générique(s) constituent un groupe générique. » [2].

Le médicament générique est présenté comme spécialité essentiellement similaire, c'est-à-dire présentant la même composition qualitative et quantitative en ce qui concerne les principes actifs, la forme pharmaceutique, la voie d'administration, ainsi que les normes de qualité [3].

Le fabricant du générique doit :

- ✓ Obtenir un produit exempt d'impuretés avec la même manière que pour le produit d'origine.
- ✓ Assurer les mêmes conditions de stabilité contre un effet de la lumière, de la chaleur, de l'humidité, ou de l'oxygène s'il existe.
- ✓ S'assurer de la conformité avec le matériel de conditionnement.
- ✓ Obtenir l'uniformité pour tous les principes actifs qui composent les produits finis similaire à l'original.

1.4 Comparaison entre médicament générique et princeps

Le médicament générique est une notion très encadrée mais pas nécessairement une copie strictement identique de l'originale, il peut avoir :

- ✓ La même composition qualitative et quantitative en principe actif que le médicament de référence.
- ✓ Les procédures et la réglementation sont identiques à celle du médicament d'origine et répondent aux normes de fabrication similaire à celle du médicament d'origine.
- ✓ Il est fabriqué dans un laboratoire pharmaceutique, agréé par les autorités, et il est soumis à la même réglementation et suit le même contrôle de fabrication que celle de l'origine [4].
- ✓ Les mêmes propriétés de biodisponibilité que le médicament original, c'est-à-dire la même vitesse d'absorption et d'assimilation par l'organisme.
- ✓ Le médicament générique peut contenir des excipients différents qui permettent de lui donner certaines particularités « esthétiques » (goût, couleur, aspect...) mais surtout sa forme, sa stabilité ou sa capacité de dissolution, L'excipient participe donc pleinement de la capacité du médicament à agir [5].
- ✓ Le médicament générique peut ainsi être intéressant car il peut ne pas contenir un excipient à effet notoire contenu dans le princeps.
- ✓ Le médicament générique a l'avantage d'offrir pour le malade le même traitement que le médicament original avec un moindre coût.

Dès lors, la différence entre le médicament générique et le médicament princeps ne devrait pas être perçue comme une différence de qualité mais de prix en rapport avec une différence d'investissement. En effet les coûts de recherche et développement ainsi que les coûts de promotion du médicament

princeps sont beaucoup plus élevés. Les médicaments génériques offrent donc la possibilité d'économiser sur le coût des soins de santé [6].

1.5 Composition d'un médicament

Dans la formule d'un médicament, on trouve :

Une espèce chimique généralement présente en faibles proportions, ayant des propriétés thérapeutiques : ***le principe actif (PA)***.

Les substances actives peuvent être des éléments ou des composés chimiques ainsi que des mélanges et des solutions naturelles qui sont issus d'origine microbienne (les vaccins), végétales ou animales. Les substances actives peuvent aussi être obtenues par synthèse chimique ou par des techniques de biotechnologie [7].

-Des substances présentes en plus grosses proportions jouant le rôle d'agents de consistance ou « diluants » pour obtenir la forme galénique souhaitée (sirop, comprimé, comprimé effervescent, gélule, solution injectable, suspension buvable, granules, spray, suppositoire, pommade, ...) : ***les excipients***.

Par définition l'excipient est une substance chimique neutre dans laquelle on incorpore un principe actif pour permettre sa mise en forme galénique qui peut jouer un rôle notamment dans l'absorption du principe actif par l'organisme, la stabilité et la conservation du médicament, donner au médicament des caractéristiques organoleptiques selon l'observance par le patient (cela est rendu possible par les diverses fonctions dont ils peuvent bénéficier : diluant, délitant, liant, lubrifiant, mouillant, absorbant, filmogène, adjuvant, stabilisant, épaississant, émulsifiant, antioxydant, conservateur anti-microbien, colorant, aromatisant, etc.), et aider à la mise en forme pharmaceutique et la facilité d'administration (excipients pour pommade facilitant la pénétration d'une molécule médicamenteuse). A l'heure actuelle, il existe plusieurs classes d'excipients, classées par catégories [8]:

Par origine : On peut différencier entre deux catégories d'excipients :

- ✓ Origine organique (≈ 90%)
- ✓ Origine minérale (≈ 10%).

Par fonction : Au sein des deux grands groupes précédents, les excipients sont divisés en fonction de la classe chimique à laquelle ils appartiennent.

Certains excipients sont dits à effet notoire, c'est-à-dire qu'ils sont contre indiqués ou peuvent nécessiter des précautions d'emploi chez certains patients. Si le génériqueur change l'excipient, il

faudra démontrer la sécurité et l'innocuité de ce changement sur un plan toxicologique et pharmacologique [9], il existe différentes formes d'excipients :

- **Les diluants :**

Poudres généralement inertes, ils jouent un rôle de remplissage lorsque la quantité de principe actif est insuffisante pour faire un comprimé de taille suffisante. Par exemple :

- ❖ Les sucres (lactose, mannitol, saccharose)
- ❖ Les sels (phosphate dicalcique, tricalcique, sulfate de calcium, carbonate de calcium, chlorure de sodium)
- ❖ Amidons natifs et la cellulose microcristalline

La vitesse de dissolution augmente avec les diluants hydrophiles, le changement de la concentration du diluant ou le changement du diluant lui-même peut changer la vitesse de dissolution des comprimés [10].

- **Les désagrégeants ou délitants :**

Les délitants accélèrent la désintégration du comprimé en fragments et particules, exposant et dispersant ainsi une certaine quantité du principe actif dans le milieu physiologique (eau et suc gastrique) [11]. Par exemple : l'amidon, la gélatine. Ils se gonflent dans l'eau et favorisent la pénétration de l'eau dans le comprimé et l'écartement des granules [12].

- **Les lubrifiants :**

Les lubrifiants sont ajoutés en phase externe, ils donnent un aspect brillant et non poussiéreux aux comprimés, Leur dose d'utilisation est généralement faible : 0,2 à 5%. Ils jouent un rôle sur les propriétés rhéologiques des granules et sur les opérations de compression. Les lubrifiants généralement utilisés sont : le stéarate de magnésium, l'acide stéarique, les dérivés glycéridiques, l'huile de coton hydrogéné, la paraffine solide, le polytétrafluoroéthylène, le talc, l'huile de ricin hydrogénée, le lauryl sulfate de sodium et la silice pure colloïdale [13].

Les lubrifiants peuvent augmenter ou diminuer la vitesse de dissolution. La plupart des lubrifiants sont hydrophobes, ils forment ainsi un film hydrophobe autour du comprimé retardant ainsi la pénétration du milieu de dissolution à l'intérieur du comprimé, et ralentit la vitesse de dissolution [14].

- **Les agglutinants ou liants :**

Ils combinent les particules du comprimé, la quantité du liant varie selon sa nature et celle du principe actif. Ex : gomme arabique, gélatine, sorbitol en solution, etc [15].

Le liant fournit la cohésion aux particules lors de la compression, une quantité excessive de celui-ci augmente la dureté et le temps de désintégration et par conséquent elle ralentie la vitesse de dissolution.

1.6 Les comprimés

1.6.1 Définition

Les comprimés sont des préparations solides contenant une unité de prise d'une ou plusieurs substances actives. Ils sont obtenus en agglomérant par compression un volume constant de particules ou par un autre procédé de fabrication approprié tel que l'extrusion, le moulage ou la cryodessiccation (lyophilisation). Les comprimés sont destinés à la voie orale. Certains sont avalés ou croqués, d'autres sont dissous ou désagrégés dans de l'eau avant administration, certains, enfin, doivent séjourner dans la bouche pour y libérer la substance active. Les particules sont constituées d'une ou plusieurs substances actives, additionnées ou non d'excipients tels que : diluants, liants, désagrégant, agents d'écoulement, lubrifiants, composés pouvant modifier le comportement de la préparation dans le tube digestif, colorants autorisés par l'autorité compétente, aromatisants [16].

1.6.2 Les formes des comprimés

1.6.2.1 Les formes à libération conventionnelle :

Ce sont les comprimés généralement non enrobés dont le délitement est obtenu dans l'estomac. C'est le type des comprimés le plus généralement utilisé par le consommateur.

1.6.2.2 Les comprimés à libération modifiée :

Ils sont des comprimés enrobés ou non, préparés par des excipients spéciaux, ou par des procédés particuliers ou les deux, visant à modifier la vitesse, le lieu, ou le moment de libération du ou des principes actifs

- **Les formes à libération accélérée :**

Les comprimés à libération accélérée sont formulés de façon à obtenir un temps de désagrégation court. La vitesse de libération est plus élevée que celle d'une forme à libération immédiate. Ils comprennent :

- **Comprimés effervescents :**

Les comprimés effervescents sont des comprimés non enrobés contenant généralement des substances acides et des carbonates ou bicarbonates qui réagissent rapidement en présence d'eau en libérant du dioxyde de carbone. Ils sont destinés à être dissous ou dispersés dans l'eau avant administration.

○ Comprimés solubles :

Les comprimés solubles sont des comprimés non enrobés ou pellicules destinés à être dissous dans l'eau avant administration, la solution obtenue peut être légèrement opalescente en raison de la présence d'excipients ajoutés lors de la fabrication.

○ Comprimés dispersibles :

Les comprimés dispersibles sont des comprimés non enrobés ou pellicules destinés à être dispersés dans l'eau avant administration en donnant une dispersion homogène

○ Comprimés orodispersibles :

Les comprimés orodispersibles sont des comprimés non enrobés ou pellicules destinés à être placés dans la bouche (entre la joue et la gencive) où ils se dispersent rapidement avant d'être avalés.

○ Lyophilisats oraux :

Ce sont des préparations solides destinées à être placées dans la bouche, soit être dispersée (ou dissoute) dans de l'eau avant administration en présence de salive.

● Les formes à libération retardée :

Ces formes galéniques sont destinées à libérer le principe actif à un moment différent par rapport à une forme conventionnelle. Ce sont par exemple les comprimés gastro-résistants, formulés de façon à résister aux sucs gastriques puis à se désagréger dans l'intestin. Ils ne doivent pas être écrasés. Leur but est de protéger le principe actif contre une dégradation par les acides de l'estomac, et la muqueuse gastrique contre une irritation par le principe actif.

● Les formes à libération prolongée :

La libération prolongée d'un principe actif est celle pour laquelle la dose unitaire totale est retenue au sein d'un système contrôlant la vitesse de libération. La rétention du principe actif peut être faite par son inclusion dans un excipient insoluble dans les liquides de l'organisme qui forme ainsi une espèce de matrice à partir de laquelle le principe actif sera libéré lentement. La libération prolongée est caractérisée par une vitesse de libération du principe actif plus lente que dans le cas de libération conventionnelle.

2 La méthode de dosage par HPLC

La chromatographie est une méthode de séparation des constituants d'un mélange même très complexe. Elle est basée sur les différentes affinités d'un ou plusieurs composés à l'égard de deux

phases (stationnaire et mobile).

2.1 Définition

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

2.2 Principe

La chromatographie en phase liquide à haute performance (**Figure 1**) repose sur la séparation de plusieurs composés dans un échantillon grâce à une colonne chromatographique, appelée phase stationnaire, par pompage d'un solvant, appelée phase mobile, à travers la colonne selon l'affinité de chaque composant existant entre la phase mobile et stationnaire. Les composés migrent le long de la colonne à différentes vitesses et ressortent à différents temps, établissant ainsi une séparation du mélange. La phase mobile poussée par une pompe sous haute pression, parcourt le système chromatographique. Le mélange à analyser est injecté puis transporté à travers du système chromatographique. Les composés en solution se répartissent alors suivant leur affinité entre la phase mobile et la phase stationnaire. En sortie de colonne grâce à un détecteur approprié les différents solutés sont caractérisés par un pic. L'ensemble des pics enregistrés est appelé chromatogramme. Le signal du détecteur est amplifié et enregistré, la température du four est maintenue constante.

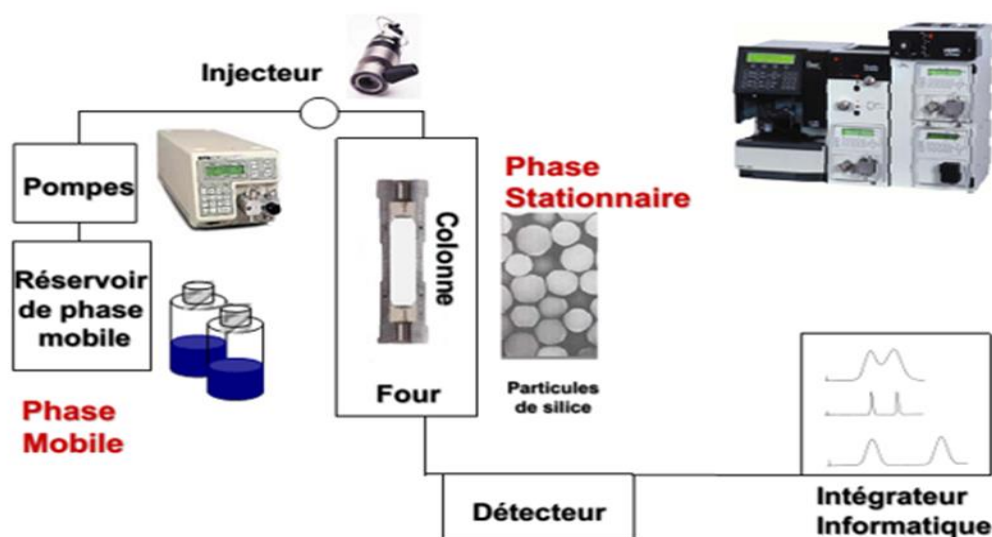


Figure 1 : Appareillage HPLC

Les appareils de Chromatographie sont constitués de :

- **Réservoir de la phase mobile (solvant) :** Le plus souvent ce réservoir est une bouteille en verre dans lequel plonge un tube avec une extrémité filtrante en téflon. Le réservoir de la phase mobile contient la phase mobile en quantité suffisante. Plusieurs flacons d'éluant (solvant de polarités différentes) sont disponibles pour pouvoir réaliser des gradients d'élution (mélange de plusieurs solvants à des concentrations variables) à l'aide de la pompe qui réalise le mélange demandé.
- **Un système d'injection de l'échantillon :** L'injection de l'échantillon se fait de deux manières :
 - Manuelle : L'injecteur comporte une vanne à plusieurs voies montée sur le parcours de la phase mobile, juste avant la colonne. L'échantillon à analyser est introduit avec une micro-seringue dans un petit volume tubulaire appelé boucle ; l'échantillon est ainsi inséré avec un flux de phase mobile.
 - Automatique : L'injection se fait automatiquement, il comporte une vanne à boucle d'échantillonnage d'une capacité fixe, cette boucle permet d'introduire l'échantillon sans modifier la pression dans la colonne.
- **Une colonne :** Est l'élément majeur de la chaîne HPLC, C'est un tube cylindrique compact qui renferme des microparticules qui jouent le rôle de la phase stationnaire. Il existe deux modes :
 - La phase normale : Cette phase 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.
 - La phase inverse : La plupart des colonnes actuelles utilisées en HPLC sont peu polaires et hydrophobes. Cette phase est majoritairement composée de gel de silice greffée par des chaînes linéaires de 18 atomes de carbones (C18) alors il nécessite un éluant polaire. Dans ce cas, ce sont les composés polaires qui seront élués en premier.
- **Un détecteur :** Il permet d'analyser chaque composé à sa sortie de la colonne. Le détecteur le plus utilisé en HPLC est un spectrophotomètre d'absorption UV-visible. La détection est basée sur la loi de Lambert-Beer :

$$A = \epsilon_{\lambda} l c$$

L'absorbance A de la Phase mobile est mesurée à la longueur d'onde λ ou plusieurs longueurs à la sortie de la colonne.

Il existe plusieurs autres détecteurs (Spectrométrie de masse ; Fluoromètre ; électrochimie ; Résonance Magnétique Nucléaire...) qui peuvent être présentés comme suivant (**Figure 2**):

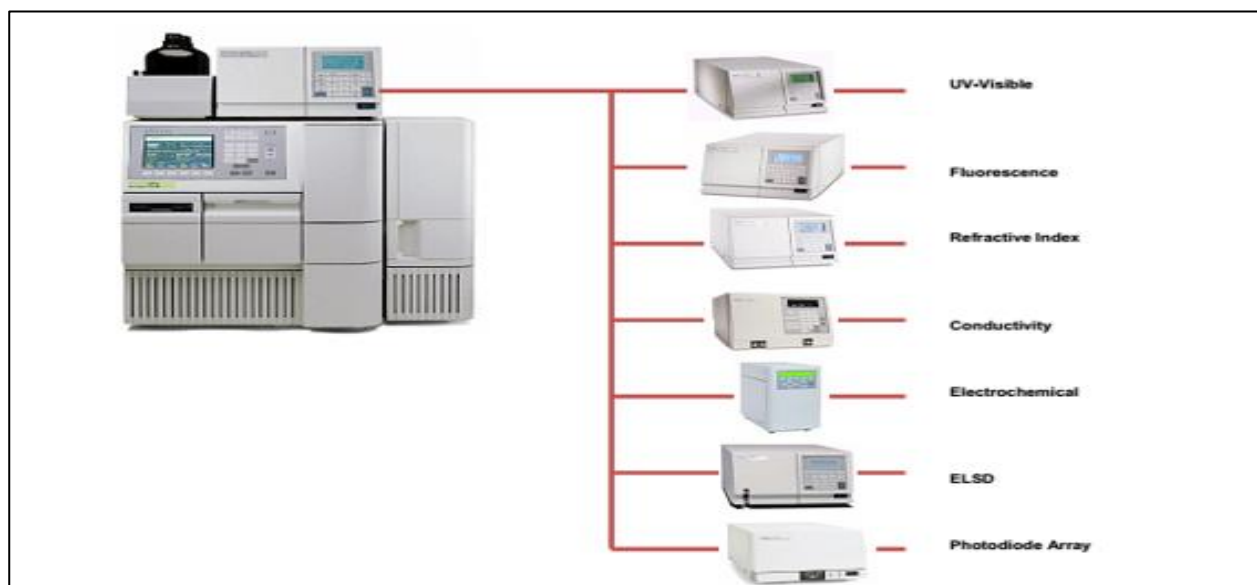


Figure 2: La détection en HPLC

- **Une pompe :** Elle délivre en continu la phase mobile. Elle est définie par la pression qu'elle permet d'atteindre dans la colonne, son débit, et la stabilité du flux. Elle doit fournir la phase mobile à un débit constant à une certaine pression pour atteindre la colonne. Elle permet de travailler soit :
 - En mode isocratique, c'est à dire avec 100% d'un même éluant tout au long de l'analyse.
 - En mode gradient, c'est à dire avec une variation des constituants du mélange d'éluant.
- **D'un système d'enregistrement et/ou d'analyse des chromatogrammes ;**

Le choix d'une colonne HPLC est lié aux diamètres des particules, longueur et type de phase stationnaire, et le débit supportable de la phase mobile

3 Validation des procédures analytiques

Dans la pratique courante, après l'étape d'optimisation, il devient de plus en plus évident et essentiel de démontrer au moyen de la validation qu'une méthode optimisée correspond à l'usage attendu tout en fournissant, par ailleurs, des résultats fiables. La validation est utilisée dans différents secteurs pharmaceutiques, agroalimentaires, environnementales, et industriels dans les domaines suivants :

- les méthodes non normalisées ;
- les méthodes conçues/développées par le laboratoire ;
- les méthodes normalisées employées en dehors de leur domaine d'application prévu ;

- les amplifications ou modifications de méthodes normalisées ;
- et aussi une méthode alternative par rapport à une méthode de référence.

3.1 Définition

Selon la **FDA** : La validation d'une méthode d'analyse « consiste à démontrer, avec un degré de confiance élevé et sous une forme documentée, que la méthode permet d'obtenir un résultat analytique qui atteint les spécifications définies à l'avance » [17].

D'après La norme ISO / CEI 17025 la validation est défini comme « La confirmation par examen et la fourniture de preuves objectives que les exigences particulières pour l'usage spécifique prévu sont remplies » [18].

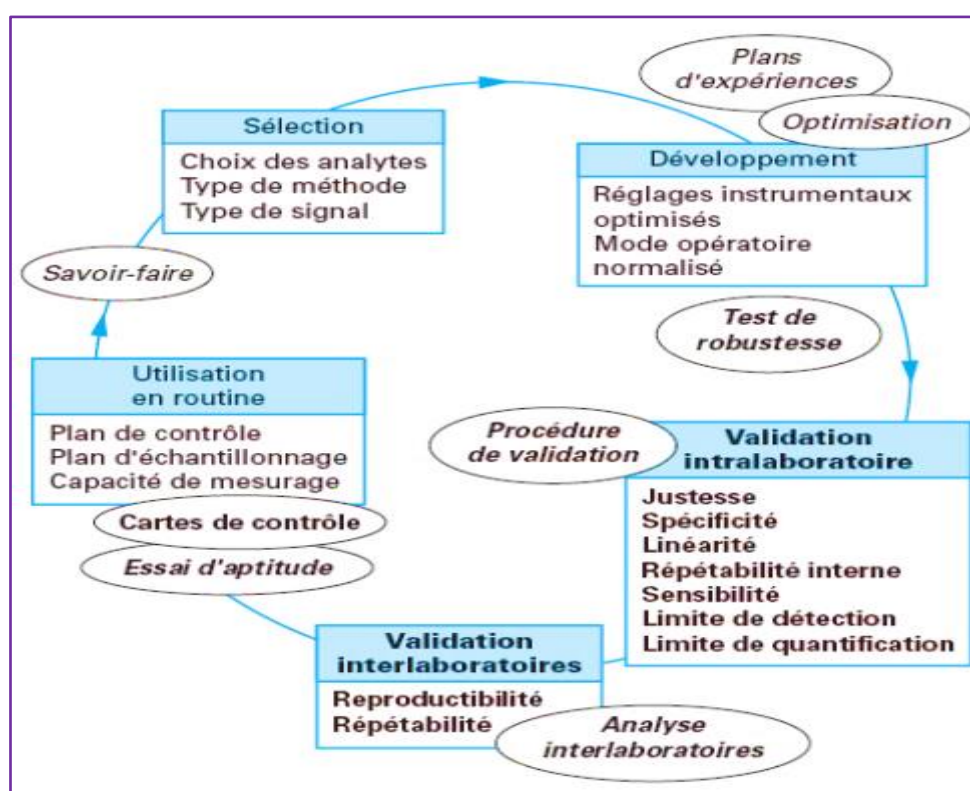


Figure 3: Cycle de vie d'une méthode analytique

La mise en œuvre d'une méthode d'analyse peut être décomposée en plusieurs étapes (**Figure3**) : sélection, développement, validation, études inter laboratoires, et l'utilisation en routine. Les principales étapes de ce cycle sont les suivantes :

- **Etape préliminaire** : Correspond à la mise en œuvre d'une méthode pour un client, et pour un usage spécifié ;
- **Sélection** : Définir les besoins et sélectionner des outils, des analytes, et par conséquent choisir la bonne méthode;

- **Phase de développement / optimisation de la méthode** : Optimiser les différentes étapes du mode opératoire (en l'absence de méthode préexistante pour le domaine d'application considéré).
- **Validation** : Caractérisation intra laboratoire et, au besoin, inter-laboratoires, de la méthode. La première concerne principalement les méthodes analytiques destinées à être utilisées dans les laboratoires, et concerne les méthodes analytiques développées au sein d'un laboratoire. Ce type de validation est généralement utilisée en industrie agro-alimentaire. En effet, il faut impérativement réaliser une validation inter-laboratoire pour des méthodes destinées à mesurer la conformité d'une denrée lors d'un échange commercial ;
- **L'application en routine** : Le plus souvent est une validation en routine et parfois une validation partielle. A l'issue de ces étapes, l'utilisation en routine de la méthode peut être envisagée. La revue périodique de la méthode peut donner lieu à un besoin de revalidation ou d'un nouveau développement ;
- **Revalidation** : La revalidation fournit l'évidence que les changements dans un procédé et / ou son environnement, introduits intentionnellement ou involontairement, n'affectent pas négativement le procédé et la qualité du produit. Il existe deux catégories principales de revalidation :
 - La revalidation lorsqu'il y a eu un changement au niveau du procédé.
 - La revalidation périodique à intervalles réguliers. En effet, même des changements mineurs qui, individuellement ne requièrent pas de revalidation peuvent, par effet cumulatif sur une période déterminée, affectés l'état validé du procédé.

3.2 Aspect réglementaire

Dans la littérature on trouve différents textes réglementaires :

- Les documents ISO 5725 (Afnor X06-041).
- Le document ISO 17025.
- Les documents ICH (International Conference on Harmonization) validation analytique : Q2: «Analytical Validation» :
 - Q2A: «Text on Validation of Analytical Procedures»: Présente une discussion sur les caractéristiques qui doivent être prises en compte au cours de la validation des méthodes analytiques.
 - Q2B: «Methodology» : Son but est de fournir des conseils et recommandations sur la manière d'appréhender les différentes caractéristiques de la validation pour chaque méthode

analytique. En outre, le document fournit une indication sur les données qui devraient être présentées dans un dossier d'enregistrement.

- Les documents FDA (Guidance for Industry),
- La décision 2002/657/CEE (Sanco) de la Commission européenne. Par ailleurs, ainsi qu'en témoigne la bibliographie, la validation des procédures de dosage est un vaste sujet qui intéresse tant le monde scientifique que réglementaire depuis des années.

Certains d'entre eux ont également servi de support au présent guide :

- Les documents SFSTP (Société Française des Sciences Techniques et Pharmaceutiques) :
 - SFSTP « Guide de validation analytique – Rapport d'une commission SFSTP »
 - SFSTP « Méthodes chromatographiques de dosage dans les milieux biologiques : stratégie de validation. Rapport d'une commission SFSTP » paru dans STP Pharma Pratique en 1997;
 - SFSTP « Validation des procédures analytiques quantitatives : Harmonisation des démarches »

3.3 But de la validation analytique

La validation des méthodes analytiques a pour principal objectif de développement d'une nouvelle méthode analytique avant son application en analyse de routine, elle doit s'assurer qu'une méthode analytique donnée donnera des résultats suffisamment fiables et reproductibles et évaluer les performances de la méthode par l'étude d'un certain nombre de critères au moyen des outils statistiques appropriés en appliquant correctement à la fois les conditions dans lesquelles la méthode sera utilisée et le but dans lequel elle sera employée . D'une autre façon : « Le but de la validation d'une procédure analytique est de démontrer qu'elle correspond à l'usage pour lequel elle est prévue » [19] [20].

3.4 Critères de validation

La validation est basée sur des critères couramment utilisés peut être résumer dans le tableau suivant (spécificité, linéarité, justesse, fidélité, limite de détection, limite de quantification et robustesse.):

Type de tests caractéristiques	Dosage	Impuretés		Identification
		Quantitatif	Essais limites	
Exactitude	✓	✓		
Fidélité Répétabilité	✓	✓		
Fidélité Fidélité intermédiaire	✓	✓		
Spécificité/sélectivité	✓	✓	✓	✓
Limite de détection		✓	✓	
Limite de quantification		✓		
Linéarité	✓	✓		
Intervalle de mesure	✓	✓		
Robustesse	✓	✓		

Tableau 1: Critères de validation analytique

3.4.1 Spécificité

La spécificité d'une procédure analytique est sa capacité à établir de manière univoque l'existence de la substance à analyser en présence d'autres composants normalement présents, il comporte :

- **Identification** : Vérifier l'identité de la substance analysée, il peut être effectués par comparaison d'une propriété de l'échantillon (spectre, comportement chromatographique, réactivité chimique, etc.)
- **Pureté** : vérifier que les analyses permettent de déterminer avec exactitude la teneur en impuretés de la substance analysée (substances apparentées, métaux lourds, résidus de solvants, etc.)
- **Dosage** : Donner un résultat fiable et exact de la concentration ou l'activité de la substance analysée dans l'échantillon.

La spécificité peut être démontrée de deux façons :

- Soit en comparant les chromatogrammes obtenus à partir des solutions précédemment préparées : les chromatogrammes obtenus à partir de la solution standard 100% et l'échantillon 100%, ils doivent présenter des pics au même temps de rétention et avec des surfaces comparables et les chromatogrammes obtenus à partir du diluant et de la solution placebo ne doivent pas présenter un pic au même temps de rétention que l'analyte étudié.

- Soit par la comparaison de la droite obtenue avec les standards de validation (principe actif avec la forme pharmaceutique reconstituée) avec celle obtenue à partir des standards d'étalonnage.

La plupart des interférences sont due à la présence d'autres constituants, on dit qu'on a un effet de matrice, les interférences ont deux effets sur la réponse qui occasionnent un biais de la justesse :

- ✓ Surestimation de la concentration si la réponse est plus grande que la réponse vraie.
- ✓ Sous-estimation de la concentration est partiellement masquée.

3.4.2 Fonction de réponse (courbe d'étalonnage)

La fonction de réponse d'une méthode analytique exprime la relation existante entre la réponse (signal) et la concentration (quantité) en substance à examiner à l'intérieur de l'intervalle de dosage. La courbe d'étalonnage traduit une fonction de réponse monotone la plus simple.

3.4.3 Exactitude

L'exactitude d'une procédure analytique exprime « l'étroitesse de l'accord entre la valeur acceptée comme conventionnellement vraie, ou comme valeur de référence, et la valeur trouvée » [21]. Cette étude peut se faire par l'utilisation d'un outil graphique qui repose sur une approche statistique fondée sur le calcul d'un intervalle de dispersion. Cet outil est le profil d'exactitude et il permet de statuer sur la validation de la performance de la méthode.

$$\text{Valeur trouvée} = x_i$$

$$\text{Vraie valeur} = \mu_T$$

$$\text{Exactitude du résultat} = x_i - \mu_T$$

3.4.4 Justesse

La justesse exprime l'étroitesse de l'accord entre la valeur moyenne obtenue à partir d'une série de résultats d'essais et une valeur qui est acceptée soit comme une valeur conventionnellement vraie, soit comme une valeur de référence acceptée. La justesse est étudiée pour chaque niveau de concentration avec ou sans la matrice. Ces niveaux sont communément appelés « standards de validation ».

3.4.5 Fidélité

La Fidélité d'une procédure analytique exprime « l'étroitesse de l'accord (mesure de la dispersion) entre une série de mesures obtenues à partir de plusieurs prises d'essai provenant d'un même échantillon homogène, dans les conditions prescrites ». La fidélité traduit uniquement la distribution des erreurs aléatoires et n'a aucune relation avec la valeur vraie ou spécifiée. La mesure de fidélité

est calculée à partir de l'écart-type des résultats d'essais et peut être exprimée sous forme de coefficient de variation (CV). Elle peut être considérée à 3 niveaux (**Tableau 2**): répétabilité, fidélité intermédiaire et reproductibilité[20].

- **Répétabilité : INTRA-LABORATOIRE**

Conditions où les résultats d'essai indépendants sont obtenus par la même méthode sur des individus d'essai identiques dans le même laboratoire, par le même opérateur, utilisant le même équipement et pendant un court intervalle de temps.

- **Fidélité intermédiaire : INTRA-LABORATOIRE**

Conditions où les résultats d'essai indépendants sont obtenus par la même méthode sur des individus d'essai identiques dans le même laboratoire, avec différents opérateurs et utilisant des équipements différents et pendant un intervalle de temps donné.

- **Reproductibilité : INTER-LABORATOIRE**

Conditions où les résultats d'essai indépendants sont obtenus par la même méthode sur des individus d'essai identiques dans différents laboratoires avec différents opérateurs, utilisant des équipements différents.

Il convient si possible d'étudier simultanément la répétabilité et la fidélité intermédiaire, même si ces caractéristiques sont décrites séparément dans les normes, réglementations ou référentiels.

Fidélité	Échantillon	Méthode	Laboratoire	Opérateur	Équipement	Jour
Répétabilité	Même	Même	Même	Même	Même	Même
Fidélité intermédiaire	Même	Même	Même	Différent	Différent	Différent
Reproductibilité	Même	Même	Différent	Différent	Différent	Différent

Tableau 2: Les différences entre les niveaux de fidélité

3.4.6 Limite de détection LOD

La limite de détection d'une procédure analytique est la plus petite quantité d'une substance qui peut être détectée mais non nécessairement quantifiée comme une valeur exacte. Généralement, il existe différentes méthodes universelles pour la détermination de LOD et différentes méthodes ont été proposées dans quelques guides. L'AOAC exige 20 blancs à mesurer et 10 pour EURACHEM.

L'estimation de LOD est obtenue à partir de l'estimation de l'écart-type du blanc : Le guide ICH Q2(R1) propose différentes approches pour l'évaluation de LOD :

- **Evaluation visuelle :**

L'évaluation visuelle peut être utilisée pour les méthodes non instrumentales et les méthodes instrumentales. La limite de détection est déterminée par l'analyse des échantillons de concentrations connues de l'analyte en démontrant le niveau minimal correspondant à la quantité détectée.

- **Rapport Signal/Bruit :**

Cette approche est destinée seulement aux méthodes d'analyse qui fournissent un enregistrement graphique. Il est estimé à partir du bruit de fond de l'enregistrement de blanc d'analyse sur un échantillon. La détermination du rapport signal/bruit est accomplie par la comparaison des signaux provenant des échantillons de concentrations d'analyte connues. Un rapport signal/bruit entre 3 et 2 :1 est accepté pour l'estimation de LOD.

- **Ecart-type de la réponse et la pente :**

Selon l'IUPAC la limite de détection (LOD) est estimée de la manière suivante :

$$LOD = 3.3 \times \frac{S_b}{a}$$

- ◆ S_b : L'écart-type de la réponse :
- ◆ a : La pente de la courbe d'étalonnage

3.4.7 Limite de quantification LOQ

La limite de quantification d'une procédure analytique est la plus petite quantité d'une substance qui peut être quantifiée avec une exactitude et une précision définie. La limite de quantification est estimée par :

- **L'évaluation visuelle :**

L'évaluation visuelle peut être utilisée pour les méthodes non instrumentales, mais peut également être utilisée avec méthodes instrumentales. La limite de quantification est généralement déterminée par l'analyse d'échantillons avec des concentrations d'analyte et en établissant le niveau minimal auquel l'analyte peut être quantifié avec une exactitude.

- **L'approche signal sur bruit :**

Cette approche ne peut être appliquée qu'aux procédures analytiques qui présentent un bruit de base. La détermination du rapport signal sur bruit est effectuée en comparant les signaux mesurés échantillons avec de faibles concentrations connues d'analyte avec ceux des échantillons à blanc et

par établir la concentration minimale à laquelle l'analyte peut être quantifié de manière fiable. Un rapport signal sur bruit typique est de 10:1.

- **L'écart type de la réponse et la pente**

La limite de quantification (LOQ) peut être exprimée comme suit :

$$LOQ = 10 \times \frac{S_b}{a}$$

3.4.8 Linéarité

La linéarité d'une procédure analytique donnée est sa capacité (à l'intérieur d'un intervalle donné) à fournir des résultats directement proportionnels à la concentration/quantité de la substance à analyser (dans l'échantillon) [20]. Autrement dit :

- Établir qu'il existe une relation linéaire entre les quantités retrouvées (ou quantifiées) dans des échantillons et leurs valeurs de référence.
- Établir un graphique des réponses obtenues en fonction de la concentration/teneur ; d'au moins cinq échantillons de concentrations différentes, et de procéder à une évaluation visuelle de ce graphique.

3.4.9 Intervalle de mesure

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

3.4.10 Robustesse

La robustesse d'une méthode d'analyse est une mesure de sa capacité à supporter sans conséquences de petites variations apportées délibérément aux paramètres de la méthode ; elle donne une idée de la fiabilité de la méthode aux conditions normales d'utilisation [20].

4 Notion de validation par profil d'exactitude

4.1 Principe

Le principe de la méthode du profil d'exactitude est une approche globale combinant justesse et fidélité de la méthode validée, et donc tenir compte de l'erreur totale de mesure (erreur systématique + erreur aléatoire). La différence entre une mesure x et sa vraie valeur μ doit être inférieure à la limite d'acceptation (λ) et peut s'écrire par l'équation suivante :

$$-\lambda < \mu - x < +\lambda \text{ ou } |\mu - x| < \lambda$$

Les quantités $-\lambda$ et $+\lambda$ représentent ces « distances raisonnables » maximales qu'un client est prêt à accepter. Elles forment ce qu'on appelle l'intervalle d'acceptabilité. En outre, cette approche peut également fournir des garanties en calculant la probabilité de produire des résultats situés dans les limites d'acceptabilité. Cette idée de fournir une garantie peut s'écrire sous la forme d'une probabilité supérieure ou égale à une proportion β :

$$P_r(-\lambda < \mu - x < +\lambda) \geq \beta$$

Avec β la proportion des mesures dans les limites d'acceptation, et λ la grandeur définissant les limites d'acceptation fixées en fonction des contraintes du secteur d'activité. La limite d'acceptation est de :

- 1% ou 2 % pour le dosage de principes actifs dans une matière première.
- 5% pour les formes pharmaceutiques
- 15 % pour les analyses dans les matrices biologiques ou environnementales.
- 10% pour la détermination des impuretés.

4.2 Avantage de l'approche de l'erreur totale

La méthode de validation reposant sur le concept de l'erreur totale en combinant les deux erreurs aléatoire et systématique, présente plusieurs avantages par rapport aux approches classiques :

- Elle est considérée comme une approche globale qui peut être appliquée quel que soit le domaine d'activité et la matrice étudiée.
- Elle propose une méthode d'interprétation graphique très simple et visuelle qui ne s'embarrasse pas de tests statistiques toujours délicats à décrypter. Son objectif est de servir les analystes plutôt que de les transformer en statisticiens.
- Elle permet de minimiser considérablement le risque d'accepter une procédure qui ne serait pas suffisamment exacte ou, au contraire, de rejeter une procédure qui serait exacte (dans les deux cas il s'agit d'améliorer significativement le rapport coût/efficacité des prestations).
- Elle permet de générer différents modèles d'étalonnage avec la possibilité de choisir le plus adéquat.

4.3 Etapes de validation par l'approche de l'erreur totale

On peut résumer l'approche de l'erreur totale en plusieurs étapes :

- Réalisation des expériences sur deux gammes
 - Une gamme de standards d'étalonnage.
 - Une gamme de standards de validation.
- Sélection des limites d'acceptation considérant l'usage attendu de la méthode.
- Ajustement d'un modèle de régression à partir des standards de calibration.
- Calcul des concentrations des standards de validation à partir du modèle sélectionné.
- Détermination du biais moyen à chaque niveau de concentration.
- Calcul des limites de tolérance bilatérales pour les résultats attendus au niveau β à chaque niveau de concentration en considérant le biais et l'écart type de fidélité intermédiaire.
- Etablissement du profil d'exactitude, représentant comme fonction de la concentration, le biais moyen, l'intervalle de tolérance des valeurs attendues au niveau β et les limites d'acceptation.

4.4 Fonction de réponse

La relation entre la réponse Y et la concentration X est exprimée à l'aide d'un modèle mathématique f de la forme :

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

On a différentes fonctions de réponses qui peuvent envisagées lors de la validation :

Type	Equation	Paramètres
Droite passant par l'origine	$Y = \beta X$	β
Droite linéaire	$Y = \alpha + \beta X$	β, α
Fonction quadratique	$Y = \alpha + \beta X + \gamma X^2$	β, α, γ
Transformation logarithmique	$\text{Ln}(Y) = \alpha + \beta \text{Ln}(X)$	β, α
Transformation racine carré	$\sqrt{Y} = \alpha + \beta \sqrt{X}$	β, α

Tableau 3: Exemples de fonction de réponse

4.5 Alignement des observations

Il est indispensable de vérifier que les niveaux de concentration, les quantités introduites sont identiques pour toutes les séries, sinon il est indispensable de procéder à un alignement sur la concentration moyenne.

Pour ce faire, cela consiste à transformer les réponses observées à des réponses calculés ($Y_{ijk} \rightarrow Y_{ijk,c}$) afin de les aligner sur la concentration moyenne. Cet alignement s'effectue par interpolation en ajoutant à la réponse observée la différence entre la valeur de β cette fonction à la concentration introduite :

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

4.6 Calcul des concentrations prédites inverses

Le plan d'étalonnage est exprimé par un modèle qui relie la réponse instrumentale Y avec les concentrations X. L'estimation des coefficients du modèle se fait par le calcul des paramètres de régression sur les données d'étalonnage. Les concentrations retrouvées sont réalisées sur les données du plan de validation. Le tableau suivant récapitule les prédictions inverses de différentes fonctions de réponse :

Type	Concentration calculée
Droite passant par l'origine	$Z_{ijk,calc} = \frac{y_{ijk}}{\beta}$
Droite linéaire	$Z_{ijk,calc} = \frac{y_{ijk} - \alpha}{\beta}$
Fonction quadratique	$Z_{ijk,calc} = -\beta i + \sqrt{\frac{\beta^2 - 4\hat{\gamma}_i(\alpha_i - y_{ijk})}{2\hat{\gamma}}}$
Transformation logarithmique	$Z_{ijk,calc} = e^{\frac{y_{ijk} - \alpha}{\beta}}$
Transformation racine carré	$Z_{ijk,calc} = \left(\frac{y_{ijk} - \alpha}{\beta}\right)^2$

Tableau 4 : Calcul des prédictions inverses pour différentes fonctions de réponse

4.7 L'estimation de la justesse et de la fidélité

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

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

où :

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

avec :

- ◆ i : indice de série
- ◆ j : indice de niveau
- ◆ k : indice de répétition

L'erreur expérimentale est supposée indépendante de la série. Les variances S^2_B , jet $S^2_{w,j}$ représentent les variances inter-série et intra-série, respectivement. La méthode du maximum de vraisemblance restreint est utilisée pour estimer à chaque niveau de concentration j les paramètres μ_j , $S^2_{B,j}$ et $S^2_{w,j}$ du modèle.

4.7.1 Calcul de la fidélité

- Ecart type de répétabilité :

$$S^2_{Re,j} = S^2_{w,j} = \frac{SCE_r}{N - i} = CM_w$$

- Ecart type de fidélité intermédiaire :

$$S^2_{FL,j} = S^2_{w,j} + S^2_{B,j}; \quad S^2_{B,j} = \sqrt{\frac{CM_B - CM_w}{n}}$$

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

Si $CM_w > CM_B$ donc $S^2_B = 0$.

Le coefficient de variation de la fidélité intermédiaire (CV_{FI}) :

$$CV_{FI} = \frac{SFI}{Z_{moy}} * 100$$

Ce calcul est réalisé par ANOVA équilibrée à un seul facteur (dans notre cas le facteur c'est le jour) à chaque niveau de concentration.

4.7.2 Calcul de la justesse

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

- **Biais absolu** : $b_{ijk} = Z_{ijk} - X_{ijk}$
- **Biais relatif** : $b_{ijk} \% = \frac{Z_{ijk} - X_{ijk}}{X_{ijk}} * 100$
- **Recouvrement** $\% = \frac{Z_{ijk}}{X_{ijk}} * 100$

4.8 Calcul des intervalles de tolérance

L'intervalle de tolérance de type β -expectation est un outil statistique qui utilise l'erreur de la méthode déterminée expérimentalement en se basant sur des mesures répétées plusieurs fois et réalisées dans différent jour. Ces intervalles de tolérances une fois calculée pour une probabilité β , ils traduisent la proportion (β) des futures mesures qui seront incluses dans les limites d'acceptabilité $\pm \lambda$ définie à priori. L'estimation des intervalles de tolérance absolue est exprimée par la formule si dessous :

$$Z_{moy} \pm K SFI$$

$$L_j = Z_{moy} - t(v; \frac{1+\beta}{2}) \times \sqrt{1 + \frac{1}{npB^2j}} SFI$$

$$U_j = Z_{moy} + t(v; \frac{1+\beta}{2}) \times \sqrt{1 + \frac{1}{npB^2j}} SFI$$

Avec :

$$v = \frac{(R+1)^2}{\frac{1}{(R+\frac{1}{n})} + \frac{1-\frac{1}{n}}{np}} ; \quad R = \frac{S^2_{Bj}}{S^2_{Wj}} ; \quad B^2_j = \sqrt{\frac{R+1}{nR+1}}$$

4.9 Construire le profil d'exactitude

Il peut servir à accepter ou rejeter une méthode analytique selon l'usage attendu. Par ailleurs, le profil d'exactitude peut également être utilisé comme outil de diagnostic. Il s'obtient en plotant, dans le même graphique, les valeurs des intervalles de tolérances et les limites d'acceptabilité en fonction des valeurs de concentration (**Figure 4**).

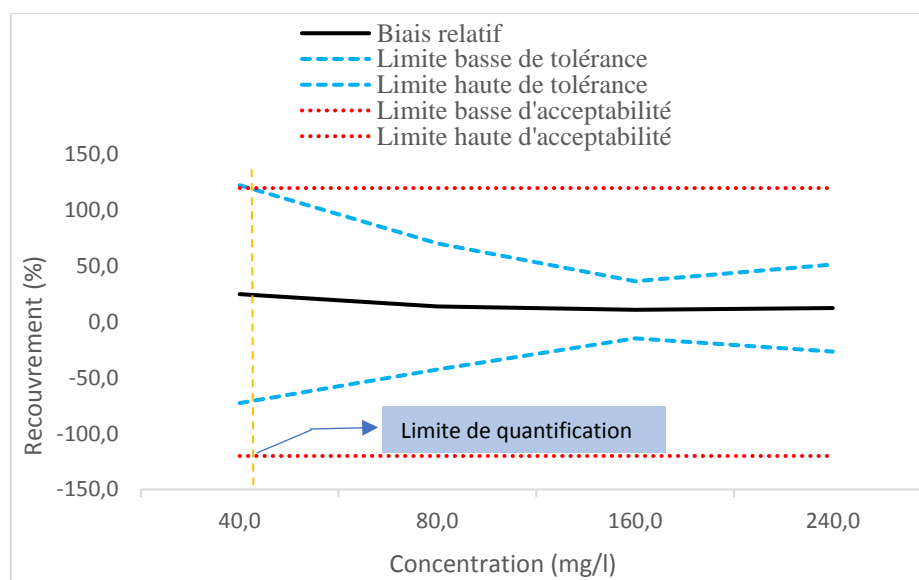


Figure 4: Exemple de profil d'exactitude.

Chapitre 2 :
Matériels et Méthodes

L'étude concerne la validation d'une nouvelle méthode de dosage de l'Azithromycine dans les comprimés à libération conventionnelle, ce travail est réalisé au sein du laboratoire de la faculté de pharmacie de l'université Mohamed VI des sciences de santé, selon les directives de la commission de la société française des sciences techniques et pharmaceutiques (SFSTP) décrivant un protocole de validation harmonisé, publié en 2006 dans la revue STP Pharma pratique.

1 Méthode de dosage de l'Azithromycine dans une forme pharmaceutique par HPLC

1.1 Présentation du principe actif

1.1.1 Azithromycine

L'Azithromycine est un antibiotique macrolide apparenté à l'érythromycine (**Figure 5**). Il est principalement utilisé pour traiter diverses bactéries infections causées par des agents pathogènes respiratoires, tels que Bactéries Gram-positives et Gram-négatives. L'Azithromycine empêche les cellules bactériennes de fabriquer des protéines spécifiques nécessaires à leur survie.

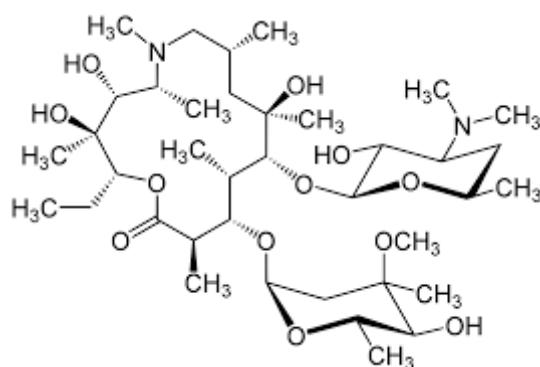


Figure 5: Azithromycine

1.1.2 Propriétés physico-chimiques

- *Aspect* : Poudre blanche ou sensiblement blanche.
- *Solubilité* : Pratiquement insoluble dans l'eau, facilement soluble dans l'éthanol anhydre et dans le chlorure de méthylène.
- *Propriétés chimiques* : L'Azithromycine est dérivée de l'érythromycine par addition d'un atome d'azote dans le cycle lactone de l'érythromycine A, rendant ainsi cet anneau lactone un anneau à 15 atomes.
- *Mécanisme d'action* : Les macrolides agissent au niveau de la synthèse protéique de la bactérie, en empêchant la synthèse protéique.
- *pKa* : 8,48
- *Point de fusion* : 125 °C

1.2 Matériels

1.2.1 Appareillage

Le tableau suivant présente les équipements utilisés au cours de la validation :

Equipement	Marque	Illustration
Le système chromatographique HPLC	LC-100 à détecteur UV	
Balance analytique	METTLER TOLEDO AG245 d=0.01mg/0.1mg	
pH-mètre	EUTECH INSTRUMENTS PH 6+	
Bain ultrasons	DIGITAL ULTRASONIC CLEANER CD-4830	
Système de filtration	ROCKER 300	

Tableau 5:*Equipements utilisés*

1.2.2 Verreries et autres

La préparation nécessite l'utilisation des verreries et des autres matériels présentés dans le tableau suivant :

Verreries	Autres
-Fioles jaugées :5ml ;25ml ;100ml ;1000ml	-Pissettes
-Béchers	-Spatules
-Eprouvette 50ml	-Barreau magnétique
-Pipettes graduées :10 ml ;	-Parafilm
-Flacons : 200ml ;1000 ml ;	-Filtres millipores
	-Mortier

Tableau 6: Verreries et autres matériels utilisés

1.2.3 Réactifs

Ce tableau présente les réactifs utilisés en pratique avec les précautions de sécurité en laboratoire :

Réactifs	Caractéristiques	Précautions
Potassium phosphate dibasique	Formule brute: K_2HPO_4 M ^r : 174,2 g/mol ρ : 2,44 g / cm ⁻³	
Acide orthophosphorique	Formule brute : H_3PO_4 M ^r : 98,00 g/mol ρ : 1,83 g / cm ⁻³	
Acétonitrile pour HPLC	Formule brute : C_2H_3N M ^r : 41,05 g/mol ρ : 0,8g / cm ⁻³	
Hydroxyde de potassium KOH	Formule brute : KOH M ^r : 56,10 g/mol ρ : 2,12g / cm ⁻³	
Eau distillée	Formule brute : H_2O M ^r : 18 g/mol ρ : 1 g / cm ⁻³	

Tableau 7: Réactifs utilisés et précautions.

1.3 Méthode

1.3.1 Mode opératoire

1.3.1.1 Préparation de la phase mobile

- Mélangez 60 volumes d'Acétonitrile et 40 volumes d'une solution de phosphate dipotassique 6,7 g/l ajustée à un pH de 7.8 avec de l'acide phosphorique (Si le mélange descend du pH=7,8 on ajuste avec solution d'hydroxyde de potassium R à 560 g/l)
- Agiter l'ensemble dans un ultrasons pour dégazer et dissoudre au besoin.
- Filtrer par un Système complet avec système de filtration et pompe à vide avec l'utilisation des filtres et mettre la phase mobile dans des flacons.

1.3.1.2 Solution A

Le diluant est composé de même composition de la phase mobile (60% Acétonitrile et 40% K₂HPO₄ 6,7 g/L) ajustée à pH 8,0 avec de l'acide phosphorique.

1.3.1.3 Préparation des standards d'étalonnage

- Le plan d'expérience de validation consiste en trois jours, six niveaux et deux répétitions.
- Un intervalle de concentration entre 40% à 140 % de la dose cible.
- Trois séries réalisées dans des conditions de répétabilité et de fidélité intermédiaire.

La solution mère est préparé en dissolvant 17.5 mg d'Azithromycine dans 1 ml d'Acétonitrile et en complétant à 25ml avec la solution A. Ensuite, des dilutions successives ont été réalisées afin d'obtenir plusieurs solutions filles aux niveaux de concentration mentionnés dans le tableau suivant dans des flacons de 5 ml (**Figure 6**).

Echantillons	Niveau de concentration en %	Teneur en dihydrate d'azithromycine en mg/l	Volume prélevée en ml	Volume finale en ml
1	40%	200	1.43	5
2	60%	300	2.18	5
3	80%	400	2.86	5
4	100%	500	3.57	5
5	120%	600	4.28	5
6	140%	700	5	5

Tableau 8: Préparation des standards d'étalonnage



Figure 6: Préparation de la gamme du principe actif

1.3.1.4 Conditions chromatographiques

Colonne	Longueur	250 mm
	Diamètre	4.6 mm
	Taille des particules	5 μ m
	Phase stationnaire	Alcool polyvinilique Octadécylsilylé
Détection		Spectroscopie UV Visible à 210 nm
Volume d'injection		20 μ L
Débit de la phase mobile		1.2 ml/min
Température de la colonne		40°C

Tableau 9: Conditions chromatographiques de l'étude

1.3.1.5 Préparation des standards de validation

- La masse d'un comprimé de l'Azithromycine est 0.9370g ;
- Un comprimé contient 500 mg d'Azithromycine. Pour préparer d'une solution mère de concentration 700mg/l :

$$500\text{mg} \longrightarrow 0.9370 \text{ g}$$

$$700\text{mg} \longrightarrow 1.312 \text{ g}$$

Alors pour la préparation de 100 ml de la solution mère, il faut dissoudre 0.131g de comprimé d'Azithromycine dans 4 ml d'acétonitrile puis compléter au trait de jauge à 100 ml avec la solution A. Mettre l'ensemble dans l'ultrasons pour dissoudre complètement ;

- Préparer les autres concentrations par dissolution en réalisant les mêmes dilutions que celle des standards d'étalonnages dans des flacons de 5 ml.

Chapitre 3 :

Validation de la méthode de dosage de l'Azithromycine par HPLC

Le présent travail consiste à mettre valider une méthode développée de dosage de l'Azithromycine par chromatographie liquide à haute pression (HPLC) et s'assurer de la fiabilité des résultats de la méthode. Le choix de validation est basé sur :

- Limites d'acceptabilité est de $\pm 5\%$ autour de la concentration introduite.
- La proportion β est fixée à 95%.

1 Validation de la méthode de dosage de l'Azithromycine par HPLC selon le profil d'exactitude

1.1 Standards d'étalonnage

Les données des standards d'étalonnage sont regroupées dans le **tableau 10** suivant :

Niveau j	Concentration en mg/l	Série1	Série 2	Série3
1	200	3056,3	2582,5	2861
		2847	2676,4	2888,4
2	300	4106,9	3461,9	4402,6
		4260	3265,3	4491,3
3	400	6826	5916,1	7125,8
		5760	5333,9	5731,4
4	500	7596,1	8154,3	7495,2
		7603	7495,2	7678,9
5	600	8388,8	8945,6	9030,9
		8774,1	8336,1	8938,3
6	700	11415,6	11362	10607,1
		10607,1	10985,9	11167,1

Tableau 10 : Les données des standards d'étalonnage

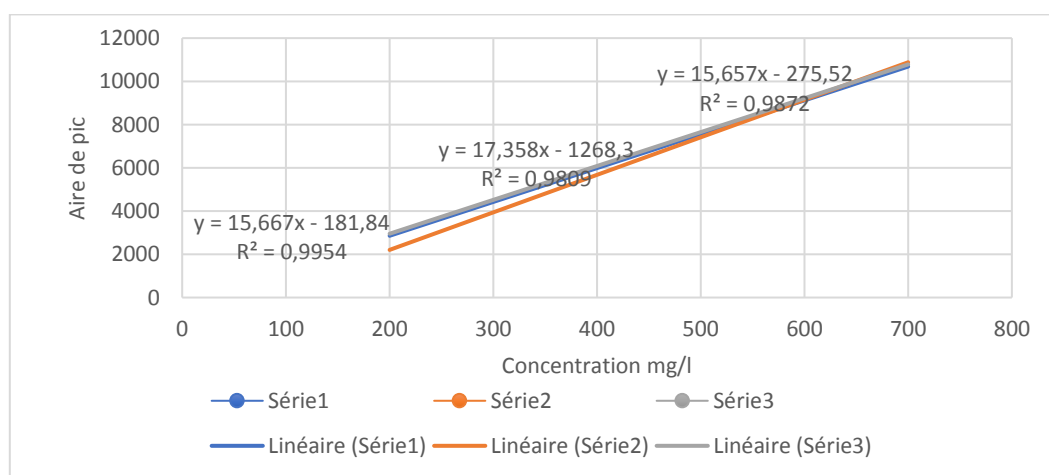


Figure 7 : Courbe d'étalonnage

1.2 Standards de validation

Le tableau suivant présente les données en relations avec les standards de validation :

Niveau j	Concentration (mg/l)	Réponse analytique (Aire)		
		Série 1	Série 2	Série 3
1	300	4403,8	4071,3	4615,5
		4407	3865,2	4520
		4339	4017,7	4540,8
2	400	5991,3	5670,8	6190,7
		6123,7	5565	6154,4
		5998,2	5551,3	6127,8
3	500	7593	7405,2	7644,9
		7583,9	7363,1	7642,9
		7611,8	7154,4	7595,1
4	600	9218	8984,4	9219,9
		9061,8	9152,2	9259,4
		9175,7	9336,6	9238
5	700	10645,6	10858,1	10825,7
		10628	10853,9	10766,5
		10636,7	10874,6	10688,1

Tableau 11 :Les données de standards de validation

1.3 Conformité de la spécificité

Le chromatogramme du blanc (la phase mobile) a montré qu'il n'y a aucune interférence au temps de rétention de l'azithromycine alors l'aire de pic est seulement de la molécule analysée (**Figure8 ;Figure9 ;Figure10**)

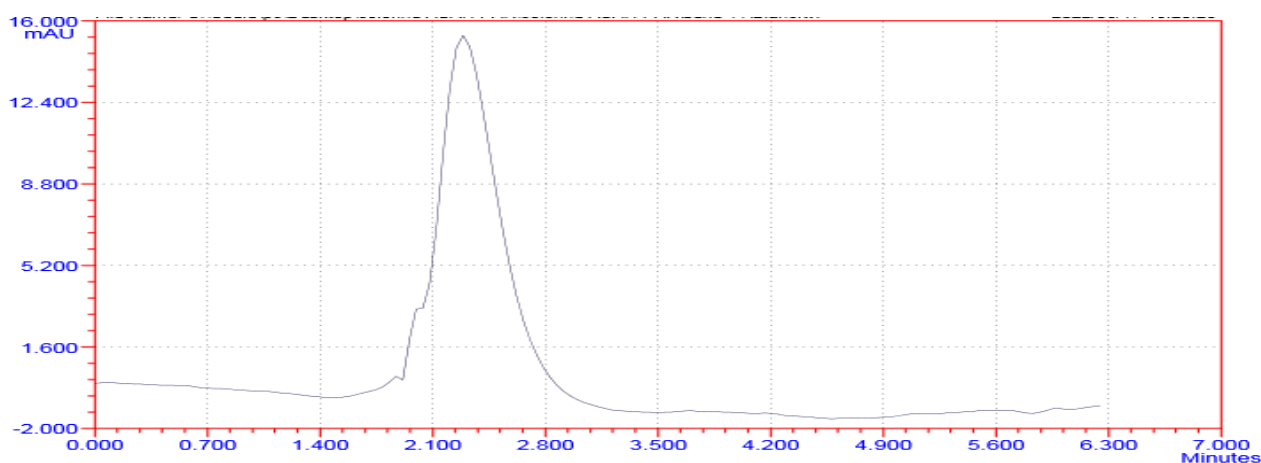


Figure 8 :Chromatogramme du blanc

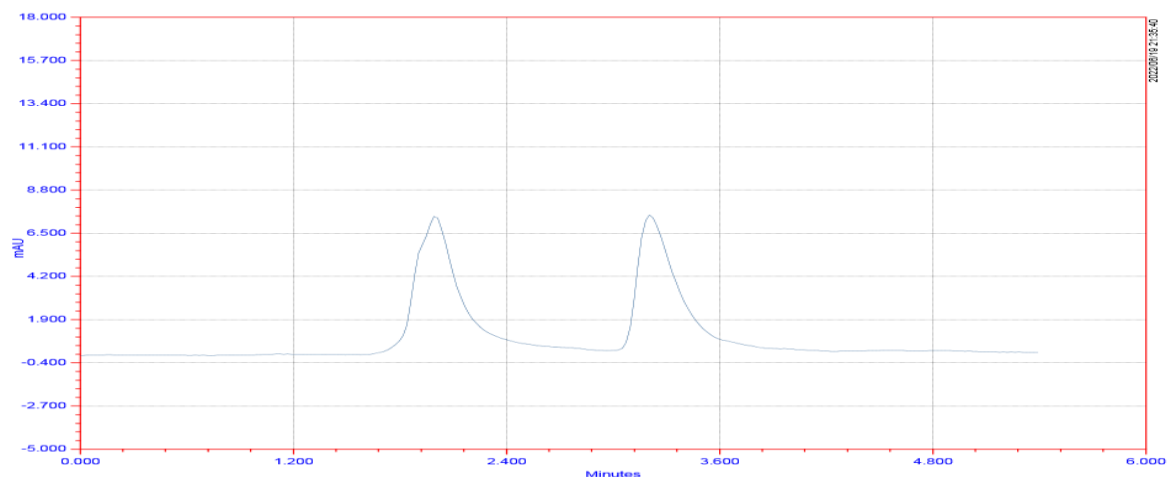


Figure 9 : Chromatogramme du principe actif seul

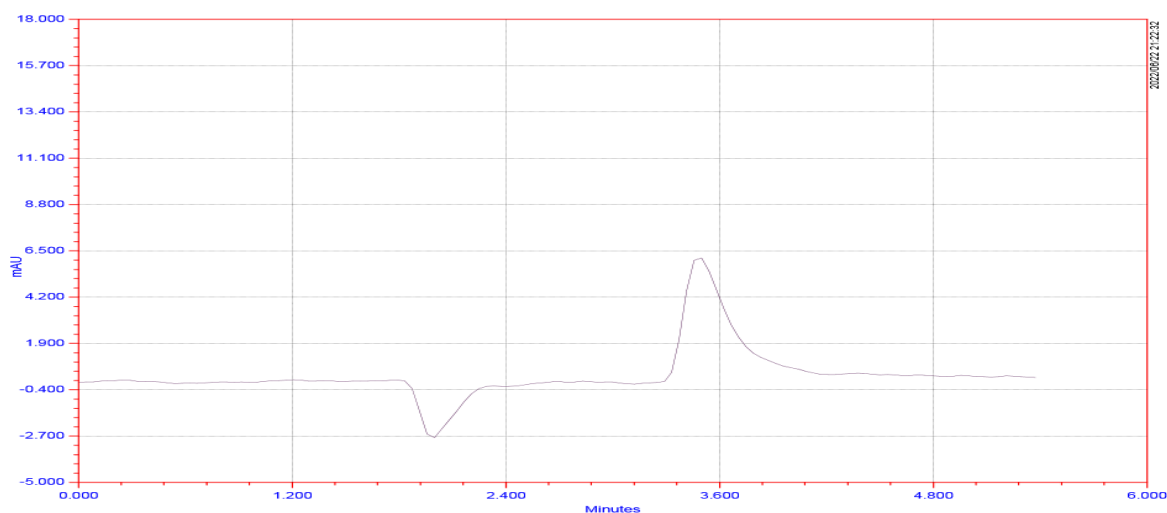


Figure 10 : Chromatogramme de la forme pharmaceutique reconstituée

1.4 Linéarité

On reporte sur un graphique les deux variables : concentration calculée ($C_{calculée}$) en fonction de la concentration théorique introduite ($C_{introduite}$). Dans le cas de l'exemple en utilisant le modèle linéaire simple comme fonction de réponse, le graphique de la linéarité (**Figure 11**) avec les estimations de la pente, l'ordonnée à l'origine, et le coefficient de détermination de la droite de régression R^2 de cette relation qui doit s'approcher nécessairement de 1.

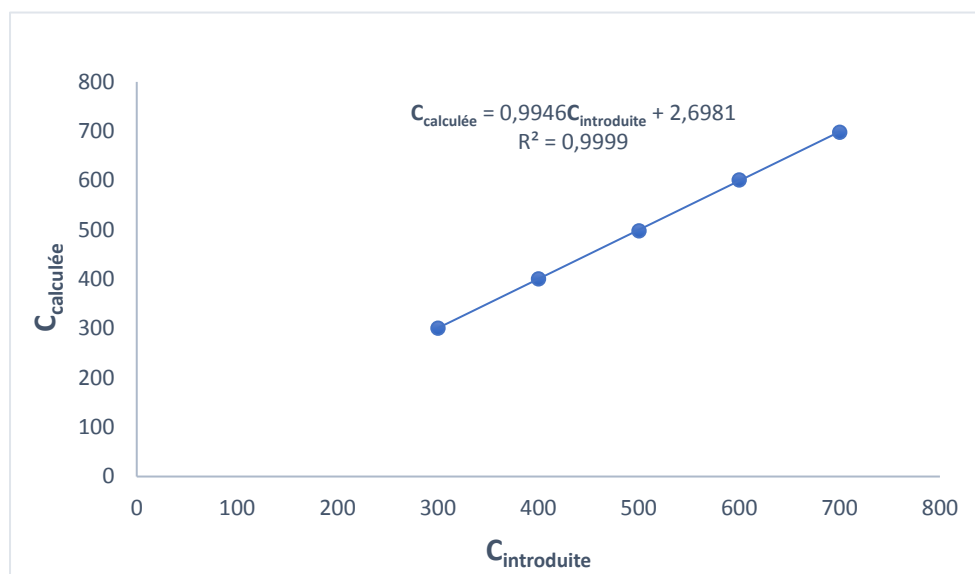


Figure 11 : Droite de régression linéaire entre les quantités prédites et les quantités introduites

On constate que la courbe de linéarité illustre le très bon ajustement linéaire de ces deux variables alors les concentrations calculées et les concentrations introduites sont strictement proportionnelles :

$$C_{calculée} = 0.9946C_{introduite} + 2.6981$$

On constate que la courbe de linéarité ne présente pas un effet de matrice puisque la pente présente la valeur de 0.9946 mais présente un effet additif égale 2.6981. Par ailleurs, le coefficient de détermination de la droite de régression $R^2=0.9999$ alors la linéarité de la méthode a été vérifiée dans l'intervalle de concentration étudiée.

1.5 Fonction de réponse

Les 7 modèles sélectionnés pour évaluer les différents critères de validation sont : linéaire simple, linéaire simple pondéré $1/X$, quadratique, quadratique pondéré $1/X$, linéaire après transformation racine carrée, linéaire après transformation logarithmique, linéaire 0-max. Le choix des modèles peuvent nous aider à révéler et choisir les fonctions de réponses les plus adaptées et qui correspondent aux objectifs attendus à travers de cette étude et qui permettent aussi de visualiser plusieurs profils et sélectionner ceux qui vont s'approcher de l'idéal. **Le tableau 12** présente les paramètres de régression correspondantes aux fonctions de réponse étudiés :

Modèle	Séries	Ordonnée à l'origine	Pente	Terme quadratique
Linéaire 0-max	Série 1	0	15.12	
	Série 2	0	14.89	
	Série 3	0	15.31	
Linéaire simple	Série 1	-275.52	15.66	
	Série 2	-1268.3	17.36	
	Série 3	-181.84	15.67	
Transformation racine carrée	Série 1	-3.29	4.03	
	Série 2	-16.01	4.55	
	Série 3	-3.01	4.04	
Fonction quadratique	Série 1	182.55	13.28	0.00264
	Série 2	-273.63	12.19	0.00573
	Série 3	-393.91	16.77	-0.00122
Transformation Logarithmique	Série 1	2.46	1.04	
	Série 2	1.42	1.20	
	Série 3	2.42	1.05	
Linéaire Pondéré 1/X	Série 1	-231	15.56	
	Série 2	-1080	16.94	
	Série 3	-233	15.78	
Quadratique Pondéré 1/X	Série 1	51	13.96	0.00189
	Série 2	113	10.15	0.008
	Série 3	-563	17.65	-0.00022

Tableau 12 : Paramètre de régression des différents modèles

1.6 Prédiction inverse

Les concentrations sont toutes identiques alors ce n'est pas nécessaire de faire un alignement. Les prédictions inverses pour les différents modèles de régression s'obtiennent comme suit (**Tableau 13**) :

Modèle	Concentration introduite (mg/l)	Concentration calculée (mg/l)		
		Série n°1	Série n°2	Série n°3
Linéaire 0-max	300	291,22	273,34	301,40
	300	291,44	259,50	295,16
	300	286,94	269,74	296,52
	400	396,21	380,73	404,26
	400	404,96	373,62	401,89
	400	396,66	372,70	400,16
	500	502,13	497,17	499,23
	500	501,52	494,34	499,1
	500	503,37	480,33	495,97
	600	609,59	603,19	602,08
	600	599,26	614,46	604,66
	600	606,79	626,84	603,26
	700	703,99	728,99	706,94
	700	702,83	728,71	703,07
	700	703,40	730,1	697,95
Linéaire simple	300	298,86	307,61	306,20
	300	299,07	295,74	300,11
	300	294,72	304,53	301,44
	400	400,26	399,76	406,75
	400	408,71	393,67	404,43
	400	400,70	392,88	402,73
	500	502,56	499,68	499,57
	500	501,97	497,26	499,44
	500	503,76	485,23	496,39
	600	606,34	590,66	600,1
	600	596,37	600,33	602,62
	600	603,64	610,95	601,25
	700	697,52	698,61	702,59
	700	696,40	698,36	698,81
	700	696,95	699,56	693,81
Transformation Racine carré	300	298,86	308,1	307,73
	300	299,07	295,60	301,63
	300	294,67	304,85	302,96
	400	401,13	403,26	407,98
	400	409,63	397,05	405,68
	400	401,58	396,25	403,99
	500	503,75	503,79	500,11
	500	503,17	501,37	499,987
	500	504,95	489,38	496,96
	600	607,45	593,69	599,55
	600	597,50	603,17	602,04
	600	604,76	613,57	600,69
	700	698,30	698,89	700,68
	700	697,18	698,66	696,95
	700	697,74	699,81	692,02
Transformation Logarithmique	300	294,80	310,39	309,32
	300	295,00	297,25	303,22
	300	290,64	306,98	304,55
	400	396,01	409,05	409,24
	400	404,40	402,68	406,96
	400	396,45	401,86	405,28
	500	497,00	510,86	500,42
	500	496,43	508,44	500,30
	500	498,18	496,41	497,31
	600	598,56	600,11	598,26
	600	588,84	609,43	600,70
	600	595,93	619,64	599,38
	700	687,17	702,66	697,21
	700	686,08	702,44	693,57
	700	686,62	703,55	688,76

Fonction quadratique	300	299,99	310,85	305,56
	300	300,21	297,71	305,56
	300	295,63	307,45	299,61
	400	404,84	408,84	300,90
	400	413,41	402,56	404,64
	400	405,29	401,74	402,34
	500	506,94	508,20	400,65
	500	506,37	505,86	497,48
	500	508,11	494,22	494,28
	600	607,10	593,49	599,58
	600	597,62	602,29	602,16
	600	604,54	611,92	600,76
	700	692,52	689,30	705,42
	700	691,48	689,10	701,49
	700	692,00	690,12	696,28
Linéaire Pondéré 1/X	300	297,90	304,07	307,24
	300	298,11	291,91	301,18
	300	293,74	300,91	302,50
	400	399,94	398,49	407,05
	400	408,45	392,24	404,75
	400	400,3	391,43	403,07
	500	502,89	500,87	499,20
	500	502,31	498,38	499,07
	500	504,10	486,06	496,04
	600	607,34	594,08	599,00
	600	597,30	603,99	601,51
	600	604,62	614,87	600,15
	700	699,10	704,69	700,76
	700	697,97	704,44	697,01
	700	698,53	705,66	692,04
Quadratique pondéré 1/X	300	299,65	312,84	294,48
	300	299,86	299,14	289,03
	300	295,35	309,30	290,22
	400	403,48	413,08	384,49
	400	412,02	406,74	382,41
	400	403,93	405,92	380,89
	500	505,64	511,90	467,76
	500	505,07	509,61	467,65
	500	506,83	498,15	464,90
	600	606,81	594,99	558,15
	600	597,19	603,50	560,42
	600	604,21	612,77	559,20
	700	693,76	686,82	650,53
	700	692,70	686,63	647,12
	700	693,23	687,60	642,60

Tableau 13 : Prédiction inverses des modèles envisagés

1.7 Calcul de la justesse

La justesse est exprimée en biais absolu, biais relatif et en taux de recouvrement pour chaque niveau de concentration des standards de validation comme indiqué dans le tableau suivant :

Modèle	Niveau	60%	80%	100%	120%	140%
	Concentration introduite en mg/l	300	400	500	600	700
Linéaire simple	Concentration retrouvée	300.92	401.10	498.43	601.36	698.07
	Biais absolu	0.92	1.10	-1.57	1.36	-1.93
	Biais relative	0.31	0.27	-0.31	0.23	-0.28
	Recouvrement	100.3	100.3	99.7	100.2	99.7
Linéaire 0-max	Concentration retrouvée	285.03	392.36	497.02	607.80	711.78
	Biais absolu	-14.97	-7.65	-2.98	7.80	11.78
	Biais relative	-4.99	-1.91	-0.60	1.30	1.68
	Recouvrement	95	98.1	99.4	101.3	101.7
Transformation racine carrée	Concentration retrouvée	301.50	402.95	500.39	602.49	697.80
	Biais absolu	1.50	2.95	0.39	2.49	-2.20
	Biais relative	0.50	0.74	0.08	0.42	-0.31
	Recouvrement	100.5	100.7	100.1	100.4	99.7
Fonction quadratique	Concentration retrouvée	301.99	404.92	502.09	602.16	694.19
	Biais absolu	1.99	4.92	2.09	2.16	-5.81
	Biais relative	0.66	1.23	0.42	0.36	-0.83
	Recouvrement	100.7	101.2	100.4	100.4	99.2
Transformation logarithmique	Concentration retrouvée	301.35	403.55	500.60	601.21	694.23
	Biais absolu	1.35	3.55	0.60	1.21	-5.77
	Biais relative	0.45	0.89	0.12	0.20	-0.82
	Recouvrement	100.5	100.9	100.1	100.2	99.2
Linéaire Pondéré 1/X	Concentration retrouvée	299.73	400.65	498.77	602.54	700.02
	Biais absolu	-0.27	0.647	-1.229	2.542	0.022
	Biais relative	-0.09	0.16	-0.25	0.42	0.003
	Recouvrement	99.9	100.2	99.8	100.4	100
Quadratique Pondéré 1/X	Concentration retrouvée	298.87	399.22	493.06	588.58	675.67
	Biais absolu	-1.13	-0.78	-6.94	-11.42	-24.33
	Biais relative	-0.38	-0.20	-1.39	-1.90	-3.48
	Recouvrement	99.6	99.8	98.6	98.1	96.5

Tableau 14 : Estimation de la justesse obtenus par différents modèles

Les résultats de la justesse donnent une comparaison des biais relatifs avec les limites d'acceptabilité. Pour l'Azithromycine, les biais relatifs des différents niveaux de concentration ne dépassent pas les limites d'acceptabilité fixées à $\pm 5\%$, et on peut alors dire que la justesse est satisfaisante.

1.8 Calcul de la fidélité

Avec une analyse de la variance (ANOVA), on obtient les écarts-types de répétabilité et de fidélité intermédiaire en utilisant les concentrations calculées ou prédites par calcul en retour. La fidélité en conditions de répétabilité et de fidélité intermédiaire est exprimée en écarts types et en coefficients de variation (CV) suite au modèle choisi. Les résultats sont exprimés dans le tableau ci-dessous :

Modèle	Concentration Introduite(mg/l)	Conc. Moyenne calculée	Ecart-type répétabilité	Ecart-type inter- série	Ecart-type Fidélité intermédiaire	CV Répétabilité	CV fidélité intermédiaire
Linéaire 0-max	300	285.03	4.79	15,41	16,14	1,68	5,66
	400	392.36	3.99	14,32	14.87	1.02	3.79
	500	497.02	5.34	5,07	7.37	1.07	1.48
	600	607.79	7.53	4,38	8.71	1.24	1.43
	700	711.78	2.66	15,07	15.30	0.37	2.15
Linéaire simple	300	300.92	4.25	1.58	4.53	1.41	1.51
	400	401.10	3.69	4.47	5.80	0.92	1.45
	500	498.43	4.62	3.44	5.76	0.93	1.16
	600	601.36	6.61	0.00	6.61	1.10	1.10
	700	698.07	2.59	0.00	2.58	0.37	0.37
Transformation logarithmique	300	301.35	4.58	6.30	7.79	1.52	2.58
	400	403.55	3.73	3.59	5.18	0.92	1.28
	500	500.59	4.61	3.20	5.61	0.92	1.12
	600	601.20	6.38	6.86	9.37	1.06	1.56
	700	694.23	2.49	8.05	8.43	0.36	1.21
Transformation racine carrée	300	301.50	4.42	2.38	5.02	1.46	1.66
	400	402.95	3.73	2.96	4.76	0.92	1.18
	500	500.38	4.60	1.64	4.88	0.92	0.98
	600	602.49	6.51	0.00	6.51	1.08	1.08
	700	697.80	2.55	0.00	2.55	0.37	0.37
Fonction quadratique	300	301.99	4.58	2.08	5.03	1.52	1.67
	400	404.92	3.76	1.59	4.08	0.93	1.01
	500	502.09	4.48	4.76	6.53	0.89	1.30
	600	602.16	6.07	0.00	6.07	1.01	1.01
	700	694.19	2.68	5.88	6.46	0.39	0.93
Linéaire Pondéré 1/X	300	299.73	4.32	2.58	5.03	1.44	1.68
	400	400.65	3.73	5.38	6.55	0.93	1.64
	500	498.77	4.72	2.98	5.58	0.95	1.12
	600	602.54	6.75	0.00	6.75	1.12	1,12
	700	700.02	2.57	4.1	4,84	0.37	0.69
Quadratique Pondéré 1/X	300	298.87	4.58	2.08	5.03	1.53	1.68
	400	399.22	3.76	1.59	4.08	0.94	1.02
	500	493.06	4.48	4.76	6.53	0.91	1.33
	600	588.58	6.08	0.00	6.08	1.03	1.03
	700	675.67	2.68	5.88	6.46	0.40	0.96

Tableau 15 :Estimateurs de fidélité obtenus avec les principaux modèles

Ce tableau donne des informations sur les performances de la méthode. On constate que les coefficients de variation de la fidélité intermédiaire ne dépassent pas 5% pour les différents modèles sauf la régression linéaire 0-max.

1.9 Intervalle de tolérance et exactitude

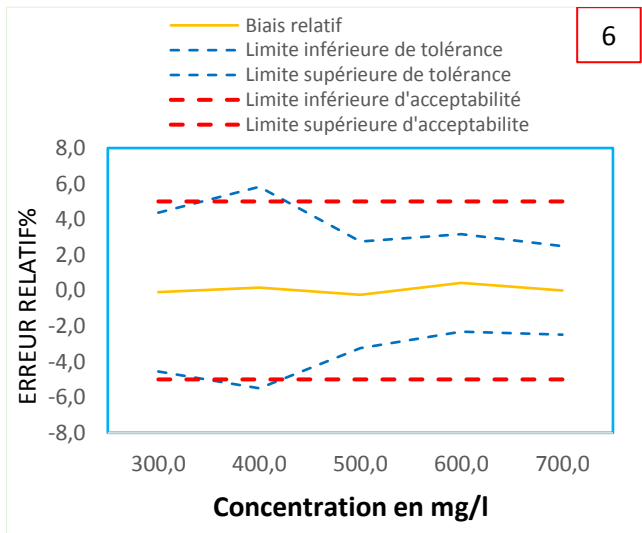
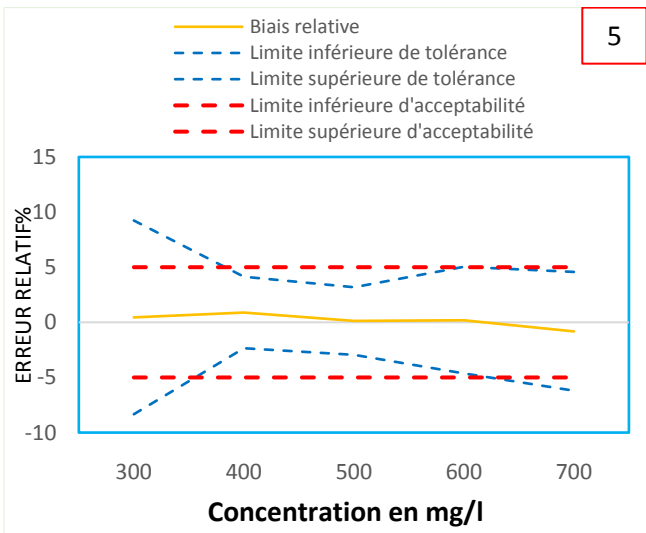
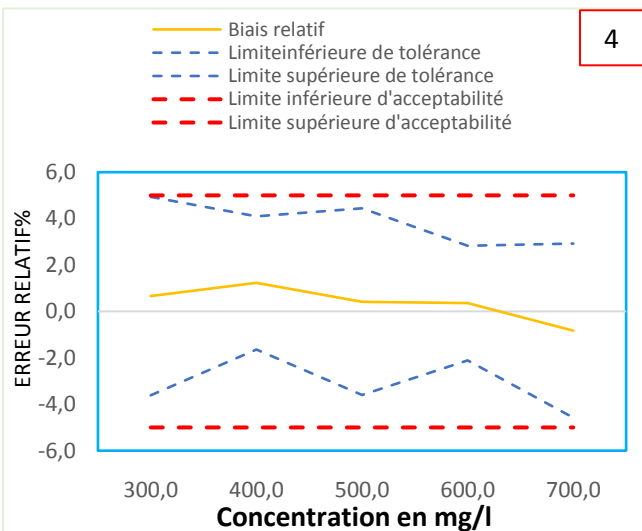
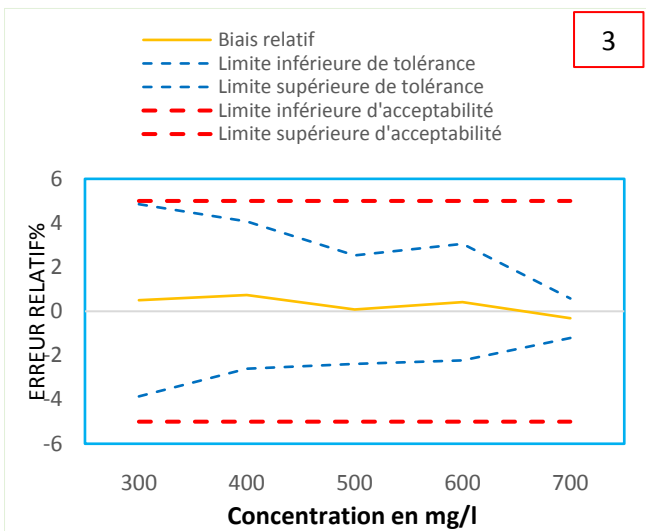
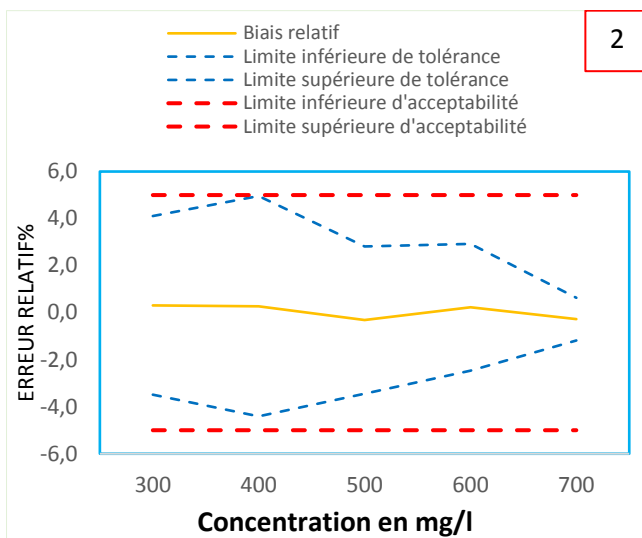
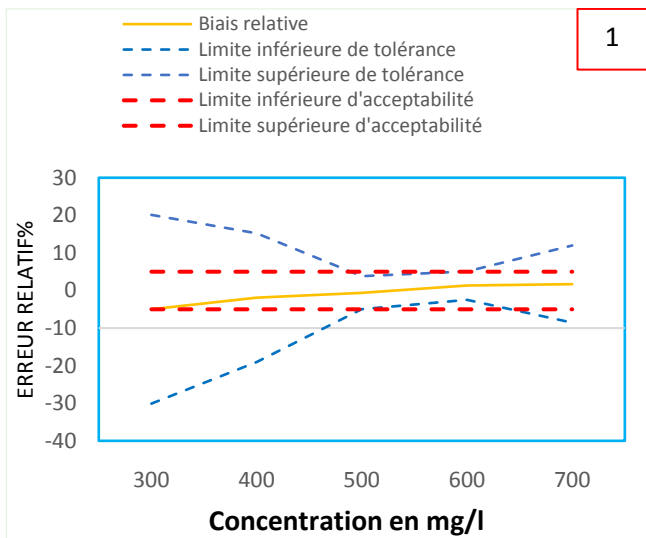
Il s'agit d'un intervalle dans lequel on peut garantir que chaque future mesure en moyenne a une probabilité β à 95% d'être dedans et avec des limites d'acceptabilité de $\pm 5\%$ autour de la valeur de concentration introduite :

Modèle	Concentration introduite(mg/l)	Biais relatif %	Limite supérieure de tolérance	Limite inférieure de tolérance
Droite linéaire	300	0.31	-3.49	4.11
	400	0.28	-4.41	4.96
	500	-0.31	-3.44	2.82
	600	0.23	-2.46	2.92
	700	-0.28	-1.18	0.63
Linéaire 0-max	300	-4.99	-30.10	20.12
	400	-1.91	-19.05	15.23
	500	-0.60	-5.00	3.81
	600	1.30	-2.49	5.09
	700	1.68	-8.57	11.94
Transformation racine carrée	300	0.50	-3.85	4.85
	400	0.74	-2.59	4.07
	500	0.08	-2.38	2.53
	600	0.41	-2.23	3.06
	700	-0.31	-1.21	0.58
Fonction quadratique	300	0.67	-3.61	4.93
	400	1.23	-1.64	4.10
	500	0.42	-3.60	4.44
	600	0.36	-2.11	2.83
	700	-0.83	-4.58	2.92
Transformation logarithmique	300	0.45	-8.34	9.24
	400	0.89	-2.35	4.12
	500	0.12	-2.94	3.18
	600	0.20	-4.63	5.04
	700	-0.82	-6.21	4.56
Linéaire pondérée 1/X	300	-0.09	-4.55	4.37
	400	0.16	-5.49	5.82
	500	-0.25	-3.25	2.76
	600	0.42	-2.32	3.16
	700	0.003	-2.48	2.49
Quadratique Pondéré 1/X	300	-0.37	-4.69	3.94
	400	-0.20	-3.11	2.72
	500	-1.39	-5.48	2.71
	600	-1.90	-4.43	0.62
	700	-3.48	-7.33	0.38

Tableau 16 : Intervalles de tolérance des modèles

On observe, d'après le **Tableau 16**, que chaque modèle de régression choisi a conduit à différentes valeurs de limites de tolérance supérieures et inférieures en fonction de la valeur de β choisie.

1.10 Profil d'exactitude



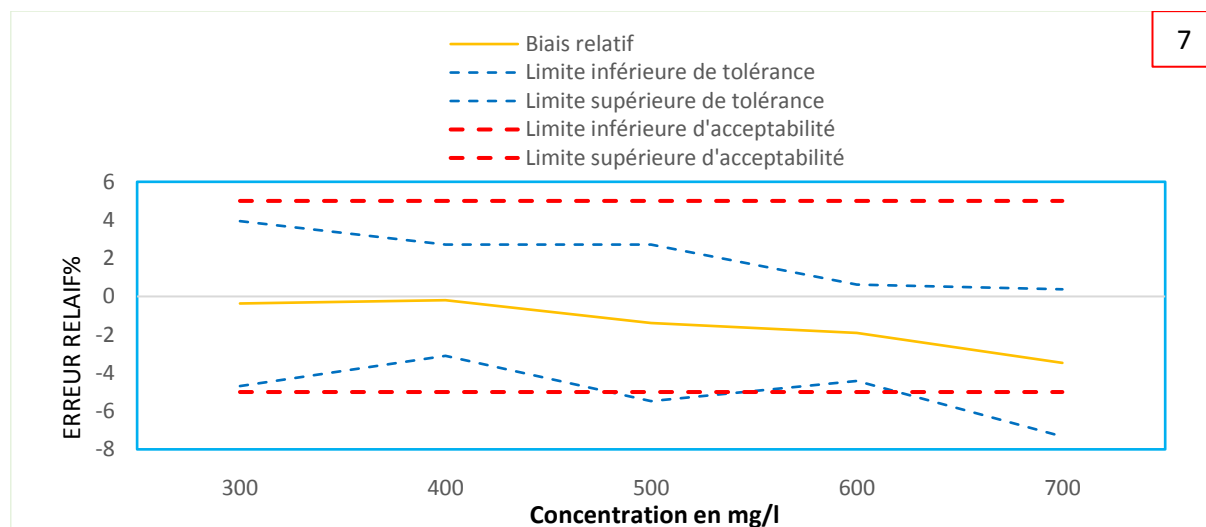


Figure 12: Profils d'exactitude de l'Azithromycine ($\beta = 95\%$, $\lambda = \pm 5\%$). (1: linéaire 0-max, 2: linéaire simple, 3: Racine carré, 4: Quadratique, 5: Logarithme, 6: linéaire pondéré 1/X, 7: Quadratique pondéré 1/X).

Le profil d'exactitude peut être considéré comme un outil de décision très utile pour décider sur une méthode, selon son usage prévu. De plus, c'est une combinaison, sous la forme d'un graphique de plusieurs intervalles de tolérance calculés à partir de mesures réalisées sur des échantillons à différents niveaux de concentration. Il peut également être utilisé pour sélectionner le modèle de régression le plus approprié, déterminer les limites de quantification et sélectionner l'intervalle de concentration pour le dosage. En outre, ce qui est attendu d'une méthode analytique c'est d'avoir une différence entre le résultat d'une mesure (x_i) et la « vraie valeur » (μ_T) de l'échantillon (inconnu) qui ne dépasse pas les limites d'acceptabilité définie par l'analyste afin de garantir que la procédure analytique donnera au futur des résultats exactes.

L'examen visuel des profils d'exactitude obtenus montrent que certaines fonctions de réponse donnent des résultats plus fiables que d'autres à savoir le modèle linéaire simple, la régression linéaire après transformation racine carrée, et le modèle quadratique. Ces profils montrent que l'intervalle de tolérance se trouve dans les limites d'acceptations prédéfinies pour tous les niveaux de concentration comme indiqué présentés dans la **Figure 12** alors les critères de validation principaux (justesse, fidélité intermédiaire) demeurent dans les limites d'acceptabilité ($\pm 5\%$) au sein de l'intervalle de tolérance $\beta = 95\%$. Par ailleurs l'utilisation de certaines fonctions de réponses ne permet pas à la procédure analytique d'atteindre ses objectifs, vu que pour certaines concentrations, les limites de tolérances sortent comme le cas de la régression linéaire après transformation modèle linéaire pondéré avec un facteur de pondération de 1/X (X étant la

concentration), le modèle linéaire quadratique pondéré ($1/X$) et le modèle linéaire après transformation logarithmique, dans les limites d'acceptabilité (-5%,+5%). Dans ce cas si l'analyste veut travailler avec ces modèles, il faut impérativement réduire l'intervalle de dosage .

Enfin, le modèle linéaire 0-max présente des limites de tolérance qui ne sont pas compris à l'intérieur des limites d'acceptabilité fixées à $\pm 5\%$, ce modèle ne peut pas être plus approprié.

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

1.11 Limites de détection et de quantification

Les limites de quantification sont obtenues à partir de profil d'exactitude, elles sont représentées par des points d'intersection du premier point tracé des limites de tolérance avec les limites d'acceptabilité. Les profils ci-dessus ne présentent pas tous une intersection. La LOQ peut être obtenue exactement en calculant l'abscisse du point d'intersection. En effet, le calcul des coordonnées du point d'intersection est un problème d'algèbre bien connu. Alors on peut recourir à la méthode basée sur la courbe d'étalonnage. Les estimations de valeur de la limite de détection LOD, et de la limite de quantification LOQ peuvent se calculer en utilisant les formules suivantes :

- $LOD = 3.3 \times \frac{S_b}{a}$

- $LOQ = 10 \times \frac{S_b}{a}$

Avec :

a : La pente de la droite de régression

S_b : L'écart type sur l'ordonnée à l'origine

Modèle	Spécification	Valeurs	Limite de détection (mg/l)	Limite de quantification (mg/l)
Droite linéaire	Pente	17.36	80,69	244,52
	Ecart type de la pente	0.88		
	Ordonnée à l'origine	-1268.26		
	Ecart type de l'ordonnée à l'origine	424.45		
Transformation racine carré	Pente	4.55	3,64	11,025
	Ecart type de la pente	0.24		
	Ordonnée à l'origine	-16.00		
	Ecart type de l'ordonnée à l'origine	5.01		
Fonction quadratique	Pente	13.28	307.70	931.12
	Ecart type de la pente	5.05		
	Ordonnée à l'origine	182.55		
	Ecart type de l'ordonnée à l'origine	1036.83		

Tableau 17: *Limites de détection et de quantification*

Les valeurs des limites de détection et de quantification obtenus en fonction des modèles de régression sélectionnés pour $\beta=95\%$. L'analyse de ces valeurs montre qu'elles sont marquées d'une différence importante d'une fonction de réponse à une autre. En outre, il est évident que si on change la valeur de la limite d'acceptabilité, les limites de quantification et de détection seront aussi modifiées. Pour une spécificité pharmaceutique λ est fixée sur $\pm 5\%$ alors que pour l'analyse d'une matière première ou des impuretés λ prendre d'autres valeurs alors qu'on peut aussi proposer λ et la fixer quand la limite de quantification est un critère très important avec des situations qu'on peut rencontrer pour une méthode de contrôle. Enfin, la proportion β montre clairement qu'elle a une influence directe sur le calcul de ces paramètres et c'est très important de la choisir avec prudence.

Conclusion générale

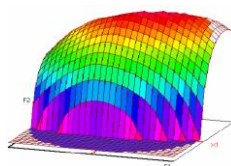
A travers de ce travail, nous avons effectué une validation analytique par l'approche de l'erreur totale pour le dosage de l'Azithromycine en se basant pour l'interprétation sur le profil d'exactitude pour accepter ou rejeter la méthode. Les résultats sont donnés par différents modèles dont le but de sélectionner le modèle de régression le plus approprié et de garantir que la méthode peut être utilisée en routine. Les différents résultats obtenus ont montré un ensemble de points à mettre en évidence :

- ✓ La génération de plusieurs fonctions de réponse et sélectionner les modèles de régression les plus fiables et qui peuvent atteindre nos objectifs.
- ✓ L'étude de la linéarité à travers cette approche présente généralement en analyse que l'effet de matrice est négligeable. Par conséquent ce n'est pas nécessaire d'utiliser un facteur de correction.
- ✓ Un examen visuel des profils d'exactitude montre que la méthode est acceptable pour des modèles étudiés à savoir : Le modèle linéaire, le modèle quadratique, et la régression linéaire par transformation racine carrée ($\beta=95\%$, $\lambda=\pm 5\%$) et fournissent des résultats meilleurs que d'autres ; Alors le choix de certaines fonctions de réponse ne permet pas la méthode analytique de donner des objectifs.

Notre méthode peut facilement être appliquée pour l'identification et le dosage de l'Azithromycine, En conséquence, nous estimons d'utiliser la méthode d'analyse en routine et d'avoir plus d'information sur ses performances.

Références
Bibliographiques

- [1]-L'application effective des mesures d'obligation de détention des stocks de sécurité.
- [2]-La loi n° 17-04 portant code du médicament et de la pharmacie. Le 30 chaoual 1427 (22 novembre 2006) Article 2 / 6.
- [3]-Meredith, P., Bioequivalence and other unresolved issues in generic drug substitution. *Clinical Therapeutics*, 2003. 25(11): p. 2875-2890.
- [4]-SABIR. R Thèse : le générique au Maroc : intérêt, enjeux et perspectives. 2008 Faculté de médecine et de pharmacie- Rabat
- [5]-BERTHOMIER F, CHOPINEAU J. Génériques et dépenses de santé *Actualités pharmaceutiques* 1997 ; 349 :62-66
- [6]-King, D.R. and P. Kanavos, Encouraging the use of generic medicines: implications for transition economies. *Croat Med J*, 2002. 43(4): p. 462-9
- [7]-Stora D., *Pharmacologie BP*, Prophyre, Wolters Kluwer, France, 2010.
- [8]- Handbook of Pharmaceutical Excipients, 6th edition - 31 janvier 2008. [En ligne] Date de consultation : Décembre 2016. <https://www.researchgate.net>.
- [9]-VIGOUROWX. F. Les conditions juridiques et techniques préalables à l'enregistrement des copies de spécialités pharmaceutiques *S.T.P. Pharma*. 1988 ; 4 (8) : 709-713
- [10]-Olivier Allo, Pascale Blanc, Marie-Ange Dalmasso.,(2005), *Pharmacie galénique BP.2ème édition*
- [11]-R Onahès., B Devaller. 1988. *Chimie générale*. 4 ème édition. Raymond.
- [12]-Tall ML .,(2006) Contrôle qualité de princeps et génériques de comprimés de métformine A propos de 7 spécialités. Thèse de Doctorat en Pharmacie, Faculté de Médecine et de Pharmacie de Rabat, Université Mohammed V, n°10.
- [13]-Djamila A. 2010. Thèse de doctorat : Synthèse, étude physico-chimique et pré formulation d'un dérivé PYRIDO [3,2g] QUINOLEINE TRIMETHYLE. Marseille. Université de la Méditerranée.
- [14]-RIDOUAN Khadija. Application de certaines approches statistiques au transfert de la cinétique de dissolution cas du DICLOFENAC sodique. Thèse pour l'obtention du doctorat en pharmacie. RABAT. 2010.
- [15]-www.doc-etudiant.fr/Sciences/Pharmacie/Expose-Les-excipients-pharmaceutiques42048.html
- [16]-Council of Europe, European Directorate for the Quality of Medicines & HealthCare (EDQM). *Pharmacopée européenne*. Strasbourg: Conseil de l'Europe; 2010
- [17]- Code of Federal Regulations – Parts 210 and 211, FDA.
- [18]-NF EN ISO 17025 (2005) Prescriptions générales concernant la compétence des laboratoires d'étalonnage et d'essais, ISO, Genève
- [19]-Feinberg M., Validation of analytical methods based on accuracy profiles. *Journal of Chromatography A*. 2007, 1158, 174-183.
- [20]- Note for guidance on validation of analytical procedures: Text and methodology. ICH Q2 (R1) Validation of Analytical Procedures: Text and Methodology. CPMP/ICH/381/95
- [21]-Feinburg M. Boulanger B Dewé W., Hubert Ph. New advances in method validation and measurement uncertainty aimed at improving the quality of chemical data, *Analytical and bioanalytical chemistry*, 2004



Master ST CAC Ageq

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

Nom et prénom: EL GHALY Wafaa

Année Universitaire : 2021/2022

Titre: Validation analytique par le profil d'exactitude d'une méthode HPLC pour le dosage d'Azithromycine

Résumé

L'Azithromycine est un antibiotique largement prescrit à l'échelle nationale durant la période Covid19, il est commercialisé sous différentes spécialités. Le contrôle de son dosage et l'étude de la dissolution de différentes spécialités sèche implique la validation analytique de sa méthode de dosage.

L'Azithromycine sujet de cette étude. Nous avons réalisé la validation analytique de dosage d'Azithromycine inclus dans des comprimés à libération conventionnelles par la méthode de chromatographie liquide à haute performance HPLC sous les conditions de répétabilité et de fidélité intermédiaire en se basant sur la nouvelle approche le profil d'exactitude comme un outil de décision basé sur l'étude de l'erreur totale (la justesse + fidélité). Il peut servir à accepter ou rejeter une méthode analytique suivant les objectifs attendus. Par ailleurs il permet un jugement visuel et facile et choisir la meilleure fonction de réponse donnant des résultats fiables.

L'ensemble des résultats obtenus, affirme que notre méthode analytique est déclarée valide et fiable pour des modèles étudiés et peut être utiliser pour le dosage de l'Azithromycine.

Mots clés : Validation, profil d'exactitude, intervalle de tolérance, linéarité, Fidélité, Justesse, Limite de détection, Limite de quantification