

Liste des abréviations

AMM : autorisation de mise sur le marché

BPF : bonnes pratiques de fabrication

A.D.V : agent de vente

OTC : Over The Counter

HPLC: chromatographie liquide a haute performance

ISO : International Organization for Standardization

SFSTP : Société Française des Sciences Techniques et Pharmaceutiques

ICH : International Conference on Harmonization

STD : standard

LOQ: limite optimal de détection

LOD : limite optimal de quantification

RA : la réponse analytique

CM : carré moyenne

CV : coefficient de variation

Liste des figures

Figure 1 : les valeurs adoptées par la société

Figure 2 : Organigramme de la société SYNTHEMEDIC

Figure 3 : structure moléculaire d'acétate de flécainide

Figure 4 : schéma des principaux modules d'une chaîne HPLC

Figure 5 : image d'une chaîne HPLC

Figure 6 : Profil d'exactitude basée sur l'erreur totale

Figure 7 : chromatogramme obtenu par HPLC du blanc

Figure 8 : chromatogramme obtenu par HPLC du placebo

Figure 9 : chromatogramme obtenu par HPLC du STD

Figure 10 : chromatogramme obtenu par HPLC de la forme reconstituée

Figure 11 : profil d'erreur totale par la fonction droite linéaire

Figure 12 : profil d'exactitude par la fonction de réponse transformation logarithmique

Figure 13 : profil d'exactitude par la fonction de réponse racine carré

Liste des tableaux

Tableau 1 : utilisation des solvants selon le type de la colonne

Tableau 2 : les critères de validation

Tableau 3 : calcul des concentrations, standard d'étalonnage

Tableau 4 : calcul des concentrations, standard de validation

Tableau 5 : tableau des données de standards d'étalonnage

Tableau 6 : tableau des données de standards de validation

Tableau 7 : les types des fonctions de réponse

Tableau 8 : l'ordonné à l'origine, la pente, coefficient de détermination de chaque série

Tableau 9 : prédiction inverse de concentration à partir de différent fonction de réponses

Tableau 10 : résultats des concentrations retrouvées par prédiction inverse

Tableau 11 : résultats des différentes variances pour le calcul de la fidélité

Tableau 12 : calcul des CV de répétabilité , fidélité intermédiaire

Tableau 13 : calcul des biais et recouvrement

Tableau 14 : critères d'établissement du profil d'exactitude

Tableau 15 : critères de la régression linéaire après transformation mathématique

Sommaire

| | |
|--|----|
| Introduction générale :..... | 1 |
| Présentation générale du laboratoire SYNTHEMEDIC :..... | 2 |
| CHAPITRE I : CARACTERISTIQUES DU PRODUIT (Acétate de lecaïnide)..... | 5 |
| I.1 Dénomination du médicament :..... | 6 |
| I.2. Composition qualitative et quantitative : | 6 |
| I.3.Structure du principe actif : acétate de flécaïnide | 6 |
| I.4. Données cliniques :..... | 7 |
| I. 4.1. Indications thérapeutiques :..... | 7 |
| I.4.2. Posologie et mode d'administration : | 7 |
| I.4.3. Contre-indications :..... | 7 |
| I.4.4. Précautions d'emploi : | 8 |
| CHAPITRE II : ANALYSE PAR CHROMATOGRAPHIE LIQUIDE A HAUTE PERFORMANCE (HPLC)..... | 9 |
| II.1. Définition, Principe et Appareillage :..... | 10 |
| II.2. Précaution d'utilisation des modules de la HPLC | 13 |
| II.2.1.Utilisation des colonnes d'HPLC : | 13 |
| II.2.2.Choix de la phase mobile :..... | 13 |
| II.2.3.pH de la phase mobile : | 14 |
| II.2.4.Installation de la colonne :..... | 14 |
| II.2.5.Solvants et échantillons : | 14 |
| II.2.6.Stabilité des conditions expérimentales :..... | 14 |
| II.2.7. Influence du débit : | 14 |
| II.2.8. Influence de la composition de la phase mobile : | 15 |
| II.2.9.Caractéristiques du détecteur :..... | 15 |
| II.2.10.Stockage des colonnes : | 16 |
| CHAPITRE III : VALIDATION D'UNE METHODE ANALYTIQUE PAR L'APPROCHE DE L'ERREUR TOTALE..... | 17 |
| III.1.Cycle de vie d'une méthode : | 18 |
| III.1.1.Sélection de la méthode :..... | 18 |
| III.1.2.Mise au point de la méthode : | 18 |

| | |
|---|----|
| III.1.3. Validation de la méthode : | 19 |
| III.1.4. Estimation de l'incertitude et vérification de l'aptitude | 19 |
| III.1.5. Utilisation en routine : | 19 |
| III.1.6. Revalidation : | 19 |
| III.2. Définition et objectif de la validation : | 20 |
| III.2.1. Définition: | 20 |
| III. 2.2. Objectif : | 20 |
| III.3. Les critères de la validation analytique : | 20 |
| III.4 .Approche de l'erreur totale : | 23 |
| III.4.1. Définition et objectif..... | 24 |
| III.4.2. Avantage de l'approche de l'erreur totale : | 24 |
| III.4.3. Etapes de la validation analytique basée sur le concept de l'erreur totale : | 25 |
| CHAPITRE IV : VALIDATION DE LA METHODE DU DOSAGE D'ACETATE DE FLECAINIDE PAR HPLC | 26 |
| IV .1. Mode opératoire : | 27 |
| IV . 2. Validation analytique : | 27 |
| IV. 2.1. vérification de la sélectivité : | 27 |
| IV. 2.1. Réalisation des gammes STD d'étalonnage, STD de validation : | 30 |
| IV .3. Données brutes recueillies : | 31 |
| IV. 4. Réalisation des étapes du concept de l'erreur totale..... | 33 |
| IV. 4.1. Fonction de réponse : | 33 |
| IV. 4.2. Alignement des concentrations introduites par la fonction de réponse : Droite linéaire :..... | 34 |
| IV. 4.3. Prédiction inverse : | 35 |
| IV. 4.4. Calcul de la fidélité : | 36 |
| IV. 4.5. Calcul de la justesse : | 39 |
| IV. 4.6. Calcul des intervalles de tolérance : | 40 |
| IV. 4.7. Profil d'exactitude : | 42 |
| IV. 5. Génération de profil d'exactitude par la fonction de réponse transformation logarithmique et racine carré : | 42 |
| Conclusion : | 45 |

Remerciements

Ce travail n'aurait pu prendre naissance sans l'assistance et l'intervention généreuse de certaines personnes dont les apports ne pourraient être qu'infiniment reconnus. Ainsi, j'ai saisi l'occasion pour présenter mes profonds respects et dévouements.

Je tiens à exprimer mes profonds remerciements à **M. BENKABOU Said** Directeur de SYNTHEMEDIC, d'avoir accepté de m'accorder la possibilité d'effectuer ce stage.

Mes chaleureux remerciements s'adressent également à M. **BOUDERRA Hassan**, et **M. JEBLI Mehdi** et **M. CHAFIK Amine** pour leurs précieuses informations et pour leurs apports considérables durant mon stage.

Mes remerciements vont également à mon encadrant **M. HARDANE Abdellah**, pour son aide précieuse notamment au niveau de la démarche à suivre pendant ce stage, et pour le grand intérêt qu'il m'a manifesté malgré ses nombreuses occupations et ses responsabilités.

Je tiens à exprimer ma profonde gratitude et mes sincères remerciements à **M. ELHADRAMI EL Mostafa**. Le responsable de la filière chimiométrie et analyse chimique, et à **M. SAFFAJ Taoufiq** pour son encadrement et ses précieuses consignes et recommandations, et d'avoir accepté d'évaluer mon modeste travail.

Ma sincère gratitude va également à l'ensemble du personnel de l'entreprise qui n'ont cessé de me fournir les informations nécessaires durant mon stage et qui m'ont entouré de leur affection et j'aimerais bien adresser mes vifs remerciements à toute autre personne ayant contribué de près ou de loin à la réalisation de ce travail.

Introduction générale :

Le principe de la validation des procédures analytiques quantitatives est, aujourd'hui 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 contrôle de la matière première, le développement galénique, le contrôle en cours de fabrication, le contrôle des produits intermédiaires et finis et les essais de stabilité de tous les produits pharmaceutiques.

Dans le domaine pharmaceutique, son exigence est avant tout une pratique réglementaire. En effet, au Maroc, selon la dernière circulaire du ministère de la santé N°49DMP/00 du 16 juillet 2003, toute méthode analytique décrite dans le dossier d'AMM doit être accompagnée d'une validation complète.

Actuellement, de nouvelles tendances et de nouveaux concepts scientifiques apparaissent afin de faire évoluer la validation des méthodes analytiques, avec notamment l'apparition de l'utilisation du profil d'exactitude comme outil de décision.

L'objectif de ce stage est de valider une méthode en chromatographie liquide à haute performance pour le dosage du principe actif l'acétate de flécainide.

Cette technique serait employée pour effectuer le contrôle qualité du principe actif ainsi que son dosage pour les formes pharmaceutiques. La mise au point a consisté en la détermination des paramètres de validation analytique telle décrite dans la nouvelle approche proposée par SFSTP afin de pouvoir juger la validité de la méthode.

Présentation générale du laboratoire SYNTHEMEDIC :

Présentation :

- Fondé en 1989, **SYNTHEMEDIC** est un laboratoire pharmaceutique marocain spécialisé dans la fabrication, l'importation et la distribution de spécialités couvrant des pathologies d'importance majeure dans le pays.
- La stratégie de **SYNTHEMEDIC** est d'être en adéquation avec la politique des pouvoirs publics visant l'optimisation des soins et les dépenses de santé.
- **SYNTHEMEDIC** exploite ses propres gammes de produits tout en bâtissant des partenariats réussis et performants avec des firmes pharmaceutiques de renommée internationale.
- La gamme proposée couvre la majorité des spécialités soumises à ordonnance ainsi que des produits de conseil en pharmacie. [1]



Structure :

SYNTHEMEDIC dispose de deux sites industriels adaptés aux standards de la pharmacie :

- Un site de production d'une superficie de 4 280 m² construit pour répondre aux exigences de l'activité pharmaceutique, situé à proximité du port de Casablanca et à trente minutes de l'aéroport international Mohamed V. Il comporte des bâtiments de fabrication, le laboratoire de contrôle qualité et un magasin de stockage. Ce site est en ligne avec les normes BPF.
- Un site de distribution à Sidi Bernoussi à proximité de l'autoroute d'une superficie d'environ 10 000 m². Ce site récemment bâti, flexible et moderne, dispose de

bâtiments de stockage de matières premières, d'articles de conditionnement et de produits finis.

L'organisation de la société SYNTHEMEDIC se fait selon l'organigramme suivant :

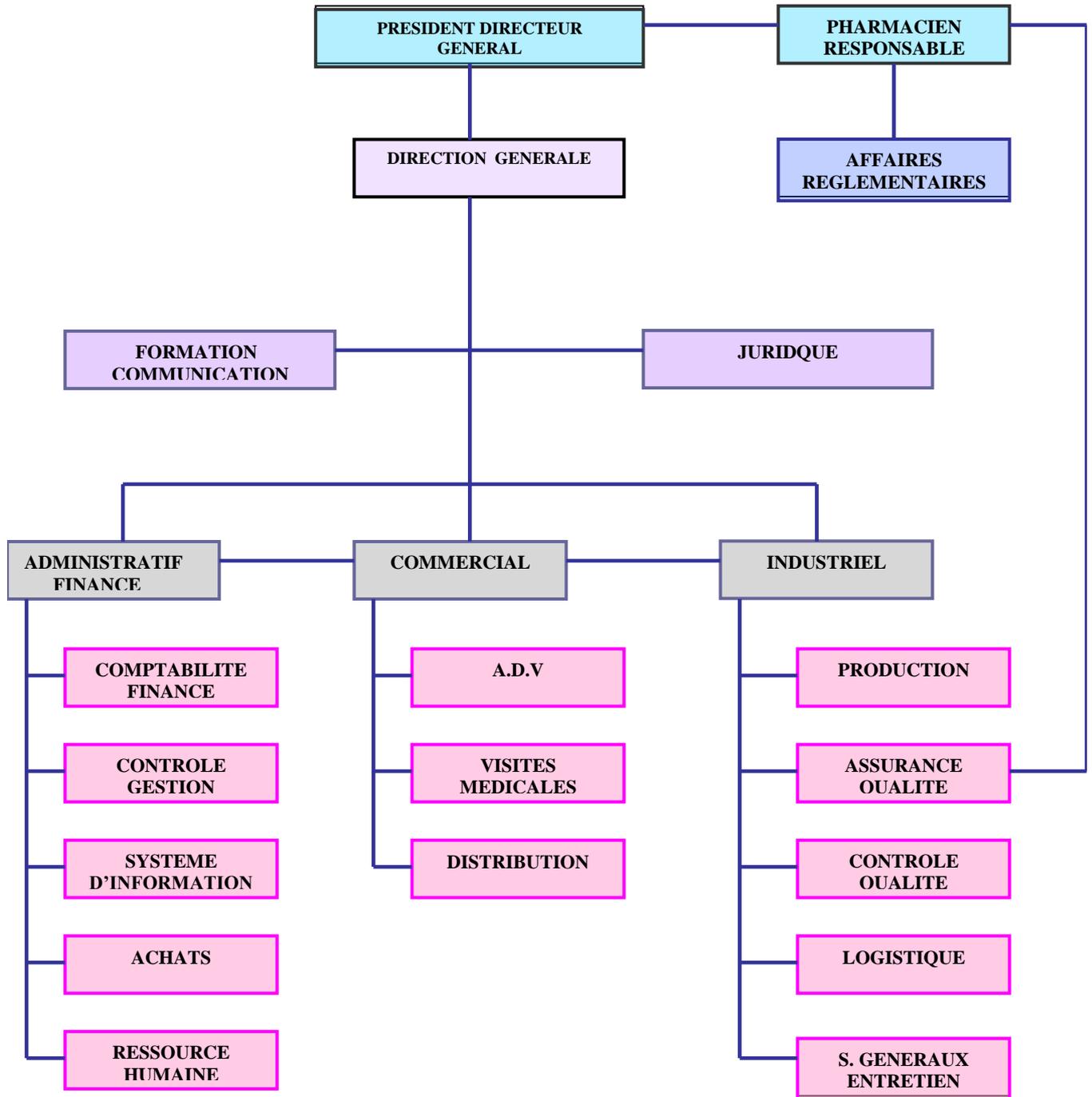


Figure 1 : Organigramme de la société SYNTHEMEDIC

Ressources Humaines :

- Les 2 sites emploient aujourd'hui plus de 170 personnes à temps plein.
- Les équipes de SYNTHEMEDIC sont engagées dans une démarche d'amélioration continue.
- Cette démarche intègre le contrôle des flux et la maîtrise des procédés. Des formations internes et externes sont dispensées à tous les niveaux de l'entreprise pour viser l'excellence.

Engagement qualité :

- Respect et application des règles de Bonnes Pratiques de Fabrication (BPF)
- Mise en place permanente d'un système de "management par la qualité" soutenu par une formation continue, qui développe chez les personnels le sens des responsabilités, les principes d'intégrité et d'éthique et assure à chacun le sentiment d'œuvrer utilement pour le bien être commun.
- Des audits internes et externes réguliers permettent de maintenir et de mettre à jour si nécessaire l'Assurance Qualité à tous les niveaux de l'entreprise.

Stratégie :

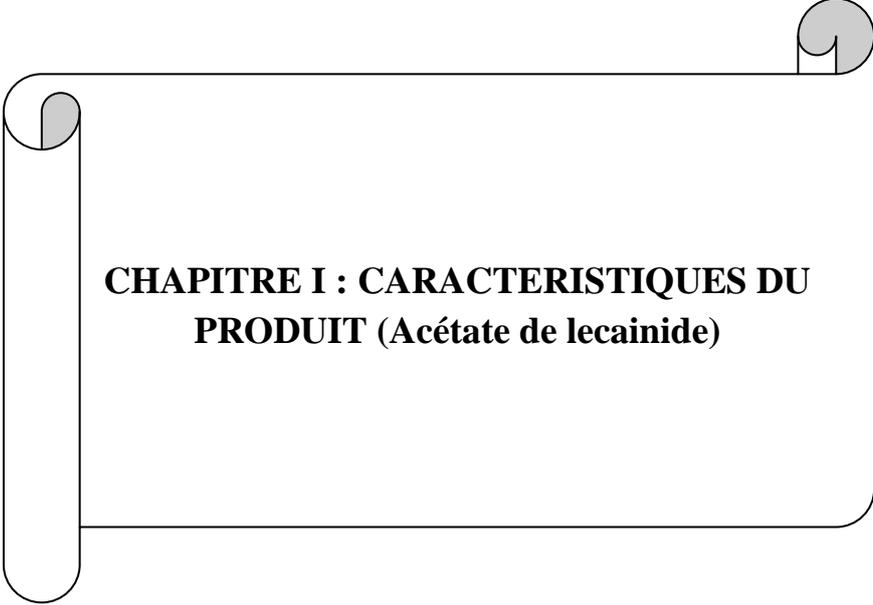
- Engagement résolu vers l'avenir, dans une démarche d'innovation et de développement de nos gammes et de celles de nos partenaires.
- Assurer la qualité et la sécurité de nos produits dans le respect des normes environnementales.
- Diversifier la gamme de nos produits OTC et de conseil en pharmacie.
- Lancer des « génériques plus » adaptés aux besoins du Prescripteur et du Patient.
- Développer l'entreprise à l'international

Valeur :

Les valeurs de SYNTHEMEDIC s'articulent autour de :



Figure 2 : les valeurs adoptées par la société



**CHAPITRE I : CARACTERISTIQUES DU
PRODUIT (Acétate de lecanide)**

I.1 Dénomination du médicament :

Un médicament est une substance possédant des propriétés curatives, préventives ou administrées en vue d'établir un diagnostic. Ce médicament est le plus souvent destiné à favoriser la guérison, à soulager ou à prévenir des maladies humaines ou animales.

Le médicament est constitué de deux types de substances :

- Une ou plusieurs substances actives ou principe actif. Les substances actives sont constituées d'une quantité de produit active ou dose ayant un effet pharmacologique et un intérêt thérapeutique démontrés cliniquement.
- De un ou plusieurs excipients qui sont des substances auxiliaires inertes sur le plan pharmacologique servant à la formulation c'est-à-dire à la présentation de la substance active sous une forme galénique déterminée. [2]

I.2. Composition qualitative et quantitative :

Le médicament FLECAINIDE est composé du principe actif acétate de flécainide avec une teneur de 100 mg pour une gélule à libération prolongée, additionné à des excipients dont les principaux sont : Cellulose microcristalline, copolymère d'acide méthacrylique et de méthacrylate de méthyle (1: 2) (EUDRAGIT S 100), macrogol 400, talc. Enveloppe de la gélule: gélatine, dioxyde de titane (E171), oxyde de fer noir (E172) et érythrosine (E127).

I.3. Structure du principe actif : acétate de flécainide

L'acétate de Flécainide est un médicament antiarrhythmique disponible dans les comprimés de 50, 100, ou 150 mgs pour l'administration orale.

L'acétate de Flécainide est benzamide, N-(2-piperidinylmethyl) - 2,5-bis (2, 2,2-trifluoroethoxy) - le monoacétate. La formule structurale est donnée ci-dessous.

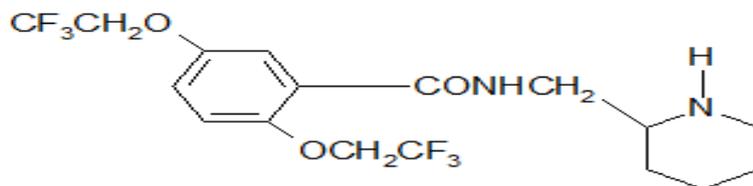


Figure 3 : structure moléculaire d'acétate de flécainide

Formule moléculaire : $C_{17}H_{20}F_6N_2O_3 \cdot C_2H_4O_2$ Poids moléculaire : 474.40

L'acétate de Flécainide est une substance cristalline blanche avec un pKa de 9.3. Il a une solubilité aqueuse de 48.4 mgs/millilitres à 37°C.

I.4. Données cliniques :

I. 4.1. Indications thérapeutiques :

- Prévention des récurrences des tachycardies supra ventriculaires documentées lorsque la nécessité d'un traitement est établie et en l'absence d'altération de la fonction ventriculaire gauche.
- Prévention des chocs cardiaques électriques chez certains patients porteurs de défibrillateurs implantables. [2]

I.4.2. Posologie et mode d'administration :

La forme à libération prolongée de FLECAINE s'administre en une seule prise par jour.
En cas de tachycardies supra ventriculaires documentées.

La posologie initiale usuelle est de 100 mg par jour.

Les augmentations éventuelles de posologie ne seront envisagées qu'après un délai de 4 à 5 jours.

La posologie maximale est de 200 mg par jour en cas de tachycardies ventriculaires documentées.

I.4.3. Contre-indications :

Ce médicament ne doit pas être utilisé dans les cas suivants:

- Infarctus du myocarde (aigu ou ancien) sauf en cas de tachycardie ventriculaire menaçant le pronostic vital.
- Insuffisance cardiaque, quel que soit le trouble rythmique.
- Bloc de branche gauche complet, bloc bi fasciculaire, bloc auriculo-ventriculaire du 2ème et du 3ème degré, dysfonctionnement sinusal et maladie de l'oreillette, en l'absence d'appareillage,
- En association avec les bêtabloquants indiqués dans le traitement de l'insuffisance cardiaque (carvédilol, bisoprolol, métoprolol)

Ce médicament est généralement déconseillé dans les cas suivants:

- Grossesse ou allaitement
- En association avec les anti-arythmiques de classe I

I.4.4. Précautions d'emploi :

Effets pro-arythmiques : L'acétate de flécaïnide, comme d'autres agents anti-arythmiques, peut provoquer la survenue d'une forme plus sévère d'arythmie, augmenter la fréquence d'une arythmie précédemment diagnostiquée ou aggraver la sévérité des symptômes. Une variation spontanée du trouble du rythme propre au patient peut se révéler difficile à distinguer d'une aggravation secondaire à l'administration du médicament.

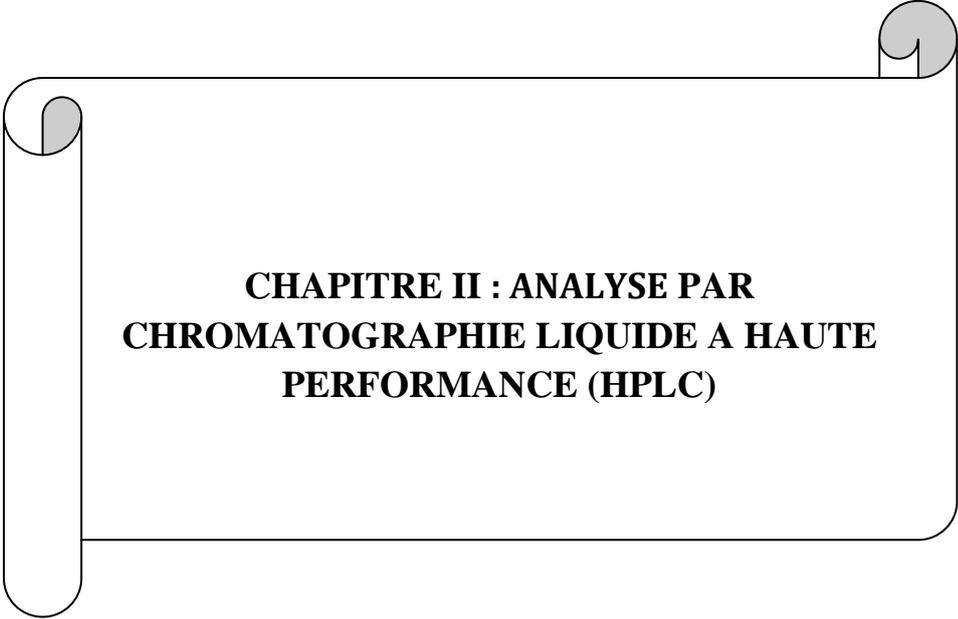
L'apparition d'extrasystoles ventriculaires plus nombreuses ou polymorphes doit faire interrompre le traitement.

Antécédents d'insuffisance cardiaque : En raison de son action inotrope négative, l'acétate de flécaïnide sera prescrit sous stricte surveillance de la fonction cardiaque chez les malades ayant des antécédents ou des symptômes faisant craindre le développement d'une insuffisance cardiaque.

· L'acétate de flécaïnide doit être administré avec précaution chez les patients ayant des anomalies de la conduction préexistantes.

· La survenue sous traitement d'un bloc auriculo-ventriculaire, d'un bloc de branche complet permanent ou d'un bloc sino-auriculaire doit faire arrêter le traitement.

En cas de modification de la posologie de l'acétate de flécaïnide ou des traitements associés pouvant affecter la conduction cardiaque, les patients, notamment ceux présentant des anomalies de la conduction, seront étroitement surveillés par électrocardiogramme. [2]



**CHAPITRE II : ANALYSE PAR
CHROMATOGRAPHIE LIQUIDE A HAUTE
PERFORMANCE (HPLC)**

II.1. Définition, Principe et Appareillage :

La chromatographie permet la séparation ou la purification d'un ou de plusieurs composés d'un mélange en vue de leur identification et de leur quantification.

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

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

Principe :

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

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

Le mélange à analyser est injecté puis transporté au travers du système chromatographique. Les composés en solution se répartissent alors suivant leur affinité entre la phase mobile et la phase stationnaire.

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

Appareillage :

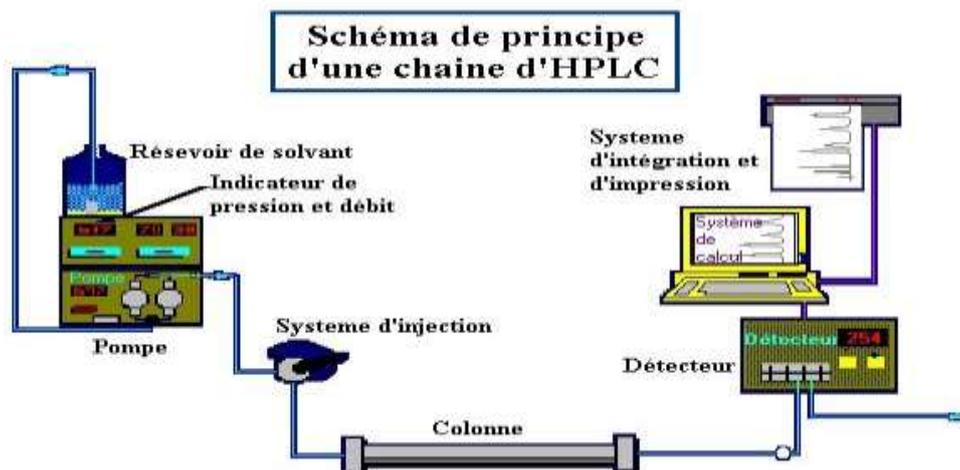


Figure 4 : schéma des principaux modules d'une chaîne HPLC



Figure 5 : image d'une chaîne HPLC

1. Réservoir de la phase mobile (solvant)

La phase mobile est pompée à partir d'une bouteille et parcourt en permanence le chromatographe : l'injecteur, la colonne dans le four et le détecteur. La température du four est maintenue constante, le signal du détecteur est amplifié et enregistré.

Le plus souvent ce réservoir est une bouteille en verre dans laquelle plonge un tube avec une extrémité filtrante en téflon. S'il est nécessaire le dégazage peut se faire par agitation puis conservation du solvant sous atmosphère d'hélium. [3]

2. Pompe

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

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

Certaines sont pilotées par informatique (bien utile lors de l'utilisation de gradient d'élution).[3]

3. Injecteur

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

Vanne à boucle d'échantillonnage

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

Le remplissage de la boucle d'injection se fait à l'aide d'une seringue. [3]

4. Colonne

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

5. Détecteurs

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

Le détecteur le plus utilisé en CLHP est un spectrophotomètre d'absorption UV-visible (190-600 nm) relié à la sortie de colonne. [3]

Il existe d'autres détecteurs :

- réfractomètre différentiel
- UV à barrette de diodes
- électrochimique
- fluorimétrique...

Ainsi que différents types de couplage :

- Spectrométrie infrarouge
- Spectrométrie de masse
- Résonance Magnétique Nucléaire...

6. Intégrateur

La chromatographie est une méthode de séparation utilisée en vue d'un dosage. Il faut donc avant tout chercher à séparer correctement les pics avant de les intégrer. Une intégration consiste à mesurer la surface sous un pic.

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

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

La largeur de pic est à peu près prévisible en fonctions de la technique d'analyse et des conditions opératoires. Elle détermine la fréquence d'échantillonnage du signal. Le pic est alors découpé en tranches. Le seuil d'intégration est la valeur du signal à partir de laquelle le calculateur repère un début de pic. [3]

II.2. Précaution d'utilisation des modules de la HPLC

II.2.1. Utilisation des colonnes d'HPLC :

Les colonnes sont conditionnées avec un solvant ou un mélange de solvant. Il faut impérativement utiliser un solvant miscible avec les solvants contenus dans la colonne. Pour passer d'un solvant à un autre et si les 2 solvants ne sont pas miscibles entre eux (passage de l'eau au cyclohexane par exemple), il faut utiliser un solvant intermédiaire pour purger la colonne. L'isopropanol (propan-2-ol) convient dans un grand nombre de cas (eau → isopropanol → cyclohexane).

Pour garantir une meilleure durée de vie de la colonne, il faut éviter les changements brutaux de débits et de viscosité afin de toujours faire varier la pression graduellement. Respecter les consignes des fabricants : pression et température maximale admissible, phase mobile. [4]

II.2.2. Choix de la phase mobile :

Les solvants utilisés doivent avoir impérativement une qualité HPLC (HPLC Grade). Si le solvant est de l'eau issue d'un purificateur, il faut vérifier sa résistivité. Une eau de qualité HPLC, doivent être de préférence pré-filtrés et dégazés et leur pH doit rester dans les spécifications de la colonne.

Lors de l'utilisation de solutions tampons, d'acides ou de sels dissous, il faut purger la colonne avec de l'eau. Le temps de purge varie selon la taille de la colonne et les conditions expérimentales.

Les échantillons injectés doivent être filtrés et miscibles dans la phase mobile. Régénérations de la colonne: des séquences de passage de solvants permettent de régénérer la colonne. Se conformer aux indications du fabricant. [4]

II.2.3.pH de la phase mobile :

Le pH de la phase mobile doit être compris entre 2 et 7,5. Des pH plus élevés dissolvent le gel de silice et des pH inférieurs à 2 peuvent détacher une partie du greffage.

L'ajustement du pH doit être exclusivement effectué sur le composant aqueux de la phase mobile et non sur le mélange .si des solutions tampons sont utilisées, il convient de rincer soigneusement le système avec un mélange d'eau et du modifiant organique de la phase mobile (5 % V/V) une fois la chromatographie terminée, afin d'éviter la cristallisation des sels.[4]

II.2.4.Installation de la colonne :

Avant de raccorder votre colonne, assurez-vous que les tubulures de votre système HPLC soient bien purgées de toute phase mobile préalablement utilisée. (Cela permet d'éviter d'envoyer vers votre colonne HPLC de la phase mobile potentiellement incompatible avec la colonne ou son solvant de stockage.) Vérifiez le sens du débit et connectez la colonne.

Il est recommandé d'utiliser une colonne de garde, avec son support, afin de protéger la colonne des produits contaminants et d'allonger sa durée de vie. [4]

II.2.5.Solvants et échantillons :

- Utilisez des solvants frais, de qualité HPLC.
- Filtrez les tampons avec un filtre 0,45µm, avant leur utilisation.
- S'assurer que les solvants utilisés soient miscibles. (Tableau de miscibilité des solvants).
- Si on veut utiliser un mélange de solvants organiques et de tampons, testez la miscibilité et la solubilité de l'échantillon dans ce mélange, avant utilisation.
- Filtrez votre échantillon avec un filtre 0,45µm. [4]

II.2.6.Stabilité des conditions expérimentales :

Toute variation du débit ou de la composition de la phase éluant entraîne une modification de la forme ou de la position du pic d'élution enregistré sur le chromatogramme.

II.2.7. Influence du débit :

La plupart des détecteurs utilisés en CPL sont des détecteurs différentiels qui mesurent des variations de grandeurs proportionnelles à la concentration du soluté dans l'effluent. Il existe une relation entre l'aire enregistrée A et le débit de l'effluent :

$$A \cdot D = m \cdot K = \text{Cte} \quad \text{eq :}(1)$$

Avec : m : masse de soluté injectée,
 K : coefficient de réponse du détecteur.

Toute variation du débit entraîne, toutes choses égales par ailleurs, une modification de l'aire enregistrée. Il est donc impératif de stabiliser parfaitement le débit de l'éluant pendant les analyses pour pouvoir baser les déterminations quantitatives sur l'aire des pics d'éluion. Si le débit de l'effluent ne peut être stabilisé, il est alors préférable de mesurer la hauteur du pic d'éluion plutôt que sa surface.

En effet, la hauteur d'un pic d'éluion correspond à la concentration maximale C_{max} du soluté : celle-ci est donnée par la relation :

$$C_{max} = \frac{m}{V_R} * \sqrt{\frac{N}{2*\pi}} \quad \text{eq:(2)}$$

Avec : m : masse de soluté injectée,
 V_R : volume de rétention du soluté,
 N : nombre de plateaux théoriques contenus dans la colonne chromatographique.

Le volume de rétention V_R étant indépendant du débit de la phase éluant, seul le nombre de plateaux N contenus dans la colonne varie ; mais C_{max} ne varie que comme $N_{1/2}$. De plus, si l'on choisit un débit de phase éluant correspondant à une vitesse réduite voisine de la vitesse optimale, les fluctuations du débit n'entraînent qu'une variation négligeable de la hauteur de plateau théorique et par là du nombre de plateaux N. [3]

II.2.8. Influence de la composition de la phase mobile :

Si la composition de la phase mobile varie, en raison par exemple de la volatilité d'un des solvants ou de la non-reproductibilité d'un gradient d'éluion, le facteur de capacité des solutés varie et par là les caractéristiques de la séparation. Dans ces conditions, il est préférable de mesurer l'aire du pic d'éluion, qui est sensiblement indépendante des fluctuations de la composition de la phase éluant, plutôt que sa hauteur qui varie avec celles-ci.

II.2.9. Caractéristiques du détecteur :

Les conditions de la détection sont sûrement un des points les plus critiques de l'analyse quantitative en chromatographie en phase liquide.

Avant tout traitement du signal, il faut s'assurer :

- De la compatibilité du détecteur avec les conditions opératoires et la nature du soluté ;
- De la linéarité de sa réponse ;
- De la stabilité de sa ligne de base ;
- De sa sensibilité qui doit être compatible avec la mesure des concentrations envisagées.

Par ailleurs, il est important d'estimer les perturbations entraînées par les variations de la température de la phase mobile, les pulsations éventuelles du système de pompage, etc., et de se rappeler que, sans précautions particulières, les intégrateurs électroniques retranchent l'aire des pics négatifs. [4]

II.2.10. Stockage des colonnes :

➤ Phase inverse (C18 – C8...)

Après avoir utilisé la colonne avec un éluant contenant du tampon, enlevez toutes traces de tampons et de sels en rinçant la colonne avec de l'eau de qualité HPLC. Après que la colonne ait été minutieusement rincée, passez 10 volumes de colonne d'un mélange acétonitrile / eau 80 :20, avant de la stocker.

➤ Phase normale (Si)

Nettoyez avec chlorure de méthylène et stockez sous hexane.

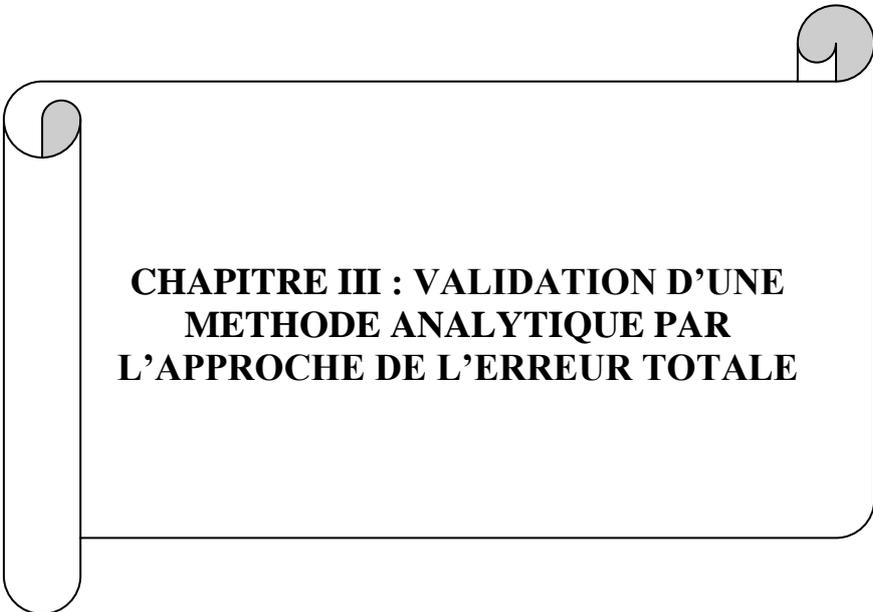
Quand la colonne n'est pas utilisée, bouchez bien chacune de ses extrémités avec les vis prévues à cet effet et stockez à une température stable (20 – 25°C).

➤ Compatibilité des solvants avec les colonnes :

| Type de colonne | Solvants utiles | Solvants de stockage | Solvants à éviter |
|-----------------|--|----------------------|-------------------------------------|
| Phase normale | Hexane Chlorure de méthylène Isopropanol Tetrahydrofurane | Hexane Heptane | Eau Méthanol Chloroforme |
| Phase inverse | Eau Méthanol Acétonitrile Isopropanol | Eau / Acétonitrile | Solvants dont le pH < 2 ou pH > 7,5 |

Tableau 1 : utilisation des solvants selon le type de la colonne

- Le tableau illustre les solvants utiles pour garder les colonnes dans un bon état, ainsi que les solvants de stockage de ces dernières, ainsi que les solvants à éviter pour ne pas détériorer la phase stationnaire des colonnes.



**CHAPITRE III : VALIDATION D'UNE
METHODE ANALYTIQUE PAR
L'APPROCHE DE L'ERREUR TOTALE**

III.1.Cycle de vie d'une méthode :

Le cycle de vie d'une méthode est un concept souligné dans la norme ISO 17025 . L'idée de base est qu'une méthode d'analyse n'est pas statique, mais une entité vivante qui passe par plusieurs étapes interdépendantes. Ainsi, pour bien comprendre le rôle et la place de la validation, il convient de décrire les différentes étapes de ce cycle, depuis la création de la méthode analytique jusqu'à son remplacement par une autre. L'exemple d'une méthode de dosage est utilisé ci-après pour illustrer ces différentes étapes. [5]

III.1.1.Sélection de la méthode :

Cette première étape va permettre de définir les objectifs de la méthode et les conditions opératoires initiales.

L'analyste va choisir parmi les diverses méthodes physico-chimiques possibles, la méthode la plus pertinente pour permettre le dosage de l'analyte à déterminer.

La norme ISO 17025 précise que :

« Le laboratoire doit utiliser des méthodes d'essai et/ou d'étalonnage, y compris des méthodes d'échantillonnage, qui répondent aux besoins du client et qui conviennent aux essais et/ou étalonnages qu'il effectue, de préférence les méthodes publiées comme normes internationales, régionales ou nationales ».

Ce texte précise qu'il est préférable d'utiliser des méthodes officielles, lorsque cela est possible. Cependant, l'utilisation de méthodes développées par le laboratoire est acceptée.

Dans ce deuxième cas, le développement de la méthode doit être confié à du personnel qualifié, avec des ressources adéquates, et la démarche de développement ainsi que les résultats obtenus doivent être correctement renseignés.[6]

III.1.2.Mise au point de la méthode :

Il s'agit d'une étape de développement de la méthode sélectionnée, afin d'optimiser les différents paramètres du protocole opératoire pour les adapter à la matrice des échantillons qui seront dosés ainsi qu'aux conditions opératoires d'utilisation de la méthode.

Il est important, lors de cette étape de développement, de suivre un cheminement précis et non pas de simplement réaliser des expériences aléatoires, afin de maîtriser la programmation des essais et les délais.

En tenant compte de cette remarque, l'analyste peut utiliser des plans d'expériences, qui vont permettre d'optimiser le nombre d'expériences à réaliser pour trouver les valeurs optimales des variables susceptibles d'influencer le paramètre à optimiser.

Au terme de cette seconde étape, l'analyste devrait avoir recueilli des informations de base sur les performances de la procédure analytique, concernant la pertinence du modèle de

régression utilisé pour établir la fonction de réponse, la variabilité des résultats, la limite de quantification et l'intervalle de dosage.

Ces prérequis vont ainsi constituer une base pour l'étape suivante, qui est la phase de validation proprement dite.[5]

III.1.3. Validation de la méthode :

L'étape de validation intervient après le développement d'une nouvelle procédure d'analyse. En effet, les performances de la méthode vont évoluer tout au long du cycle de vie, et plus particulièrement au cours des deux premières étapes. Ainsi, la fiabilité du résultat analytique fourni par la méthode doit être améliorée lors de ces premières phases, pour tendre vers une confiance accrue qui sera attestée durant cette troisième étape de validation.[6]

III.1.4. Estimation de l'incertitude et vérification de l'aptitude :

L'estimation de l'incertitude de mesure, tout comme la validation analytique, est une exigence de la norme ISO 17025 qui indique que :

« Les laboratoires d'essais doivent aussi posséder et appliquer des procédures pour estimer l'incertitude de mesure »

L'estimation de l'incertitude de mesure et la validation analytique de la méthode sont des concepts interdépendants, et le protocole développé par la commission SFSTP et publié en 2003-2006 lors de la démarche d'harmonisation des validations analytiques permet de les combiner.

Ainsi, l'utilisation du profil d'exactitude comme outil de décision illustre comment l'incertitude peut être obtenue à partir des résultats de validation.[5]

III.1.5. Utilisation en routine :

L'objectif d'une méthode analytique n'est pas sa validation, mais bien son utilisation en routine pour l'analyse d'échantillons de valeur vraie inconnue. Le passage en routine de la méthode s'inscrit dans le cadre d'un système de contrôle de la qualité qui a pour objectifs de valider les résultats obtenus sur des échantillons inconnus, et de contrôler les performances de la méthode analytique au fil du temps.[5]

III.1.6. Revalidation :

Au cours de l'utilisation en routine de la méthode analytique, certaines améliorations peuvent être apportées à la méthode. Ces modifications vont alors conduire à une procédure plus ou moins complète de revalidation. Un test simple devra être effectué pour déterminer l'impact de ces modifications. En règle générale, une modification de réglage est considérée comme mineure, tandis qu'une modification affectant le principe de la méthode est considérée comme

majeure. Dans ce dernier cas, une procédure de validation complète devra de nouveau être appliquée.[5]

III.2. Définition et objectif de la validation :

III.2.1.Définition:

La validation d'une méthode analytique est l'opération par laquelle on s'assure que ses résultats répondant au problème de manière satisfaisante pour l'utilisateur. Elle s'efforce de détecter et contrôler les sources d'erreurs possibles liées à la méthode étudiée : ca définition dans les normes « Valider une méthode consiste à démontrer, avec un degré de confiance élevé et sous une forme documentée, que la méthode permet d'obtenir un résultat analytique qui atteint les spécifications définis à l'avance » [8] [9]

III. 2.2.Objectif :

La validation des méthodes analytiques a pour principal objectif de s'assurer qu'une méthode analytique donnée donnera des résultats suffisamment fiables et reproductibles, compte tenu du but de l'analyse. Il faut donc définir correctement à la fois les conditions dans lesquelles la méthode sera utilisée et le but dans lequel elle sera employée. Ces principes s'appliquent à toutes les méthodes utilisées par un fabricant de produits pharmaceutiques, qu'elles soient ou non décrites dans une pharmacopée. Autrement dit : «Le but de la validation d'une procédure analytique est de démontrer qu'elle correspond à l'usage pour lequel elle est prévue». [8] [10]

III.3.Les critères de la validation analytique :

La validation porte sur les critères suivants : Qu'on va adopter selon le type du test caractéristique.

- Spécificité
- Linéarité
- justesse
- Fidélité
 - ❖ Répétabilité
 - ❖ Reproductibilité
- Exactitude
- Limite de détection : LOD
- Limite de quantification : LOQ
- Intervalle de mesure
- 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 | ✓ | ✓ | | |

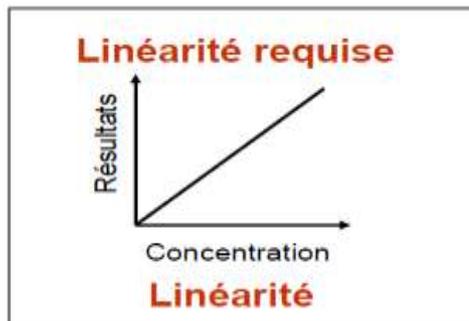
Tableau 2 : les critères de validation

- Sélectivité :

La sélectivité ou spécificité d'une méthode est son aptitude à mesurer la concentration de l'analyte sans interférence de la part des autres constituants de l'échantillon (par exemple, impuretés résultant de la fabrication ou de la dégradation du produit, ou constituants autres que l'analyte, que ces substances soient pharmaco logiquement actives ou inertes). La sélectivité (ou l'absence de sélectivité) peut s'exprimer par l'erreur systématique constatée dans les résultats obtenus avec l'analyte en présence des concentrations escomptées des autres constituants, par comparaison avec les résultats obtenus en l'absence de ces substances. Lorsque tous les autres constituants sont connus et disponibles, la sélectivité peut être déterminée en comparant les résultats obtenus avec l'analyte seul et avec l'analyte additionné des substances soupçonnées de provoquer des interférences. Lorsque ces substances n'ont pu être identifiées ou ne sont pas disponibles, on peut souvent évaluer la sélectivité en ajoutant des quantités connues d'analyte pur à des échantillons dans lesquels la concentration des autres constituants est maintenue constante et en déterminant la quantité d'analyte retrouvée.[11]

- Linéarité :

La linéarité d'une méthode analytique est sa capacité à donner des résultats directement proportionnels à la concentration de l'analyte dans les échantillons. Le domaine d'utilisation est l'intervalle entre la concentration la plus faible et la concentration la plus élevée dont on a démontré qu'elles pouvaient être déterminées avec une précision, une exactitude et une linéarité acceptables. Ces caractéristiques sont déterminées en appliquant la méthode à une série d'échantillons dont les concentrations en analyte couvrent tout le domaine d'utilisation proposé. [11]



- ➔ Concentration
= quantité introduite
- ➔ Résultat
= quantité mesurée

- 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 (ex : standard international, standard d'une pharmacopée).

- Indication sur les erreurs systématiques

- Fidélité :

La fidélité exprime l'étroitesse de l'accord (degré de dispersion, coefficient de variation) entre une série de mesures provenant de multiples prises d'un même échantillon homogène (résultats d'essais indépendants) dans des conditions prescrites.

- Indication sur les erreurs aléatoires
- Il couvre trois niveaux 3 niveaux :
 - 1) Répétabilité
 - 2) Fidélité intermédiaire (intra-laboratoire)
 - 3) Reproductibilité (inter-laboratoire)

- 1) Répétabilité : Cette mesure de la variation des résultats au sein d'un même laboratoire caractérise la précision obtenue lorsque la méthode est répétée par le même analyste dans les mêmes conditions (réactifs, matériel, réglage, laboratoire) dans un court intervalle de temps. La répétabilité d'une méthode est évaluée en procédant à des déterminations complètes et distinctes sur des échantillons identiques provenant du même lot homogène de produit. Cela permet d'évaluer la précision de la méthode dans les conditions opératoires normales. [10], [11]

- 2) 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. [10], [11]
- 3) Reproductibilité (inter-laboratoire) : C'est la précision de la méthode lorsqu'elle est appliquée dans des conditions différentes - généralement dans des laboratoires différents - à des échantillons distincts, théoriquement identiques, prélevés sur le même lot homogène de produit à analyser. Afin de pouvoir comparer des résultats obtenus par différents analystes, avec un matériel différent, ou à des dates différentes. [10], [11]

- Exactitude :

L'exactitude correspond au degré de concordance entre la valeur de référence ou la valeur considérée comme véritable par convention et la valeur obtenue.

$$\begin{aligned} \text{Valeur trouvée} &= x_i \\ \text{Vraie valeur} &= \mu_T \\ \text{Exactitude du résultat} &= x_i - \mu_T \end{aligned}$$

- Robustesse :

La robustesse est la qualité d'une méthode capable de donner des résultats d'une exactitude et d'une précision acceptables dans des conditions diverses. Elle permet d'évaluer dans quelle mesure les résultats obtenus sur des échantillons distincts, théoriquement identiques, prélevés sur le même lot homogène de produit à analyser, subissent l'influence des changements apportés aux conditions opérationnelles ou environnementales, dans la limite des spécifications établies pour la méthode. [11]

III.4 .Approche de l'erreur totale :

La méthode de validation utilisant le profil d'exactitude comme outil de décision a été développée par une commission de la SFSTP (SFSTP 2003 et 2006), pour pallier aux faiblesses des guides de validation précédents.

Cette commission est répartie des objectifs fondamentaux de la validation analytique pour proposer un outil de décision permettant de prévoir avec quelle garantie une proportion donnée des résultats futurs seront compris dans les limites d'acceptabilité.

Ceci permet de mieux intégrer les besoins de l'utilisateur final de la méthode analytique aux objectifs de la validation. [8]

III.4.1. Définition et objectif :

L'approche de l'erreur totale est une démarche harmonisée de validation applicable aux différentes procédures analytiques quantitatives, et ce indépendamment du secteur d'activité.

Le but principale de cette approche est non uniquement de recadrer les objectifs de la validation en fonction de la finalité de la méthode analytique, de la valider telle qu'elle sera utilisée en routine, mais également d'offrir un outil pratique de décision en distinguant notamment les règles de diagnostic et les règles de décision.

En effet, cette démarche repose sur l'utilisation du profil d'exactitude, qui intègre de façon statistiquement correcte dans un seul graphique l'ensemble des éléments essentiels de la validation.

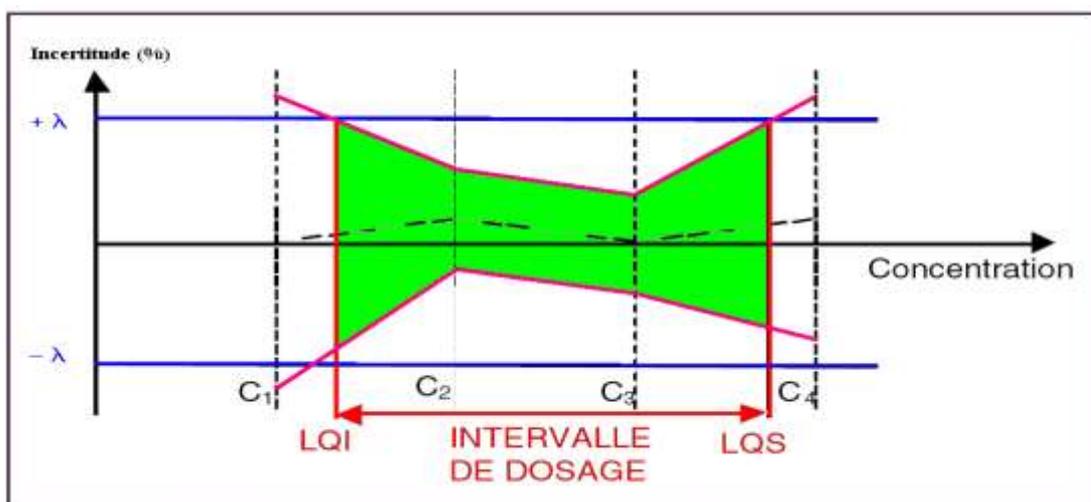


Figure 6 : Profil d'exactitude basée sur l'erreur totale

III.4.2. Avantage de l'approche de l'erreur totale :

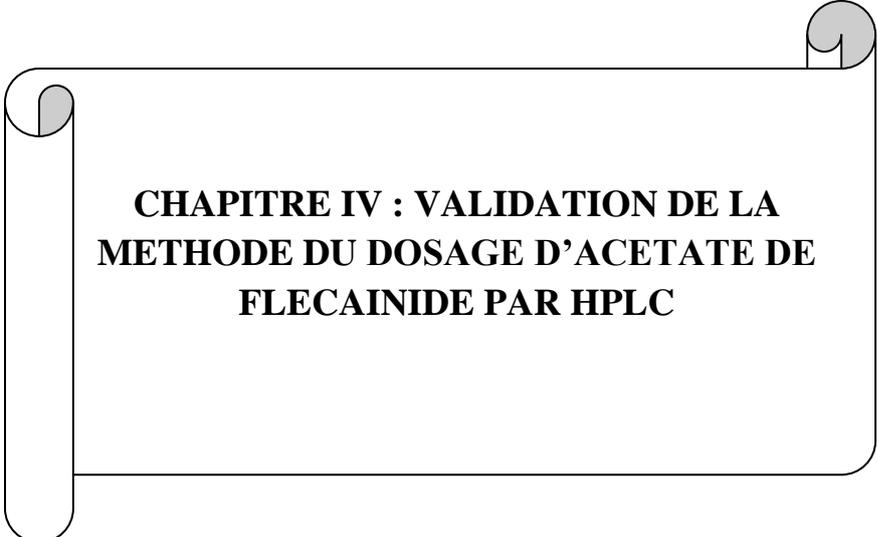
La méthode de validation reposant sur le concept de l'erreur totale en combinant les deux erreurs aléatoire et systématique, présente plusieurs avantages par rapport aux approches classiques :

- Elle est considérée comme une approche globale qui peut être appliquée quelque soit le domaine d'activité et la matrice étudiée.
- Cette approche propose une méthode d'interprétation graphique très simple et visuelle qui ne s'embarrasse pas de tests statistiques toujours délicats à décrire. 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 non seulement de simplifier l'approche de validation d'une procédure mais aussi l'estimation de l'incertitude de mesure sur la base des données de validation.
- Elle permet de génère différentes modèles d'étalonnage et possibilité de choisir le plus adéquat pour calculer, par la prédiction inverse, la concentration en retour.

III.4.3.Etapes de la validation analytique basée sur le concept de l'erreur totale :

- 1) Réalisation des expériences sur deux gammes
 - Une gamme de standards d'étalonnage (échantillons de concentrations connues).
 - Une gamme de standards de validation (échantillons reconstitués dans la matrice).
- 2) Alignement des observations (si pour un niveau de concentration les quantités introduites ne sont pas identiques pour toutes les séries).
- 3) Sélection des limites d'acceptation en fonction des contraintes du secteur d'activité
- 4) Choix du modèle adéquat après génération de plusieurs modèles d'étalonnage
- 5) Calcul des concentrations en retour a partir du modèle sélectionné par prédiction inverse
- 6) Calcul de la justesse a chaque niveau de concentration
- 7) Calcul de la fidélité a chaque niveau de concentration
- 8) Calcul des intervalles de tolérance bilatéraux pour chaque niveau de concentration
- 9) Etablissement du profil d'exactitude



**CHAPITRE IV : VALIDATION DE LA
METHODE DU DOSAGE D'ACETATE DE
FLECAINIDE PAR HPLC**

IV .1.Mode opératoire :

Ce travail consiste a examiner les facteurs de validation analytique tout en passant par un mode opératoire bien déterminer avec des conditions expérimentale prédéfinie a l'avance.

Pour la réalisation des essais et les conditions chromatographiques on a adopté le mode opératoire suivant :

- a) Principe : opérez par chromatographie liquide à haute performance selon la pharmacopée européenne 8ème édition.
- b) Solvant de dilution : préparer une solution d'acide lactique de 2 % dans l'eau purifiée.
- c) Condition chromatographique :
 - Colonne : en acier inoxydable C8, 5 µm, 150 * 4.6mm
 - Phase mobile : Eau purifiée 710V, Acétonitrile HPLC 290V, Acide acétique 10V, tetrabutylamonium hydroxyde (1N) dans le methanol 5V
 - Ajustement de la phase a pH=5.8 avec l'ammoniaque concentré
 - Débit : 1 ml/min
 - Température du four : ambiante
 - Volume d'injection : 10 µl
 - Détection : 300 nm

- d) Préparation de la solution standard (principe actif seul) :

Peser exactement 100mg du flecainide acétate témoin (soit Pet) dans une fiole jaugé de 100ml, ajouter 80 ml de solvant de dilution, agiter jusqu'à dissolution et compléter au volume avec le même solvant.

Prélever 5ml de cette solution dans une fiole de 20ml et compléter au volume avec le même solvant.

- e) Préparation de la solution reconstituée (principe actif + excipient) :

Introduire 100mg du principe actif flécainide acétate dans une fiole de 20ml, puis en ajoute exactement 164mg du placebo .ajouter 15ml de solvant de dilution, agiter pendant 30 min jusqu'à dissolution, placer au ultrason pendant 15min, laisser refroidir et compléter au volume avec le même solvant, agiter et laisser décanter pendant 15 min puis filtrer .

Le filtrat obtenu est opalescent filtré sur un filtre de 0.45 µm.

Prélever 1ml de cette solution dans une fiole de 20ml et compléter au volume avec le même solvant.

IV. 2.Validation analytique :

IV. 2.1.vérification de la sélectivité :

- Avant la réalisation des deux gammes standard d'étalonnage et standard de validation il faut vérifier la sélectivité en injectant séparément le blanc, le placebo, le standard et la forme reconstituée.

- Les résultats obtenus sont représenté dans les figures suivant :

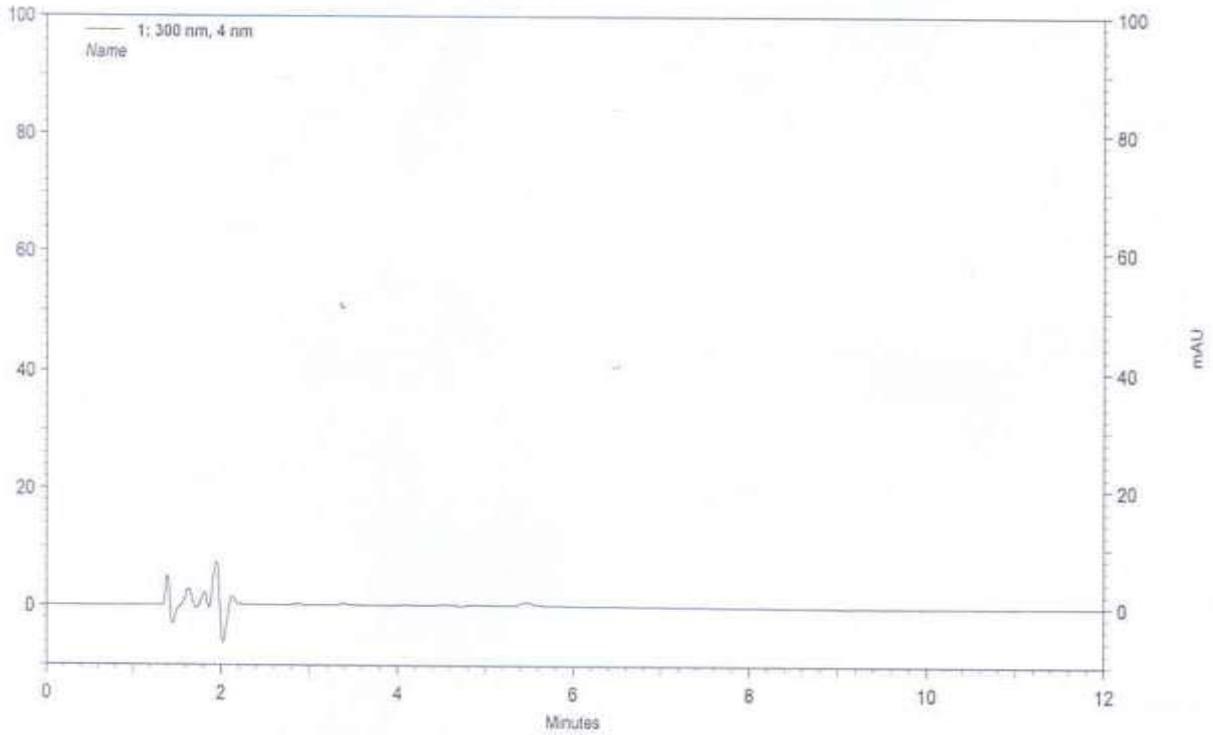


Figure 7 : chromatogramme obtenu par HPLC du blanc

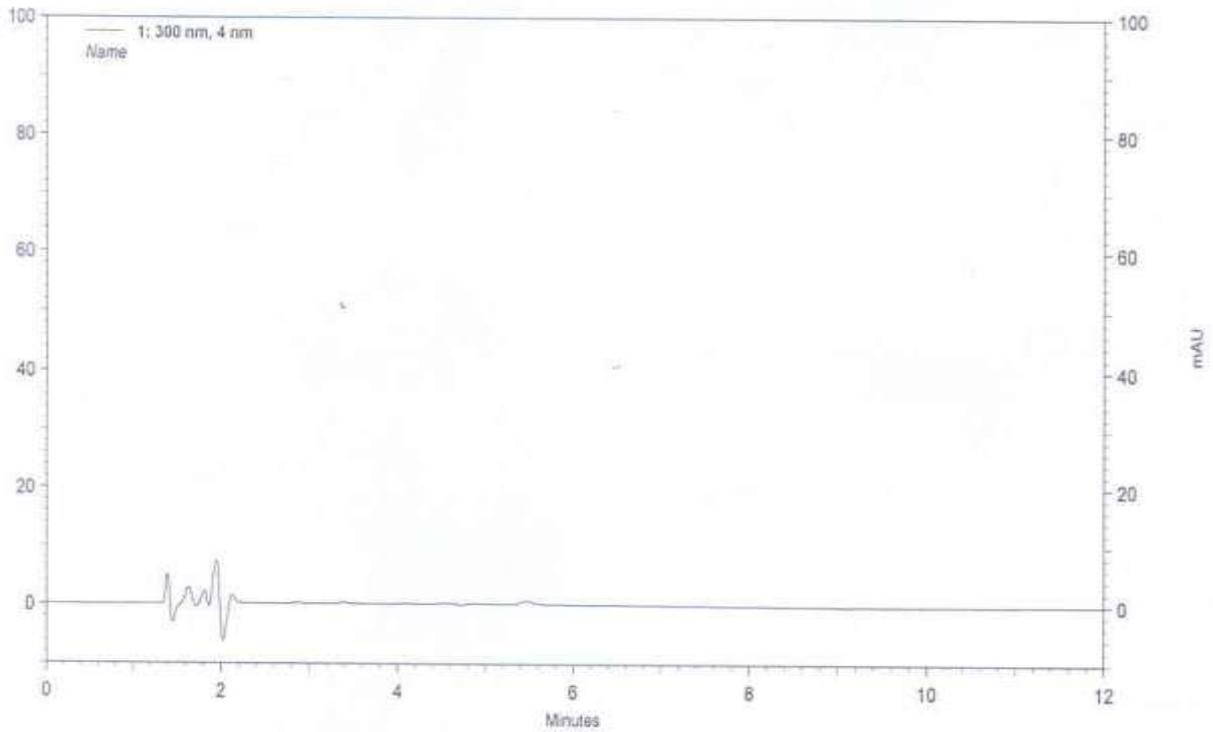


Figure 8 : chromatogramme obtenu par HPLC du placebo

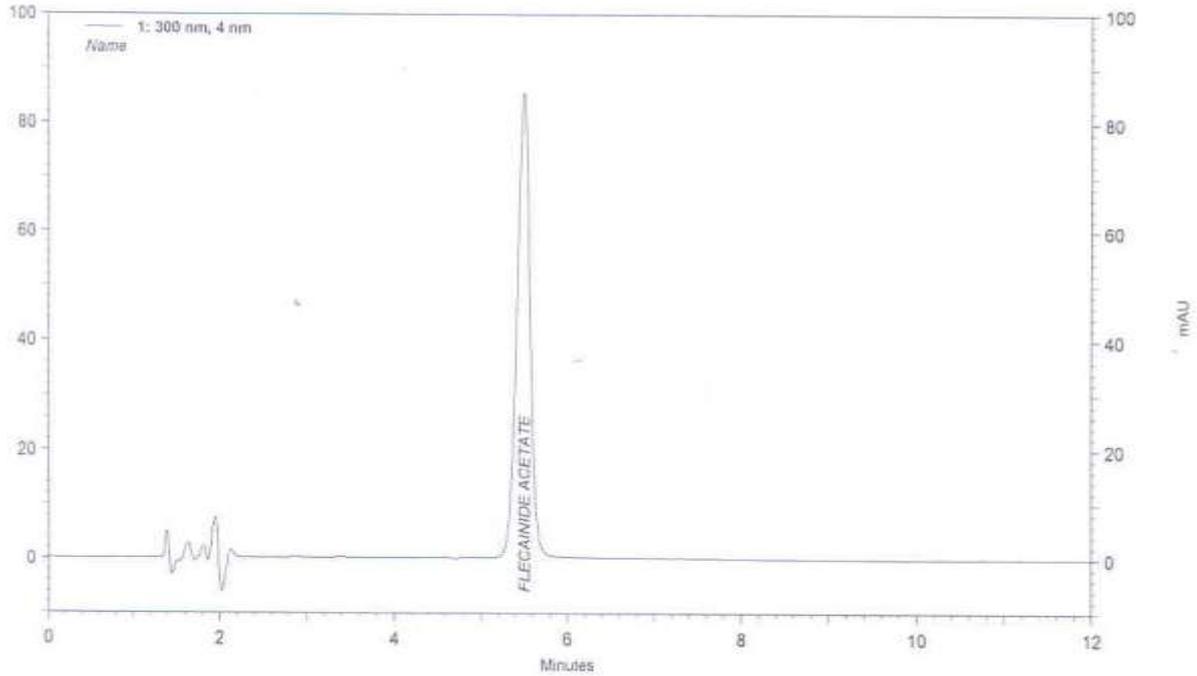


Figure 9 : chromatogramme obtenu par HPLC du STD

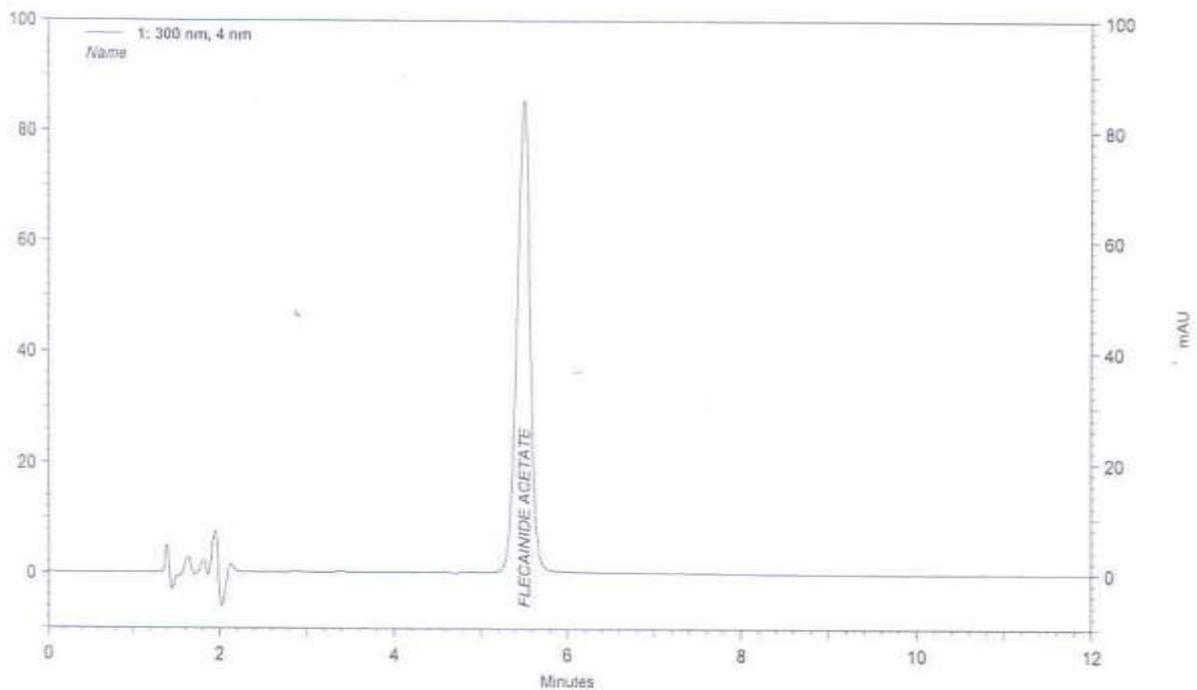


Figure 10 : chromatogramme obtenu par HPLC de la forme reconstituée

- ❖ Les chromatogrammes du blanc et du placebo ne montrent aucune détection des pics c'est-à-dire l'absence du principe actif, par contre les chromatogrammes du STD et la forme reconstituée montrent la détection du pic principale flecainide acétate dans le même temps de rétention = 5.50min sans présence d'interférences. Donc on peut déclarer que la méthode est sélective pour le dosage envisagé.

IV. 2.1.Réalisation des gammes STD d'étalonnage, STD de validation :

- Standard d'étalonnage : les solutions de standard d'étalonnage ont été analysées pendant trois jours différents (p=3), avec des niveaux de concentration (m=5), chaque niveau étant répété trois fois (n=3).
- Calcul des concentrations en µg/ ml pour les différents pourcentages du principe actif :

Le calcul se fait par le biais de la formule suivante :

$$C = \frac{P_{et}}{V_s} * \frac{P_{ed}}{V_d} * 1000 \quad \text{eq : (3)}$$

Avec : P_{et} : prise d'essai témoin V_s : volume du solvant
 P_{ed} : prise d'essai de dilution V_d : volume de dilution

On prépare 5 concentrations réparties sur l'intervalle d'étude avec 3 essais par niveau. D'après le calcul on a trouvé les résultats suivants :

| Niveau | pourcentage | P_{et} (mg) | P_{ed} (ml) | V_s (ml) | V_d (ml) | Conc(µg) |
|--------|-------------|---------------|---------------|------------|------------|----------|
| 1 | 60% | 60 | 5 | 100 | 20 | 150 |
| 2 | 80% | 80 | | | | 200 |
| 3 | 100% | 100 | | | | 250 |
| 4 | 120% | 120 | | | | 300 |
| 5 | 140% | 140 | | | | 350 |

Tableau 3 : calcul des concentrations, standard d'étalonnage

- Selon la norme ICH les niveaux de concentration varie de 60 % a 140 constituent l'intervalle de mesure, donc on a calculé les concentrations pour chaque niveau du standard d'étalonnage en utilisant équation (3).
- Standard de validation : les solutions de standard de validation ont été analysées pendant trois jours différents (p=3), avec des niveaux de concentration (m=5), chaque niveau étant répété quatre fois (n=4).

On prépare 5 concentrations réparties sur l'intervalle d'étude avec 4 essais par niveau. D'après le calcul on a trouvé les résultats suivants :

| Niveau | pourcentage | P _{et} (mg) | P _{ed} (ml) | V _s (ml) | V _d (ml) | Conc (µg) |
|--------|-------------|----------------------|----------------------|---------------------|---------------------|-----------|
| 1 | 60% | 60,142 | 1 | 20 | 20 | 150,355 |
| | | 60,113 | | | | 150,283 |
| | | 60,161 | | | | 150,403 |
| | | 60,139 | | | | 150,348 |
| 2 | 80% | 80,154 | 1 | 20 | 20 | 200,385 |
| | | 80,198 | | | | 200,495 |
| | | 80,148 | | | | 200,370 |
| | | 80,166 | | | | 200,415 |
| 3 | 100% | 100,231 | 1 | 20 | 20 | 250,578 |
| | | 100,137 | | | | 250,343 |
| | | 100,192 | | | | 250,480 |
| | | 100,184 | | | | 250,460 |
| 4 | 120% | 120,163 | 1 | 20 | 20 | 300,408 |
| | | 120,215 | | | | 300,538 |
| | | 120,178 | | | | 300,445 |
| | | 120,201 | | | | 300,503 |
| 5 | 140% | 140,180 | 1 | 20 | 20 | 350,450 |
| | | 140,155 | | | | 350,388 |
| | | 140,173 | | | | 350,433 |
| | | 140,159 | | | | 350,398 |

Tableau 4 : calcul des concentrations, standard de validation

- la variation des concentrations théoriques pour le même niveau sont due aux différentes prises d'essais du principe actif qu'on a mélangé avec le placebo, est qu'on va les aligné par la suite de ce modeste travail.

IV .3.Données brutes recueillies :

- Après réalisation des essais est le calcul des concentrations, on a procéder a des injections sur la chromatographie a haute performance pour différentes séries réaliser dans des jours différents afin d'obtenir les réponses analytique sous forme des aires des pics. Les résultats obtenus sont regroupées dans les tableaux suivants :

| niveau j | Concentration ($\mu\text{g/ml}$) | Aire | | |
|----------|------------------------------------|--------|--------|--------|
| | | série1 | série2 | série3 |
| 1 | 150 | 432953 | 440028 | 439146 |
| | 150 | 436871 | 435843 | 435990 |
| | 150 | 430828 | 434642 | 436012 |
| 2 | 200 | 564077 | 572944 | 569611 |
| | 200 | 566091 | 568126 | 568565 |
| | 200 | 566040 | 571144 | 569586 |
| 3 | 250 | 720267 | 722918 | 724116 |
| | 250 | 717948 | 720030 | 719978 |
| | 250 | 720407 | 720498 | 723002 |
| 4 | 300 | 850080 | 854046 | 853570 |
| | 300 | 852026 | 850068 | 848500 |
| | 300 | 853716 | 853495 | 851484 |
| 5 | 350 | 996728 | 995935 | 997531 |
| | 350 | 996822 | 996713 | 998206 |
| | 350 | 995982 | 996004 | 997601 |

Tableau 5: tableau des données de standards d'étalonnage

| Niveau | Concentration ($\mu\text{g/ml}$) | Aire | | |
|--------|------------------------------------|--------|--------|--------|
| | | série1 | série2 | série3 |
| 1 | 150,355 | 432008 | 439304 | 438644 |
| | 150,283 | 430421 | 433706 | 436205 |
| | 150,403 | 435712 | 437701 | 436069 |
| | 150,348 | 432842 | 435991 | 438043 |
| 2 | 200,385 | 566090 | 571082 | 570025 |
| | 200,495 | 566402 | 566017 | 569264 |
| | 200,37 | 566508 | 568922 | 569709 |
| | 200,415 | 566242 | 567578 | 569569 |
| 3 | 250,578 | 720777 | 723292 | 724025 |
| | 250,343 | 720196 | 721552 | 719775 |
| | 250,48 | 720209 | 720276 | 722824 |
| | 250,46 | 720527 | 722411 | 721931 |
| 4 | 300,408 | 848064 | 852039 | 852947 |
| | 300,538 | 852180 | 851937 | 848846 |
| | 300,445 | 853316 | 852731 | 851702 |
| | 300,503 | 851996 | 852421 | 852030 |
| 5 | 350,45 | 995013 | 995503 | 997014 |
| | 350,388 | 996002 | 996422 | 998686 |
| | 350,433 | 995730 | 996130 | 998036 |
| | 350,398 | 995801 | 995996 | 997518 |

Tableau 6 : tableau des données de standards de validation

- Les réponses analytiques sous forme des aires des pics obtenus par HPLC sont proportionnelles aux concentrations introduites.

IV. 4. Réalisation des étapes du concept de l'erreur totale

IV. 4.1. Fonction de réponse :

En utilisant les données de la gamme des standards d'étalonnage, on va pouvoir générer différents modèles de calibration afin de choisir le plus adéquat.

Cette étape est l'une des étapes les plus importantes du fait que la fiabilité des résultats de validation qui seront obtenus dépend du modèle de régression sélectionné.

| Type | Equation | Paramètres |
|------------------------------|---------------------------------------|------------------|
| Droite passant par l'origine | $Y = a Z$ | A |
| Droite linéaire | $Y = a Z + b$ | a, b |
| Fonction quadratique | $Y = a Z^2 + bZ + c$ | a, b, c |
| Transformation logarithmique | $\ln(Y) = \alpha \ln(Z) + \beta$ | α, β |
| Transformation racine carrée | $\sqrt{Y} = \delta \sqrt{Z} + \gamma$ | δ, γ |

Tableau 7 : les types des fonctions de réponse

- Le choix du type de fonction de réponse va être selon le plus adéquat après génération des différents modèles.

IV. 4.2. Alignement des concentrations introduites par la fonction de réponse : Droite linéaire :

Après la réalisation des essais de validation et l'estimation des paramètres d'étalonnage, le guide de validation SFSTP 2006 indique que, dans le cas où les quantités introduites ne sont pas identiques, il faut aligner les concentrations sur la concentration moyenne du niveau par interpolation.

- Les résultats de la régression linéaire pour le calcul de l'ordonnée à l'origine (intercepte), la pente, coefficient de détermination sont regroupés dans le tableau suivant :

| | intercepte | pente | R ² |
|---------|------------|---------|----------------|
| série 1 | 7160,26 | 2824,92 | 0,9998 |
| série 2 | 15217,17 | 2801,11 | 0,9996 |
| série 3 | 13831,63 | 2806,78 | 0,9994 |

Tableau 8 : l'ordonnée à l'origine, la pente, coefficient de détermination de chaque série

- Les paramètres de la régression sont calculés à partir de la gamme de standard d'étalonnage afin de pouvoir les utiliser pour le calcul des réponses corrigées

Sur les données du tableau 5 on va procéder à un alignement avant de passer à la prédiction inverse, car il faut vérifier que les niveaux des concentrations des quantités introduites soient identiques pour chaque série. Pour ce faire, on procède à un alignement sur la concentration moyenne. L'alignement s'applique aux réponses choisies à partir des standards de calibration. Cela consiste à transformer les réponses obtenues à des réponses calculées selon l'équation suivante et d'après la norme ISO 5725-2 :

$$y_{ijk,cal}=y_{ijk}+f(\bar{Z}_{ij})-f(z_{ijk}) \quad \text{eq :}(4)$$

Avec:

i est l'indice de série, k est l'indice de niveau, j est l'indice de répétitions

$Y_{ijk,cal}$ est la réponse calculée

Y_{ijk} est la réponse obtenue

$f(\bar{Z}_{ij})$ est la fonction de réponse considérée à la concentration moyenne

$f(z_{ijk})$ est la fonction de réponse considérée à la concentration introduite

- Les résultats obtenus de la réponse analytique corrigée sont présentés dans le tableau 9.

IV. 4.3. Prédiction inverse :

Les calculs de la justesse et la fidélité se font avec les concentrations prédites et non pas avec les réponses. La prédiction inverse se fait via la fonction inverse de la fonction de réponse choisie à partir des données de calibration, selon le modèle mathématique suivant :

$$Z_{cal} = f^{-1}(Y) \quad \text{eq :}(5)$$

Avec :

Z_{cal} est la concentration calculée ou concentration retrouvée

$f^{-1}(Y)$ est l'équation de prédiction inverse dans notre cas : $Y = a Z + b$

Le tableau ci-dessous donne un exemple de fonction inverse pour le calcul de la concentration par la prédiction inverse.

| Type de fonction de réponse | Equation | Concentration calculée |
|------------------------------|---------------------------------------|---|
| Droite passant par l'origine | $y = a Z$ | $Z_{cal} = \frac{Y}{a}$ |
| Droite linéaire | $Y = a Z + b$ | $Z_{cal} = \frac{Y-b}{a}$ |
| Fonction quadratique | $Y = a Z^2 + bZ + c$ | $Z_{cal} = \frac{-b \pm \sqrt{b^2 - 4a(c-Y)}}{2a}$ |
| Transformation logarithmique | $\ln(Y) = \alpha \ln(Z) + \beta$ | $Z_{cal} = e^{\frac{\ln(Y) - \beta}{\alpha}}$ |
| Transformation racine carrée | $\sqrt{Y} = \delta \sqrt{Z} + \gamma$ | $Z_{cal} = \left(\frac{\sqrt{Y} - \gamma}{\delta} \right)^2$ |

Tableau 9 : prédiction inverse de concentration à partir de différentes fonctions de réponses

Les résultats obtenus après calcul en utilisant l'équation (4) et (5) sont regroupés dans le tableau suivant :

| Niveau | Conc µg/ml | RA corrigé | | | concentration retrouvé | | |
|--------|------------|------------|--------|--------|------------------------|---------|---------|
| | | S1 | S2 | S3 | S1 | S2 | S3 |
| 1 | 150,347 | 431986 | 439282 | 438622 | 150,385 | 151,392 | 151,344 |
| | 150,347 | 430602 | 433886 | 436385 | 149,895 | 149,465 | 150,547 |
| | 150,347 | 435555 | 437545 | 435913 | 151,649 | 150,771 | 150,379 |
| | 150,347 | 432840 | 435988 | 438041 | 150,688 | 150,216 | 151,137 |
| 2 | 200,416 | 566178 | 571170 | 570113 | 197,888 | 198,475 | 198,192 |
| | 200,416 | 566180 | 565796 | 569043 | 197,889 | 196,557 | 197,811 |
| | 200,416 | 566639 | 569052 | 569839 | 198,051 | 197,719 | 198,094 |
| | 200,416 | 566245 | 567582 | 569573 | 197,912 | 197,194 | 197,999 |
| 3 | 250,465 | 720459 | 722976 | 723708 | 252,503 | 252,670 | 252,915 |
| | 250,465 | 720541 | 721894 | 720118 | 252,532 | 252,284 | 251,636 |
| | 250,465 | 720167 | 720235 | 722783 | 252,399 | 251,692 | 252,585 |
| | 250,465 | 720541 | 722426 | 721945 | 252,532 | 252,474 | 252,287 |
| 4 | 300,474 | 848249 | 852223 | 853131 | 297,739 | 298,812 | 299,026 |
| | 300,474 | 851998 | 851756 | 848665 | 299,066 | 298,645 | 297,435 |
| | 300,474 | 853396 | 852811 | 851782 | 299,561 | 299,022 | 298,545 |
| | 300,474 | 851913 | 852339 | 851948 | 299,036 | 298,853 | 298,604 |
| 5 | 350,417 | 994920 | 995411 | 996922 | 349,660 | 349,930 | 350,256 |
| | 350,417 | 996085 | 996504 | 998768 | 350,072 | 350,320 | 350,913 |
| | 350,417 | 995686 | 996086 | 997991 | 349,931 | 350,171 | 350,637 |
| | 350,417 | 995855 | 996050 | 997572 | 349,991 | 350,158 | 350,487 |

Tableau 10 : résultats des concentrations retrouvées par prédiction inverse

- Après application des formules déjà mentionner on a pu regrouper les résultats de la réponse analytique corrigé ainsi les concentrations retrouvé qui vont nous servir pour calculer les critères de fidélité et justesse

IV. 4.4. Calcul de la fidélité :

La fidélité de la méthode se caractérise par le coefficient de variation de la répétabilité et de la fidélité intermédiaire, donc il faut :

- Calculer pour chaque niveau k les critères de fidélité :
 - L'écart-type de répétabilité, noté s_r ;
 - l'écart-type inter-séries, noté S_b ;
 - L'écart-type de fidélité intermédiaire $S_{FI} = \sqrt{S^2_L + S^2_r}$ **eq :(6)**
 - Coefficient de variation de la repétépilité $CV_r = \frac{S_r}{\bar{Z}} * 100$ **eq :(7)**
 - Coefficient de variation de la fidélité intermédiaire $CV_{FI} = \frac{S_{FI}}{\bar{Z}} * 100$. **eq :(8)**

- Calculer la moyenne générale d'un niveau par le biais de la formule suivante :

$$\bar{\bar{Z}} = \frac{1}{I*J} \sum_{i=1}^I \sum_{j=1}^J Z_{ij} \quad \text{eq: (9)}$$

- Calculer les écarts-types de répétabilité, inter-séries et de fidélité intermédiaire en effectuant l'analyse de la variance (ANOVA) d'un modèle à effet aléatoire, selon les principes décrits de la norme ISO 5725, à savoir une décomposition de la somme des carrés des écarts totale en deux sommes des carrés d'écarts

$$\sum_{i=1}^I \sum_{j=1}^J (z_{ij} - \bar{\bar{Z}})^2 = \sum_{i=1}^I \sum_{j=1}^J (z_{ij} - \bar{Z}_i)^2 + \sum_{i=1}^I J(\bar{Z}_i - \bar{\bar{Z}})^2 \quad \text{eq: (10)}$$

Cette équation est traditionnellement écrite sous une forme abrégée, faisant appel à trois sommes de carrés d'écarts (*SCE*).

$SCE_t = SCE_B + SCE_r$ Équation générale de l'analyse de variance

Où chacune des sommes est définie comme suit pour faciliter l'interprétation :

- SCE_t Somme totale des écarts à la moyenne générale du niveau
- SCE_B Somme des écarts inter-séries
- SCE_r Somme des écarts intra-série

Comme le propose la norme ISO 5725, il n'est pas nécessaire de développer les trois sommes de carrés pour effectuer les calculs ; le calcul de SCE_B se fait par différence. Cette méthode peut poser des problèmes si le résultat est négatif : forcer alors la valeur de SCE_B à 0.

$$SCE_B = SCE_t - SCE_r \text{ si } SCE_B > 0$$

$$SCE_B = 0 \text{ si } SCE_B \leq 0$$

- Calculer la variance de répétabilité du niveau, à partir des répétitions z_{ij} :

$$S_r^2 = \frac{SCE_r}{J(I-1)} \quad \text{eq: (11)}$$

Donc l'écart type de répétabilité

$$S_r = \sqrt{S_r^2} \quad \text{eq: (12)}$$

- Calculer la variance inter-séries notée S_B^2 , comme suit :

$$S_B^2 = \frac{SCE_B}{J(I-1)} - \frac{S_r^2}{J} \quad \text{eq: (13)}$$

Donc l'écart type inter-série noté

$$S_B = \sqrt{S_B^2} \quad \text{eq: (14)}$$

- Calculer la variance de fidélité intermédiaire du niveau :

$$S_{FI}^2 = S^2_L + S^2_r \quad \text{eq: (15)}$$

Donc L'écart-type de fidélité intermédiaire

$$S_{FI} = \sqrt{S^2_L + S^2_r} \quad \text{eq: (16)}$$

- Les résultats obtenus par l'analyse de la variance ANOVA sont regroupés dans le tableau suivant :

| niveau | CM _b | CM _w | S ² _b | S ² _r | S ² _w | S ² _{FI} |
|--------|-----------------|-----------------|-----------------------------|-----------------------------|-----------------------------|------------------------------|
| 1 | 0,153 | 0,477 | 0,000 | 0,477 | 0,477 | 0,418 |
| 2 | 0,332 | 0,231 | 0,025 | 0,231 | 0,231 | 0,256 |
| 3 | 0,046 | 0,160 | 0,000 | 0,160 | 0,160 | 0,139 |
| 4 | 0,258 | 0,364 | 0,000 | 0,364 | 0,364 | 0,345 |
| 5 | 0,448 | 0,045 | 0,101 | 0,045 | 0,045 | 0,145 |

Tableau 11 : résultats de différentes variances pour le calcul de la fidélité

- Le tableau regroupe les différents critères qui vont nous permettre le calcul de la répétabilité et la fidélité intermédiaire afin de pouvoir jugé la fidélité de la méthode.
 - Les résultats du calcul de la répétabilité et la fidélité intermédiaire via les équations (12) et(16) sont regroupé dans le tableau suivant :

| moyen (zj) | répétabilité | | fidélité intermédiaire | |
|------------|--------------|-------|------------------------|-------|
| | Sr | CV% | Sfi | CV% |
| 150,656 | 0,691 | 0,458 | 0,691 | 0,458 |
| 197,815 | 0,481 | 0,243 | 0,506 | 0,256 |
| 252,376 | 0,399 | 0,158 | 0,399 | 0,158 |
| 298,695 | 0,604 | 0,202 | 0,604 | 0,202 |
| 350,211 | 0,211 | 0,060 | 0,381 | 0,109 |

Tableau 12 : calcul des CV de répétabilité , fidélité intermédiaire

- Les coefficients de variation soit de la répétabilité ou de fidélité intermédiaire sont inférieurs à 2% exigé par les normes ICH c'est-à-dire que la méthode est fidèle pour les différents niveaux.

IV. 4.5. Calcul de la justesse :

La justesse fournit une indication sur les erreurs systématiques de la procédure analytique. Elle peut s'exprimer de différentes façons. Les trois paramètres présentés, mesurent en réalité des défauts de justesse.

| Les paramètres de la justesse | Equation |
|--|--|
| Biais absolu | $B_{\text{biais}} = Z_j - X_j$ |
| Biais relatif | $B_{\text{biais}} = \frac{ Z_j - X_j }{X_j} * 100$ |
| Taux de recouvrement ou de récupération | $R_j(\%) = \frac{Z_j}{X_j} * 100$ |

Avec : X_j : La valeur de référence d'un échantillon (concentration introduite)

Z_j : est la moyenne de mesurages répétés sur ce même échantillon (concentration calculée).

- Les résultats des paramètres de la justesse sont regroupés dans le tableau suivant :

| niveau | biais absolu | biais relatif % | recouvrement % |
|--------|--------------|-----------------|----------------|
| 1 | 0,31 | 0,21 | 100,21 |
| 2 | 2,6 | -1,3 | 98,70 |
| 3 | 1,91 | 0,76 | 100,76 |
| 4 | 1,78 | -0,59 | 99,41 |
| 5 | 0,21 | -0,06 | 99,94 |

Tableau 13 : calcul des biais et recouvrement

- ❖ Les résultats du biais relatif sont très faible c.à.d. un faible écart entre la valeur introduite est la valeur prédite, pour le taux de recouvrement il dépasse le 100% pour

le 1^{er} est le 3^{ème} niveau explique une surestimation de la concentration, pour les niveaux 2, 4,5 le taux de recouvrement est inférieure a 100% c.à.d. une sous estimation de la concentration.

IV. 4.6. Calcul des intervalles de tolérance :

- La méthode de calcul proposée par Mee (1984) est celle qui a été choisie pour cette procédure. Elle a aussi été adoptée par une commission de la Société des sciences et techniques pharmaceutiques (SFSTP - 2003, 2006). Le calcul se fait à partir des données du critère de fidélité et de justesse par niveau, indépendamment pour chaque niveau de concentration k . Pour des raisons de simplification des formules, l'indice k est omis dans les formules suivantes.

- Exprimer l'intervalle de tolérance comme un intervalle symétrique autour de la concentration retrouvée moyenne \bar{Z} du niveau :

- $\bar{Z} \pm K_{tol} S_{IT}$ **eq: (17)**

- Calculer l'écart-type de l'intervalle de grâce aux formules suivantes :

- $S_{IT} = S_{FI} * \sqrt{\left(1 + \frac{1}{I * J * B^2}\right)}$ **eq: (18)**

- $B = \sqrt{\frac{R+1}{R * J + 1}}$ **eq : (19)**

- $R = \frac{S^2_L}{S^2_r}$ **eq : (20)**

- La quantité k_{tol} est appelé **facteur de couverture de l'intervalle de tolérance** et vaut:

- $k_{tol} = t_{v, \frac{1+\beta}{2}}$ **eq : (21)**

- $t_{v, \frac{1+\beta}{2}}$ Est le quantile de la distribution t de Student pour v degrés de liberté et β la probabilité du contenu de l'intervalle de tolérance. Le nombre de degrés de liberté v est calculé selon méthode d'approximation et donne :

- $v = \frac{(R+1)^2}{\frac{(R+\frac{1}{J})^2}{I-1} + \frac{1-1/J}{IJ}}$ **eq: (22)**

- $L_j = \text{biais}(\%) - k_{tol}$ **eq: (23)**

- $U_j = \text{biais}(\%) + k_{tol}$ **eq: (24)**

Donc l'intervalle de tolérance est un moyen statistique commode d'exprimer l'erreur totale puisqu'il combine simultanément les erreurs aléatoires et systématiques.

- En utilisant les équations (17) —————> (24) on a pu obtenir les résultats présenté dans le tableau (13) pour tracer les intervalles de tolérances.

| niveau | Conc µg/ml | Rj | Bj | V | t | K | CVFI | Li (Lj) | Ls(Uj) | LAS | LAI | biais relatif |
|--------|---------------|-------|-------|--------|-------|-------|-------|---------|--------|-----|-----|---------------|
| 1 | 150,347 | 0 | 1 | 10,667 | 2,209 | 2,299 | 0,458 | -0,78 | 1,19 | -5 | 5 | 0,205 |
| 2 | 200,416 | 0,109 | 0,879 | 9,684 | 2,238 | 2,356 | 0,256 | -1,90 | -0,69 | -5 | 5 | -1,298 |
| 3 | 250,465 | 0 | 1 | 10,667 | 2,209 | 2,299 | 0,158 | 0,42 | 1,10 | -5 | 5 | 0,763 |
| 4 | 300,474 | 0 | 1 | 10,667 | 2,209 | 2,299 | 0,202 | -1,04 | -0,14 | -5 | 5 | -0,592 |
| 5 | 350,417 | 2,262 | 0,570 | 3,307 | 3,022 | 3,388 | 0,109 | -0,43 | 0,31 | -5 | 5 | -0,059 |

Tableau 14 : critères d'établissement du profil d'exactitude

- Les valeurs des limites de tolérances supérieure (Ls) et limites de tolérances inférieure (Li) sont comprise entre les valeurs des limites d'acceptation (LAS, LAI).
- Donc le calcul des limites de tolérances et du biais relatif d'après la justesse ainsi la détermination des limites d'acceptation selon le risque qu'on peut supporter pour le domaine pharmaceutique= 5% va nous permettre de tracer le profile d'exactitude pour prendre la bonne décision.

IV. 4.7.Profil d'exactitude :

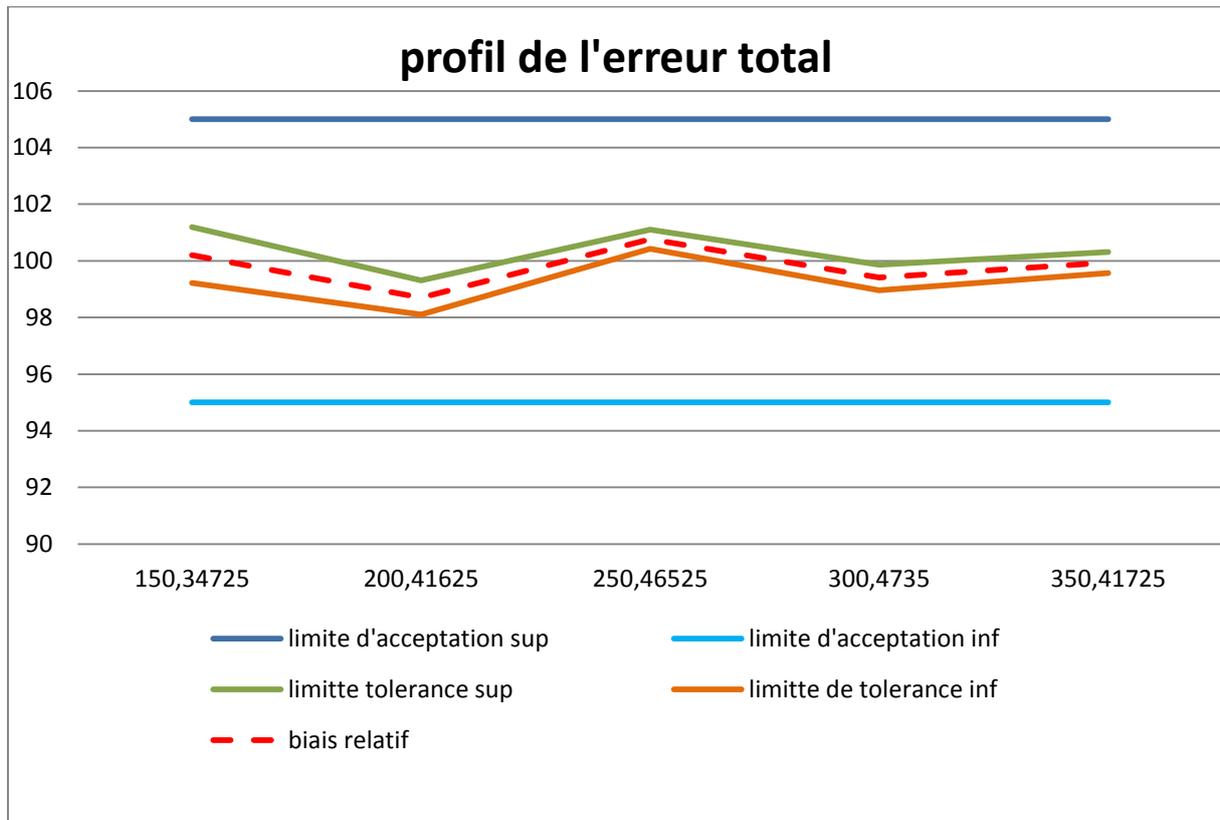


Figure 11 : profil d'erreur totale par la fonction droite linéaire

- En voie bien que les limites de tolérances inf et sup sont comprise entre les limites d'acceptation, ainsi que le biais relatif qui est au alentour de 100 %, donc on peut conclure avec une vision claire que la méthode de dosage traiter est exacte ce qui implique d'après les nouvelles approche qu'il est juste et fidèle, alors on peut prendre la discision avec un risque de 5 % que cette dernier est valider pour les différentes niveaux de concentration choisie. Autrement dit on peut déclarer que la méthode du dosage de l'acétate de flécainide par HPLC est performante.

IV. 5.Génération de profil d'exactitude par la fonction de réponse transformation logarithmique et racine carré :

- Par le même principe adopté pour la fonction de réponse droite linéaire on va calculer les paramètres de la régression linéaire après transformation mathématique des concentrations et des réponses qui sont les suivant :

| | | régression linéaire | | |
|---------------------------------|---------|---------------------|--------|----------------|
| | | Intercepte | penste | R ² |
| transformation logarithmique | série 1 | 9,54 | 52,82 | 0,9994 |
| | série 2 | 19,11 | 52,30 | 0,9996 |
| | série 3 | 17,77 | 52,39 | 0,9994 |
| transformation par racine carré | série 1 | 8,10 | 0,98 | 0,9995 |
| | série 2 | 8,10 | 0,98 | 0,9995 |
| | série 3 | 8,09 | 0,98 | 0,9993 |

Tableau 15 : critères de la régression linéaire après transformation mathématique

- Par suivie des différentes étapes d'approche de l'erreur totale déjà mentionner
 - Les figures suivantes montrent le profil d'exactitude après transformation logarithmique et racine carré.

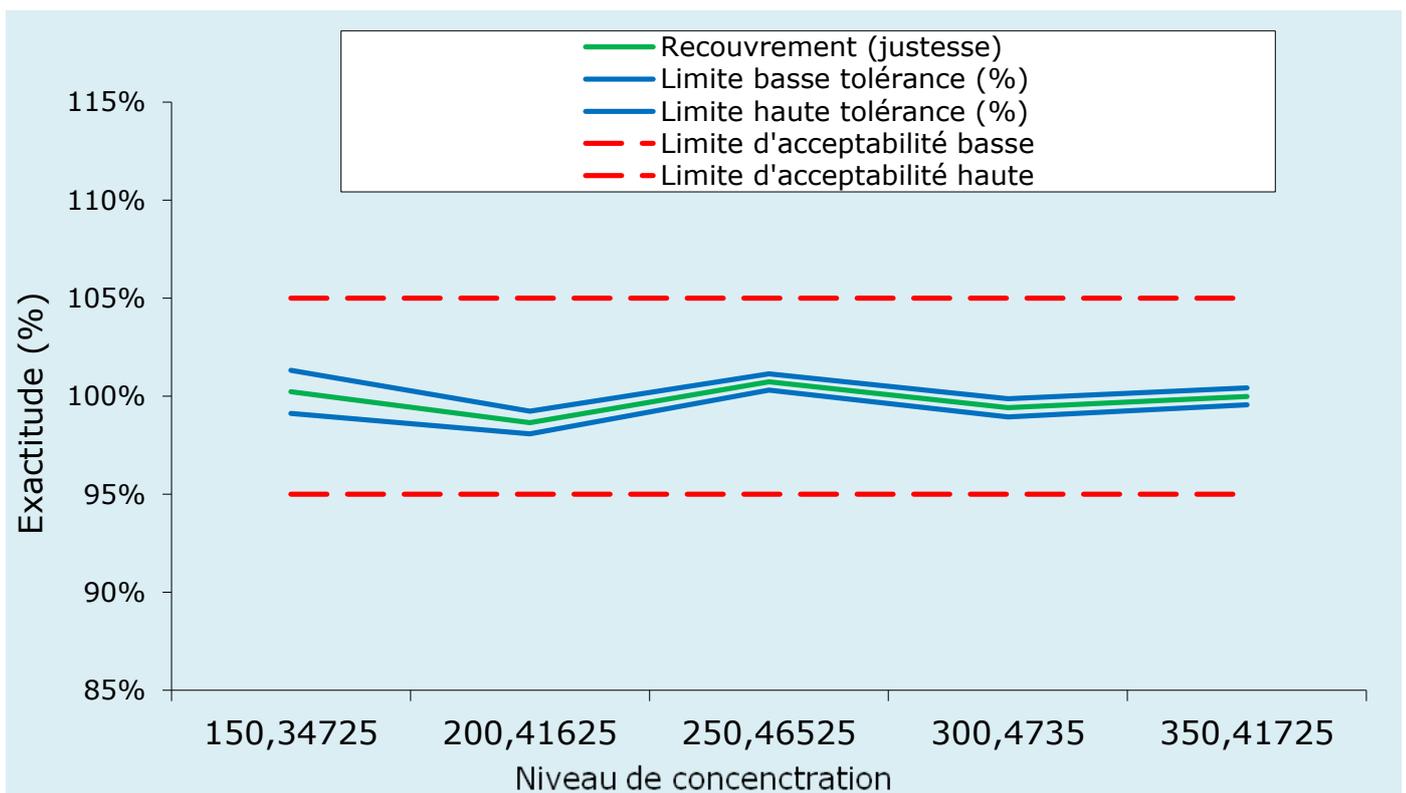


Figure 12 : profil d'exactitude par la fonction de réponse transformation logarithmique

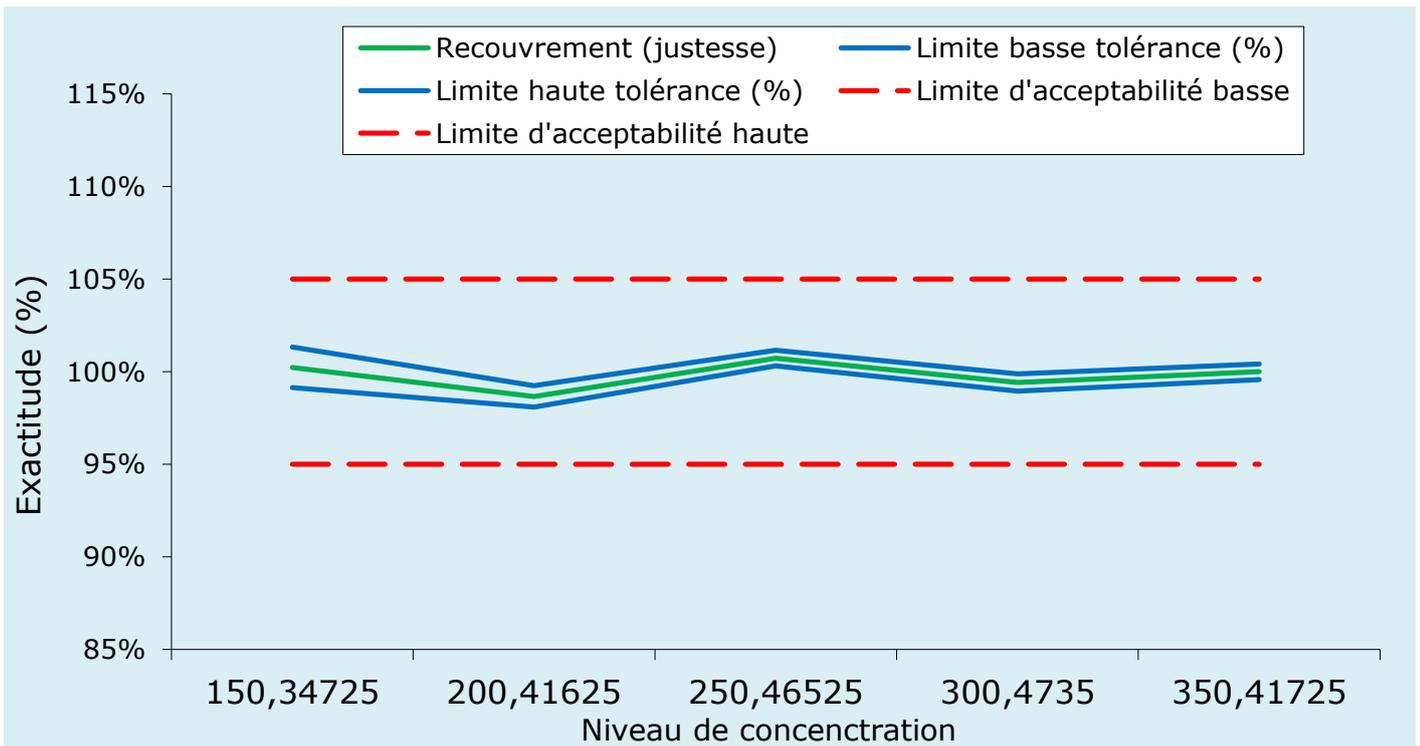


Figure 13 : profil d'exactitude par la fonction de réponse racine carré

- D'après le profil d'exactitude, les fonctions de réponse transformation logarithmique et racine carré montrent presque la même exactitude de la méthode donc on peut déclarer que la méthode est valide quelque soit la fonction de réponse choisie, de ce fait la décision prise est que la méthode est performante pour le dosage du principe actif l'acétate de flécaïnide.

Conclusion générale

Afin de garantir la qualité des médicaments, le recours à des méthodes analytiques validées est nécessaire. En effet, des résultats analytiques fiables en conformité avec les réglementations internationales sont requis d'autant plus qu'à la base de ces résultats, sont prises des décisions critiques mettant en jeu la vie de milliers de personnes.

Pour mener à bien cette étude, plusieurs référentiels réglementaires, et plusieurs guidelines, sont à la disposition des analystes, mais tous ces référentiels peuvent différer au niveau de plusieurs points.

La validation des méthodes d'analyse de dosage de substances médicamenteuses est, en effet, plus ou moins explicitement imposée dans les différentes pharmacopées, elle figure parmi les mesures universellement reconnues, comme faisant nécessairement partie d'un système exhaustif d'assurance qualité. A cet effet, une méthode chromatographique de dosage de la *L'acétate de flécaïnide* dans une forme pharmaceutique a été sujette de la validation analytique en respectant les normes et les contextes réglementaires à savoir ICH et le guideline SFSTP 2003.

Les résultats obtenus montrent que les différents critères de validation analytique par le concept de l'erreur total ont été satisfaisantes ce qui a permis de prendre la décision que la méthode du dosage est valide c.à.d. que la méthode est performante pour les niveaux de concentration choisis.

Finalement ce stage a été pour moi une occasion, d'une part, d'avoir des riches contacts humains avec tout le personnel professionnel de la société. Et d'autre part, d'avoir une idée réelle sur l'application des études statistiques à l'échelle industrielle. Ceci sera, sans doute, une énorme opportunité pour mon futur parcours professionnel.

References

[1]: <http://www.synthemedic.ma/>

[2]: <http://www.doctissimo.fr/medicament-FLECAINE-LP.htm>

[3]: Pharmacopée européenne 8ème édition

[4]: Véronique JACOB, IUT de Chimie de Grenoble 22/08/2010, la Chromatographie Liquide haute Performance (HPLC)

[5] Isabelle Pinguet 31 Aug 2015 Validation analytique : application de la proc_edure SFSTP 2003-2006 au domaine de la phytoth_erie

[6]: Exigences générales concernant la compétence des laboratoires d'étalonnages et d'essais. ISO/CEI 17025:2005.

[7]: **Feinberg M., Boulanger B., Dewé W., Hubert P.**, New advances in method validation and measurement uncertainty aimed at improving the quality of chemical data. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*. 2004, 380, 502-514.

[8]: **Feinberg M.**, Validation of analytical methods based on accuracy profiles. *Journal of Chromatography A*. 2007, 1158, 174-183.

[9]: <http://www.adn.sg/index.php?id=241>

[10]: International Conference on Harmonization of Technical Requirements for the registration of pharmaceuticals for humane use: Validation of analytical procedures: Q2A, Q2B.

[11]: <http://apps.who.int/medicinedocs/fr/d/Jh1814f/5.2.html#Jh1814f.5.2>