

République Algérienne Démocratique et Populaire
Ministère de l'enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique
Université A. MIRA - Bejaia

Faculté des Sciences et de la Nature et de la Vie
Département de biologie Physico-chimique
Filière : science biologique
Option : pharmacologie moléculaire



Mémoire de Fin de Cycle
En vue de l'obtention du diplôme

MASTER

Thème

**Validation des méthodes analytiques
par chromatographie dans le but de
mise au point d'un neuroleptique**

Présenté par :

KAKOUCHE Fedha & OUAR Rima

Soutenu le : 11 Juin 2015

Devant le jury composé de :

Mr M.HAMOUM	MAA	President
Mr A. GHIDOUCHE	MCB	Encadreur
Mr N.BREBI	MAA	Examineur
Mr I.BOUTMEUR		Invité

Année universitaire : 2014 / 2015

Remerciements

Nous remercions Dieu, le tout puissant pour nous avoir donné la foi qui nous a guidé jusqu'à la réalisation et l'aboutissement de ce projet.

Nous exprimons notre respect et notre gratitude à Mr GHIDOUCHE ABDERRZAK pour avoir accepté de nous encadrer, et Mr HERFI TOUFIK pour avoir suivi notre travail avec une extrême bienveillance.

Nous remercions les membres du jury Mr HEMOUM et Mr BRJBI pour leurs évaluations.

Notre travail a été réalisé au laboratoire de développement analytique au niveau du BIOPHARM industrie, nous présentant nos remerciements de nous avoir reçu et accordé un stage pratique au sein de leur structure, en particulier

Mr HADJRES

Nous tenons à exprimer toute notre gratitude et notre respect au responsable du laboratoire de développement analytique Mr BOUTEMEUR, IDIR, de nous accueillir et d'avoir accepté de diriger notre travail et compléter notre formation.

Nos sincères remerciements s'étendent à SAADOUDI Abdelkader (Bechar) pour avoir supervisé notre travail, et pour tout ce qu'il nous a facilité lors des manipulations.

Un remerciement tout particulier à KRITA Bilal, AITYAHIA Nabil, et HASSAM, K, Fateh, pour leurs aides, disponibilités et générosités en partageant avec nous leurs connaissances et expériences.

Nous tenons également à remercier ROUIS Rabiaa, NAKIB Salma pour leurs assistance, ZAATRI Sakina pour sa simplicité et connaissances précieuses, BRAHIMI Samir pour ses remarques et gentillesse, AIT KACI Sofiane pour ses conseils judicieux, GASMI Billel pour sa grande sympathie, LAIDI Amine pour sa gentillesse, et sans oublier BEROUANE Charif du laboratoire Galénique pour sa disponibilité, et aussi Warda et Razika pour leurs gentillesse et générosité, et tout le personnel de Biopharm.

Une atmosphère de travail très agréable existe grâce à vous !



Dédicaces

Je dédie ce modeste travail

*A la lumière de mes jours, la source de mes efforts,
ma vie et mon bonheur, à celle qui ma tout donné sans compter
Maman que j'adore.*

*À l'homme de ma vie, celui qui s'est toujours sacrifié pour me voir
réussir, que Dieu te garde pour nous, à toi*

Mon père.

*Mes chères sœurs : daya, Mélissa, et la petite Hadjer, Mon Chèr frère Naim,
votre encouragement, affection et spontanéité de cœur me sont très chères.*

Mon cousin dada Abdelkrim tu as été toujours mon exemple.

*Ma tante Zwina, ton soutien et ton profond attachement m'ont permis de réussir
mes études*

Ma cousine Saadia, tu as été toujours à mes cotés.

Mes cousins Salim, Boualem et Yasser.

Je ne vous remercierai jamais assez

Tous mes oncles et tantes Djemaa, Zakia, Fadila, Fatchi et Fouzia.

Ma grand-mère pour qui je souhaite une longue vie pleine de santé.

*Mes fidèles compagnants dans les moments les plus délicats, qui étaient toujours
à mes côtés : Karima, Amel, Sara, Salima, Channez. Je vous remercie pour tous
les moments que nous avons passé ensemble et les souvenirs qui resteront gravé
dan ma mémoire.*

*Mes aimables amies : Nawel, Safia, Karima, et sabrina, avec qui je partage
d'agréables moments et de nombreux fous rires.*

Aux personnes qui m'ont toujours aidé et encouragé, Bouzid et Smail.

Tous mes amis que je n'ai pas cités et toute la promotion de pharmacologie

*Ma chère amie et mon binôme Ryma, avec qui j'ai partagé d'importants moments
inoubliables, toujours épaulées l'une à l'autre. Que ce travail soit un
témoignage de ma gratitude et mon profond respect.*

Fedha

Dédicaces

A mes très chers parents

*A ceux que j'aime le plus au monde, A ceux qui m'ont tout donné sans compter.
Vous avez été pour moi tout au long de mes études le plus grand symbole
d'amour et de dévouement qui n'a ni cessé ni diminué.
En ce jour, j'espère réaliser l'un de vos rêves, et j'espère ne jamais vous décevoir.
Que Dieu vous garde et vous procure santé, bonheur et longue vie pour que vous
demeuriez le flambeau illuminant le chemin de vos enfants.*

A mon très cher frère Walid,

*Tu m'as toujours soutenue dans les moments difficiles. Ton affection n'a d'égale
que ta gentillesse. Avec mon grand amour, je te dédie ce travail en te souhaitant
beaucoup de bonheur et un avenir plein de joie.*

A toute ma famille,

*A mes grands-mères, je vous souhaite une longue vie, à tous mes oncles et tantes
en particulier Sadika, je vous remercie pour votre soutien, ainsi qu'à mes très
chères cousines Amel et Yasmine. Mes sincères remerciements pour mon cousin
Fodil, pour son aide tout au long de mon cursus.*

A mes amis (es) ceux qui me sont chers,

*Je vous dédie ce travail avec mes sentiments les plus sincères, en mémoire de tous
les moments agréables vécus ensemble Nawel, Safia, Sabrina, Karima
, Chahinez, Radia. Aux personnes qui m'ont toujours aidée et encouragée,
soufiane et Abderrahmane ainsi que tous mes amis que je n'ai pas cités.*

A ma très chère amie et collègue Fedha

*Je te dédie ce travail partagé ensemble avec amitié et fraternité, je te remercie
pour tous les moments qu'on a passés et tous ces jolis souvenirs qui resteront
gravés dans ma mémoire
Que ce travail, si modeste qu'il soit, témoigne de ma gratitude et ma profonde
affection*

A toute la promotion 2014/2015 de la filière pharmacologie moléculaire

Ryma

TABLES DE MATIERES

Remerciement.....	i
Dédicace.....	ii
Liste des abréviations.....	iv
Liste des figures.....	v
Liste des tableaux.....	vi
Introduction.....	1

CHAPITRE I : ETUDES BIBLIOGRAPHIQUES

I - QUALITE ET VALIDATION	2
Historique	2
I.1- NOTION DE QUALITE.....	2
I.1.1- Assurance qualité	3
I.1.2- Système qualité.....	3
I.1.3- contrôle de qualité.....	4
I.2- VALIDATION ANALYTIQUE.....	5
I.2.1 - Définition	5
I.2.2- Objectif	5
I.2.3 - Types de validation.....	5
I.2.4 - Domaine d’application pharmaceutique.....	6
I.2.5 – Structure de la validation	6
I.2.6 - Cycle de vie d’une validation analytique.....	7
I.2.7 - Critères de validation.....	7
I.2.7.1- Conformité du système.....	8
I.2.7.2- Spécificité.....	8
I.2.7.3- Fidélité.....	8

I.2.7.4- Linéarité.....	9
I.2.7.5- Robustesse.....	9
I.2.7.6- Exactitude.....	10
I.2.7.7- Limite de détection et limite de quantification.....	10
II - TECHNIQUES CHROMATOGRAPHIQUES	11
II.1 - CHROMATOGRAPHIE SUR COUCHE MINCE (CCM).....	11
II.1.1 - Appareillage	11
II.1.2 - Principe de séparation.....	11
II.1.3 - Le rapport frontal R_f	12
II.2 - CHROMATOGRAPHIE LIQUIDE A HAUT PERFORMANCE	
(HPLC).....	12
II.2.1 – Appareillage.....	12
II.2.2 - Principe de la séparation.....	13
II.2.3-Chromatogramme.....	13
II.2.3.1 – Le pic.....	14
III - PRESENTATION DE L'ENTREPRISE ET DU MEDICAMENT	15
III.1- Présentation de l'entreprise.....	15
III.2- Présentation du médicament.....	16
III.2.1- Définition.....	16
III.2.2- Classification.....	16
III.2.3- Propriétés physico-chimiques du principe actif.....	16
III.2.4- Propriétés pharmacocinétiques.....	17
III.2.5- Mécanisme d'action.....	18
III.2.6- Indications.....	18
III.2.7- Effets indésirables.....	19

CHAPITRE II : MATÉRIEL ET MÉTHODES

A. Validation analytique par Chromatographie sur couche mince	
CCM.....	20
I - PROTOCOL EXPERIMENTALS	20
I.1- la phase mobile.....	20
I.2- la phase stationnaire.....	20
I.3- conditions chromatographiques	20
I.4- solutions préparées	21
I.4.1- spécificité	21
I.4.2- dégradation forcée.....	21
I.4.3- limite de détection.....	22
II- mode opératoire	22
III- NORMES.....	23
B .VALIDATION ANALYTIQUE PAR CHROMATOGRAPHIE	
LIQUIDE A HAUT PERFORMANCHE (HPLC).....	23
I - PROTOCOL EXPERIMENTAL.....	24
I-1 solubilité du principe actif	24
I-2 La phase mobile.....	24
I-3 La phase stationnaire (la colonne).....	24
I-4 Les conditions chromatographique.....	24
I-5 solutions préparées.....	25

CHAPITRE III : RÉSULTATS ET DISCUSSION

A . Validation analytique par Chromatographie sur couche mince	
CCM.....	29
I - Spécificité.....	29
II - Dégradation forcée.....	30
III - Limite de détection.....	31
B . VALIDATION ANALYTIQUE PAR CHROMATOGRAPHIE	
LIQUIDE A HAUT PERFORMANCHE (HPLC).....	32
I - Evaluation de la conformité du système.....	32
II - Spécificité	33
III – Robustesse.....	35
IV – Fidélité.....	37
IV-1 répétabilité	37
IV-2 Fidélité intermédiaire.....	38
V – Exactitude.....	40
VII - Stabilité des solutions.....	41
VIII – Linéarité.....	45
VIII-1- Linéarité sur le principe actif seul.....	45
VIII-2- Linéarité sur placebo chargé.....	47
CONCLUSION.....	51
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUE	
ANNEXES	

LISTE DES ABRÉVIATIONS

AMM: Autorisation de Mise sur le Marché

BPF: Bonne Pratique de Fabrication

BPL: Bonne Pratique de Laboratoire

CCM : Chromatographie sur Couche Mince

Ech: Echantillon

FDA : Food and Drug Administration

HPLC: High Performance Liquid Chromatography

ICH: International Conference on Harmonisation

ISO: International Organization for Standardization

K lux H: kulo Lux heure

PA: Principe Actif

Pan: Purity angle

PTh: Purity Threshold

Rf: Rapport frontal

RSD: Relatif Standard Deviation

SNC: Systeme Nerveux Central

STD: Standard

USP: United States Pharmacopeis

UV: Ultra- Violet

WS: Working Standard

LISTE DES FIGURES

Figure 01 : *les règles de l'assurance qualité.*

Figure 02 : *représentation graphique pyramidal d'une structure de validation.*

Figure 03 : *représentation graphique de cycle de vie d'une validation analytique.*

Figure 04 : *principe de fonctionnement de la CCM.*

Figure 05 : *représentation graphique de l'appareillage de l'HPLC.*

Figure 06 : *schéma représentatif du principe de séparation(HPLC).*

Figure 07 : *représentation graphique d'un chromatogramme.*

Figure 08 : *mode d'action des neuroleptiques.*

Figure 09: *représentation photographique de détection d'une plaque de la spécificité.*

Figure 10 : *représentation photographique de détection d'une plaque de la dégradation forcée.*

Figure 11: *représentation photographique de détection d'une plaque de la limite de détection.*

Figure 12: *représentation graphique de la droite de régression (linéarité sur PA).*

Figure 13: *représentation graphique de la droite de régression (linéarité sur placebo chargé).*

Figure 14: *comparaison des graphes de linéarité.*

LISTE DES TABLEAUX

- Tableau 01 :** Classification des neuroleptiques selon la structure.
- Tableau 02 :** présentation des conditions chromatographiques (CCM).
- Tableau 03 :** préparation des solutions pour le paramètre de spécificité.
- Tableau 04 :** préparation des solutions de dégradation forcées.
- Tableau 05 :** préparation des solutions pour le paramètre de LOD.
- Tableau 06 :** la solubilité du principe actif.
- Tableau 07 :** conditions chromatographiques (HPLC).
- Tableau 08 :** préparation des solutions pour la dégradation forcée
- Tableau 09 :** préparation des solutions : standard, placebo chargé à 100% et du blanc.
- Tableau 10 :** gammes de linéarité.
- Tableau 11 :** prises d'essai du PA pour la gamme de linéarité.
- Tableau 12 :** calcul des rapports frontaux pour le paramètre de spécificité.
- Tableau 13 :** Calcule des rapports frontaux pour le paramètre de dégradation forcée.
- Tableau 14 :** Calcule des rapports frontaux pour le paramètre de limite de détection.
- Tableau 15 :** présentation des signaux standards pour la conformité du système.
- Tableau 16 :** évaluation de la conformité du système.
- Tableau 17 :** évaluation de la pureté de pic PA.
- Tableau 18 :** paramètres opératoires considérés pour l'étude de robustesse.
- Tableau 19 :** différents combinaisons des paramètres opératoires.
- Tableau 20 :** calcul de la concentration du PA dans la solution échantillon et du facteur de recouvrement.
- Tableau 21 :** calcul des effets de la robustesse.
- Tableau 22 :** évaluation de la répétabilité.

Tableau 23: évaluation de la fidélité intermédiaire.

Tableau 24: calcul du RSD intra, RSD inter, RSD total.

Tableau 25: calcul de l'exactitude et du PR%

Tableau 26: pesée des solutions de stabilité (mg).

Tableau 27: stabilité des solutions à température ambiante Aires/temps.

Tableau 28: calcul du pourcentage de variation x (% de dégradation/temps).

Tableau 29: conditions des standards de quantification.

Tableau 30: stabilité des solutions au réfrigérateur Aire/temps

Tableau 31: stabilité des solutions au réfrigérateur concentration/temps.

Tableau 32: calcul des pourcentages de dégradation/temps.

Tableau 33: Détermination de l'équation de la droite du signal en fonction de la concentration de PA, le coefficient de corrélation et le biais moyen. (Principe actif seul)

Tableau 34: Détermination de l'équation de la droite du signal en fonction de la concentration de PA, le coefficient de corrélation et le biais moyen. (Placebo chargé)

INTRODUCTION

Le médicament est un produit stratégique destiné à un usage très sensible « la santé », il doit donc répondre à des exigences de quantité et de qualité aussi stricte que possible. L'industrie pharmaceutique doit donc mettre au point des techniques très adaptées, permettant de satisfaire ces exigences.

La validation des techniques analytiques est basée sur une analyse statistique, ensemble de critères normalisés, visant à démontrer que ces méthodes permettent de donner des résultats fiables et reproductibles. En pharmacologie moderne ce processus de validation est réalisé après l'étape de la recherche et du développement du principe actif du médicament en question et de sa mise au point analytique: procédure d'identification, de dosage, de contrôle...etc. La phase de validation est un passage obligé pour toute entreprise s'inscrivant dans une démarche qualité ou, plus exactement, Assurance-Qualité.

La validation a pour objectif de démontrer que la technique concorde avec l'utilisation pour laquelle elle est destinée. Ceci fait clairement apparaître le lien existant entre la qualité d'une analyse et la validation de la méthode qui permet sa réalisation.

Dans cette optique nous nous sommes fixé comme travail la validation de techniques chromatographique, HPLC et CCM, pour le dosage et le contrôle d'un médicament neuroleptique présenté sous forme de comprimés à 25mg.

Nous avons répartis ce travail en deux parties :

- une synthèse bibliographique présentant un aperçu sur le contrôle de qualité, critères de validation ainsi que les méthodes chromatographiques ;
- une partie pratique portant sur la Validation des méthodes chromatographiques pour le dosage et le contrôle du neuroleptique.

I - QUALITE ET VALIDATION

Historique

- **1960** : jusque là, la validation ne représentait pas une exigence réglementaire et les industries pharmaceutiques n'étaient pas obligées de prouver la sécurité de leurs médicaments.

- **1962** : aux États-Unis l'amendement Kefauver-Harris (respectivement sénateur et procureur) exige aux fabricants des médicaments de démontrer l'efficacité, la sécurité de leurs produits, et de déclarer leurs effets indésirables à la FDA

- **1963** : les premiers règlements (BPF), basés sur les directives de contrôle ont été publiés et devenus effectifs.

- **1978**, l'expression « procédé de fabrication validé » a été définie dans « Drug Process Inspections Compliance Program » un programme exigeant la conduite d'un échantillonnage massif et d'essais sur les lots fabriqués.

- **1987**, une directive sur les principes généraux de validation de procédé a été émise pour les industries pharmaceutiques (U.S. FDA, 1987), cette directive a été récemment mise à jour (U.S. FDA, 2011).

- **1989**, première édition du guide Européen GMP: il remplace toutes les directives nationales dans l'union Européenne.

- **2001**(Union Européenne), l'annexe 15 du guide GMP intitulée « Qualification et Validation » (Commission Européenne 2001) et la « Note for Guidance on Process Validation » (EMA, 2001).

- **2010**, révision de la directive EMA 2001. ^[1]

I.1- NOTION DE QUALITE

Dans l'industrie pharmaceutique, la qualité peut être résumée en trois critères : la sécurité, l'efficacité et l'acceptabilité des médicaments. ^[2] Elle représente également un outil d'amélioration compétitive et d'optimisation, elle permet aussi de garantir la maîtrise des systèmes et leurs progrès. ^[3]

I.1.1 - ASSURANCE QUALITE

Selon ISO 8402, 1995 :

Ensemble des activités préétablies et systématiques mises en œuvre dans le cadre du système qualité, et démontrées en tant que besoin, pour donner la confiance appropriée en ce qu'une entité satisfera aux exigences pour la qualité.

L'« **assurance qualité** » a pour mission de fiabiliser chaque étape du processus d'une activité allant de la prise de commande en passant par la mise sur le marché, le service après-vente, jusqu'au soutien après la vente. ^[4]

L'assurance qualité obéit à des règles précises comme montrées dans la **figure 01** :

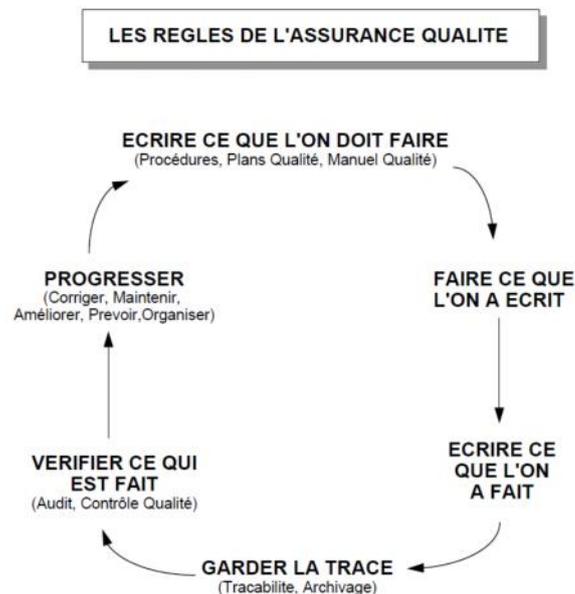


Figure 01 : Les règles de l'assurance qualité ^[5]

I.1.2- SYSTEME QUALITE

Tous les systèmes-qualités s'accordent sur un point : les «appareils de mesure de toutes sortes» doivent faire l'objet d'une qualification avant leur mise en service et lors de l'utilisation de routine, ils doivent être contrôlés et étalonnés à intervalles réguliers. Ils existent plusieurs systèmes internationaux permettant le management et l'assurance qualité.

[6]

I.1.2.1 - SYSTEME UNIVERSEL DE MANAGEMENT DE LA QUALITE

Les systèmes généraux de management de la qualité peuvent être un objectif souhaité par les entreprises de toute branche pour un domaine de validité choisi librement.

- **ISO 9000** : c'est l'organisation la plus utilisée actuellement et la plus reconnue mondialement. Les critères d'obtention de certification ISO ne sont pas juste des critères techniques mais touchent à la gestion globale de l'entreprise. ^[7]

I.1.2.2 - SYSTEMES SPECIAUX DE GESTION DE QUALITE

Dans différentes branches (p. ex. la chimie, la pharmacie), la satisfaction aux obligations est prescrite par des systèmes qualité. Dans la plus part des pays, ces exigences sont inscrites dans la loi.

- **Bonnes Pratiques de Laboratoire (BPL)**

Les principes de bonnes pratiques de laboratoire (BPL) constituent un système de garantie de la qualité du mode d'organisation et de fonctionnement des laboratoires et ont un caractère légal dans de nombreux pays et dans la plupart des domaines. ^[7]

- **Bonnes pratiques de fabrications (BPF)**

Les BPF constituent un des éléments de l'assurance qualité, d'autant plus que le médicament est un produit stratégique. Elles garantissent que les médicaments sont fabriqués et contrôlés de façon cohérente et selon les normes de la qualité adaptées à leur emploi et requises par l'autorisation de mise sur le marché. Les guides de BPF des médicaments comportent les lignes directrices à suivre pour la maîtrise des éléments essentiels. ^[6]

I.1.3- Contrôle de qualité du produit

Le contrôle de la qualité fait partie des BPF ,il concerne l'échantillonnage , les spécifications, le contrôle ainsi que les procédures d'organisation, de documentation et de libération qui garantissent que les analyses nécessaires et appropriées ont réellement été effectuées et que les matières premières, les articles de conditionnement et les produits ne sont pas libérés pour l'utilisation, la vente ou l'approvisionnement sans que leur qualité n'ait été jugée conforme aux normes préétablies. ^[8]

I.2 VALIDATION ANALYTIQUE

I.2.1 - Définition

La validation fait partie intégrante de l'assurance de la qualité. Une opération validée est une opération dont on a prouvé qu'elle permettait de fabriquer des lots uniformes répondant aux spécifications préétablies. ^[9]

Selon **FDA** : valider c'est l'établir à l'évidence, avec un degré de confiance élevée et sous une forme documentée, qu'un procédé déterminé permet d'obtenir un produit (ou service) qui atteint des spécifications définies à l'avance. ^[10]

D'après les **BPF** : la validation c'est l'établissement de la preuve, en conformité avec les principes de bonne pratique de fabrication ; que la mise en œuvre ou l'utilisation de tout processus, procédure, matériel, matière première, article de conditionnement ou produit, activité ou système permet réellement d'atteindre les résultats escomptés. ^[11]

Selon **ISO** : Les études de validation doivent conforter les bonnes pratiques de fabrication ; elles doivent être menées conformément à des procédures définies. Les résultats et les conclusions doivent être consignés. ^[5]

I.2.2- Objectifs

L'objectif de la validation est de donner des garanties suffisantes que chacune de ces mesures qui seront réalisées en routine avec une méthode précise seront suffisamment proches de la « vérité » Il s'agit du meilleur moyen permettant de:

- Réduire le nombre des tests de routine.
- Assurer la qualité du produit.
- Diminuer le nombre de rejets.
- Diminuer les temps de démarrage ce qui implique une économie de matériel et d'énergie.
- Réduire le temps de gestion des dysfonctionnements. ^[5]

I.2.3 - Types de validation

Il existe plusieurs types de validation, prospective, concomitante, rétrospective et revalidation, mais cette dernière est la plus utilisée dans le domaine pharmaceutique car elle permet de vérifier que les changements introduits, volontairement ou non dans le procédé

ou/et dans son environnement n'ont pas d'effets indésirables sur les caractéristiques du procédé et de la qualité du produit. [8]

Afin de réaliser cette validation, il existe plusieurs méthodes notamment :

- Méthode de dosage.
- Méthode d'identification et de recherche des substances apparentés.

I.2.4 - Domaine d'application pharmaceutique

Le champ d'application de la validation analytique s'étend à tous les niveaux de 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 aussi une pratique réglementaire : toute méthode analytique décrite dans le dossier comme d'Autorisation de Mise sur le Marché (AMM) doit être accompagnée d'une validation complète. [12]

I.2.5 - Structure de la validation

L'entreprise doit définir une politique générale de validation et d'orientation ayant pour objectif premier l'assurance-qualité et une meilleure maîtrise et compréhension de ses procédés. [13]

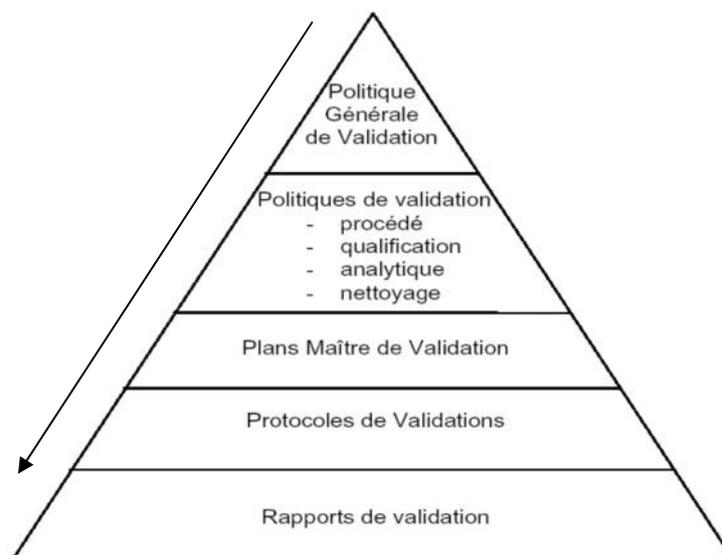


Figure 02 : Représentation graphique pyramidal d'une structure de validation. [13]

I.2.6 - Cycle de vie d'une validation analytique

Une méthode analytique est un moyen visant à exprimer concrètement un besoin bien défini, ou encore c'est la réponse matérialisée à un problème donné. La mise en œuvre d'une méthode peut se décomposer en quatre grandes phases successives telles qu'illustrées dans la **figure 03** et elle est composée de : [14]

- phase de *sélection* où des objectifs et des conditions opératoires initiales sont définis ;
- une phase de *développement*, avec ou sans optimisation au moyen de plans d'expériences
- phase de *validation* (Validation Interne/Externe) précédée, selon les cas, d'une phase de pré validation
- phase d'application en routine (Usage en routine), incluant le plus souvent une validation en routine et parfois une validation partielle ou une revalidation. [15]

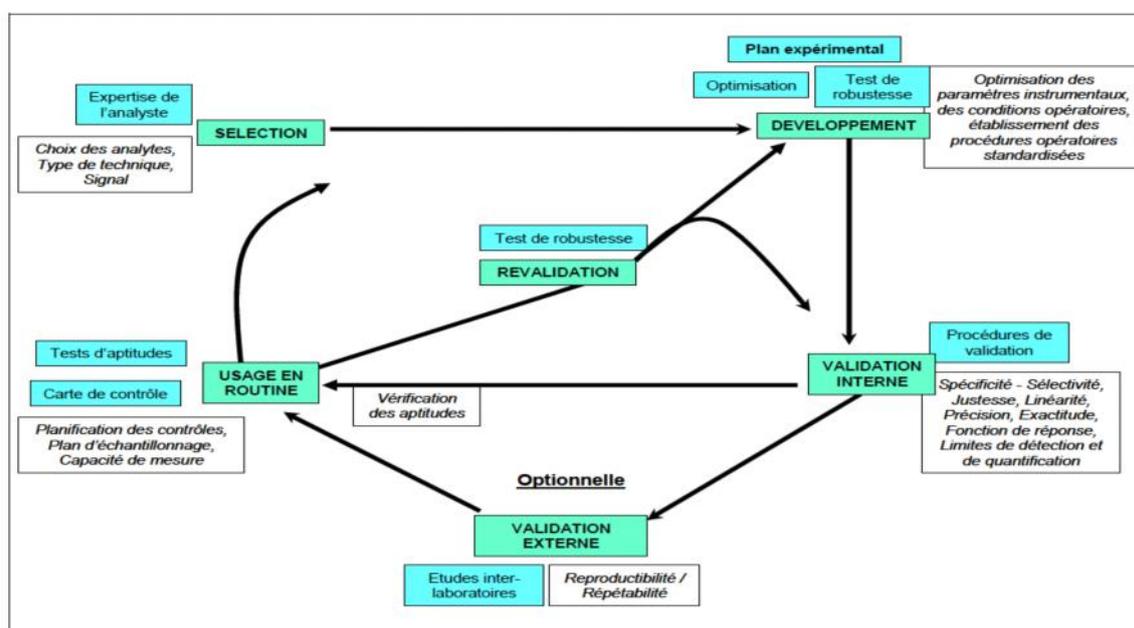


Figure 03 : Représentation graphique de cycle de vie d'une validation analytique [15]

Légendes : Les étapes sont reprises dans un rectangle vert (gras), les tests associés dans un rectangle bleu et les critères pour l'évaluation dans un rectangle non coloré (italique).

I.2.7 - Critères de validation

Les critères de validation sont ceux couramment utilisés dans les procédures analytiques de séparation et repris dans le document-référentiel Q2A de la Conférence Internationale sur l'Harmonisation et comprend les paramètres suivant :

- Conformité du système
- Spécificité
- Fidélité
- Linéarité
- Exactitude
- Robustesse
- Stabilité des solutions
- Limite de détection et limite de quantification

I.2.7.1 - Conformité du système

La conformité du système renseigne sur l'aptitude du système à effectuer l'analyse suivant des critères préétablis. ^[16]

Les différents éléments de l'appareillage doivent être qualifiés et permettre d'atteindre la performance requise pour la réalisation de l'essai ou du dosage considéré.

I.2.7.2 - Spécificité

La spécificité de la méthode d'analyse mérite une mention toute particulière, car elle renseigne sur le fait que la réponse mesurée n'est pas perturbée par des espèces physico-chimiques autres que l'analyte considéré. Si une méthode d'analyse est insuffisamment spécifique, cette déficience peut être compensée par la spécificité de l'une ou de plusieurs des autres analyses complémentaires. ^[16]

I.2.7.3 - Fidélité

La fidélité à un niveau donné correspond à l'étroitesse de l'accord entre les résultats obtenus en appliquant le procédé expérimental à plusieurs reprises dans des conditions

déterminées. Selon les conditions d'exécution de l'essai, cette caractéristique s'exprime sous forme de fidélité intermédiaire et de répétabilité. [17]

■ La répétabilité

La répétabilité d'une méthode analytique présente la qualité de l'accord entre des mesures répétées, effectuées sur un même échantillon dans des conditions constantes et déterminées, en calculant le facteur de recouvrement %. [17]

■ Fidélité intermédiaire

La fidélité intermédiaire de la méthode analytique exprime des variations des laboratoires : différents jours, différents analystes. [16]

- *La répétabilité et la fidélité intermédiaire seront évaluées. Pour être dans les conditions de reproductibilité intra laboratoire, il faut faire varier au moins un paramètre (analyste, jour, appareil,...) d'une série à l'autre.* [17]

I.2.7.4 - Linéarité

Capacité d'une méthode d'analyse, à l'intérieur d'un certain intervalle, à fournir une valeur d'information ou des résultats proportionnels à la quantité en analyte à étudier. Cette proportionnalité s'exprime à travers une expression mathématique définie a priori. Elle est déterminée par le coefficient de corrélation R et le biais moyen. [18]

L'intervalle de mesure d'une procédure analytique est l'intervalle entre la concentration supérieure et inférieure de l'analyte dans l'échantillon pour lequel il a été démontré que la procédure analytique présente un niveau souhaitable de fidélité, d'exactitude et de linéarité. [16]

La fonction de calibration (ou d'étalonnage) est obtenue par régression linéaire par l'utilisation des méthodes statistiques notamment :

- le teste de COCHRAN. [20]
- le teste de STUDENT, [21]
- le teste de FISHER SNEDECOR. [22]

I.2.7.5 - Robustesse

La robustesse d'une méthode est sa capacité à maintenir ses performances lorsqu'elle est soumise à de petites variations fortuites des conditions expérimentales ou les paramètres de la méthode (débit, phase mobile, teneur.) fournissent une indication sur sa fiabilité dans des conditions normales d'utilisation. Elle Permet de fixer les limites des tests de conformité. [23]

I.2.7.6 - Exactitude

Selon **ICH**, l'exactitude d'une procédure analytique exprime l'étroitesse de l'accord entre la valeur qui est acceptée comme conventionnellement vraie, ou comme valeur de référence, et la valeur trouvée.

Elle s'exprime par les pourcentages de recouvrement par rapport à la quantité introduite en principe actif dans les échantillons. [31]

I.2.7.7- Limite de détection (LOD) et limite de quantification (LOQ)

- ❖ **LOD** : C'est la plus petite quantité d'une substance à examiner dans un échantillon pouvant être détectée, mais non quantifiée comme une valeur exacte.
- ❖ **LOQ** : C'est la plus petite quantité d'une substance à examiner dans un échantillon pouvant être quantifiée comme une valeur exact. [16]

II - TECHNIQUES CHROMATOGRAPHIQUES

La chromatographie est une méthode physique de séparation basée sur les différentes affinités d'un ou plusieurs composés à l'égard de deux phases (stationnaire et mobile).

II.1 - CHROMATOGRAPHIE SUR COUCHE MINCE (CCM)

La chromatographie sur couche mince est une technique expérimentale de séparation des composés organiques basée sur leur différence de polarité, et sur leur affinité plus ou moins prononcée pour le support sur lequel ces composés sont déposés et le solvant qui parcourt le support. [24]

II.1.1 - Appareillage

Pour réaliser ce type d'analyse, il nous faut :

Une cuve chromatographique, la phase stationnaire couvrant de gel de silice ou d'autre absorbant, l'échantillon à analyser, et l'éluant ou phase mobile. [24]

II.1.2 - Principe de séparation

La chromatographie sur couche mince repose sur les phénomènes d'adsorptions et d'interactions, on place un composé sur un support solide (phase stationnaire) et l'on applique alors un solvant (phase mobile) qui par capillarité va 'monter' et se déplacer sur la phase stationnaire. [25]

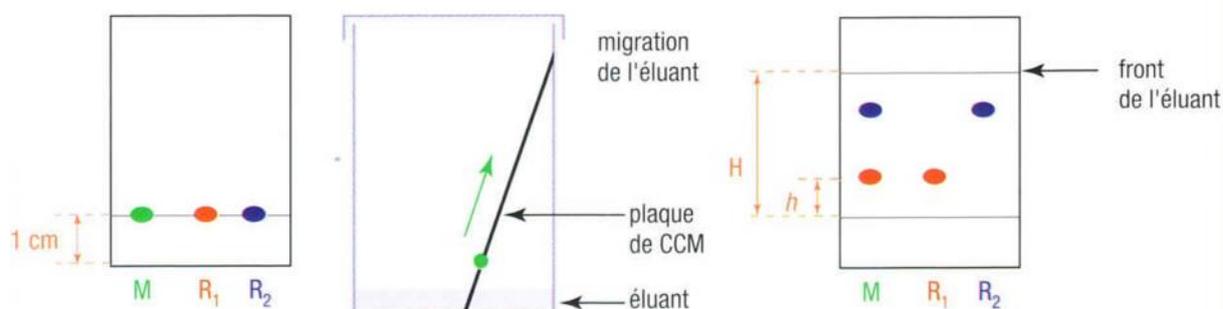


Figure 04 : Principe de fonctionnement de la CCM.

II.1.3 - Le rapport frontal R_f

Le rapport frontal (R_f) ou facteur de rétention d'un composé est compris entre 0 et 1 et est caractéristique du composé, du matériau de la plaque et du système d'éluant.

Il s'agit du rapport : distance parcourue par le soluté / distance parcourue par le solvant (**annexes 01**). Ainsi, un soluté très soluble dans la phase stationnaire aura un R_f faible ; alors qu'un composé très soluble dans la phase mobile verra son R_f proche de 1. ^[25]

II.2 - CHROMATOGRAPHIE LIQUIDE A HAUTE PERFORMANCE (HPLC)

HPLC signifie soit High Performance Liquid Chromatography, est l'une des techniques récentes les plus employées dans les laboratoires d'analyse chimiques. Cette technique est utilisée pour la séparation, l'identification et le dosage de mélange de composés. ^[26]

II.2.1 – Appareillage

Un appareil d'HPLC comprend différents modules : un réservoir à solvant contenant la phase mobile, un système de pompage permettant d'effectuer des éluions graduées, un injecteur, une colonne, un détecteur et un système d'acquisition de données, qui forment des entités séparées et reliées entre elles comme le sont les éléments d'une chaîne de haute fidélité. ^[27]

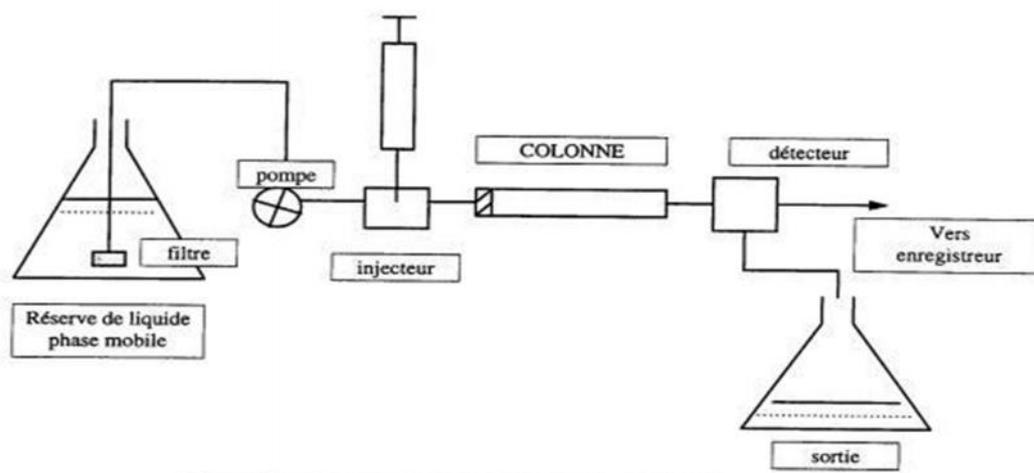


Figure 05 : Représentation graphique de l'appareillage de l'HPLC

II.2.2 - Principe de la séparation

L'échantillon des produits à séparer est entraîné par un solvant (phase mobile). Lorsqu'il passe à travers la colonne, les différents produits sont répartis entre les deux phases (mobile et stationnaire). Chaque composé a sa propre répartition en fonction de l'affinité avec chaque phase. Un produit ayant plus d'affinité avec la phase stationnaire mettra plus longtemps à traverser la colonne qu'un produit ayant plus d'affinité avec la phase mobile. Ils peuvent donc être séparés. Le processus de séparation est représenté sur le schéma ci-dessous. [27]

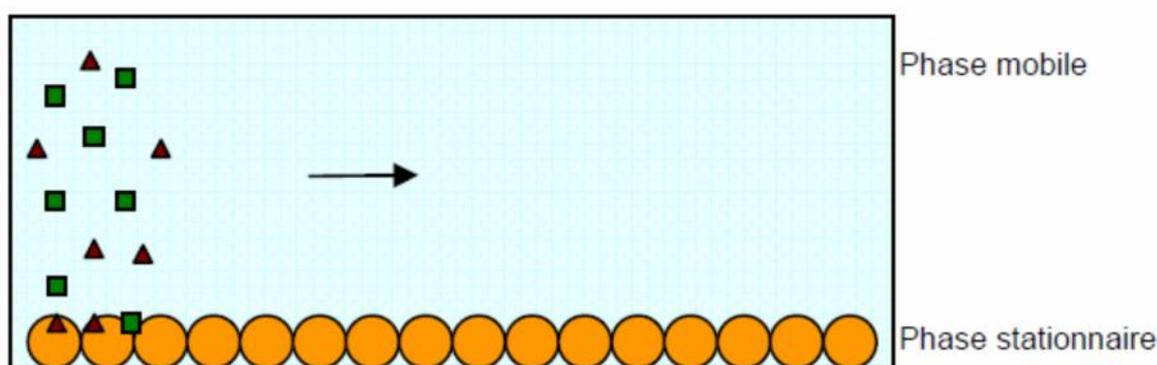


Figure 06 : Schéma représentatif du principe de séparation (HPLC). [27]

Légende : Un mélange de deux produits (▲, ■) est introduit dans la colonne. Le composé ▲ réside de préférence sur la phase stationnaire et le composé ■ sur la phase mobile.

II.2.3 - Chromatogramme

Représentation graphique ou autre de la réponse d'un détecteur, de la concentration d'un effluent ou d'une autre grandeur utilisée comme mesure de la concentration d'un effluent en fonction du temps ou du volume. Idéalement, un chromatogramme se présente comme une séquence de pics gaussiens au-dessus d'une ligne de base. Partie d'un chromatogramme enregistrant la réponse du détecteur lorsqu'un composant (ou plusieurs composants non séparés) sort de la colonne. (Figure 07) [28]

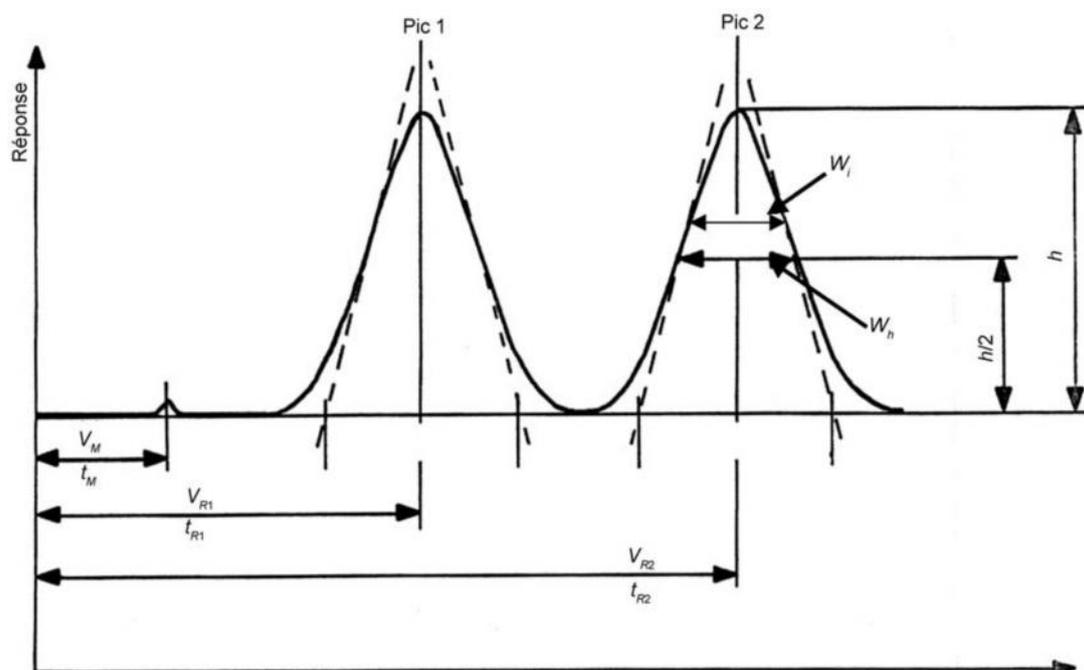


Figure 07 : Représentation graphique d'un chromatogramme.

II.2.3.1 – Le pic

Partie d'un chromatogramme enregistrant la réponse du détecteur lorsqu'un composant (ou plusieurs composants non séparés) sort de la colonne.

Le pic peut être défini par sa surface, ou par sa **hauteur h** et sa largeur à **mi-hauteur w_h** , ou par sa hauteur h et sa largeur aux points d'inflexion w_i . Dans le cas d'un pic gaussien, il existe des relations de forme suivante et calculés en (annexes 02) :

- **Temps de rétention t_R** : Temps requis pour l'élution d'un composant.
- **Volume de rétention V_R** : Volume de phase mobile requis pour l'élution d'un composant. Il peut être calculé à partir du temps de rétention, et du débit F exprimé en millilitres par minute.
- **Temps de rétention nulle (« hold-up time ») t_M** : Temps requis pour l'élution d'un composant non retenu.
- **Volume de rétention nulle (« hold-up volume ») V_M** : Volume de phase mobile requis pour l'élution d'un composant non retenu.
- **Facteur de rétention k** : Le facteur de rétention (également appelé coefficient de distribution massique D_m ou facteur de capacité k)
- **Nombre de plateaux N** : La performance d'une colonne (efficacité apparente) peut être calculée à partir des données obtenues dans des conditions isothermes, isocratiques ou isodenses, selon la technique utilisée en termes de nombre de plateaux (ou nombre apparent de plateaux théoriques).^[28]

III - Présentation de l'entreprise et du médicament

III.1- Présentation de l'entreprise

Biopharm est un laboratoire pharmaceutique algérien situé à Alger, indépendant, fondé en 1992.

Il s'est engagé dans la distribution pharmaceutique et a contribué à la stabilisation du marché algérien du médicament en offrant une gamme de produits diversifiée. Pour répondre à la demande croissante, et confirmer son engagement dans la vie économique de l'Algérie, l'entreprise accompagne la nouvelle politique de santé publique, où le besoin de maîtriser la facture du médicament se fait ressentir. Ce constat a amené le passage de Biopharm à la production locale depuis 2005, tant avec des produits sous licence de laboratoires leaders mondiaux, que des produits issus de sa propre recherche et développement, lesquels sont des médicaments génériques.

Le laboratoire de recherche et développement de Biopharm est parmi les rares laboratoires de recherche agréés par le Ministère de la Santé en Algérie, pour la conception de génériques

innovants et la transposition à l'échelle industrielle. Véritable usine à l'échelle pilote, les laboratoires de recherche et de développement comprennent en plus des trois ateliers pour les formes sèches, liquides et pâteux, **un laboratoire de développement analytique** au sein duquel on a effectué notre stage pratique.

Un comité scientifique a été constitué en 2008 par l'entreprise afin d'orienter le développement de sa gamme thérapeutique.

III.2- Présentation du médicament

III.2.1 - Définition

Les neuroleptiques appartiennent au groupe des psychotropes, ils agissent sur les neurones en modulant l'activité mentale, cette modulation est obtenue par stimulation ou blocage des récepteurs spécifiques exprimés par des neurones du SNC. [29]

III.2.2 - Classification

Selon la structure chimique, les neuroleptiques sont classés en deux grandes familles comme suit (**tableau 01**) [29]

Tableau 01 : Classification des neuroleptiques selon la structure.

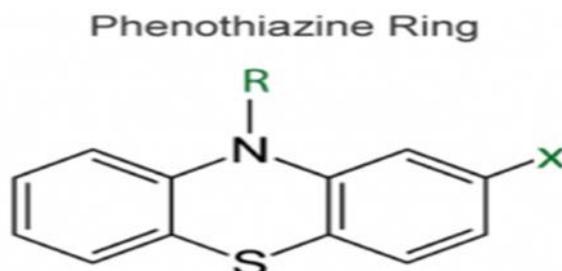
Neuroleptique de première génération	Neuroleptique de seconde génération
1- Les phénothiazines : différentes structures tricycliques obtenues par modification de la chaîne latérale, le chef de file chlorpromazine	1- Dibenzodiazépines et dérivés : ayant une structure tricyclique proche de celle de phénothiazine
2- Les butyrophénones : le chef de file l'halopiridol remarquable par son activité anti-hallucinatoire	2- Benzodiazépines : clozapine
3- Benzamides : chef de file sulpiride premier neuroleptique atypique	3- Benzoxazoles : rispéridone
4- Autres composés tricycliques : trioxanthéne résulte de modifications apportées au noyau de phénothiazines	4- Imidazolidinones : sertindole

III.2.3- Propriétés physico-chimiques du principe actif

Le médicament que nous avons utilisé fait partie des neuroleptiques de première génération et de la famille des phénothiazines.

- **Structure**

C'est un composé tricyclique (de cycle benzénique).



Le principe actif contient au minimum 98.5% et au max l'équivalent de 101% de : (Z)-butènedioate de (2R)-3-(2-méthoxy-10H-phénothiazin-10-yl)-N,N,2-triméthylpropan-1-amine, calculé par rapport à la substance desséchée. [28]

- **Caractères**

Poudre cristalline, blanche ou légèrement jaunâtre, peu soluble dans l'eau, assez soluble dans le chlorure de méthylène, peu soluble dans l'alcool.

Le PA s'altère à l'air et à la lumière. Il fond en se décomposant vers 186 °C. [28]

III.2.4 - Propriétés pharmacocinétiques

- ✓ **Absorption**

Après administration par voie orale, le PA est bien absorbé. Les concentrations sériques maximales sont atteintes en moyenne après 2 à 6 h de traitement. Il ne semble pas exister de différences importantes entre le soluté et la forme comprimée. [30]

- ✓ **Biodistribution**

La liaison aux protéines plasmatiques de la plupart des phénothiazines est supérieure à 90 %. [30]

✓ Métabolisme et Elimination

Le but principal de la métabolisation est l'élimination des propriétés médicamenteuses d'un composé (xénobiotiques). Le processus biologique de ces différentes substances dépend de plusieurs facteurs : l'âge, le sexe et le mode d'administration. Les antipsychotiques sont des substances basiques liposolubles devant passer par la voie hépatique (cytochrome P450) afin d'être métabolisés. Les transformations par oxydation et désamination de ces substances s'effectuent dans le réticulum endoplasmique des hépatocytes. Le résultat de cette étape donne des molécules hydrosolubles pouvant être éliminées facilement par les reins (urine) mais également par la bile. La demi-vie d'élimination varie considérablement selon les substances et selon l'individu. [31]

III.2.5- MECANISME D'ACTION

Le principe actif utilisé lors de notre étude, est un antipsychotique neuroleptique. A ce titre, il possède des propriétés anti dopaminergiques auxquelles sont imputés les effets antipsychotiques recherchés en thérapeutique. L'hypothèse actuelle expliquant son activité antipsychotique est le blocage des récepteurs dopaminergiques limbiques et/ou corticaux. Il bloque également les récepteurs alpha-adrénérgiques, ce qui explique son effet sédatif. [32]

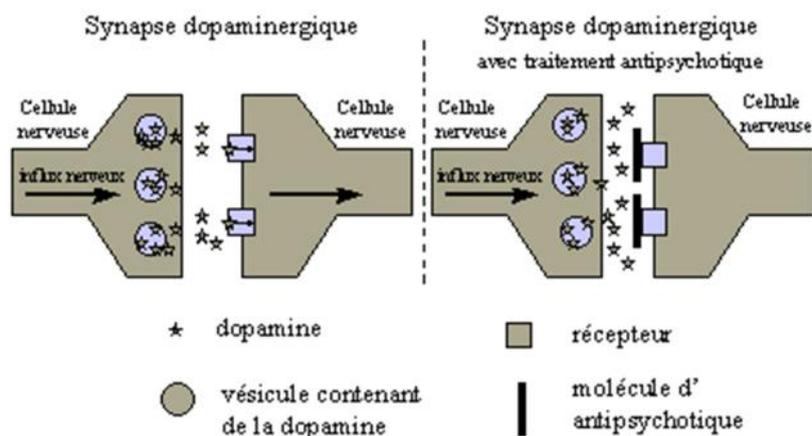


Figure 08 : Mode d'action des neuroleptiques.

III.2.6- Indications

Ce neuroleptique est utilisé dans la prise en charge de :

- agitations psychotiques,
- agressivités psychotiques,

- épisodes dépressifs majeurs,
- états psychotiques,
- troubles sévères du comportement chez l'enfant avec agitation et agressivité. ^[31]

III.2.7- Effets indésirables

Ce sont quelques complications qui peuvent intervenir lors de la prise du médicament en sachant que les effets secondaires induits, varient selon les individus.

Au cours de l'utilisation des phénothiazines antipsychotiques, ont été signalés :

- ✦ **Au niveau psychique** : une sédation, une indifférence affective, des états dépressifs.
- ✦ **Au niveau neurologique** : des dyskinésies aiguës, troubles de l'activité motrice, difficultés à réaliser des gestes volontaires.
- ✦ **Au niveau endocrinien** : une prise de poids, une aménorrhée, une impuissance, une frigidity.
- ✦ **Des troubles divers**, photosensibilisation, torsades de pointe (troubles du rythme), une hypothermie ou une hyperthermie. ^[31]

✦ **Au vu des effets indésirables importants, il est indispensable de surveiller la qualité et la quantité du médicament administré au patient. De ce fait, une analyse, une validation des méthodes contrôlant la qualité du médicament sont indispensables.**

A. Validation analytique par Chromatographie sur couche mince CCM

L'étude du comportement du principe actif lors de sa soumission à des conditions physico-chimiques, ainsi que la détermination de la plus petite concentration nous amène à élucider l'objectif voulu à savoir :

- ↗ Etude de spécificité.
- ↗ Mise en évidence de la stabilité du principe actif.
- ↗ Etude de la limite de détection (sensibilité).

I- PROTOCOLE EXPERIMENTAL

I.1- la phase mobile

Un mélange de :

- Acétone15%.
- diéthylamine15%.
- cyclohexane120%.

I.2- la phase stationnaire

On prépare trois plaques de gel de silice GF254, pour la stabilité, la dégradation forcée et enfin pour la limite de détection. ^[16]

I.3- conditions chromatographiques

Tableau 02 : Présentation des conditions chromatographiques.

Volume d'injection	Temps de migration
10µl.	2h

I.4- solutions préparées

I.4.1- spécificité

Tableau03 : Préparation des solutions pour le paramètre de spécificité.

Echantillons	Protocole
Solution de dilution	Prélever 50ml d'eau purifiée et 450ml d'acétone, agiter Préparation d'une solution d'acétone à concentration 90%.
Solution standard	Dans une fiole jaugée préparer une solution à concentration de 2mg/ml de PA WS (produit de référence). Faire attention à dissolution complète de PA. Préparation de solution de dilution au 1/20.
Solution de placebo	Dissoudre 1288mg de placebo dans la solution de dilution et compléter à 10ml avec la solution de dilution, agiter. Centrifuger la solution à 4000RPM pendant 5min, utiliser le surnageant.
solution d'échantillon a 100% (Placebo+PA)	Dissoudre 1288mg de placebo et 200mg de PA dans la solution de dilution et compléter à 10ml avec la même solution, agiter. Centrifuger à 4000RPM pendant 5min, utiliser le surnageant.

I.4.2- dégradation forcée

Tableau 04 : Préparation des solutions de dégradation forcées.

Echantillons	Protocole
Témoin	Préparation d'une solution de 200mg/ml de PA, Laisser à température ambiante et à l'abri de la lumière pendant 24h . mélanger avec de l'acétone pour concentration final de 90%.
Hydrolyse acide	200mg de PA, ajouter 1 ml de la solution d'acide chlorhydrique 5N. laisser à température ambiante et a l'abri de la lumière pendant 24h . Ajouter 9ml d'acétone, agiter.
Hydrolyse alcaline	200mg de PA, ajouter 1ml de la solution d'hydroxyde de sodium 5N. laisser à température ambiante et à l'abri de la lumière pendant 24h . Ajouter 9ml d'acétone, agiter.
Dégradation oxydative	200mg de PA, ajouter 1ml de peroxyde d'hydrogène à 30%. Laisser à température ambiante et à l'abri de la lumière pendant 24h . Ajouter 9ml d'acétone, agiter.

Dégradation par chaleur	Préparation d'une solution à 20mg/ml de PA. Chauffer à environ 100°C pendant 30 min.
Dégradation par l'humidité	Mettre 1g de PA dans l'enceinte de stabilité pendant 24h à 40°C et 75% d'humidité. A partir de cet échantillon peser 200mg de PA (en tenant compte de la quantité d'humidité absorbé), ajouter 10ml de solution de dilution et agiter.
Photolyse	Témoin non exposé à la lumière : peser 2g de PA, mettre dans l'enceinte de stabilité jusqu'à atteinte une dose de 1200 K Lux h (kilo lux heure) en lumière du jour et 200Wh /m ² en rayonnement. A partir de cet échantillon, peser 200mg de PA, ajouter 10ml de la solution de dilution et agiter.
	Echantillon exposé a une lumière visible et UV : peser 2g de PA, mettre dans l'enceinte de stabilité jusqu'à atteinte une dose de 1200K Lux h en lumière du jour et 200 Wh /m ² en rayonnement. A partir de cet échantillon, peser 200mg de PA, ajouter 10ml de la solution de dilution et agiter.

I.4.3- limite de détection

Tableau 05 : Préparation des solutions pour le paramètre de LOD.

Echantillons	Protocole
Solution mère	Dans une fiole jaugée préparer une solution de concentration 2mg/ml de PA WS, faire attention à la dissolution complète. Préparation de solutions filles de PA à concentration différentes : 0.12mg/ml, 0.10mg/ml, 0.08mg/ml, 0.04mg/ml, 0.025mg/ml, 0.0125mg/ml.

II- mode opératoire

Effectuer l'essai à l'abri de la lumière vive et préparer les solutions immédiatement avant l'emploi.

Nous avons trois types de plaques, d'où on a procédé chacune de la manière suivante :

❖ Plaque 01

On dépose 10 µl de chacune des préparations suivantes : solution de dilution, solution placebo, solution placebo chargé et solution-témoin (PA) séparément.

❖ Plaque 02

On dépose 10µl des solutions de différentes concentrations de la gamme de la limite de détection allant de la plus petite concentration à la plus élevée.

❖ Plaque 03

On dépose 10µl de chacune des solutions de dégradation.

On dépose les trois plaques dans la cuve contenant la phase mobile, laissé migrer pendant **2h**, on retire la plaque, on la laisse sécher à l'air puis on examine en lumière ultraviolet à **254nm**.
[16]

III- NORMES

- S'il apparaît d'autres taches que la tache principale dans le chromatogramme obtenu avec la solution échantillon, aucune d'entre elles n'est plus intense que la tache du chromatogramme obtenu avec la solution standard (0,5%) et ont un rapport frontale identique.
- Les taches secondaires doivent être suffisamment séparées de la tache principale. [16]

B. VALIDATION ANALYTIQUE PAR CHROMATOGRAPHIE LIQUIDE A HAUTE PERFORMANCE (HPLC)

La validation de la méthode de dosage par HPLC a pour objectifs :

- Démontrer que chaque mesure réalisée sera assez proche de la valeur vraie ou dans les limites acceptables.
- S'assurer que la technique reste valable pour le produit-médicament.
- Déterminer les paramètres nécessaires pour prouver que le protocole est suffisamment exacte et fiable pour avoir confiance dans les résultats fournis et ceci pour un usage déterminé.

I - PROTOCOLE EXPERIMENTAL

I-1 solubilité du principe actif

La solubilité du principe actif est représentée dans le tableau suivant :

Tableau 06 : La solubilité du principe actif.

Solvant	Solubilité du PA
Eau purifiée	peu soluble
Méthanol	Facilement soluble
Acétonitrile	Facilement soluble

I-2 La phase mobile

Solution tampon pH 5,6 : Peser 3,6g de sodium phosphate monobasique anhydre NaH_2PO_4 dissoudre et compléter à 1000ml avec de l'eau distillée, ajuster à pH 5,6 avec la solution d'hydroxyde de sodium 0,1N.

Un mélange de :

	Solution tampon pH5, 630%.
	Acétonitrile50%.
	Méthanol20%.

Agiter, filtrer sur un filtre 0,45 μm HPLV ou filtre équivalent et dégazer la phase mobile.

I-3 La phase stationnaire (la colonne)

D'après la procédure et en référence à l'USP, il a été retenu la colonne du type ACE C_{18} , (250mm x 4,6mm, 5 μm), sous le code interne DCN 051.

II- 4 Les conditions chromatographiques

Les conditions chromatographiques représentées dans le tableau suivant :

Tableau 07: Conditions chromatographiques (HPLC).

Débit	Longueur d'onde	Volume d'injection	Température
1 ml/min	250 nm	20 µl.	25°C

 25°C c'est la même que la température ambiante.

II-5 solutions préparées

II-5-1 Dégradation forcée

Tableau 08: Préparation des solutions pour la dégradation forcée.

Solution	Protocole
Témoin	Préparation d'une solution de 0.34mg/ml de PA, ajouter environ 70ml de la phase mobile, ultrason jusqu'à dissolution complète, refroidir et compléter au trait de jauge avec la phase mobile, agiter. Laisser à l'abri de l'air et de la lumière pendant 24h . Préparation des solutions de dilution au 5/50
Hydrolyse acide	Préparation d'une solution de 0.34mg/ml de PA, ajouter environ 70ml de la phase mobile et 10ml de la solution d'acide chlorhydrique 5N, ultrason jusqu'à dissolution complète. Laisser à l'abri de l'air et de la lumière pendant 24h , ajouter 10ml de la solution d'hydroxyde de sodium 5N et compléter au trait de jauge avec la phase mobile, agiter. Préparation de solution de dilution au 5/50
Hydrolyse alcaline	Préparation d'une solution de 0.34mg/ml de PA, ajouter environ 70ml de la phase mobile et 10ml de la solution d'hydroxyde de sodium 5N, ultrasons jusqu'à dissolution complète. Laisser à l'abri de l'air et de la lumière pendant 24h , ajouter 10ml de la solution d'acide chlorhydrique 5N et compléter au trait de jauge avec la phase mobile, agiter. Préparation de solution de dilution au 5/50.
Dégradation	Préparation d'une solution de 0.34mg/ml de PA, ajouter environ 70ml de la phase mobile et ajouter 10ml de peroxyde d'hydrogène à 30%, ultrasons jusqu'à dissolution complète, laisser refroidir à température ambiante et

oxydative	<p>compléter au trait de jauge avec la phase mobile, agiter.</p> <p>Laisser à l'abri de l'air et de la lumière pendant 2h.</p> <p>Préparation de solution de dilution au 5/50</p>
Dégradation par la chaleur	<p>Préparation d'une solution de 0.34mg/ml de PA, ajouter environ 70ml de la phase mobile, ultrasons jusqu'à dissolution complète, laisser refroidir et compléter au trait de jauge avec la phase mobile, agiter. Mettre dans un bain marie pendant 10min à 50°C puis laisser refroidir.</p> <p>Préparation de solution de dilution au 5/50</p>
Dégradation par l'humidité	<p>Peser 1g de PA dans un bécher (en tenant compte de la prise d'essai du bécher) et mettre dans l'enceinte de stabilité pendant 24h à 40°C et 75% d'humidité.</p> <p>Repeser le bécher et calculer le gain en humidité.</p> <p>À partir de cet échantillon préparer une solution de 0.34mg/ml de PA (en tenant compte du gain d'humidité) ajouter environ 70ml de la phase mobile et ultrasons jusqu'à dissolution complète, laisser refroidir agiter. Laisser à l'abri de l'air et de la lumière pendant 24h.</p> <p>Préparation de solution de dilution au 5/50</p>
Photolyse	<ul style="list-style-type: none"> - Témoin : <u>non exposé</u> à la lumière. - Echantillon <u>exposé</u> à une lumière visible et UV (illumination totale de 1200 Kluxh, intensité de 200 Wh/m²). <p>Pour chaque échantillon, peser 2g de PA, mettre dans l'enceinte de stabilité jusqu'à atteindre une dose de 1200 KLuxh en lumière du jour et 200 Wh/m² en rayonnement.</p> <p>À partir de ces échantillons préparer une solution de 0.34mg/ml de PA, ajouter environ 70ml de la phase mobile et ultrasons jusqu'à dissolution complète, laisser refroidir, agiter. Laisser à l'abri de l'air et de la lumière pendant 24h.</p> <p>Préparation de solution de dilution au 5/50</p>

II-5-2 solutions de standard, placebo, placebo chargée et blanc

Tableau 09 : Préparation des solutions : standard, placebo chargé à 100% et du blanc.

Solutions	Préparation
Solution standard	Préparation d'une solution de 0.34mg/ml de PA WS, ajouter environ 70ml de la phase mobile et ultrason jusqu'à dissolution complète, laisser refroidir et compléter au trait de jauge avec la phase mobile, agiter. Préparation de solution de dilution 5/50.
Solution placebo chargé à 100%	Peser 219mg de placebo et 34mg, ajouter environ 70ml de phase mobile puis agiter magnétiquement pendant 30 min à 500 RPM , compléter au trait de jauge avec la phase mobile, agiter et filtrer sur un filtre 0,45µm. Préparation de solution de dilution 5/50.
Blanc	Phase mobile.
Solution placebo	Peser exactement 219mg de placebo sur 100ml, ajouter environ 70ml de phase mobile puis agiter magnétiquement pendant 30 min à 500 RPM , compléter au trait de jauge avec la phase mobile, , agiter et filtrer sur un filtre 0,45µm. Préparation de solution de dilution 5/50.

II-5-3 Solutions de linéarité

Tableau 10 : Gammes de linéarité.

Solutions	Préparations
Gamme de linéarité sur le principe actif	introduire une prise d'essai de PA selon le niveau de la linéarité de 80% à 120% (voir tableau 11), ajouter environ 70ml de la phase mobile et ultrason jusqu'à dissolution complète, laisser refroidir et compléter au trait de jauge avec la phase mobile, agiter. Préparation de solution de dilution au 5/50.
Gamme de linéarité sur excipient chargé	introduire une prise d'essai de PA selon le niveau de la linéarité de 80% à 120% (voir tableau 11) et 219mg placebo, ajouter environ 70ml de phase mobile puis agiter magnétiquement pendant 30 min à 500 RPM , compléter au trait de jauge avec la phase mobile, agiter et filtrer sur un filtre 0,45µm. Préparation de solution de dilution au 5/50.

Les quantités de principe actif sont pesées individuellement comme suit :

Tableau 11: Prises d'essai du PA pour la gamme de linéarité.

Niveau de Linéarité	Prise d'essai du PA (mg)	Concentration du PA (µg/ml)
80 %	27,2	27,2
90 %	30,6	30,6
100 %	34,0	34,0
110 %	37,4	37,4
120 %	40,8	40,8

A. Validation analytique par Chromatographie sur couche mince CCM

Les substances apparentées sont des substances qui peuvent se trouver dans un produit et qui exercent un effet nocif, elles peuvent être de deux origines :

- Exogène
- Dégradation anormale de la matière première

I - Spécificité

I.1 - RESULTATS

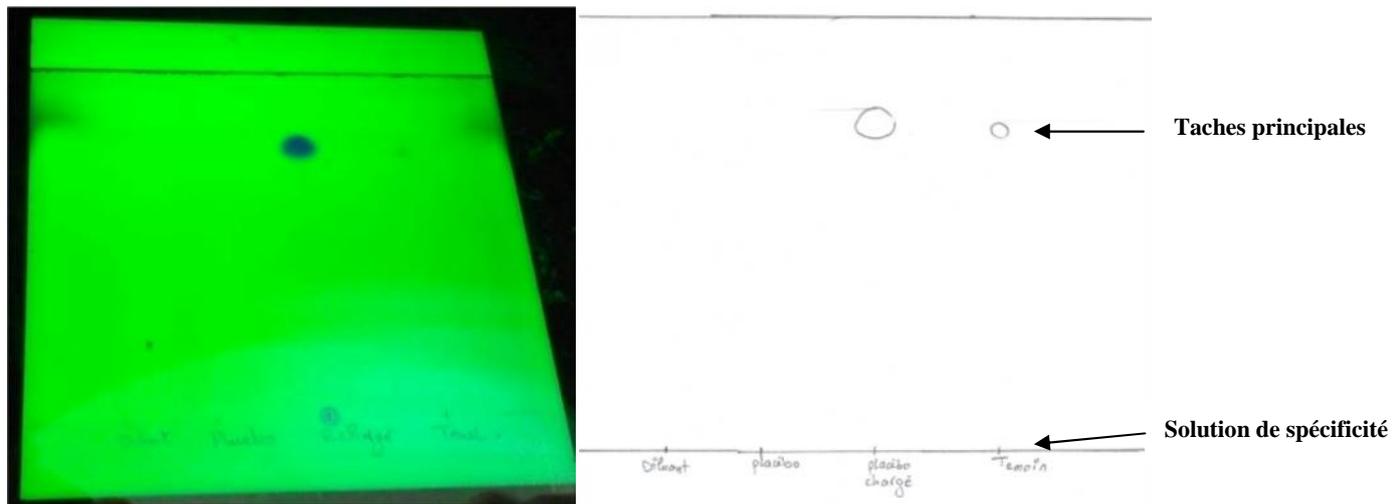


Figure 9 : Représentation photographique de détection d'une plaque de la spécificité.

Légende : a)- dépôts : témoin, placebo chargé, placebo, diluant.

b)- dessin illustrative de la plaque.

Sur la plaque de CCM, on calcule le rapport frontal de chacune des taches observées.

Tableau 12: Calcul des rapports frontaux pour le paramètre de spécificité.

Spottes	Témoin	Placebo chargée
R_f	0.75	0.78

II.2 - INTERPRÉTATION

Les résultats de l'étude de la spécificité par dégradation forcée montrent :

- Hydrolyse acide HCL (1N) : une tache secondaire
- Photolyse échantillon : une tache secondaire
- Dégradation oxydative : deux taches secondaires suffisamment séparées entre elles.

Toutes ces taches observées sont suffisamment séparées de la tache principale.

- On remarque également le même rapport frontal pour les trois produits de dégradation (0.16) ce qui nous amène à dire que la dégradation forcée engendre le même composé
- Le rapport frontal de la seconde tache de la dégradation oxydative est égale à 0.13 ceci est peut être un sous-produit de la dégradation présent dans l'oxydant.
- Le rapport frontal du témoin et donc, la nature des substances apparentées est différente de celle des produits de dégradation.

Toutefois, malgré les différentes techniques de dégradation testées, le principe actif donne toujours le même produit de dégradation, donc ces résultats confirment la spécificité de la méthode d'identification (la CCM) vis-à-vis du principe actif mais aussi vis-à-vis des sous-produits d'altération.

III - Limite de détection

III.1 - RESULTATS

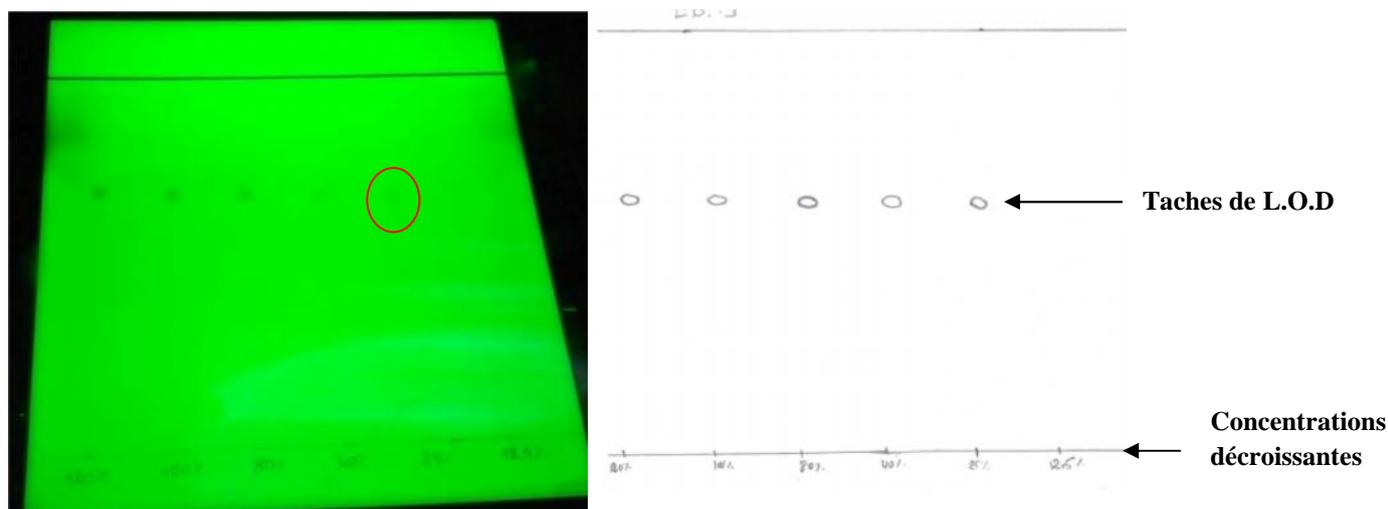


Figure 11: Représentation photographique de détection d'une plaque

Légende : les concentrations sont placées respectivement, 120%, 100%, 80%, 40%, 25%, 12.5%

Tableau 14: Calcule des rapports frontaux pour le paramètre de limite de détection.

Spotés	120%	100%	80%	40%	25%	12.5%
R _f	0.60	0.60	0.60	0.59	0.59	Négatif

III.2 - INTERPRÉTATION

D'après les résultats obtenus, on remarque qu'à 12.5% absence de tache, et les rapports frontaux pour les différentes concentrations sont équivalentes, ceci implique que la limite de détection est de 0,025mg/ml (0,125%) qui est la concentration retenue.

B. VALIDATION ANALYTIQUE PAR CHROMATOGRAPHIE LIQUIDE A HAUTE PERFORMANCE (HPLC)

I - Evaluation de la conformité du système

Elle est démontrée en analysant 06 fois de façon indépendante la solution standard ;

Les paramètres évalués sont :

- Ecart type relatif du signal pour les 06 lectures ou injection de la solution standard (Relatif standard déviation : RSD), moyenne et écart type.
- Le nombre de plateaux théoriques.
- Le facteur de symétrie.

I-1 RESULTAT : Voir chromatogrammes (annexes 09)

Les valeurs obtenues sont reprises dans les tableaux suivants :

Tableau 15: Présentation des signaux standards pour la conformité du système.

Injection N°	Signal du standard 01	Signal du standard 02
1	2204802	2255428
2	2207413	2273072
3	2206802	
4	2206297	
5	2209101	
6	2210761	
Moyenne	2207529	2264250
% RSD (2.0)	0.1	2,0%

Ces paramètres sont calculés à partir des chromatogrammes (**annexes 03**).

Tableau 16: Evaluation de la conformité du système.

Paramètre	Résultats	Critère d'acceptation
Facteur de similarité	100.5	98% à 102%
Facteur de symétrie	1.0	2,0
Nombre de plateaux théoriques	10700	5400

I-2 INTERPRÉTATION

Grace aux résultats obtenus dans les **tableaux 15** et **16**, il est possible de conclure sur le fait que les deux standards utilisés dans notre étude sont similaires car le facteur de similarité calculé est égal à 100.5%

De plus, la colonne utilisée dans notre étude est efficace donc conforme car les chiffres des plateaux théoriques obtenus (10700 – 5400) soutiennent cette affirmation.

Le facteur de symétrie est égal à 1.0 qui est inférieur à la norme (2,0).

- *Au vue de ces résultats, il nous est possible d'affirmer que le système est conforme et donc apte à effectuer l'ensemble des analyses prévues dans l'étude.*

II - Spécificité

La spécificité de la méthode est démontrée en étudiant :

- 🚫 L'interférence du placebo qui est réalisée en préparant et analysant les solutions suivantes :
 - 1- Diluant (phase mobile)
 - 2- Placebo
 - 3- Standard à 100%

- La dégradation forcée effectuée sur le principe actif mis en conditions extrêmes : acide, base, oxydation, humidité, chaleur et lumière et photolyse, a pour but l'étude de la pureté du pic PA,

II-1 RESULTATS : voir chromatogrammes (annexes 09).

Tableau 17: Evaluation de la pureté de pic PA.

Types de dégradation forcée	Purity Angle	Purity threshold	Critères d'acceptation
Hydrolyse acide	0.057	0.250	<i>Purity Angle doit être < Purity Threshold</i>
Hydrolyse alcaline	0.051	0.254	
Dégradation Humidité	0.060	0.259	
Photolyse échantillon	0.054	0.252	
Photolyse témoin	0.061	0.254	
Dégradation Oxydative	0.052	0.254	
Dégradation Chaleur	0.059	0.254	

II-2 INTERPRETATION

Dans les résultats obtenus à partir du blanc et du placebo, on remarque qu'il n'y a aucune interférence avec le pic du PA.

Les chromatogrammes obtenus de l'étude de la dégradation forcée et d'après le tableau ci-dessous, on remarque que $\text{Purity Angle} < \text{Purity Threshold}$ comme exemple dans le cas d'hydrolyse acide, on a $\text{PAn}=0.057$ comparant à $\text{PTH}=0.250$ ainsi qu'en photolyse, on a deux types : photolyses échantillon qui est exposé à une lumière visible et UV le $\text{PAn}=0.054$, $\text{PTH}=0.252$, et photolyse témoin non exposé à la lumière on a le $\text{PAn}=0.061$, $\text{PTH}=0.254$, alors on a toujours le $\text{PAn} < \text{PTH}$, cela traduit la pureté du pic principe actif.

Ces résultats ont montré que le principe actif n'est pas dégradé par l'acide, base, température, humidité, peroxyde d'hydrogène, et la lumière, donc le pic principal du PA est pure, aucun pic dû à la dégradation forcée n'interfère avec le pic du principe actif.

- *On conclut que méthode est bien spécifique pour le dosage du principe actif.*

III - Robustesse

Pour avoir une idée sur la fiabilité de la méthode aux conditions normales d'utilisation, on a appliqué la procédure d'analyse en faisant varier les paramètres retenus ;

- ☞ Teneur en principe actif, notée paramètre A.
- ☞ Débit de la phase mobile, notée paramètre B.
- ☞ Longueur d'onde du détecteur, notée paramètre C.

Les solutions préparées pour ce paramètre sont :

- Solution du standard STD1, STD2 ;
- Solution du placebo chargé à 95% ;
- Solution du placebo chargé à 105%.

La valeur nominale ainsi que les changements apportés pour chaque paramètre sont expliqués dans le (tableau 18).

Tableau 18: Paramètres opératoires considérés pour l'étude de robustesse.

	Paramètre A	Paramètre B	Paramètre C
Valeur nominale	34	1,0	250
Variation	±5%	±0.2	±2
Niveau bas (-)	32,3	0.8	248
Niveau haut (+)	37,4	1.2	252

Tableau 19: Différents combinaisons des paramètres opératoires.

Echantillon	Paramètre A	Paramètre B	Paramètre C
01	32,3	0,8	248
02	32,3	0,8	252
03	32,3	1,2	248
04	32,3	1,2	252
05	37,4	0,8	248
06	37,4	0,8	252
07	37,4	1,2	248
08	37,4	1,2	252

III-1 RESULTATS : voir chromatogrammes (annexes 09).

Pour chaque essai, on a calculé la concentration du PA dans la solution échantillon, puis le facteur de recouvrement. (Annexes 04)

Tableau 20: Calcul de la concentration du PA dans la solution échantillon et du facteur de recouvrement.

Ech	Pe éch (mg)	Signal std	Signal ech	C calculée (mg/ml)	C introduite (mg/ml)	Facteur de recouvrement (%)
Ech 95%	32,35	2800055	2653791	0,0322	0,0324	99,6
Ech 105%	35,72	2800055	2911548	0,0354	0,0357	99,0
Ech 95%	32,35	2902029	2747682	0,0322	0,0324	99,5
Ech 105%	35,72	2902029	3020987	0,0354	0,0357	99,1
Ech 95%	32,35	1852787	1762399	0,0323	0,0324	100,0
Ech 105%	35,72	1852787	2009092	0,0369	0,0357	103,2
Ech 95%	32,35	1918538	1822224	0,0323	0,0324	99,8
Ech 105%	35,72	1918538	2081227	0,0369	0,0357	103,3
Ecart type						1,8
Critère d'acceptation						< 2.0

Afin d'évaluer la robustesse de la méthode de dosage, on évaluera l'effet de chacun des 03 paramètres décrits dans le tableau suivant, en calculant leurs intervalles de confiance, cela par test de *STUDENT*.

Tableau 21: Calcul des effets de la robustesse.

Paramètre/interaction	Intervalle a	b	résultat des effets	Conclusion
B	-1.9	0.9	Non significatif	Robuste
C	-0.9	2.9	Non significatif	Robuste
AB	-1.8	1.9	Non significatif	Robuste
AC	-1.0	2.7	Non significatif	Robuste
BC	-1.9	1.9	Non significatif	Robuste
ABC	-1.9	1.9	Non significatif	Robuste
Critères d'acceptation	<i>Si la valeur 0 est comprise dans l'intervalle de confiance d'un paramètre, l'effet de ce paramètre pour les variations admises est non significatif sur la réponse obtenue.</i>			

III-2 INTERPRATATION

D'après le **tableau 01**, on remarque que les facteurs de recouvrement de chaque concentration du PA (99.6, 99.0, 99.5, 99.1, ...) sont inclus dans les normes de 97.5% à 102.5%, ainsi que le $RSD = 1.4 < 2.0\%$.

À partir des résultats de l'intervalle de confiance d'un paramètre, comme exemple on a de -0.4 à +0.3, donc la valeur « 0 » est comprise dans ce dernier, l'effet de ce paramètre pour les variations admises est non significatif sur la réponse obtenue, donc ces résultats sont bien satisfaisants aux critères d'acceptation.

- *L'étude de la robustesse montre que notre méthode est conforme, c'est à dire robuste pour les variations des paramètres étudiés ; teneur en PA, débit et longueur d'onde.*

IV - Fidélité

IV-1 répétabilité

L'étude de répétabilité est réalisée par un même manipulateur, le même jour, on a analysé 06 préparations de placebo chargé à 100%, et une préparation du standard.

IV-1-1 RESULTATS : voir chromatogrammes (annexes 09).

A partir des résultats obtenus, on détermine l'écart type relatif RSD des facteurs de recouvrement en %.

Tableau 22: Evaluation de la répétabilité.

Pe ech	Signal Std	Signal Ech	C calculée (mg/ml)	C introduite (mg/ml)	Facteur de recouvrement (%)
34.03	2175766	2197428	0.0343	0.0340	100.9
34.02	2175766	2187609	0.0342	0.0340	100.5
34.01	2175766	2184354	0.0341	0.0340	100.4
34	2175766	2196022	0.0343	0.0340	100.9
34.02	2175766	2207973	0.0340	0.0340	101.4
34	2175766	2204714	0.0345	0.0340	101.3
Moyenne					100.9
RSD					0.4

IV-1-2 INTERPRETATION

Les résultats du tableau ont montré que les facteurs de recouvrement (100.9, 100.5, 100.4, ...) sont compris dans les normes.

En calculant le coefficient de variation (RSD%) des facteurs de recouvrement égal à 0.4 qui est inférieur à la valeur d'acceptation 2,0%.

- *Les résultats obtenus sont satisfaisants aux normes, donc notre méthode est jugée répétable.*

IV-2 Fidélité intermédiaire

L'étude de la fidélité intermédiaire de notre méthode exprimée des variations dans le laboratoire : sur 02 jours, et la participation de 02 manipulateurs.

Manipulateur 01: préparer une série de 04 solutions du placebo chargée à 100% par jour.

Manipulateur 02 : préparer une série de 04 solutions du placebo chargée à 100% par jour.

IV-2-1 RESULTATS : voir chromatogrammes (annexes 09)

Les résultats obtenus dans le même jour constitué une série. On a obtenu 02 série de 08 résultats chacune (**Tableau 23**), en appliquant le test d'homogénéité des variances des différents groupes (COCHRAN), (**annexes 05**).

Tableau 23: Evaluation de la fidélité intermédiaire.

	Ech	Facteur de recouvrement	Yi	Si	Si ²
Analyste 01 Jour 01	Ech 01	97.9	99.73	1.73	2.98
	Ech 02	102.0			
	Ech 03	99.9			
	Ech 04	99.1			
Analyste 02 Jour 01	Ech 01	98.5	100.7	0.26	0.07
	Ech 02	99.6			
	Ech 03	99.3			
	Ech 04	99.5			
Analyste 01 Jour 02	Ech 01	100.9	99.23	0.50	0.25
	Ech 02	100.5			
	Ech 03	100.4			
	Ech 04	100.9			
Analyste 02 Jour 02	Ech 01	100.9	100.50	0.29	0.09
	Ech 02	100.2			
	Ech 03	100.4			
	Ech 04	100.5			
			Yo	Sy	Sy²
			100.03	0.68	0.46

La fidélité intermédiaire est évaluée par le test de validité des moyennes (ANOVA), en calculant les variations durant le même jour à savoir le RSD intra, ou bien les variations selon des jours différents donc le RSD inter, et le RSD total.

Tableau 24: Calcul du RSD intra, RSD inter, RSD total.

RSD intra	RSD inter	RSD total
1.06	0.41	0.98

- RSD inter : variations différents jours
- RSD intra : variations même jour

IV-2-2 INTERPRETATION

D'après le tableau, les facteurs de recouvrement sont dans les normes, on voit que le RSD intra, inter, et total sont inférieurs à 2,0%, alors dans les limites d'acceptation, c'est-à-dire que l'homogénéité des mesures de dosage par deux manipulateurs distincts est conforme.

- *De ce fait, la répétabilité et la fidélité intermédiaire sont démontrées, donc confèrent à la méthode une bonne fidélité.*

V - Exactitude

C'est une suite de la démarche statistique initiée lors de l'étude de la fidélité intermédiaire, on a vérifié l'exactitude de la méthode par l'estimation du recouvrement après avoir vérifié précédemment :

- ☞ L'homogénéité des variances (COCHRAN).
- ☞ La validité des moyennes (ANOVA).

Le pourcentage de recouvrement (PR%) doit être compris entre la limite inférieure et limite supérieure.

V-1 RESULTATS

La vérification de l'exactitude de la méthode est faite par rapport à la valeur de référence fixée par le laboratoire. (**annexes 06**).

Tableau 25: Calcul de l'exactitude et du PR%.

Valeur de référence	PR%	Limite inférieur	Limite supérieur	Exactitude
100,00	100,03	99,49	100,57	0,03
Critères d'acceptation	- L'exactitude doit être 2,5%. - Limite inférieur < PR% < limite supérieur.			

V-2 INTERPRETATION

Partant de la constatation que les pourcentages de recouvrement sont compris entre la limite supérieure et la limite inférieure ($PR\%=100,03$), nous pouvons conclure que nos valeurs sont très satisfaisantes aux critères d'acceptation.

L'exactitude = 0,03 est inférieur à 2,5%.

- *L'étude de la fidélité et de l'exactitude a donné des résultats satisfaisants. Nous concluons donc que la méthode est fidèle et exacte.*

VII - Stabilité des solutions

Ce paramètre a pour objectif de dégager les conditions et la durée de stabilité des différentes solutions analysées.

Notre étude est effectuée comme suit :

- 03 solutions de standard à 100% ;
- 03 solutions de placebo chargé à 100%.

Ce paramètre est testé à des conditions de températures et de temps différents :

- ☞ Stabilité à température ambiante (paillasse) : 2h, 4h, 6h, 8h.
- ☞ Stabilité au réfrigérateur (2°C – 8 °C) : 24h, 48h.

Tableau 26: Pesée des solutions de stabilité (mg).

Pesée STD	Solution 1	34,03
	Solution 2	34
	Solution 3	34,03
Pesée du placebo chargé	Solution 1	34,03
	Solution 2	34,02
	Solution 3	34,01

VII-1 RESULTATS: voir chromatogrammes (annexes 09).

VII-1-1 Stabilité des solutions à température ambiante (paillasse)

La comparaison se fait par rapport aux conditions initiales, alors sans préparer les standards de quantification.

Tableau 27: Stabilité des solutions à température ambiante Aires/temps.

Temps		T=0h	T=4h	T=6h	T=8h
Aire STD	Solution 1	2176372	2164816	2169911	2178327
	Solution 2	2175766	2125483	2165929	2175846
	Solution 3	2177475	2172378	2165010	2170344
	moyenne	2176538	2154225	2166950	2174839
Aire placebo chargé	Solution 1	2197428	2189314	2213528	2212711
	Solution 2	2187609	2178369	2193567	2191116
	Solution 3	2184354	2180371	2186917	2190092
	moyenne	2189797	2182684	2198004	2197973

Pour chaque temps d'analyse, on définit le pourcentage de variation x, représenté dans le tableau suivant. (annexes 07)

Tableau 28: Calcul du pourcentage de variation x (% de dégradation/temps).

Temps		T=4h	T=6h	T=8h	critères d'acceptation
X STD	Solution 1	0,531	0.297	0.090	<i>Les valeurs de X doivent être inférieures ou égal à 2,0%</i>
	Solution 2	2, 311	0.452	0.004	
	Solution 3	0,234	0.572	0.327	
	Moyenne	1,025	0.440	0.140	
X placebo chargé	Solution 1	0.369	0.733	0.695	
	Solution 2	0.422	0.282	0.160	
	Solution 3	0.182	0.117	0.263	
	Moyenne	0.325	0.374	0.373	

VII-1-2 Stabilité des solutions au réfrigérateur

Pour chaque analyse, on a préparé un standard de quantification en double.

Tableau 29: Conditions des standards de quantification.

	T=24h		T=48h	
	STD1	STD2	STD1	STD2
Pesé (mg)	34,02	34,00	34,01	34,01
Aire	2174880	2176759	2144024	2170031
C (mg/ml)	0,0340	0,0340	0,0340	0,0340

Tableau 30: Stabilité des solutions au réfrigérateur Aire/temps

Temps		T=24h	T=48h
Aire STD	Solution 1	2175632	2168608
	Solution 2	2170482	2166678
	Solution 3	2157268	2160411
	Moyenne	2167794	2165232
Aire placebo chargé	Solution 1	2186037	2317539
	Solution 2	2196344	2200615
	Solution 3	2190157	2220717

	Moyenne	2190846	2246290
--	---------	---------	---------

Tableau 31: Stabilité des solutions au réfrigérateur concentration/temps.

Temps		T=24h	T=48h
Concentration STD	Solution 1	0.0340	0.0342
	Solution 2	0.0339	0.0342
	Solution 3	0.0337	0.0341
	moyenne	0.0339	0.0341
Concentration placebo chargé	Solution 1	0.0342	0.0365
	Solution 2	0.0343	0.0347
	Solution 3	0.0342	0.0350
	moyenne	0.0342	0.0354

Pour ces conditions de stabilité, le pourcentage de dégradation *Dt* est calculé dans le tableau suivant : (annexes 07)

Tableau 32: Calcul des pourcentages de dégradation/temps.

Temps		T=24h	T=48h	Critère d'acceptation
Dt STD	Solution 1	0,1	0,5	<i>Les valeurs de Dt doivent être inférieures ou égal à 2,0% au réfrigérateur à 5°C</i>
	Solution 2	0,2	0,5	
	Solution 3	0,9	0,1	
	Moyenne	0,4	0,4	
Dt placebo chargé	Solution 1	0,4	7,4	
	Solution 2	0,9	2,0	
	Solution 3	0,7	3,0	
	Moyenne	0,7	4,1	

VII-2 INTERPRETATION

Les valeurs de pourcentage de dégradation pendant les 8 heures sont inférieures à 2.0%, (1.025, 1.440, 0.325, ...), cela permet de conclure que :

- *Les solutions standards et échantillons sont stables pendant 8 heures à température ambiante (sur paille) ;*

Les valeurs de pourcentage de dégradation pendant 24 heures sont inférieures à 2.0%, par contre pendant 48 heures le Dt=4.1 d'excipient chargé est supérieur à 2.0%, donc :

- *Les deux composés (solutions standards et échantillons) présentent des stabilités différentes dans des conditions réfrigérantes (5°C).*

VIII - Linéarité

L'étude de linéarité est faite simultanément :

- Sur le principe actif seul ;
- Sur l'excipient chargé.

Cette étude est faite dans un intervalle de mesure autour de 100%, on a une série de 05 concentrations théoriques, qui sont : 80%, 90%, 100%, 110%, 120%.

La détermination de l'équation de la droite du signal en fonction de la concentration de PA, le coefficient de corrélation et le biais moyen

VIII-1- Linéarité sur le principe actif seul

La linéarité sur le principe actif est démontrée en préparant des solutions du PA seul dans l'intervalle de mesure.

VIII-1-1 RESULTATS : voir chromatogrammes (annexes 09).

Tableau 33: Détermination de l'équation de la droite du signal en fonction de la concentration de PA, le coefficient de corrélation et le biais moyen.

C theo(Xi) en%	C réelle (Xi réel) en%	Signal (Yi)	Moyenne (Yi')	Xi'	Bj	Biais moyen (%)
80	80,03	1754814	1754490	79.90	99.84	100,00
		1752271		79.79	99.70	
		1756387		79.79	99.93	
90	90	1990520	1992017	90.26	100.29	
		1993428		90.39	100.43	
		1992103		90.33	100.36	
100	100,09	2204802	2206339	99.67	99.58	
		2207413		99.79	99.70	
		2206802		99.76	99.67	
110	110,06	2443155	2447736	110.14	100.08	
		2447756		110.35	100.26	
		2452297		110.54	100.44	
120	120,03	2661460	2665496	119.73	99.75	
		2670709		120.14	100.09	
		2664321		119.86	99.86	
Critères d'acceptation		- Le coefficient de corrélation R doit être : 0,99 - Le biais moyen doit être compris entre 95,0 % et 105,0 %				

On trace la droite de régression du signal en fonction de la concentration de PA, et on calcule la pente **a**, l'ordonnée a l'origine **b** et le coefficient de corrélation, ainsi on détermine l'équation de la droite de régression. (annexes 08).

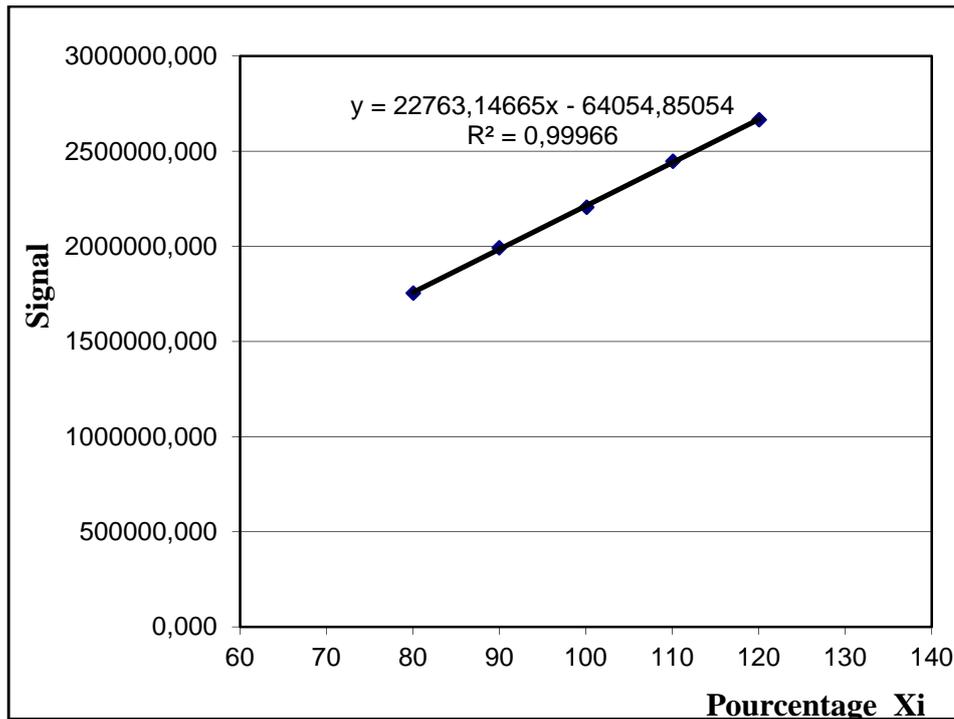


Figure 12: Représentation graphique de la droite de régression (linéarité sur PA)

L'équation de la droite de régression est comme suit : $Y = aX + b$

Avec : Y : signal mesuré.

X : concentration de PA en $\mu\text{g/ml}$.

A	22763,14665
B	-64054,85054

Dont : $Y = 22763,14665 X - 64054,85054$ (annexes 08)

VIII-2 Linéarité sur placebo chargé

La linéarité sur le placebo chargé est démontrée en préparant des solutions du PA en ajoutant une quantité d'excipient compris dans l'intervalle de mesure.

VIII-2-1 RESULTATS : voir chromatogramme (annexes 09)

Tableau 34: Détermination de l'équation de la droite du signal en fonction de la concentration de PA, le coefficient de corrélation et le biais moyen.

C theo (Xi) en%	C réelle (Xi réel) en%	Signal (Yi)	Moyenne (Yi')	Yi calculé par la droite de linéarité du p.ch	Yi calculé par la droite de linéarité du PA	Bi
80	80,03	1793932	1791858	1792611	1757679	101.99
		1791395		1792611	1757679	101.99
		1790248		1792611	1757679	101.99
90	90,03	2020147	2018562	2015746	1985311	101.53
		2019183		2015746	1985311	101.53
		2016357		2015746	1985311	101.53
100	100	2236870	2237800	2238211	2212259	101.17
		2236089		2238211	2212259	101.17
		2240443		2238211	2212259	101.17
110	110	2456885	2456766	2461346	2439891	100.88
		2455382		2461346	2439891	100.88
		2458032		2461346	2439891	100.88
120	120,09	2690186	2689418	2686489	2669571	100.63
		2689284		2686489	2669571	100.63
		2688785		2686489	2669571	100.63
Biais moyen						101.24

On trace la droite de régression du signal en fonction de la concentration de PA, et on calcule la pente a' , l'ordonnée a l'origine b' et le coefficient de corrélation, ainsi on détermine l'équation de la droite de régression (**annexes 08**).

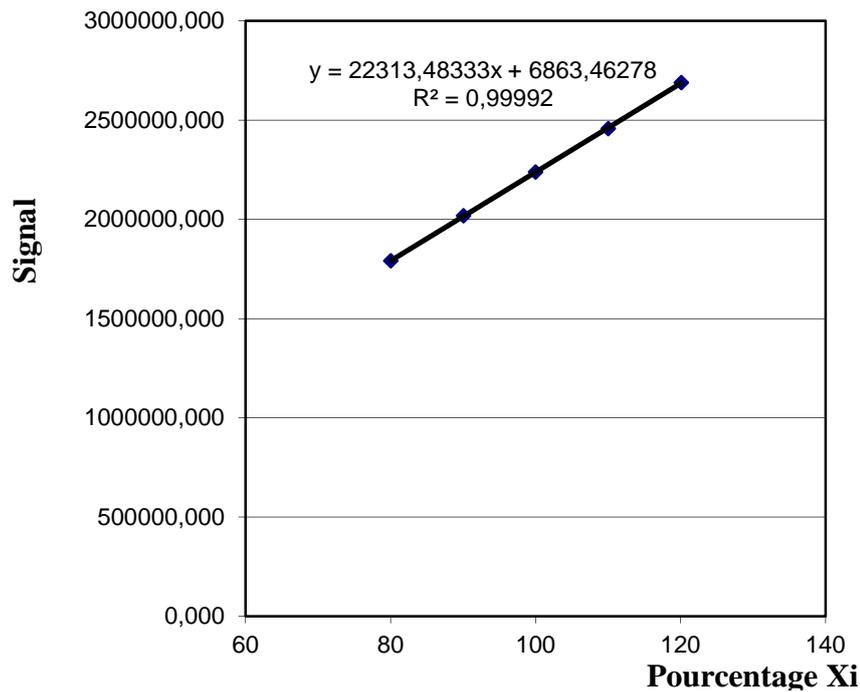


Figure 13: Représentation graphique de la droite de régression (linéarité sur placebo chargé).

A	22313,48333
B	+6863,46278

Dont : $Y = 22313,48333 X + 6863,46278$ (annexes 08)

VIII -3 INTERPRETATION

- D'après les résultats de linéarité sur standard, le coefficient de corrélation $R=0.99966$, et le biais moyen= 100.00%.
- Et celle de linéarité sur placebo chargé, le $R= 0.99992$, et le biais moyen= 101.24%.

De ce fait, les résultats sont compris dans les critères d'acceptation, de plus, la **figure 14** montre que les deux graphes de linéarité sur standard et sur placebo chargé dans le même intervalle de mesure sont superposables, ce qui nous amène à conclure que *la méthode est bien linéaire*.

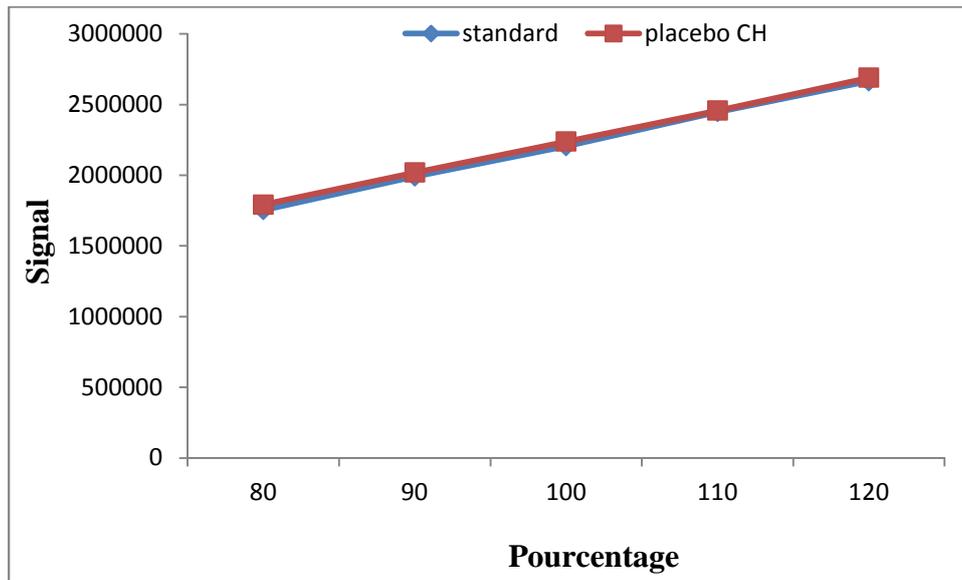


Figure 14: Comparaison des graphes de linéarité.

CONCLUSION

Le stage pratique effectué au niveau du laboratoire de développement analytique au sein de l'entreprise pharmaceutique Biopharm, nous a été très enrichissant, il nous a permis de découvrir le milieu industriel, ou nous avons pu confronter la théorie à la pratique et découvrir une autre façon, de réfléchir de parler et de procéder.

Dans la pratique courante après l'étape d'optimisation, il devient de plus en plus évident qu'il est indispensable de démontrer au moyen de la validation qu'une technique optimisée correspond à l'usage attendu tout en fournissant des résultats fiables. Pour s'assurer de la fiabilité de ces résultats, la validation analytique est un moment crucial du cycle de vie d'une méthode analytique : on l'agrée ou on la rejette !

En pratique cette validation s'est avérée fastidieuse et longue dans le sens où chaque manipulation doit être répétée plusieurs fois avec un sens strict du moindre détail pour que cela soit significatif. Ceci explique peut-être pourquoi elle reste discrète et n'est appliquée que sous la contrainte (législation) ou par engagement qualité

Tout au long de notre travail, nous avons eu à effectuer une validation complète d'une méthode HPLC pour le dosage d'un neuroleptique en forme comprimé à 25mg mais aussi et de manière rétroactive la validation de la technique CCM, utilisée comme technique de référence selon la pharmacopée dans l'identification et la recherche des substances apparentées dans le même produit et celle de la spécificité/stabilité du produit d'un point de vue analytique. Les résultats étant identiques les deux techniques se valident mutuellement.

Au terme de ce travail, nous pouvons alors conclure que la méthode utilisée a rempli toutes les exigences et performances et est donc spécifique, linéaire, exacte, fidèle et robuste, ce qui atteste sa validité et son aptitude à être utilisée en routine pour le dosage et de ce neuroleptique. De plus cette technique est plus précise, plus rapide, adaptée aux faibles dosages et automatisable. Donc gain de temps, gain de précision et gain d'argent.

Ce travail nous a aussi permis de mettre en lumière la spécificité et la stabilité du produit utilisé. Toutefois, il ne nous est pas possible de conclure sur le comportement de ce lot du produit une fois administré à un patient, car à aucun moment, nous n'avons entrepris des études *In Vivo* concernant notre produit. Il serait intéressant d'inclure des paramètres de validation *In vivo* des produits pharmaceutiques car comme présenté précédemment,

l'ensemble des molécules agissant sur la transmission nerveuse sont d'une régulation très fine, ainsi à petit changement de conformation des substances chimique, qui peuvent ne pas avoir d'effet sur le comportement analytique ; engendre une diminution ou perte totale de l'activité biologique de la substance d'intérêt.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

[1] **Pharmtech Essential Insights for Pharma Manufacturing**. FDA's new process validation guidance; industry reaction, question and challenges, 2011. [En ligne]. Disponible sur «<http://www.pharmtech.com>».

[2] **Agence Française de Sécurité Sanitaire des Produits De Santé 2009**, Bonnes Pratiques de Fabrication , Bulletin Officiel, Paris, 2009.

[3] **CNUCED/OMC**. Application des systèmes de gestion de la qualité ISO 9000. Genève, 1996.

[4] **J. PASQUALI**, Assurance qualité : *Division ST*, Groupe Technical Facilities Management (ST/TFM) CERN, Genève, Suisse, 2003.

[5] **TCHENAR. N**, Qualification & validation d'une unité forme liquide, Faculté de Pharmacie Université Grenoble- France, 2012.

[6] **Bonne Pratique de Fabrication** de produits pharmaceutiques, In: comité OMS d'experts des spécifications relatives aux préparations pharmaceutiques, trente deuxième rapport, Genève, 1992.

[7] **Mettler-Toledo GmbH, CH-8606 Greifensee**, Switzerland, disponible sur internet Internet: <http://www.mt.com>

[8] **Organisation Mondiale de la Santé**, annexe 1et 6 Bonnes Pratiques de Fabrication des Produits Pharmaceutiques, Lignes Directrices Concernant la Validation des Procédés de Fabrication, séries de rapport, 1996.

[9] **Agence fédérale des médicaments et des produits de santé**, Division Vigilance EUROSTATION II, place Victor Horta, 40/ 40 B-1060, Bruxelles, mise à jour en 2013.

[10] **Code of Federal Regulations**, Parts 210 and 211, FDA, <http://www.fda.gov/cder/dmpq/cgmpregs.htm>, 2 Janvier 2004.

[11] **La réglementation des médicaments dans l'union européenne**, bonne pratique de fabrication .médicament à usage humains et médicament vétérinaire, vol.4 édition1998.

[12] **BOUKLOUZE.A, DIGUA .K**, domaine d'application : Laboratoire de Pharmacologie et Toxicologie, Faculté de Médecine et de Pharmacie – Rabat, 2006.

[13] **HUBERT.P et all**, Validation des procédures analytiques quantitatives, Harmonisation des démarches, STP Pharma Pratiques, 101-138, 13, Mai- Jun 2003.

[14] **CHOISNARD.L**, une démarche qualité au service de la chimie, journée qualité et chimie, action national organisée par le CERMA Y 11-14, Octobre 2011.

[15] **EURACHEM**, the fitness for purpose of analytic method. A laboratory guide to method, Validation and related topics, 1998.

[16] Procédure de validation des méthodes analytiques (document interne de **BIOPHARM**)

[17] **Administration des laboratoires FFAV**, Bestuur laboratoria, AFSCA LABO: LFSAL section: phyto résidus , LAB 00 P 180 F 003, Template validation rapport – Modèle rapport de validation, v.01, 2012.

[18] Guide pratique pour la validation, le contrôle qualité, et l'estimation de l'incertitude d'une méthode d'analyse œnologique alternative, Résolution œno 10, 2005.

[19] **TENENHAUS.M**, la régression PLS, théorie et pratique, édition technip, 1998.

[20] **DUFOUR.A.B**, M2-recherche mouvement, performance, santé, cours sur logiciel R, 2006.

[21] **BOUKLOUZ.A, DIGUA.K**, démarche statistique de la validation analytique dans le domaine pharmaceutique (méthodologie et exemple pratique), les technologies de laboratoire, 2006.

[22] **GAEL.M**, comprendre et réaliser les testes statistiques a l'aide de R manuel bio statistique, P414, 2eme édition, Bruxelles, 2011.

[23] FDV01-000, analyse des produits agricoles et alimentaire- terminologie, décembre 1999

Sites internet :

[24]http://wiki.scienceamusante.net/index.php?title=Chromatographie_sur_couche_mince

[25] <http://www.exchem.fr/ccm.htm>

[26] **FRAGNIÈRE .N**, cour théorique sur HPLC ,LABO 325 Université de fribourg , faculté des science département de chimies, 2008.

[27] **JACOB.V**, présentation théorique de HPLC, institut de chimie , Grenoble, 2010

[28] **Pharmacopée Européenne**, supplément 6.4 de la 6eme eddition, octobre 2008

[29] **SENON.L**, les neuroleptiques, université de Poitiers, faculté de médecine, 2003.

[30] **CRETIGNIER.A**, développement et validation d'une méthode pour la quantification des neuroleptiques par chromatographie liquide et spectrométrie de masse en tandem (LC-MS/MS), Tab 51ème volée, Lausanne le, 23 avril 2012.

[31] **OWEN.F et al**, Increased dopamine-receptor sensitivity in schizophrenia, dopamine release in drug-free schizophrenic subjects. *Proc Natl Acad Sci USA* 1996;**93**:9235-40.s Techniques n°863, *Lancet* 1978;**2**:223-6, 1996.

[32] **Duval. L**, variation de sensibilité aux traitements psychotropes et origine genetique, a propos de huit cas de patients asiatiques, Human health and pathology. Dumas, 2012.

Annexes 01

- Calcul du rapport frontal

$$R_f = x/y$$

Annexes 02

- Le pic à mi-hauteur

$$w_h = 1,18w_i$$

Avec : w_i : points d'inflexion

- Volume de rétention

$$V_R = t_R \times F$$

Avec : F : débit ml/min

- Volume de rétention nulle

$$V_M = t_M \times F$$

- Facteur de rétention k :

$$k = \frac{\text{quantité de composant dans la phase stationnaire}}{\text{quantité de composant dans la phase mobile}}$$
$$= K_C \frac{V_S}{V_M}$$

- Nombres de plateaux

$$N = 5,54 \left(\frac{t_R}{w_h} \right)^2$$

Annexe 03

I- Conformité du système

- Nombre de plateaux théoriques : $N = 5,54 (t_R/\delta)^2$
- Facteur de symétrie : $A_s = (\omega_{0,05}/2d)$
- Calcule du facteur de similarité (%)

$$F_s\% = \frac{\text{Aire std1}}{\text{Aire std2}} \times \frac{Pe\text{ std2}}{Pe\text{ std1}} \times 100 = \frac{257905}{256701} \times \frac{34,06}{34,00} \times 100 = 100,5$$

Annexes 04

II- Robustesse

- Calcul de la teneur en PA

$$T(\%) = \frac{\text{Aire}_{ech} \times Pe_{std} \times 5 \times 100 \times 50 \times PM \times P \times 100 \times Fc}{\text{Aire}_{std} \times 100 \times 50 \times Pe_{ech} \times 5 \times 25 \times 100}$$

Avec :

Aire_{ech} : Aire du pic du PA dans la solution échantillon.

Aire_{std} : Moyenne des aires des pics du PA dans la solution standard.

Pe_{std} : Prise d'essai du standard (mg).

Pe_{ech} : Prise d'essai de l'échantillon (mg).

P : Pureté du WS (%).

Fc : Facteur de correction (0,739).

PM : Poids moyen (mg).

➤ **Calcul du facteur de recouvrement**

$$\text{Facteur de recouvrement (\%)} = \frac{\text{Concentration calculée}}{\text{Concentration introduite}} \times 100$$

➤ **Calcul d'intervalle de confiance**

$$\text{Intervalle de confiance} = \text{Effet} \pm \frac{\sigma_{\text{exp}} \times t_{\text{student}}}{\sqrt{n}}$$

Avec :

σ_{exp} : écart type expérimental des réponses expérimentales

t_{student} : coefficient de Student pour une probabilité $1-\alpha/2$ et un degré de liberté (ddl) = n- 1

Annexes 05

III- Fidélité intermédiaire

➤ **Calcul de Sy**

$$S_y = \left[\frac{\sum (Y_i - Y_0)^2}{n - 1} \right]^{1/2}$$

Avec :

Y_i : concentration en composant par série.

Y₀ : moyenne totale des Y_i

S_y : écart type des Y_i

Annexes 06

IV- Exactitude

- **Calcul de pourcentage de recouvrement%**

$$PR\% = Y_0 / \text{la valeur de référence} \times 100$$

- **Calcul de l'exactitude**

$$Exactitude = 100 - PR\%.$$

$$Limite\ inférieure = PR - (t_{0.975} \times S_y) / 4$$

$$Limite\ supérieur = PR + (t_{0.975} \times S_y) / 4$$

Annexes 07

V- Stabilité des solutions

- **calcul du pourcentage de variation X à température ambiante**

$$x = \frac{|A_0 - A_t|}{A_0} \times 100$$

Avec :

A_0 : signal dû à l'analyte au temps initial.

A_t : signal dû à l'analyte au temps T.

➤ **calcul de pourcentage de dégradation Dt**

$$D_t = \frac{|C_0 - C_t|}{C_0} \times 100$$

Avec :

C_0 : Concentration de l'analyte au temps initial en mg/ml.

C_t : Concentration de l'analyte au temps t en mg/ml. Elle est calculée à partir du signal de l'analyte au temps t, les concentrations et les aires de l'analyte dans les solutions standards fraîchement préparées.

$$C_t = \frac{A_t}{2} \left(\frac{C_{STD1}}{A_{STD1}} + \frac{C_{STD2}}{A_{STD2}} \right)$$

Avec :

C_{STD1} et C_{STD2} : Concentration de l'analyte dans les solutions standard 1 et 2

A_{STD1} et A_{STD2} : signal de l'analyte dans les solutions standard 1 et 2

A_t : signal du pic de l'analyte dans la solution analysée à un temps t

C_t : Concentration de l'analyte dans la solution analysée à un temps t (moyenne calculée à partir de 02 standards).

Annexes 08

VI- Linéarité

➤ **Sur le principe actif seul**

L'équation de la droite de régression est comme suit : **$Y = aX + b$**

A- Calcul de la pente a et de l'ordonnée à l'origine b

$$a = \frac{\sum (X_i - \bar{X})(Y_i - \bar{Y})}{\sum (X_i - \bar{X})^2}$$

$$X' = \frac{\sum Xi}{N}, \quad Y' = \frac{\sum Yi}{N}$$

$$b = Y' - a X'$$

On a : $Y = 22763,14665 X - 64054,85054$

Avec : Y : signal mesuré.

X : concentration de PA en $\mu\text{g/ml}$.

B- Calcul du biais moyen

À partir de l'équation on calcul Xi' , Bj

$$Xi' = \frac{Yi - b}{a} \quad \Rightarrow \quad Bj = \frac{Xi'}{Xi \text{ réel}} \times 100$$

$$\Rightarrow \text{Biais moyen} = \frac{\sum Bj}{N} = 100,00$$

➤ Sur placebo chargé

L'équation de la droite de régression est comme suit : $Y = a' X + b'$

Avec : Y : signal mesuré.

X : concentration de PA en $\mu\text{g/ml}$.

Dont : $Y = 22313,48333 X + 6863,46278$

$R^2 = 0,99992$

A- Calcul de Yi par la droite de linéarité du placebo chargé

On a l'équation de placebo chargé : $Yi = a' Xi + b'$ (1)

Avec : Xi : concentration réelle (sur placebo chargé).

On a remplacé les valeurs du Xi dans l'équation et on a eu les valeurs de Yi calculé par la droite de linéarité du placebo chargé.

B- Calcul de Yi par la droite de linéarité du principe actif

On a l'équation de principe actif : $Y_i = a X_i + b$ (2)

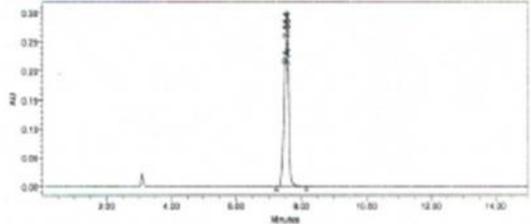
Avec : X_i : concentration réelle (sur placebo chargé).

On a remplacé les valeurs du X_i dans l'équation et on a eu les valeurs de Y_i calculé a partir de la droite de linéarité du principe actif.

C- Calcul du biais moyen

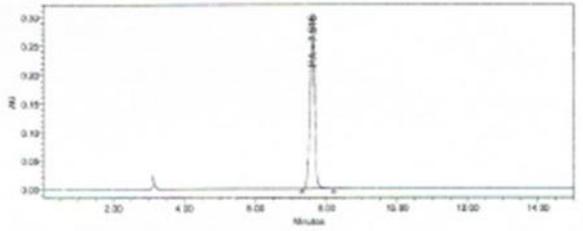
$$B_i = \frac{Y_i (1)}{Y_i (2)} \times 100 \quad \Rightarrow \quad \text{Biais moyen} = \frac{\sum B_i}{N} = 100,24$$

SAMPLE INFORMATION			
Sample Name:	standard débit 0.8	Acquired By:	System
Sample Type:	Unknown	Sample Set Name:	robotessse 040515
Vial:	1	Acq. Method Set:	debit 08 MS
Injection #:	2	Processing Method:	debit 08 248nm.MP
Injection Volume:	20.00 µl	Channel Name:	248.Dcm
Run Time:	15.0 Minutes	Proc. Chnl. Descr.:	PDA 248.0 nm
Date Acquired:	05/04/2015 10:12:49 CET		
Date Processed:	19/04/2015 14:23:28 CET		



Peak Name	RT	Area	Height
1 PA	7.554	2802142	304388

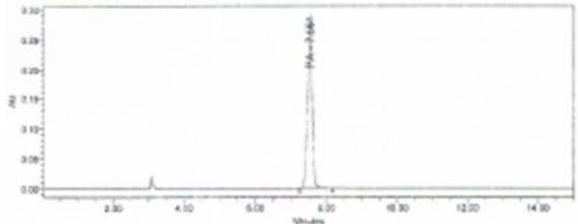
SAMPLE INFORMATION			
Sample Name:	standard débit 0.8	Acquired By:	System
Sample Type:	Unknown	Sample Set Name:	robotessse 040515
Vial:	1	Acq. Method Set:	debit 08 MS
Injection #:	1	Processing Method:	debit 08 248 nm.MP
Injection Volume:	20.00 µl	Channel Name:	248.Dcm
Run Time:	15.0 Minutes	Proc. Chnl. Descr.:	PDA 248.0 nm
Date Acquired:	05/04/2015 14:57:00 CET		
Date Processed:	19/04/2015 14:21:42 CET		



Peak Name	RT	Area	Height
1 PA	7.516	2787967	306154

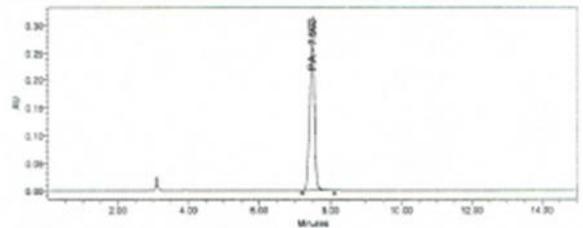
Standard 95% et 105% débit 0.8/ 248nm

SAMPLE INFORMATION			
Sample Name:	placebo charge 95% débit 0.8	Acquired By:	System
Sample Type:	Unknown	Sample Set Name:	robotessse 040515
Vial:	1	Acq. Method Set:	debit 08 MS
Injection #:	1	Processing Method:	debit 08 248nm.MP0504
Injection Volume:	20.00 µl	Channel Name:	248.Dcm
Run Time:	15.0 Minutes	Proc. Chnl. Descr.:	PDA 248.0 nm
Date Acquired:	05/04/2015 10:28:42 CET		
Date Processed:	19/04/2015 14:23:28 CET		



Peak Name	RT	Area	Height
1 PA	7.551	2862791	290883

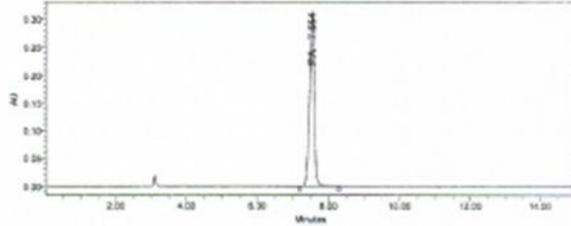
SAMPLE INFORMATION			
Sample Name:	placebo charge 105% débit 0.8	Acquired By:	System
Sample Type:	Unknown	Sample Set Name:	robotessse 040515
Vial:	4	Acq. Method Set:	debit 08 MS
Injection #:	1	Processing Method:	debit 08 248nm.MP0504
Injection Volume:	20.00 µl	Channel Name:	248.Dcm
Run Time:	15.0 Minutes	Proc. Chnl. Descr.:	PDA 248.0 nm
Date Acquired:	05/04/2015 10:41:26 CET		
Date Processed:	19/04/2015 14:25:17 CET		



Peak Name	RT	Area	Height
1 PA	7.503	2911548	315883

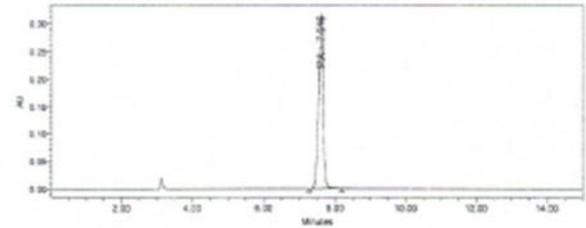
Echantillon 95% et 105% débit 0.8/ 248nm

SAMPLE INFORMATION			
Sample Name:	standard débit 0.8	Acquired By:	System
Sample Type:	Unknown	Sample Set Name:	robustesse 040515
Vial:	1	Acq. Method Set:	debit 08 MS
Injection #:	2	Processing Method:	debit 08 252nmMP
Injection Volume:	20.00 µl	Channel Name:	252.0nm
Run Time:	15.0 Minutes	Proc. Chnl. Descr.:	PDA 252.0 nm
Date Acquired:	05/04/2015 15:12:49 CET		
Date Processed:	19/04/2015 14:14:16 CET		



Peak Name	RT	Area	Height
1 PA	7.554	2907981	315250

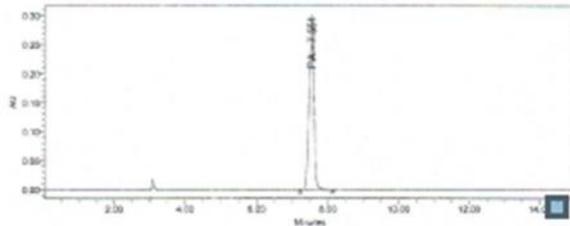
SAMPLE INFORMATION			
Sample Name:	standard débit 0.8	Acquired By:	System
Sample Type:	Unknown	Sample Set Name:	robustesse 040515
Vial:	1	Acq. Method Set:	debit 08 MS
Injection #:	1	Processing Method:	debit 08 252nmMP
Injection Volume:	20.00 µl	Channel Name:	252.0nm
Run Time:	15.0 Minutes	Proc. Chnl. Descr.:	PDA 252.0 nm
Date Acquired:	05/04/2015 14:57:00 CET		
Date Processed:	19/04/2015 14:13:28 CET		



Peak Name	RT	Area	Height
1 PA	7.618	2896078	316884

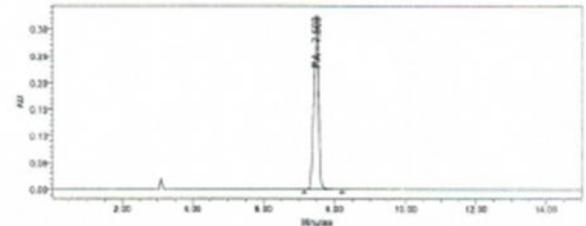
Standard 95% et 105% débit 0.8/ 252nm

SAMPLE INFORMATION			
Sample Name:	placebo charge 95% débit 0.8	Acquired By:	System
Sample Type:	Unknown	Sample Set Name:	robustesse 040515
Vial:	3	Acq. Method Set:	debit 08 MS
Injection #:	1	Processing Method:	debit 08 252nmMP
Injection Volume:	20.00 µl	Channel Name:	252.0nm
Run Time:	15.0 Minutes	Proc. Chnl. Descr.:	PDA 252.0 nm
Date Acquired:	05/04/2015 15:28:42 CET		
Date Processed:	19/04/2015 14:15:19 CET		



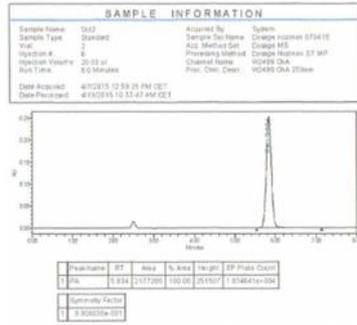
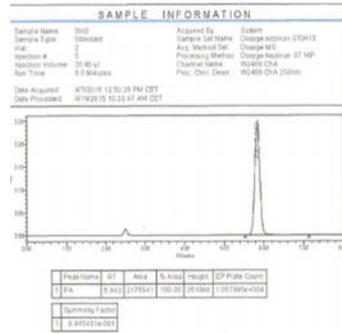
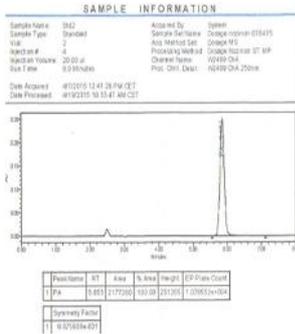
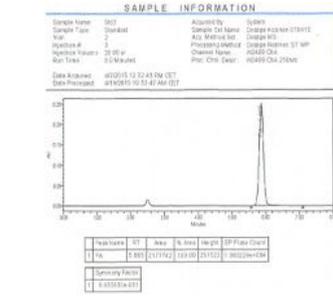
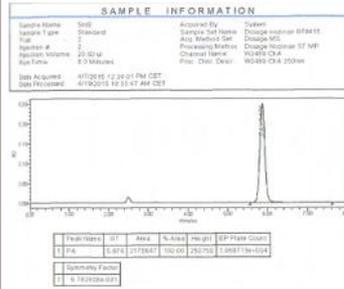
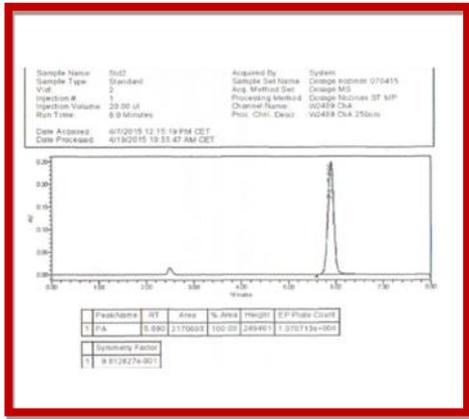
Peak Name	RT	Area	Height
1 PA	7.501	2707582	301124

SAMPLE INFORMATION			
Sample Name:	placebo charge 105% débit 0.8	Acquired By:	System
Sample Type:	Unknown	Sample Set Name:	robustesse 040515
Vial:	4	Acq. Method Set:	debit 08 MS
Injection #:	1	Processing Method:	debit 08 252nmMP
Injection Volume:	20.00 µl	Channel Name:	252.0nm
Run Time:	15.0 Minutes	Proc. Chnl. Descr.:	PDA 252.0 nm
Date Acquired:	05/04/2015 15:41:25 CET		
Date Processed:	19/04/2015 14:19:07 CET		



Peak Name	RT	Area	Height
1 PA	7.533	3320997	327260

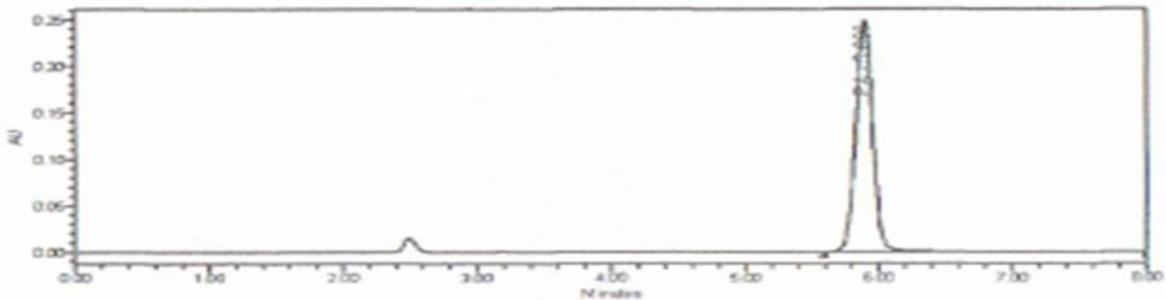
Echantillon 95% et 105% débit 0.8/ 252nm



Sample Name: Sdd2
Sample Type: Standard
Vial: 2
Injection #: 1
Injection Volume: 20.00 ul
Run Time: 6.0 Minutes

Acquired By: System
Sample Set Name: Dosage nozinan 070415
Acq. Method Set: Dosage MS
Processing Method: Dosage Nozinan ST MP
Channel Name: W2489 ChA
Proc. Chnl. Descr: W2489 ChA 250nm

Date Acquired: 4/7/2015 12:15:19 PM CET
Date Processed: 4/19/2015 10:33:47 AM CET

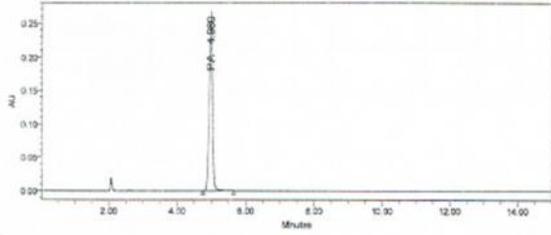


PeakName	RT	Area	% Area	Height	EP Plate Count
1 PA	5.890	2170693	100.00	249401	1.070713e+004

Symmetry Factor: 9.812827e-001

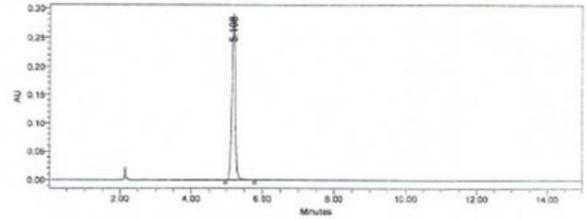
Conformité du système

SAMPLE INFORMATION			
Sample Name:	placebo charge 95% debit 1.2	Acquired By:	System
Sample Type:	Unknown	Sample Set Name:	robustesse 040515
Vial:	3	Acq. Method Set:	debit 1.2 MS
Injection #:	1	Processing Method:	debit 08 248nm
Injection Volume:	20.00 ul	Channel Name:	248.0nm
Run Time:	15.0 Minutes	Proc. Chnl. Descr.:	PDA 248.0 nm
Date Acquired:	05/04/2015 14:04:58 CET		
Date Processed:	19/04/2015 14:06:39 CET		



Peak Name	RT	Area	Height
1 PA	4.990	1762399	266679

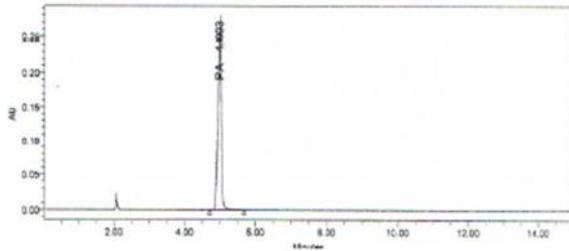
SAMPLE INFORMATION			
Sample Name:	placebo charge 105% debit 1.2	Acquired By:	System
Sample Type:	Unknown	Sample Set Name:	robustesse 040515
Vial:	4	Acq. Method Set:	debit 1.2 MS
Injection #:	1	Processing Method:	debit 08 248nm
Injection Volume:	20.00 ul	Channel Name:	248.0nm
Run Time:	15.0 Minutes	Proc. Chnl. Descr.:	PDA 248.0 nm
Date Acquired:	05/04/2015 14:20:01 CET		
Date Processed:	19/04/2015 14:07:31 CET		



Peak Name	RT	Area	Height
1 PA	4.920		
2	5.198	2009062	200233

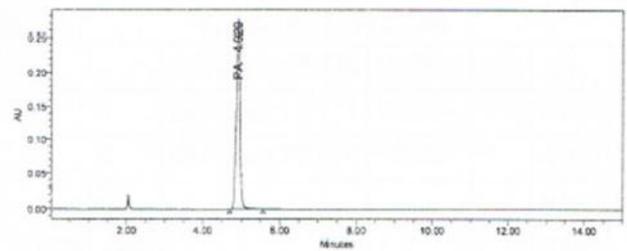
Echantillon 1.2 / 248nm

SAMPLE INFORMATION			
Sample Name:	Std1debit 1.2	Acquired By:	System
Sample Type:	Unknown	Sample Set Name:	robustesse 040515
Vial:	1	Acq. Method Set:	debit 1.2 MS
Injection #:	2	Processing Method:	debit 08 248nm
Injection Volume:	20.00 ul	Channel Name:	248.0nm
Run Time:	15.0 Minutes	Proc. Chnl. Descr.:	PDA 248.0 nm
Date Acquired:	05/04/2015 13:48:15 CET		
Date Processed:	19/04/2015 14:03:01 CET		



Peak Name	RT	Area	Height
1 PA	4.990	1890268	280128

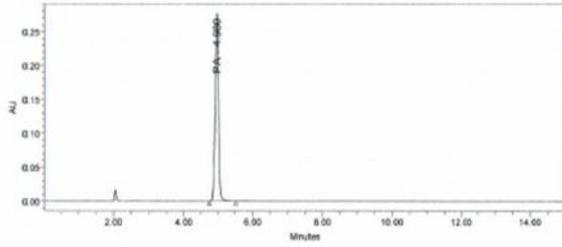
SAMPLE INFORMATION			
Sample Name:	Std1debit 1.2	Acquired By:	System
Sample Type:	Unknown	Sample Set Name:	robustesse 040515
Vial:	1	Acq. Method Set:	debit 1.2 MS
Injection #:	1	Processing Method:	debit 08 248nm
Injection Volume:	20.00 ul	Channel Name:	248.0nm
Run Time:	15.0 Minutes	Proc. Chnl. Descr.:	PDA 248.0 nm
Date Acquired:	05/04/2015 13:32:28 CET		
Date Processed:	19/04/2015 13:56:55 CET		



Peak Name	RT	Area	Height
1 PA	4.920	1939515	275325

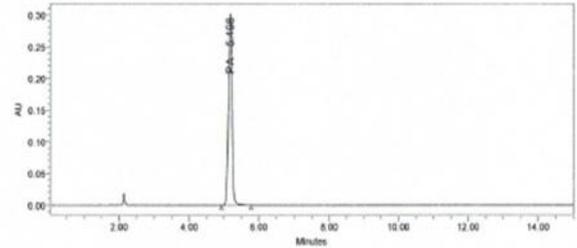
Standard 1.2 / 248 nm

SAMPLE INFORMATION			
Sample Name:	placebo charge 96% debit 1.2	Acquired By:	System
Sample Type:	Unknown	Sample Set Name:	robustesse 040515
Vial:	3	Acq. Method Set:	debit 1.2 MS
Injection #:	1	Processing Method:	debit 12 252 nm
Injection Volume:	20.00 µl	Channel Name:	252.0nm
Run Time:	15.0 Minutes	Proc. Chnl. Descr.:	FDA 252.0 nm
Date Acquired:	05/04/2015 14:04:08 CET		
Date Processed:	19/04/2015 13:46:10 CET		



Peak Name	RT	Area	Height
1 PA	4.980	162224	275215

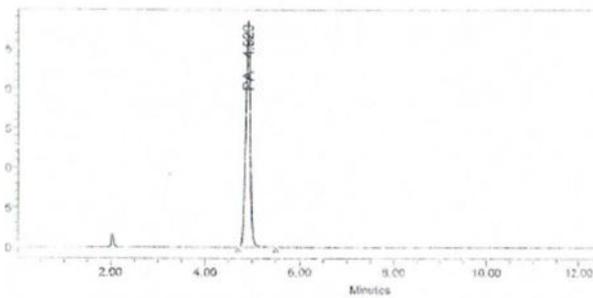
SAMPLE INFORMATION			
Sample Name:	placebo charge 100% debit 1.2	Acquired By:	System
Sample Type:	Unknown	Sample Set Name:	robustesse 040515
Vial:	4	Acq. Method Set:	debit 1.2 MS
Injection #:	1	Processing Method:	debit 12 252 nm
Injection Volume:	20.00 µl	Channel Name:	252.0nm
Run Time:	15.0 Minutes	Proc. Chnl. Descr.:	FDA 252.0 nm
Date Acquired:	05/04/2015 14:20:01 CET		
Date Processed:	19/04/2015 13:44:55 CET		



Peak Name	RT	Area	Height
1 PA	5.198	2081227	300682

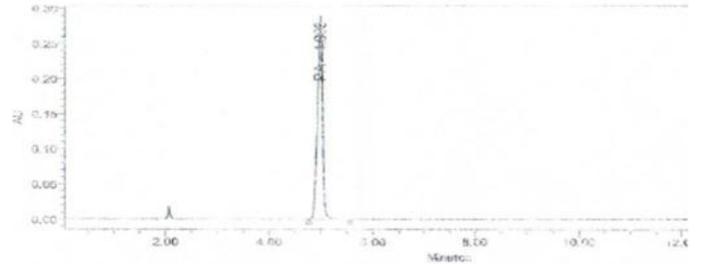
Echantillon 1.2/252nm

SAMPLE INFORMATION			
Sample Name:	Std1debit 1.2	Acquired By:	System
Sample Type:	Unknown	Sample Set Name:	robustesse 240
Vial:	1	Acq. Method Set:	debit 1.2 MS
Injection #:	1	Processing Method:	debit 12 252 nm
Injection Volume:	20.00 µl	Channel Name:	252.0nm
Run Time:	15.0 Minutes	Proc. Chnl. Descr.:	FDA 252.0 nm
Date Acquired:	05/04/2015 13:32:26 CET		
Date Processed:	19/04/2015 13:40:20 CET		



Peak Name	RT	Area	Height
1 PA	4.620	1901689	235182

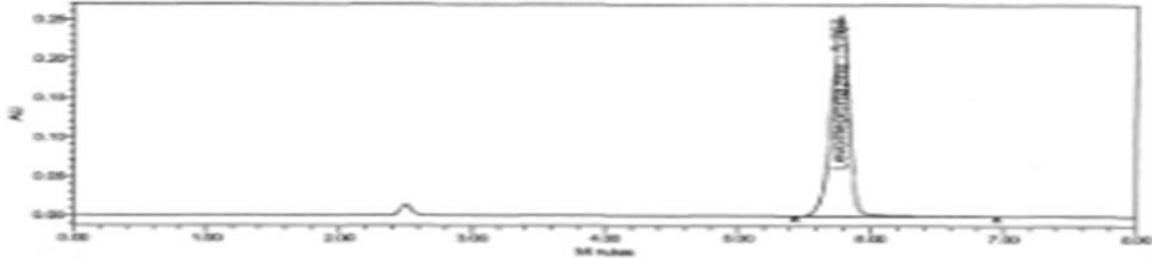
SAMPLE INFORMATION			
Sample Name:	Std1debit 1.2	Acquired By:	System
Sample Type:	Unknown	Sample Set Name:	robustesse 04
Vial:	1	Acq. Method Set:	debit 1.2 MS
Injection #:	2	Processing Method:	debit 12 252 nm
Injection Volume:	20.00 µl	Channel Name:	252.0nm
Run Time:	15.0 Minutes	Proc. Chnl. Descr.:	FDA 252.0 nm
Date Acquired:	05/04/2015 13:48:15 CET		
Date Processed:	19/04/2015 13:37:47 CET		



Peak Name	RT	Area	Height
1 PA	4.893	1928538	250158

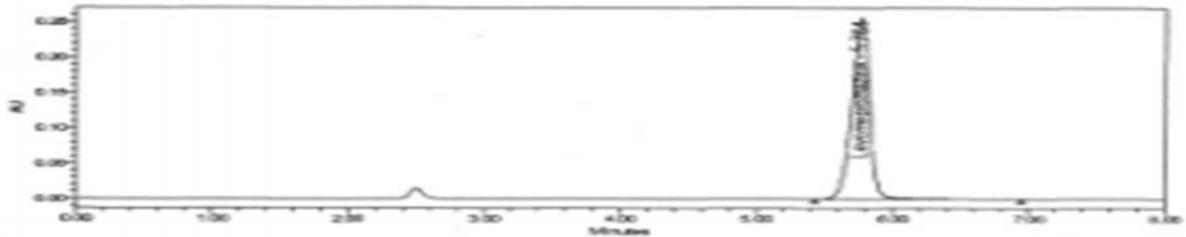
Standard 1.2/ 252nm

SAMPLE INFORMATION			
Sample Name:	std 2	Acquired By:	System
Sample Type:	Standard	Sample Set Name:	Insart6 130415
Vial:	2	Acq. Method Set:	Dosage MS
Injection #:	2	Processing Method:	Dosage Nozinan MP
Injection Volume:	20.00 ul	Channel Name:	W2489 ChA
Run Time:	8.0 Minutes	Proc. Chnl. Descr.:	W2489 ChA 250nm
Date Acquired:	4/13/2015 1:34:19 PM CET		
Date Processed:	4/13/2015 4:08:21 PM CET		



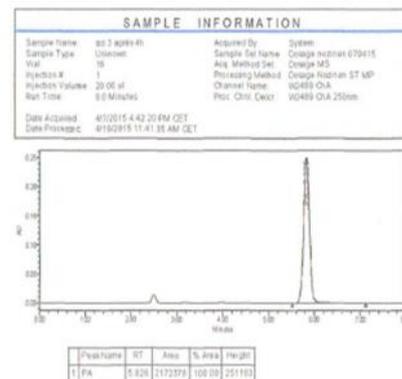
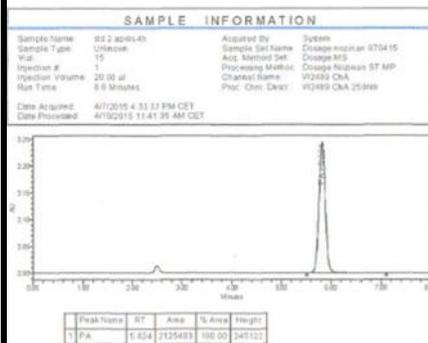
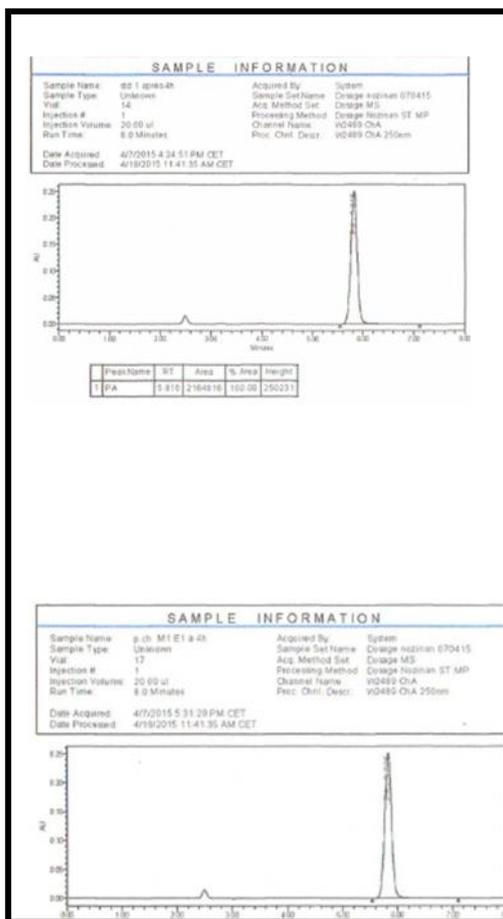
Peak Name	RT	Area	% Area	Height
1 Levomepromazine	5.767	2273072	100.00	256527

SAMPLE INFORMATION			
Sample Name:	std 2	Acquired By:	System
Sample Type:	Standard	Sample Set Name:	Insart6 130415
Vial:	2	Acq. Method Set:	Dosage MS
Injection #:	1	Processing Method:	Dosage Nozinan MP
Injection Volume:	20.00 ul	Channel Name:	W2489 ChA
Run Time:	8.0 Minutes	Proc. Chnl. Descr.:	W2489 ChA 250nm
Date Acquired:	4/13/2015 1:25:36 PM CET		
Date Processed:	4/13/2015 4:08:21 PM CET		

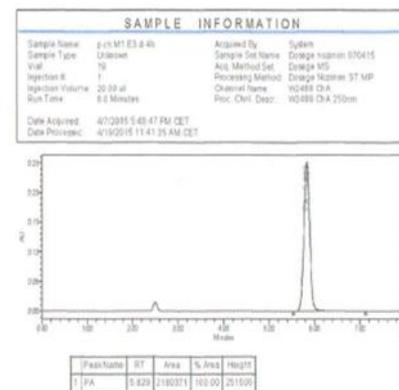
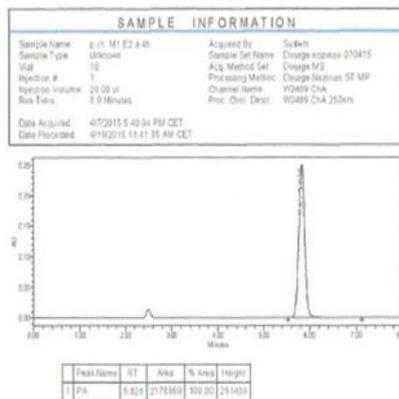
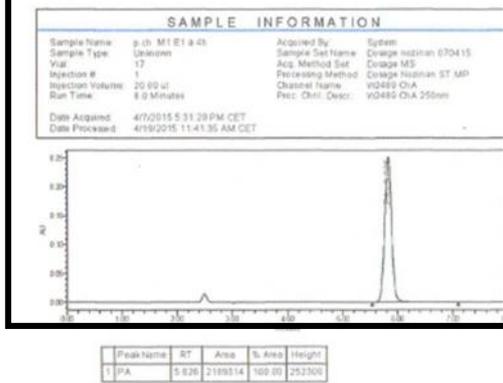


Peak Name	RT	Area	% Area	Height
1 Levomepromazine	5.764	2265428	100.00	256701

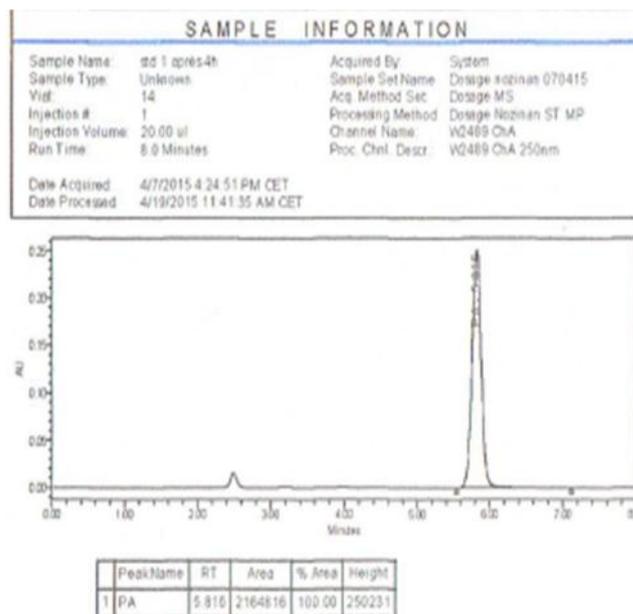
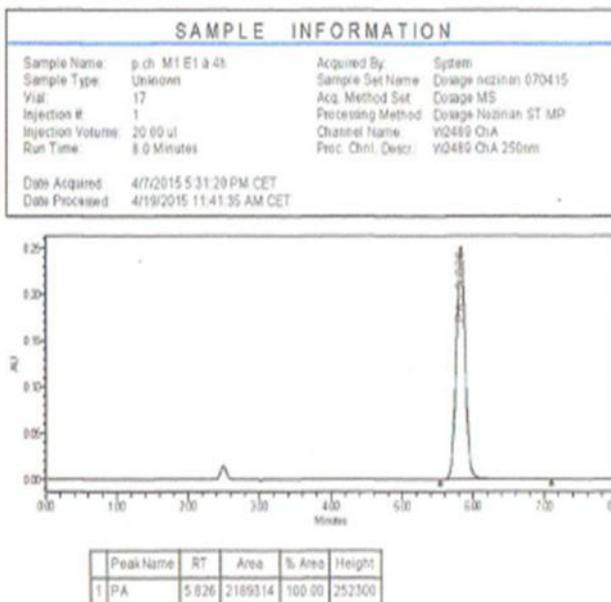
Standard 02 conformité du système

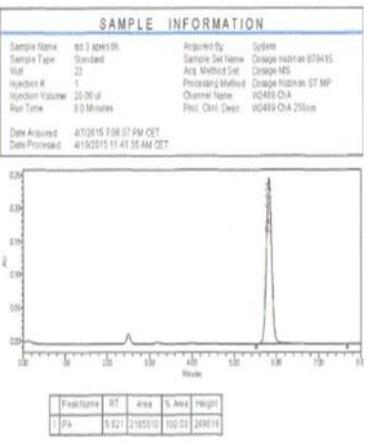
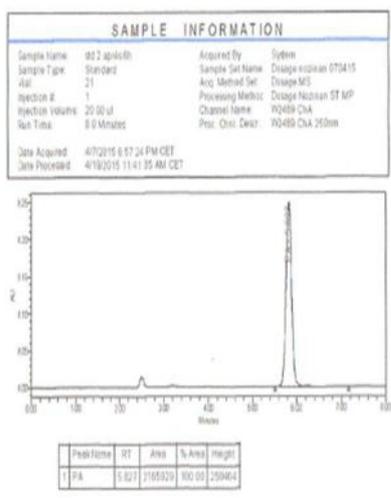
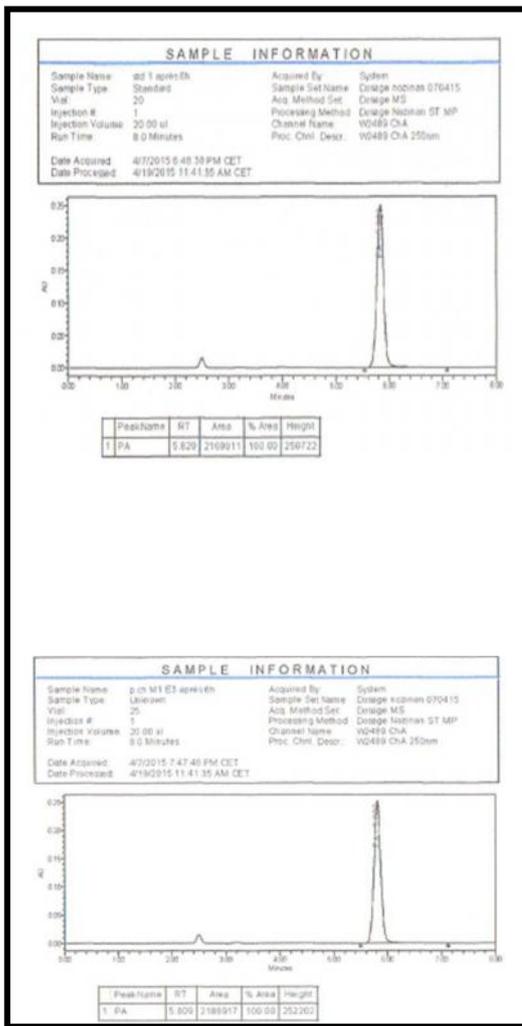


Standard après 4H

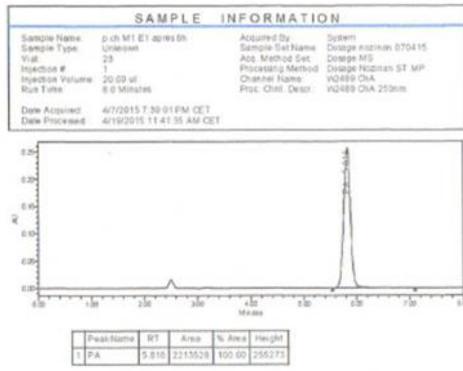
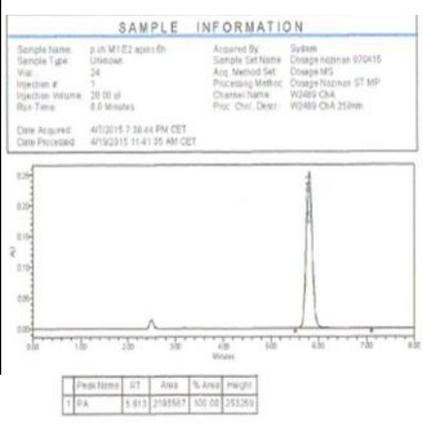
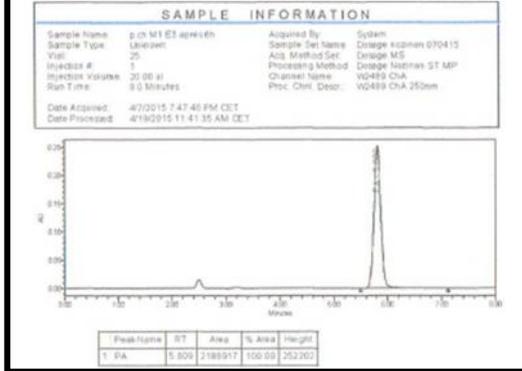


Echantillon après 4H

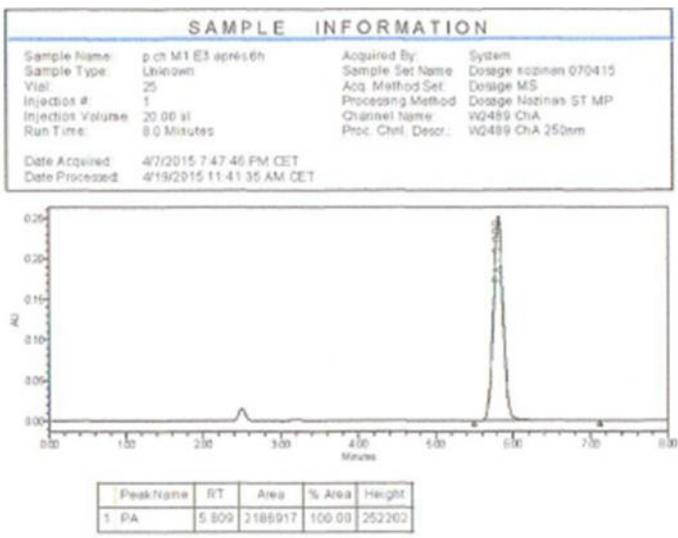
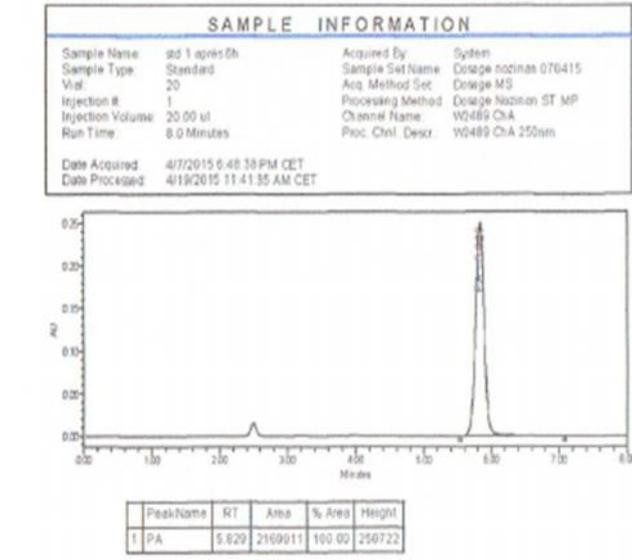


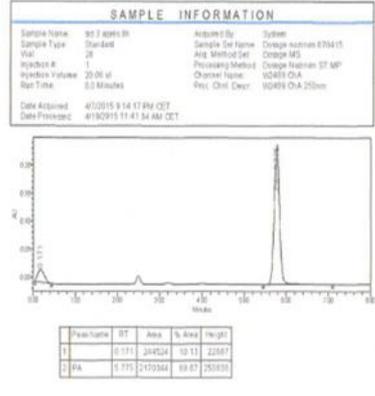
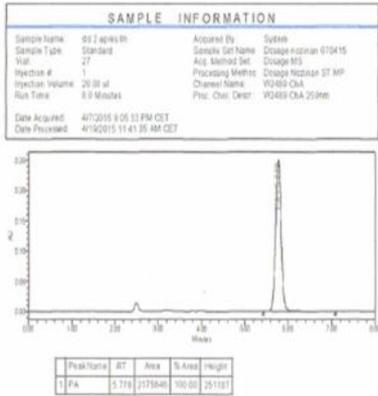
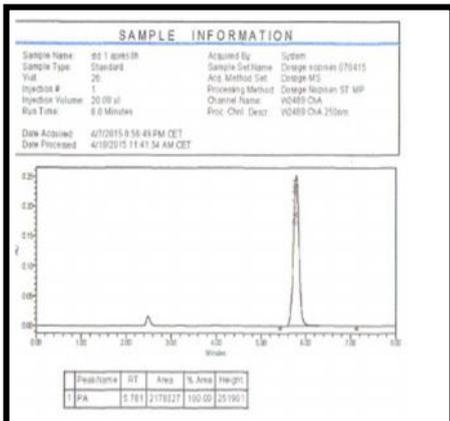


Standard après 6h

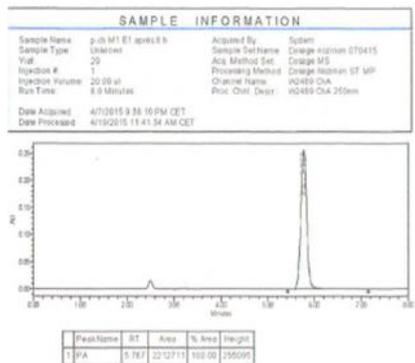
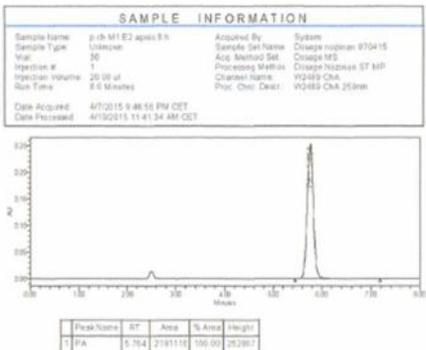
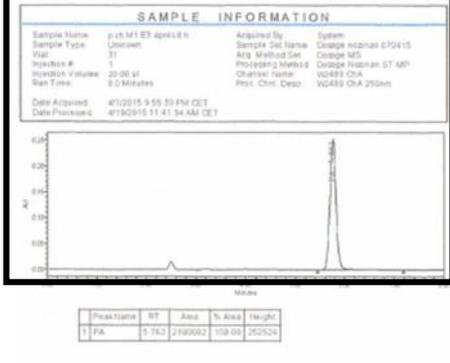


Echantillon après 6H

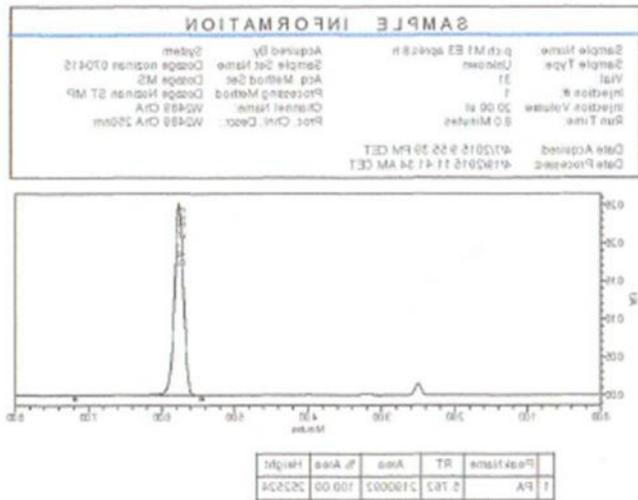
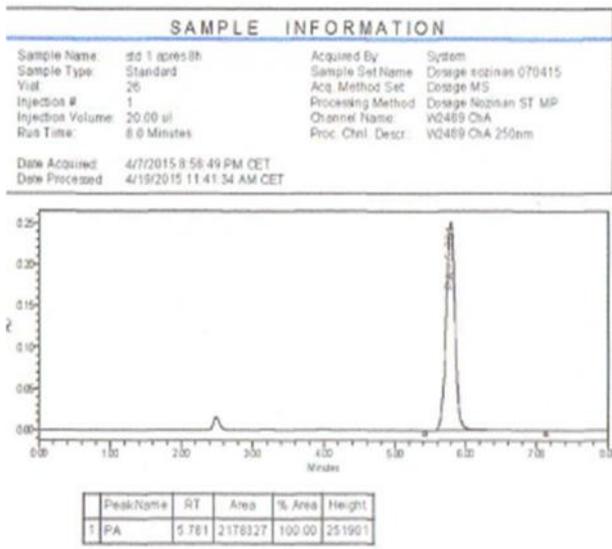


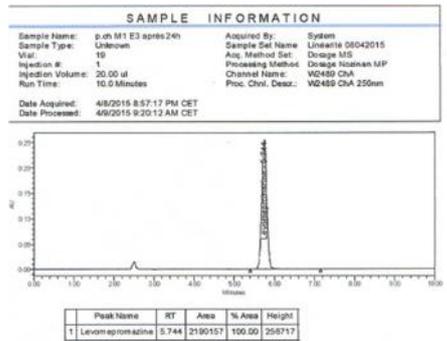
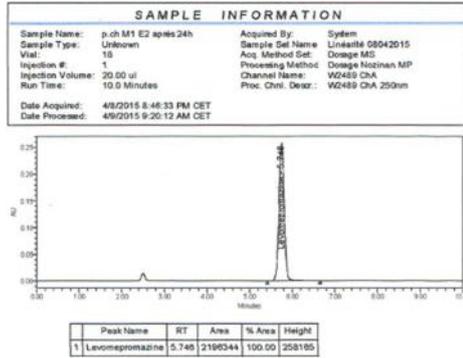
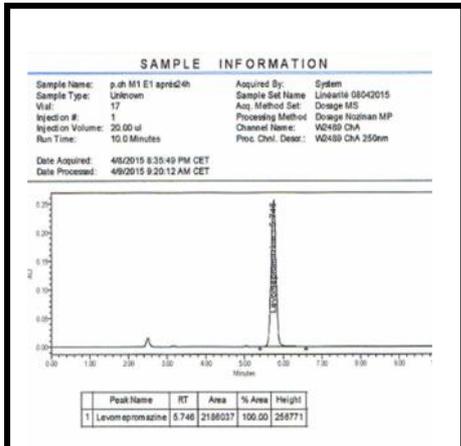


Standard après 8h

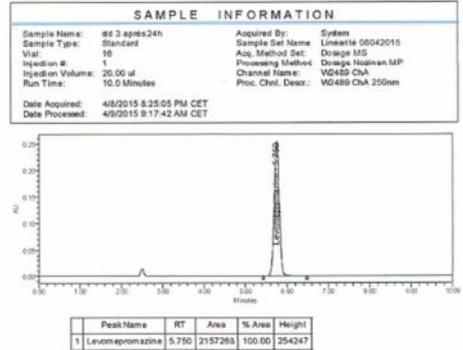
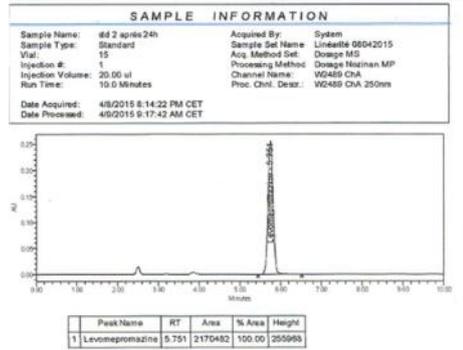
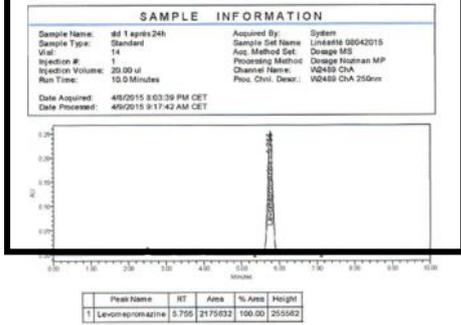


Echantillon après 8h

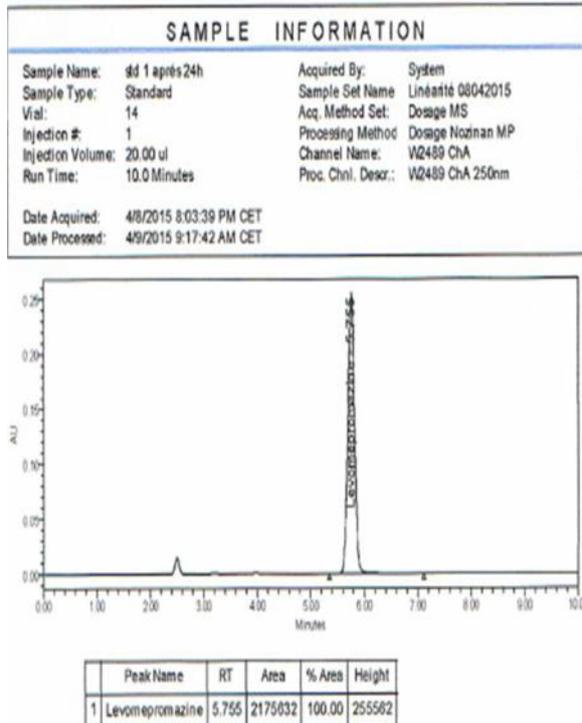
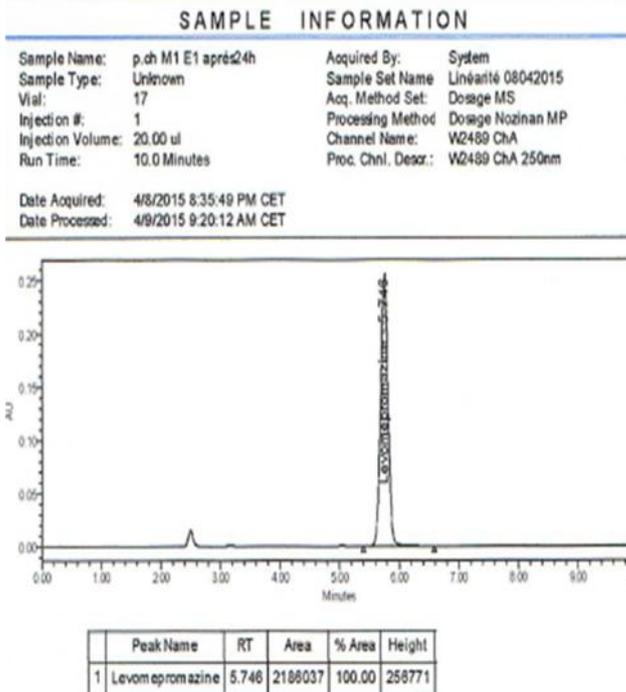


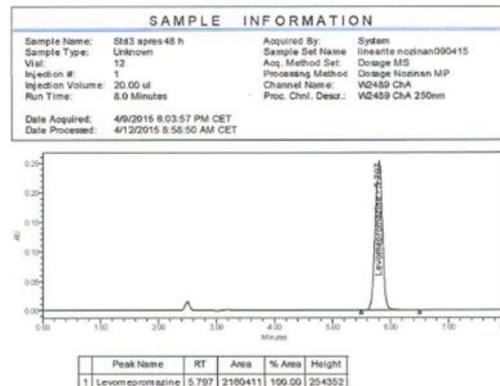
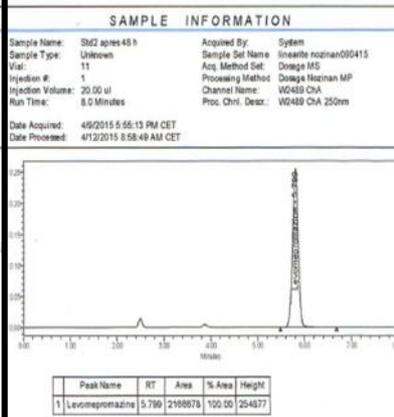
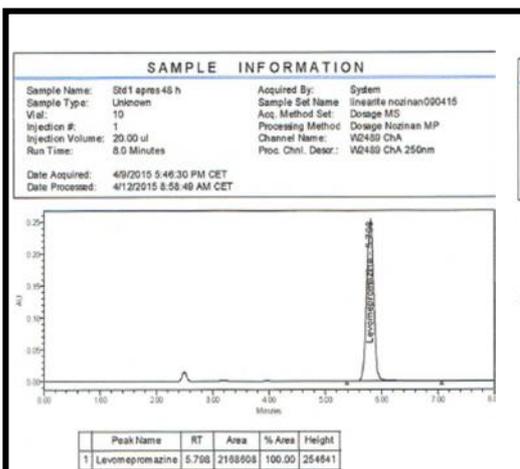


Echantillon après 24H

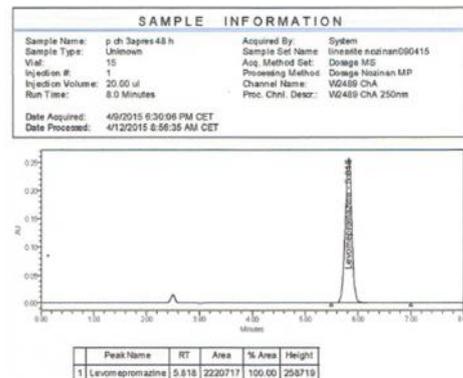
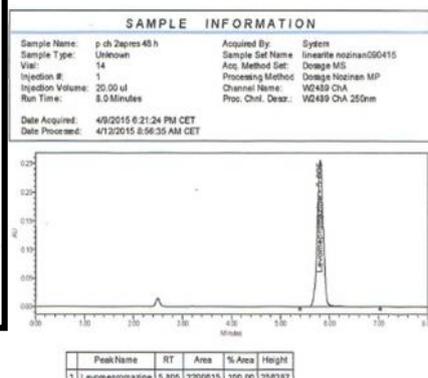
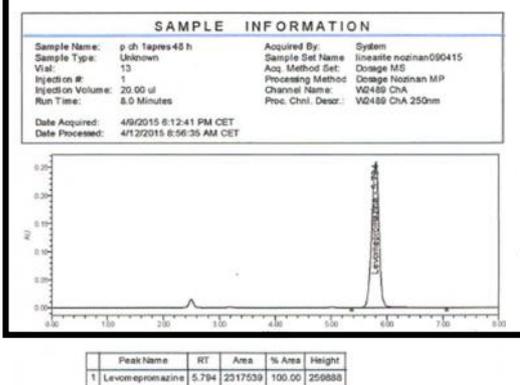


Standard après 24h

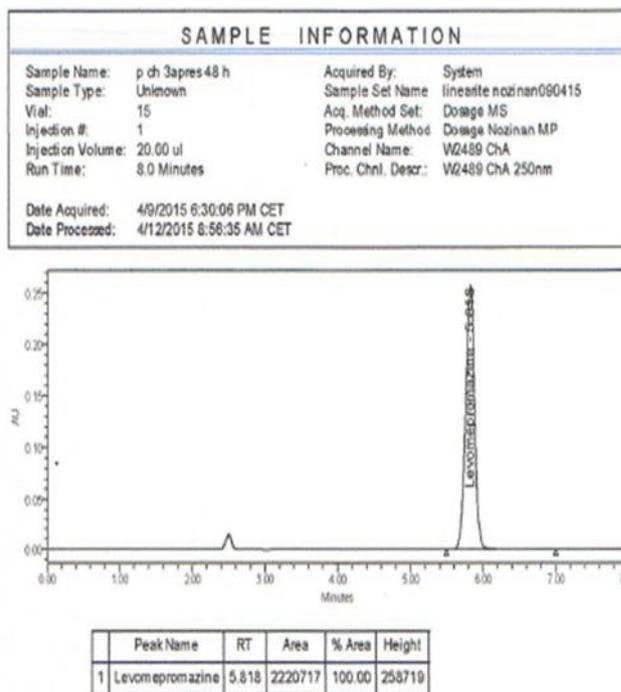
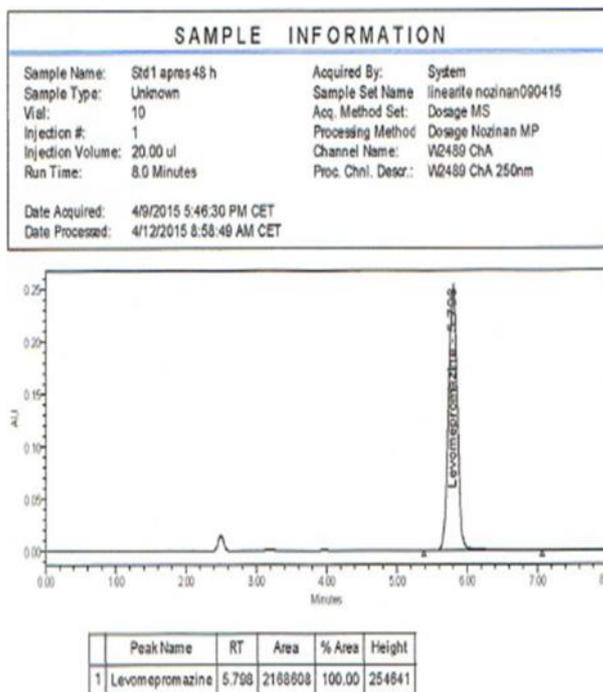


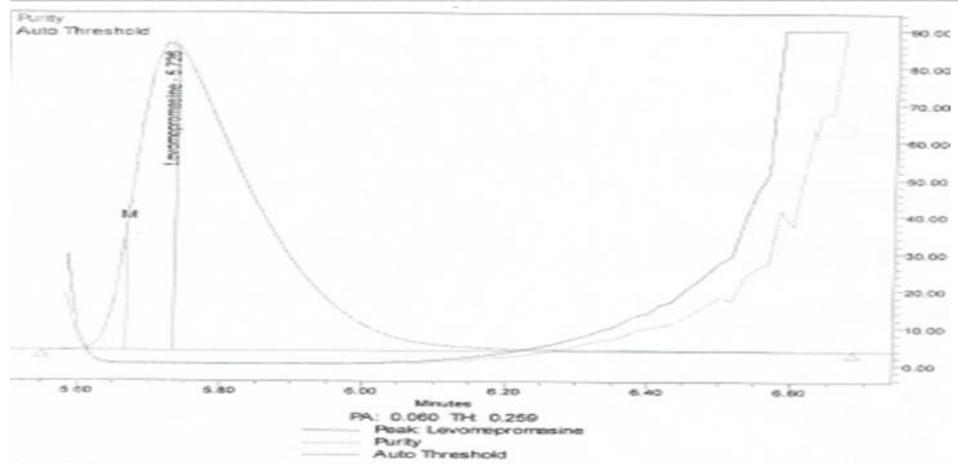
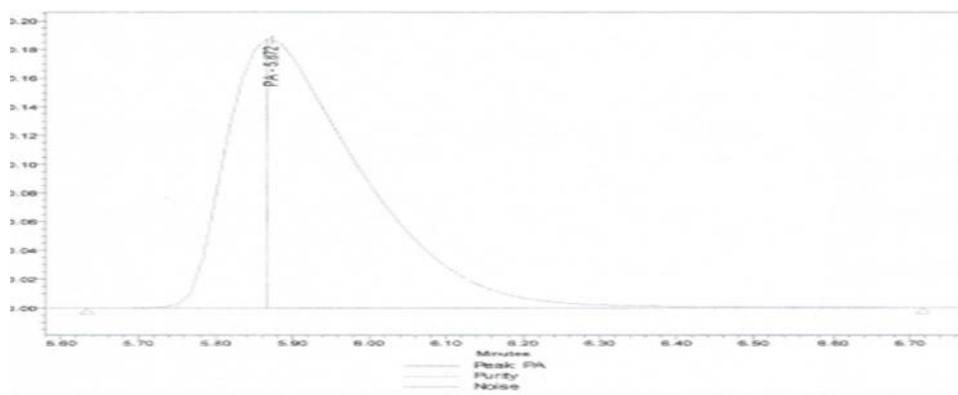
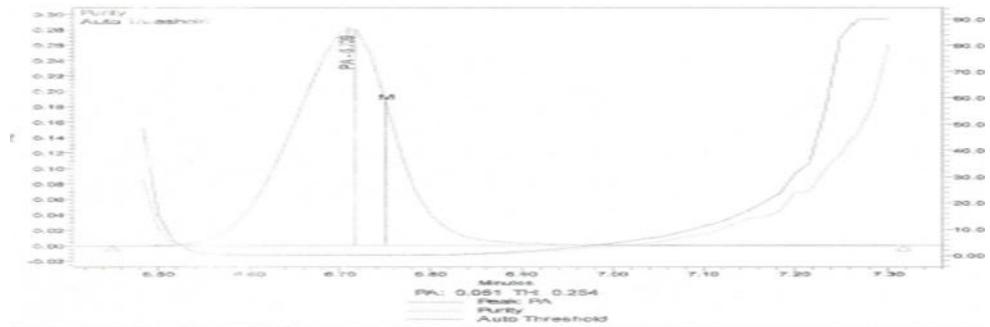
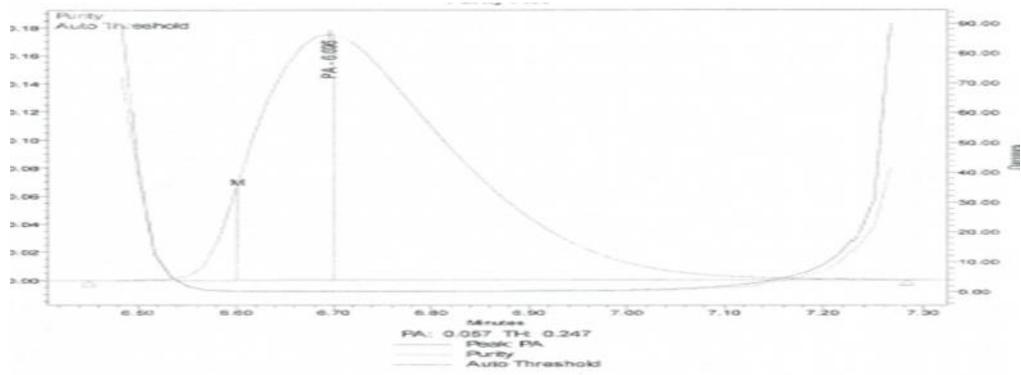


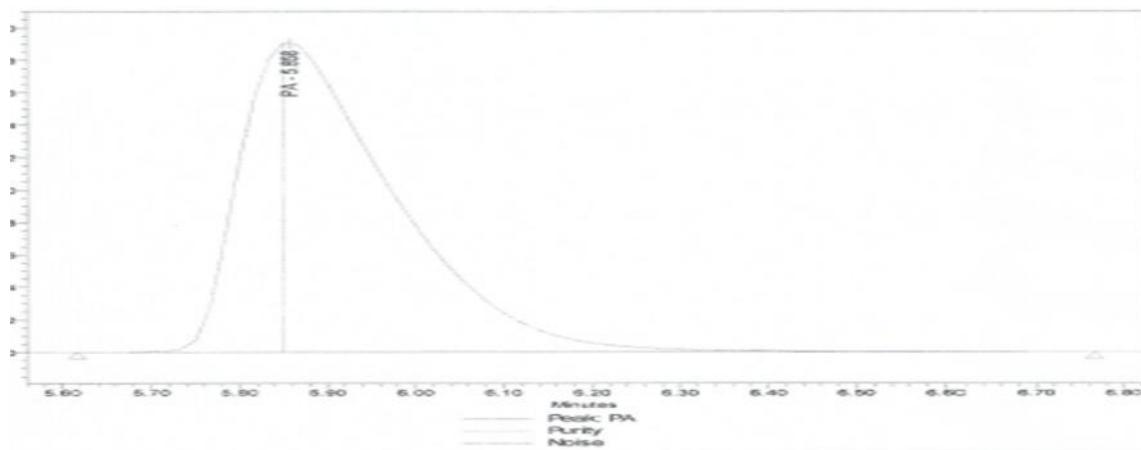
Standard après 48H



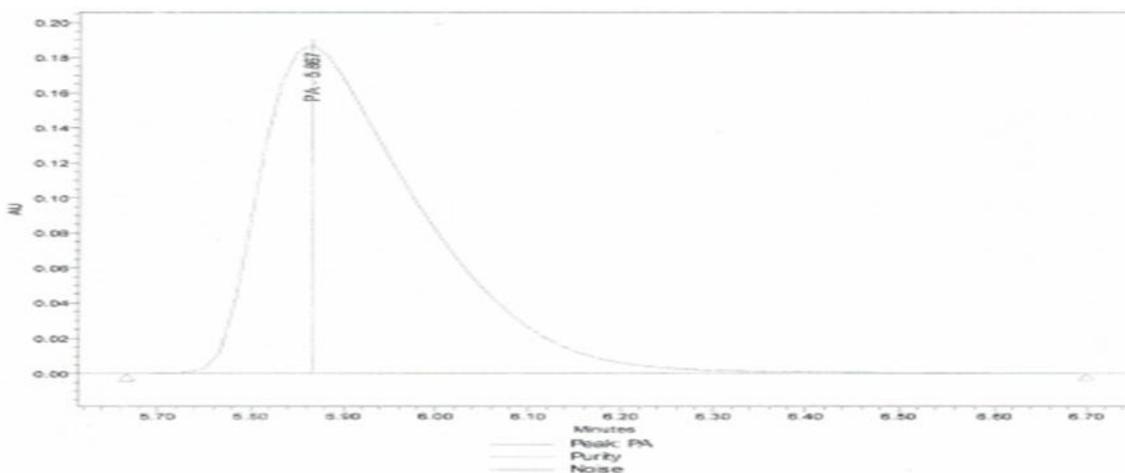
Echantillon après 48H



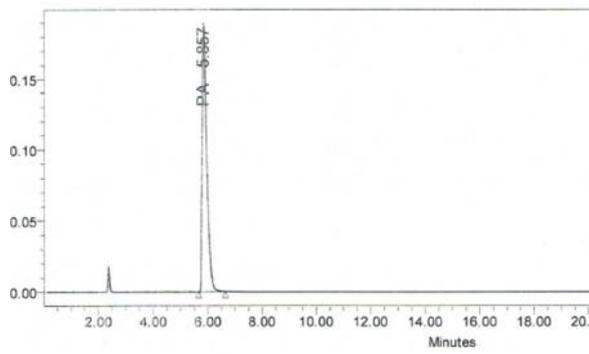




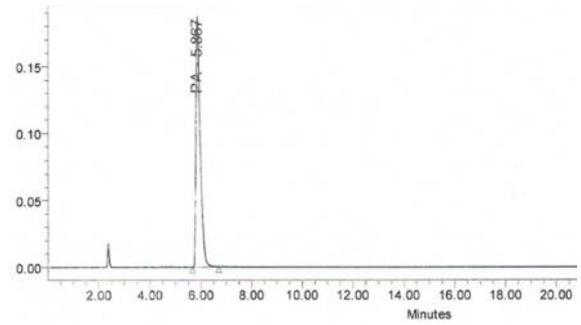
Chromatogrammes de dégradation forcée évaluation de la pureté : acide, base, humidité, oxydative, chaleur



Chromatogrammes du témoin

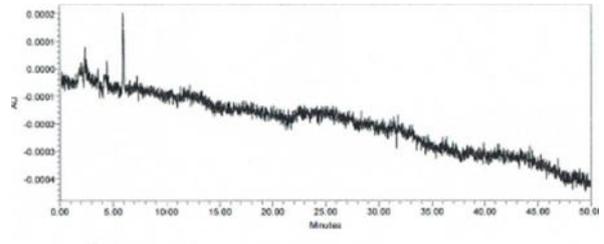
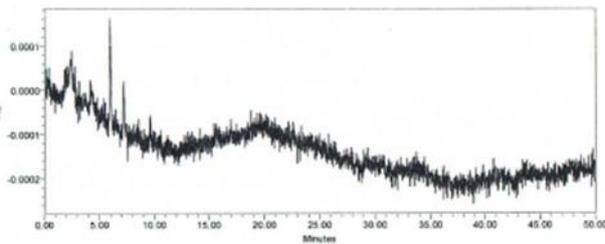


Peak Name	RT	Area	Height
1 PA	5.857	2271271	190795

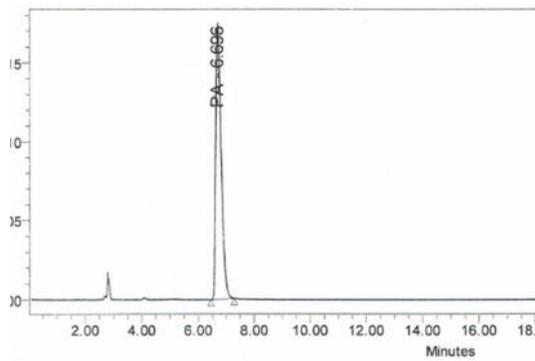


Peak Name	RT	Area	Height
1 PA	5.867	2236198	187025

Chromatogrammes de la dégradation accéléré : photolyse témoin et échantillon

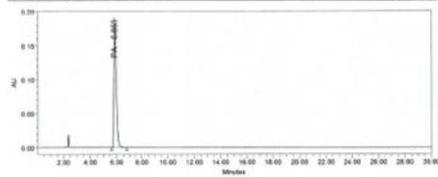


Chromatogramme de la dégradation forcée : placebo, blanc

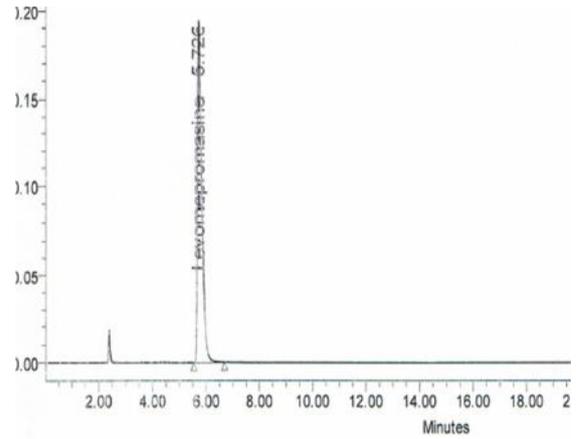


Peak Name	RT	Area	Height
1 PA	6.696	2447219	175122

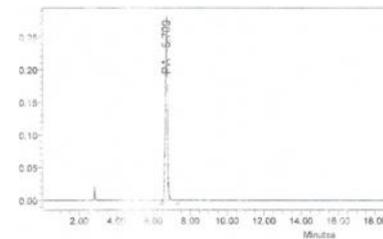
SAMPLE INFORMATION			
Sample Name:	degradation par chaleur	Acquired By:	System
Sample Type:	Urtrosin	Sample Set Name:	dosage nocian specific310315
Vial:	7	Acq. Method Set:	degradationNocian MS
Injection #:	1	Processing Method:	degradation SI MP
Injection Volume:	20.00 ul	Channel Name:	250.0nm
Run Time:	30.0 Minutes	Proc. Chnl. Descr.:	PEA 250.0 nm
Date Acquired:	31/03/2015 20:27:31 CET		
Date Processed:	15/04/2015 13:23:02 CET		



Peak Name	RT	Area	Height
1 PA	5.866	2321940	192076



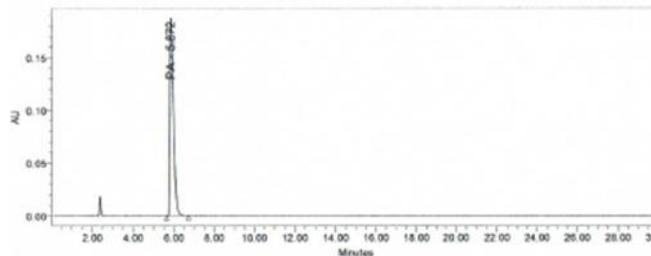
Peak Name	RT	Area	Height
1 Levomopromasine	5.726	2228235	197424



Peak Name	RT	Area	Height
1 PA	5.709	2204778	282668

SAMPLE INFORMATION

Sample Name:	degradation oxydative H2O2	Acquired By:	System
Sample Type:	Urtrosin	Sample Set Name:	dosage nocian specific310315
Vial:	6	Acq. Method Set:	degradationNocian MS
Injection #:	1	Processing Method:	degradation SI MP
Injection Volume:	20.00 ul	Channel Name:	250.0nm
Run Time:	30.0 Minutes	Proc. Chnl. Descr.:	PEA 250.0 nm
Date Acquired:	31/03/2015 19:56:31 CET		
Date Processed:	15/04/2015 13:17:16 CET		



Peak Name	RT	Area	Height
1 PA	5.872	2279402	187719

**Chromatogrammes de la dégradation forcé : Acide, Base ,
humidité, oxydante, chaleur,**

Chromatogrammes des paramètres :

I- Conformité du système

II- Chromatogrammes du paramètre dégradation forcée

III- Chromatogrammes des paramètres : Répétabilité et fidélité intermédiaire

IV- Chromatogrammes du paramètre de linéarité sur standard

**V- Chromatogrammes du paramètre
linéarité sur placebo chargé**

**VI- Chromatogrammes du paramètre
robustesse**

Débit 1.2/ 248nm

Débit 1.2/ 252

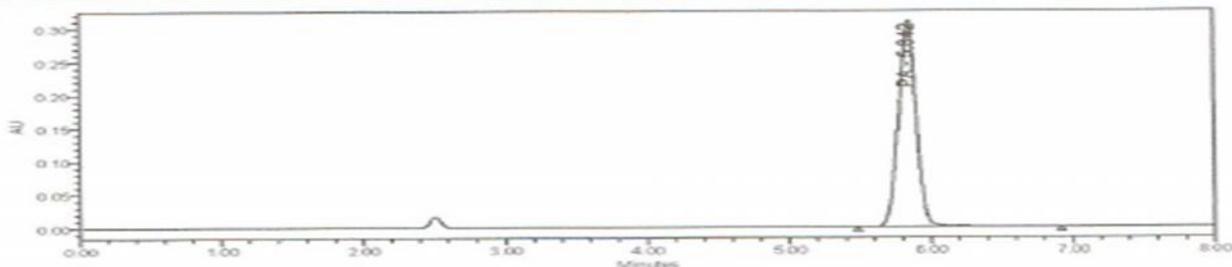
Débit 0.8/248

Débit 0.8/252

VII- Chromatogrammes du paramètre stabilité des solutions

SAMPLE INFORMATION

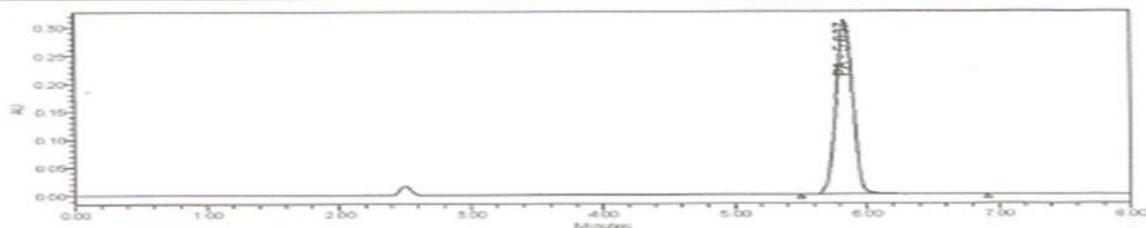
Sample Name: P.ch a 120%	Acquired By: System	Sample Set Name: linearité 130415
Sample Type: Standard	Sample Set Name: linearité 130415	Acq. Method Set: Dosage MS
Vial: 11	Acq. Method Set: Dosage MS	Processing Method: Linearité ST MP
Injection #: 1	Processing Method: Linearité ST MP	Channel Name: W2489 ChA
Injection Volume: 20.00 ul	Channel Name: W2489 ChA	Proc. Chnl. Descr.: W2489 ChA 250nm
Run Time: 8.0 Minutes	Proc. Chnl. Descr.: W2489 ChA 250nm	
Date Acquired: 4/13/2015 5:21:09 PM CET		
Date Processed: 4/19/2015 10:55:09 AM CET		



PeakName	RT	Area	% Area	Height
1 PA	5.842	2690186	100.00	312387

SAMPLE INFORMATION

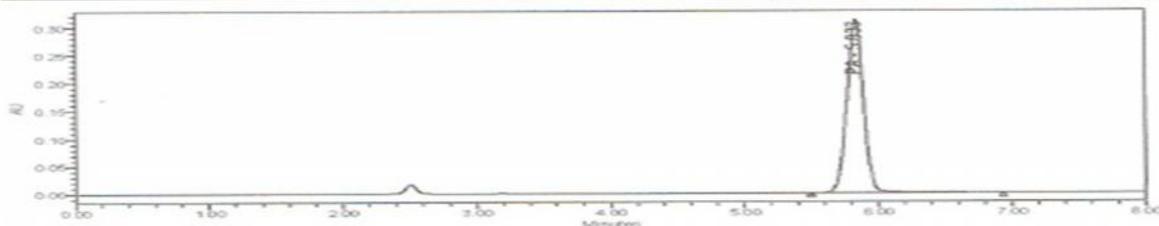
Sample Name: P.ch a 120%	Acquired By: System	Sample Set Name: linearité 130415
Sample Type: Standard	Sample Set Name: linearité 130415	Acq. Method Set: Dosage MS
Vial: 11	Acq. Method Set: Dosage MS	Processing Method: Linearité ST MP
Injection #: 2	Processing Method: Linearité ST MP	Channel Name: W2489 ChA
Injection Volume: 20.00 ul	Channel Name: W2489 ChA	Proc. Chnl. Descr.: W2489 ChA 250nm
Run Time: 8.0 Minutes	Proc. Chnl. Descr.: W2489 ChA 250nm	
Date Acquired: 4/13/2015 5:29:52 PM CET		
Date Processed: 4/19/2015 10:55:09 AM CET		



PeakName	RT	Area	% Area	Height
1 PA	5.837	2689284	100.00	311663

SAMPLE INFORMATION

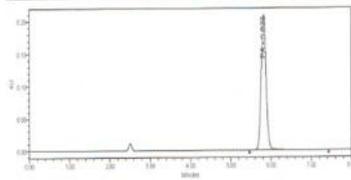
Sample Name: P.ch a 120%	Acquired By: System	Sample Set Name: linearité 130415
Sample Type: Standard	Sample Set Name: linearité 130415	Acq. Method Set: Dosage MS
Vial: 11	Acq. Method Set: Dosage MS	Processing Method: Linearité ST MP
Injection #: 3	Processing Method: Linearité ST MP	Channel Name: W2489 ChA
Injection Volume: 20.00 ul	Channel Name: W2489 ChA	Proc. Chnl. Descr.: W2489 ChA 250nm
Run Time: 8.0 Minutes	Proc. Chnl. Descr.: W2489 ChA 250nm	
Date Acquired: 4/13/2015 5:38:35 PM CET		
Date Processed: 4/19/2015 10:55:09 AM CET		



PeakName	RT	Area	% Area	Height
1 PA	5.833	2688785	100.00	312089

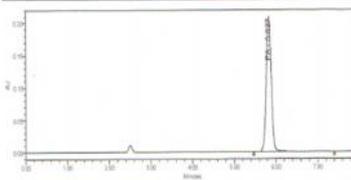
Echantillon 120%

SAMPLE INFORMATION			
Sample Name:	P.ch a 90%	Acquired By:	System
Sample Type:	Standard	Sample Set Name:	linearte 130415
Vial:	7	Acq. Method Set:	Dosage MS
Injection #:	1	Processing Method:	Linearte ST MP
Injection Volume:	20.00 ul	Channel Name:	WQ489 CHA
Run Time:	8.0 Minutes	Proc. Chnl. Descr.:	WQ489 CHA 250nm
Date Acquired:	4/13/2015 3:36:35 PM CET		
Date Processed:	4/19/2015 10:55:10 AM CET		



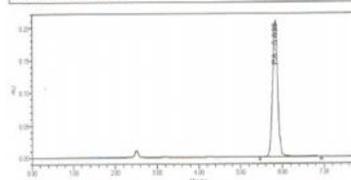
PeakName	RT	Area	%Area	Height
1 PA	5.833	1793932	100.00	210243

SAMPLE INFORMATION			
Sample Name:	P.ch a 80%	Acquired By:	System
Sample Type:	Standard	Sample Set Name:	linearte 130415
Vial:	7	Acq. Method Set:	Dosage MS
Injection #:	1	Processing Method:	Linearte ST MP
Injection Volume:	20.00 ul	Channel Name:	WQ489 CHA
Run Time:	8.0 Minutes	Proc. Chnl. Descr.:	WQ489 CHA 250nm
Date Acquired:	4/13/2015 3:45:18 PM CET		
Date Processed:	4/19/2015 10:55:10 AM CET		



PeakName	RT	Area	%Area	Height
1 PA	5.827	1791355	100.00	210342

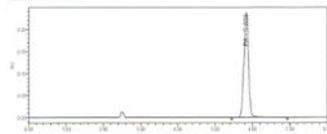
SAMPLE INFORMATION			
Sample Name:	P.ch a 80%	Acquired By:	System
Sample Type:	Standard	Sample Set Name:	linearte 130415
Vial:	7	Acq. Method Set:	Dosage MS
Injection #:	1	Processing Method:	Linearte ST MP
Injection Volume:	20.00 ul	Channel Name:	WQ489 CHA
Run Time:	8.0 Minutes	Proc. Chnl. Descr.:	WQ489 CHA 250nm
Date Acquired:	4/13/2015 3:54:01 PM CET		
Date Processed:	4/19/2015 10:55:09 AM CET		



PeakName	RT	Area	%Area	Height
1 PA	5.828	1792048	100.00	210363

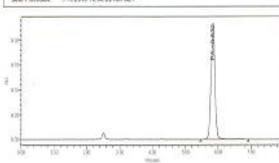
Echantillon a 90%

SAMPLE INFORMATION			
Sample Name:	P.ch a 90%	Acquired By:	System
Sample Type:	Standard	Sample Set Name:	linearte 130415
Vial:	8	Acq. Method Set:	Dosage MS
Injection #:	1	Processing Method:	Linearte ST MP
Injection Volume:	20.00 ul	Channel Name:	WQ489 CHA
Run Time:	8.0 Minutes	Proc. Chnl. Descr.:	WQ489 CHA 250nm
Date Acquired:	4/13/2015 4:02:44 PM CET		
Date Processed:	4/19/2015 10:55:09 AM CET		



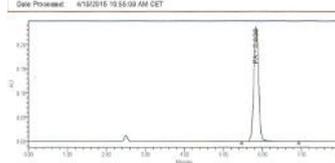
PeakName	RT	Area	%Area	Height
1 PA	5.833	2020147	100.00	237074

SAMPLE INFORMATION			
Sample Name:	P.ch a 80%	Acquired By:	System
Sample Type:	Standard	Sample Set Name:	linearte 130415
Vial:	8	Acq. Method Set:	Dosage MS
Injection #:	1	Processing Method:	Linearte ST MP
Injection Volume:	20.00 ul	Channel Name:	WQ489 CHA
Run Time:	8.0 Minutes	Proc. Chnl. Descr.:	WQ489 CHA 250nm
Date Acquired:	4/13/2015 4:07:11 PM CET		
Date Processed:	4/19/2015 10:55:09 AM CET		



PeakName	RT	Area	%Area	Height
1 PA	5.834	2019387	100.00	226900

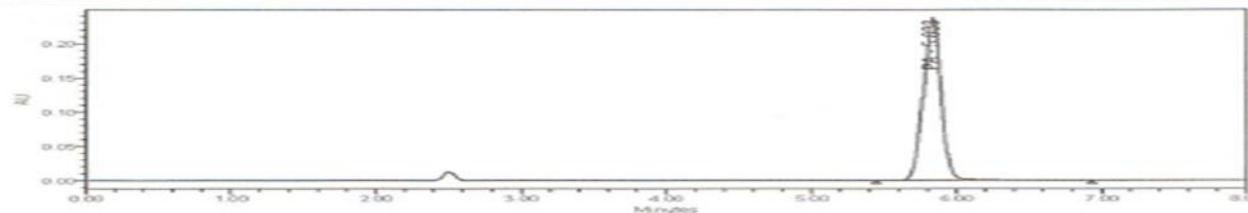
SAMPLE INFORMATION			
Sample Name:	P.ch a 90%	Acquired By:	System
Sample Type:	Standard	Sample Set Name:	linearte 130415
Vial:	8	Acq. Method Set:	Dosage MS
Injection #:	1	Processing Method:	Linearte ST MP
Injection Volume:	20.00 ul	Channel Name:	WQ489 CHA
Run Time:	8.0 Minutes	Proc. Chnl. Descr.:	WQ489 CHA 250nm
Date Acquired:	4/13/2015 4:11:23 PM CET		
Date Processed:	4/19/2015 10:55:09 AM CET		



PeakName	RT	Area	%Area	Height
1 PA	5.836	2019163	100.00	226973

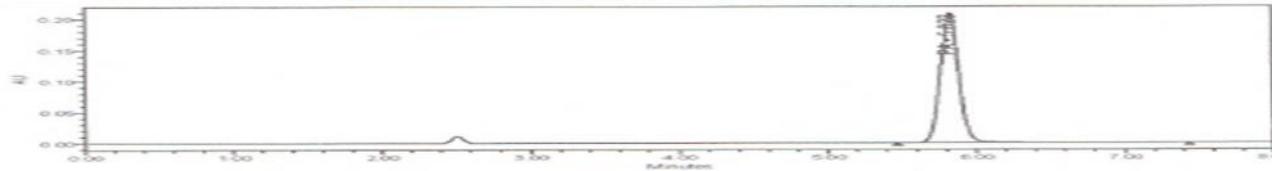
Echantillon 80%

SAMPLE INFORMATION			
Sample Name:	P.ch a 90%	Acquired By:	System
Sample Type:	Standard	Sample Set Name:	linearte 130415
Vial:	8	Acq. Method Set:	Dosage MS
Injection #:	1	Processing Method:	Linearte ST MP
Injection Volume:	20.00 ul	Channel Name:	WQ489 CHA
Run Time:	8.0 Minutes	Proc. Chnl. Descr.:	WQ489 CHA 250nm
Date Acquired:	4/13/2015 4:02:44 PM CET		
Date Processed:	4/19/2015 10:55:09 AM CET		

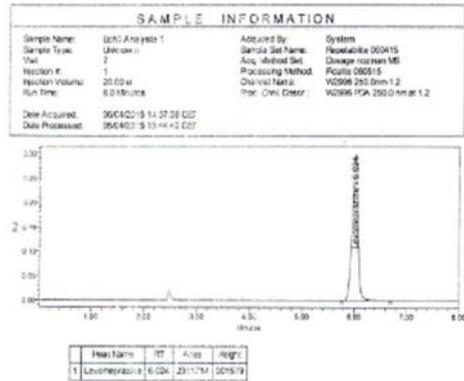
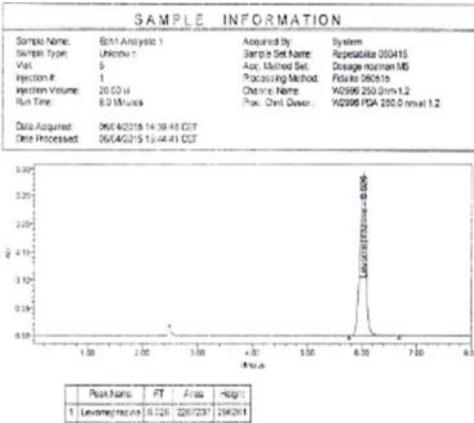
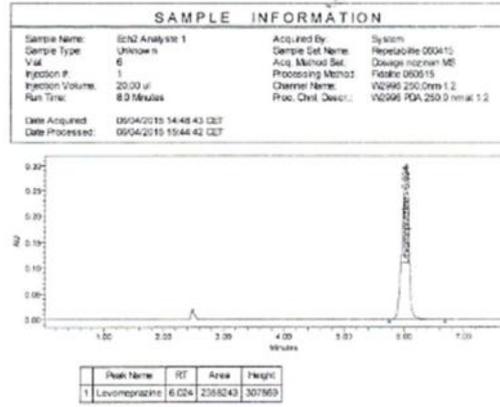
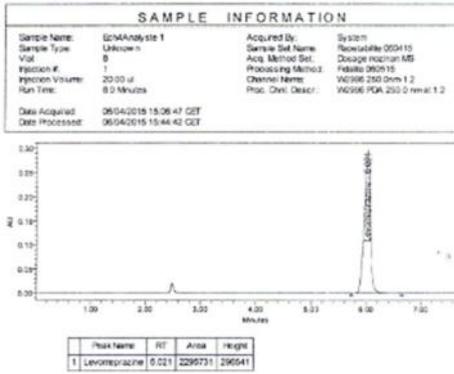


PeakName	RT	Area	%Area	Height
1 PA	5.833	2020147	100.00	237074

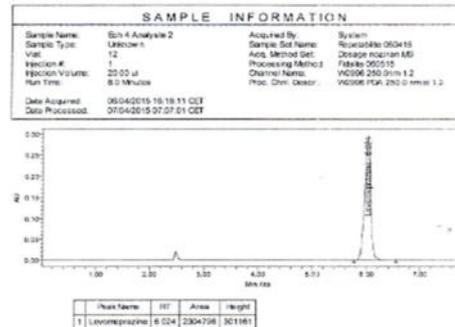
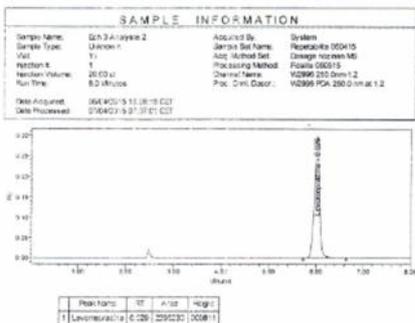
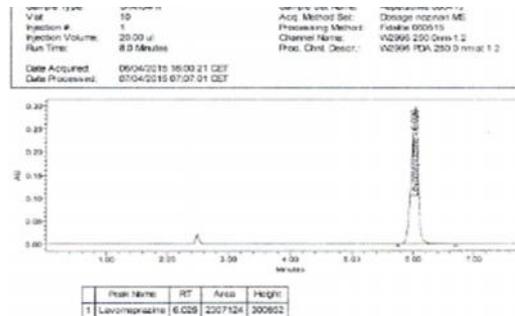
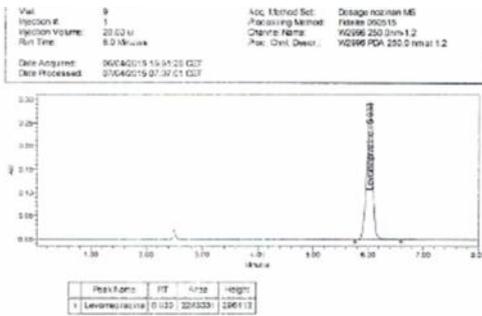
SAMPLE INFORMATION			
Sample Name:	P.ch a 80%	Acquired By:	System
Sample Type:	Standard	Sample Set Name:	linearte 130415
Vial:	7	Acq. Method Set:	Dosage MS
Injection #:	1	Processing Method:	Linearte ST MP
Injection Volume:	20.00 ul	Channel Name:	WQ489 CHA
Run Time:	8.0 Minutes	Proc. Chnl. Descr.:	WQ489 CHA 250nm
Date Acquired:	4/13/2015 3:36:35 PM CET		
Date Processed:	4/19/2015 10:55:10 AM CET		



PeakName	RT	Area	%Area	Height
1 PA	5.823	1793932	100.00	210243

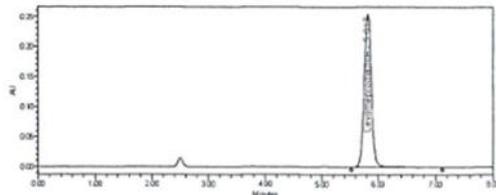


Fidélité intermédiaire jour 01 analyste 01



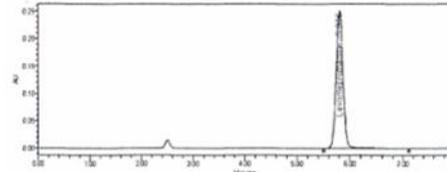
Fidélité intermédiaire jour 01 Analyste 02

SAMPLE INFORMATION			
Sample Name:	p charge J2 M1 E1	Acquired By:	System
Sample Type:	Unknown	Sample Set Name:	Dosage nozman 070415
Vial:	4	Acq. Method Set:	Dosage MS
Injection #:	1	Processing Method:	Dosage Nozman MP
Injection Volume:	20.00 ul	Channel Name:	WQ489 CHA
Run Time:	8.0 Minutes	Proc. Chnl. Descr.:	WQ489 CHA 250nm
Date Acquired:	4/7/2015 11:17:05 PM CET		
Date Processed:	4/9/2015 9:39:47 AM CET		



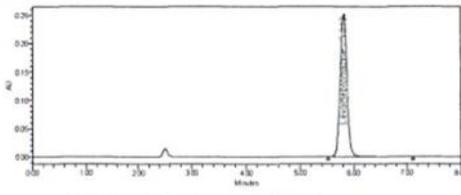
PeakName	RT	Area	% Area	Height
1 Levomepromazine	5.817	2197429	100.00	253200

SAMPLE INFORMATION			
Sample Name:	p charge J2 M1 E3	Acquired By:	System
Sample Type:	Unknown	Sample Set Name:	Dosage nozman 070415
Vial:	5	Acq. Method Set:	Dosage MS
Injection #:	1	Processing Method:	Dosage Nozman MP
Injection Volume:	20.00 ul	Channel Name:	WQ489 CHA
Run Time:	8.0 Minutes	Proc. Chnl. Descr.:	WQ489 CHA 250nm
Date Acquired:	4/7/2015 11:54:33 PM CET		
Date Processed:	4/9/2015 9:39:47 AM CET		



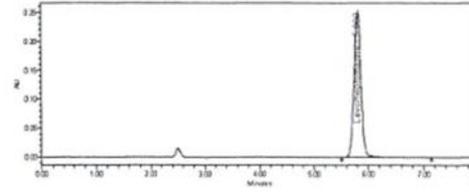
PeakName	RT	Area	% Area	Height
1 Levomepromazine	5.806	2104354	100.00	251665

SAMPLE INFORMATION			
Sample Name:	p charge J2 M1 E2	Acquired By:	System
Sample Type:	Unknown	Sample Set Name:	Dosage nozman 070415
Vial:	5	Acq. Method Set:	Dosage MS
Injection #:	1	Processing Method:	Dosage Nozman MP
Injection Volume:	20.00 ul	Channel Name:	WQ489 CHA
Run Time:	8.0 Minutes	Proc. Chnl. Descr.:	WQ489 CHA 250nm
Date Acquired:	4/7/2015 1:21:47 PM CET		
Date Processed:	4/9/2015 9:39:47 AM CET		



PeakName	RT	Area	% Area	Height
1 Levomepromazine	5.812	2187509	100.00	252439

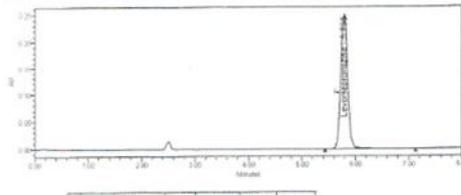
SAMPLE INFORMATION			
Sample Name:	p charge J2 M1 E4	Acquired By:	System
Sample Type:	Unknown	Sample Set Name:	Dosage nozman 070415
Vial:	7	Acq. Method Set:	Dosage MS
Injection #:	1	Processing Method:	Dosage Nozman MP
Injection Volume:	20.00 ul	Channel Name:	WQ489 CHA
Run Time:	8.0 Minutes	Proc. Chnl. Descr.:	WQ489 CHA 250nm
Date Acquired:	4/7/2015 1:43:18 PM CET		
Date Processed:	4/9/2015 9:39:47 AM CET		



PeakName	RT	Area	% Area	Height
1 Levomepromazine	5.800	2190222	100.00	253249

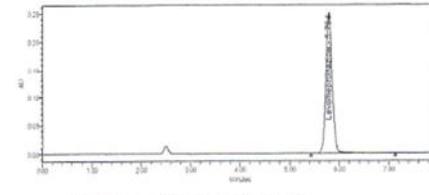
Fidélité intermédiaire jour 02 analyste 01

SAMPLE INFORMATION			
Sample Name:	p charge J2 M2 E3	Acquired By:	System
Sample Type:	Unknown	Sample Set Name:	Dosage nozman 070415
Vial:	12	Acq. Method Set:	Dosage MS
Injection #:	1	Processing Method:	Dosage Nozman MP
Injection Volume:	20.00 ul	Channel Name:	WQ489 CHA
Run Time:	8.0 Minutes	Proc. Chnl. Descr.:	WQ489 CHA 250nm
Date Acquired:	4/7/2015 2:26:53 PM CET		
Date Processed:	4/29/2015 10:45:59 AM CET		



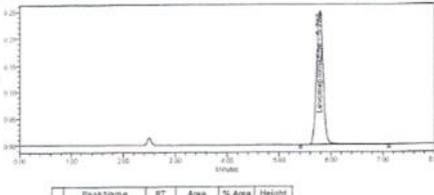
PeakName	RT	Area	% Area	Height
1 Levomepromazine	5.795	2188016	100.00	252559

SAMPLE INFORMATION			
Sample Name:	p charge J2 M2 E4	Acquired By:	System
Sample Type:	Unknown	Sample Set Name:	Dosage nozman 070415
Vial:	13	Acq. Method Set:	Dosage MS
Injection #:	1	Processing Method:	Dosage Nozman MP
Injection Volume:	20.00 ul	Channel Name:	WQ489 CHA
Run Time:	8.0 Minutes	Proc. Chnl. Descr.:	WQ489 CHA 250nm
Date Acquired:	4/7/2015 2:35:36 PM CET		
Date Processed:	4/29/2015 10:45:59 AM CET		



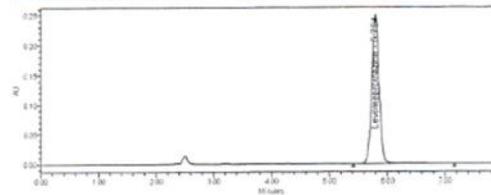
PeakName	RT	Area	% Area	Height
1 Levomepromazine	5.794	2189010	100.00	251648

SAMPLE INFORMATION			
Sample Name:	p charge J2 M2 E1	Acquired By:	System
Sample Type:	Unknown	Sample Set Name:	Dosage nozman 070415
Vial:	10	Acq. Method Set:	Dosage MS
Injection #:	1	Processing Method:	Dosage Nozman MP
Injection Volume:	20.00 ul	Channel Name:	WQ489 CHA
Run Time:	8.0 Minutes	Proc. Chnl. Descr.:	WQ489 CHA 250nm
Date Acquired:	4/7/2015 2:09:26 PM CET		
Date Processed:	4/29/2015 10:45:59 AM CET		



PeakName	RT	Area	% Area	Height
1 Levomepromazine	5.788	2198932	100.00	251024

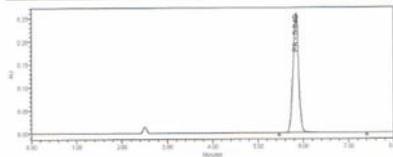
SAMPLE INFORMATION			
Sample Name:	p charge J2 M2 E2	Acquired By:	System
Sample Type:	Unknown	Sample Set Name:	Dosage nozman 070415
Vial:	11	Acq. Method Set:	Dosage MS
Injection #:	1	Processing Method:	Dosage Nozman MP
Injection Volume:	20.00 ul	Channel Name:	WQ489 CHA
Run Time:	8.0 Minutes	Proc. Chnl. Descr.:	WQ489 CHA 250nm
Date Acquired:	4/7/2015 2:18:09 PM CET		
Date Processed:	4/29/2015 10:45:59 AM CET		



PeakName	RT	Area	% Area	Height
1 Levomepromazine	5.794	2181261	100.00	251292

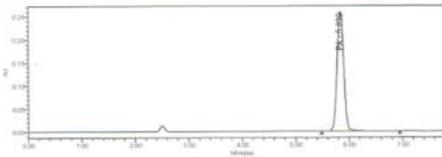
Fidélité intermédiaire jour 02 analyste02

SAMPLE INFORMATION		
Sample Name:	P.ch a 100%	Acquired By: System
Sample Type:	Standard	Sample Set Name: lineanté 130415
Vial:	9	Acq. Method Set: Dosage MS
Injection #:	1	Processing Method: Linéarité ST MP
Injection Volume:	20.00 ul	Channel Name: W2489 ChA
Run Time:	8.0 Minutes	Proc. Chnl. Descr.: W2489 ChA 250nm
Date Acquired:	4/13/2015 4:28:54 PM CET	
Date Processed:	4/19/2015 10:55:09 AM CET	



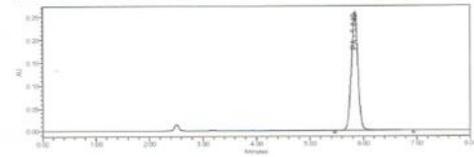
PeakName	RT	Area	%Area	Height
1 PA	5.840	2236870	100.00	280515

SAMPLE INFORMATION		
Sample Name:	P.ch a 100%	Acquired By: System
Sample Type:	Standard	Sample Set Name: lineanté 130415
Vial:	9	Acq. Method Set: Dosage MS
Injection #:	2	Processing Method: Linéarité ST MP
Injection Volume:	20.00 ul	Channel Name: W2489 ChA
Run Time:	8.0 Minutes	Proc. Chnl. Descr.: W2489 ChA 250nm
Date Acquired:	4/13/2015 4:37:36 PM CET	
Date Processed:	4/19/2015 10:55:09 AM CET	



PeakName	RT	Area	%Area	Height
1 PA	5.838	2238089	100.00	280973

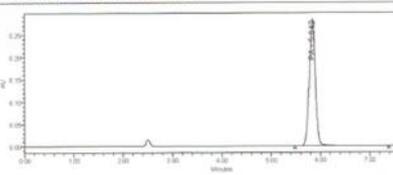
SAMPLE INFORMATION		
Sample Name:	P.ch a 100%	Acquired By: System
Sample Type:	Standard	Sample Set Name: lineanté 130415
Vial:	9	Acq. Method Set: Dosage MS
Injection #:	3	Processing Method: Linéarité ST MP
Injection Volume:	20.00 ul	Channel Name: W2489 ChA
Run Time:	8.0 Minutes	Proc. Chnl. Descr.: W2489 ChA 250nm
Date Acquired:	4/13/2015 4:46:18 PM CET	
Date Processed:	4/19/2015 10:55:09 AM CET	



PeakName	RT	Area	%Area	Height
1 PA	5.840	2240443	100.00	281091

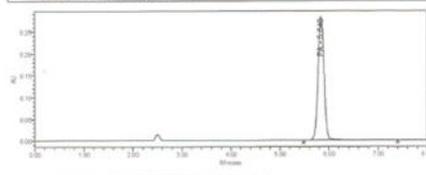
Echantillon 100%

SAMPLE INFORMATION		
Sample Name:	P.ch a 110%	Acquired By: System
Sample Type:	Standard	Sample Set Name: lineanté 130415
Vial:	10	Acq. Method Set: Dosage MS
Injection #:	1	Processing Method: Linéarité ST MP
Injection Volume:	20.00 ul	Channel Name: W2489 ChA
Run Time:	8.0 Minutes	Proc. Chnl. Descr.: W2489 ChA 250nm
Date Acquired:	4/13/2015 4:55:01 PM CET	
Date Processed:	4/19/2015 10:55:09 AM CET	



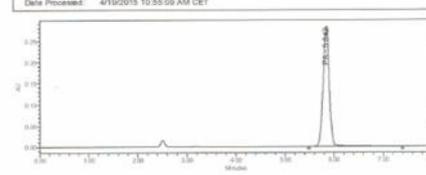
PeakName	RT	Area	%Area	Height
1 PA	5.842	2456885	100.00	286083

SAMPLE INFORMATION		
Sample Name:	P.ch a 110%	Acquired By: System
Sample Type:	Standard	Sample Set Name: lineanté 130415
Vial:	10	Acq. Method Set: Dosage MS
Injection #:	2	Processing Method: Linéarité ST MP
Injection Volume:	20.00 ul	Channel Name: W2489 ChA
Run Time:	8.0 Minutes	Proc. Chnl. Descr.: W2489 ChA 250nm
Date Acquired:	4/13/2015 5:03:44 PM CET	
Date Processed:	4/19/2015 10:55:09 AM CET	



PeakName	RT	Area	%Area	Height
1 PA	5.840	2405392	100.00	284519

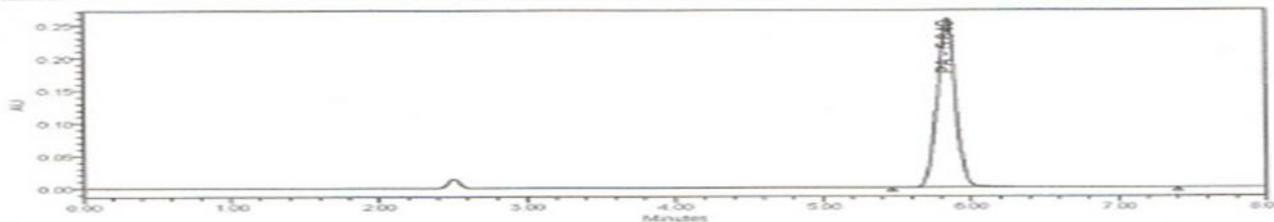
SAMPLE INFORMATION		
Sample Name:	P.ch a 110%	Acquired By: System
Sample Type:	Standard	Sample Set Name: lineanté 130415
Vial:	10	Acq. Method Set: Dosage MS
Injection #:	3	Processing Method: Linéarité ST MP
Injection Volume:	20.00 ul	Channel Name: W2489 ChA
Run Time:	8.0 Minutes	Proc. Chnl. Descr.: W2489 ChA 250nm
Date Acquired:	4/13/2015 5:12:38 PM CET	
Date Processed:	4/19/2015 10:55:09 AM CET	



PeakName	RT	Area	%Area	Height
1 PA	5.842	2456032	100.00	286089

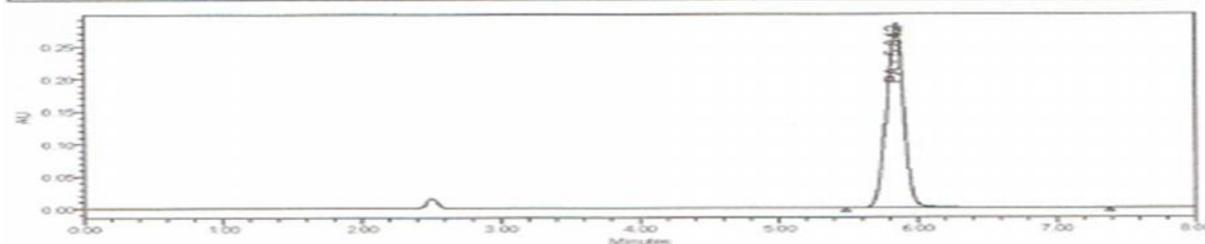
Echantillon 110%

SAMPLE INFORMATION			
Sample Name:	P.ch a 100%	Acquired By:	System
Sample Type:	Standard	Sample Set Name:	lineanté 130415
Vial:	9	Acq. Method Set:	Dosage MS
Injection #:	1	Processing Method:	Linéarité ST MP
Injection Volume:	20.00 ul	Channel Name:	W2489 ChA
Run Time:	8.0 Minutes	Proc. Chnl. Descr.:	W2489 ChA 250nm
Date Acquired:	4/13/2015 4:28:54 PM CET		
Date Processed:	4/19/2015 10:55:09 AM CET		



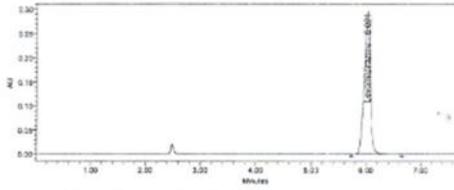
PeakName	RT	Area	%Area	Height
1 PA	5.840	2236870	100.00	280515

SAMPLE INFORMATION			
Sample Name:	P.ch a 110%	Acquired By:	System
Sample Type:	Standard	Sample Set Name:	lineanté 130415
Vial:	10	Acq. Method Set:	Dosage MS
Injection #:	1	Processing Method:	Linéarité ST MP
Injection Volume:	20.00 ul	Channel Name:	W2489 ChA
Run Time:	8.0 Minutes	Proc. Chnl. Descr.:	W2489 ChA 250nm
Date Acquired:	4/13/2015 4:55:01 PM CET		
Date Processed:	4/19/2015 10:55:09 AM CET		



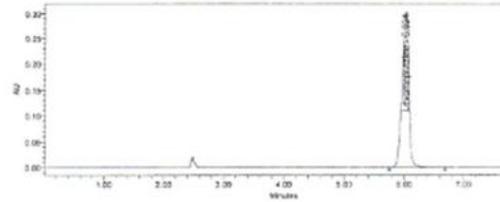
PeakName	RT	Area	%Area	Height
1 PA	5.842	2456885	100.00	286083

SAMPLE INFORMATION			
Sample Name:	ECN Analyst 1	Acquired By:	System
Sample Type:	Unknown	Sample Set Name:	Repeatability 050415
Vial:	9	Acq. Method Set:	Dosage notman MS
Injection #:	1	Processing Method:	Filefile 060915
Injection Volume:	20.00 µl	Channel Name:	VQ396 250.0mm 1.2
Run Time:	8.0 Minutes	Proc. Chnl. Descr.:	VQ396 PDA 250.0 mm at 1.2
Date Acquired:	06/04/2015 15:06:47 CEST		
Date Processed:	06/04/2015 15:44:42 CEST		



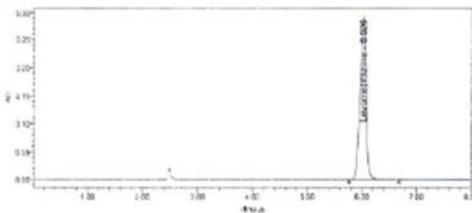
Peak Name	RT	Area	Height
1 Levomeproprazine	6.021	229731	29641

SAMPLE INFORMATION			
Sample Name:	ECN Analyst 1	Acquired By:	System
Sample Type:	Unknown	Sample Set Name:	Repeatability 050415
Vial:	6	Acq. Method Set:	Dosage notman MS
Injection #:	1	Processing Method:	Filefile 060915
Injection Volume:	20.00 µl	Channel Name:	VQ396 250.0mm 1.2
Run Time:	8.0 Minutes	Proc. Chnl. Descr.:	VQ396 PDA 250.0 mm at 1.2
Date Acquired:	06/04/2015 14:48:43 CEST		
Date Processed:	06/04/2015 15:44:42 CEST		



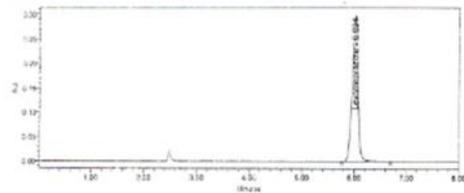
Peak Name	RT	Area	Height
1 Levomeproprazine	6.024	236243	30763

SAMPLE INFORMATION			
Sample Name:	ECN Analyst 1	Acquired By:	System
Sample Type:	Unknown	Sample Set Name:	Repeatability 050415
Vial:	5	Acq. Method Set:	Dosage notman MS
Injection #:	1	Processing Method:	Filefile 060915
Injection Volume:	20.00 µl	Channel Name:	VQ396 250.0mm 1.2
Run Time:	8.0 Minutes	Proc. Chnl. Descr.:	VQ396 PDA 250.0 mm at 1.2
Date Acquired:	06/04/2015 14:39:40 CEST		
Date Processed:	06/04/2015 15:44:41 CEST		



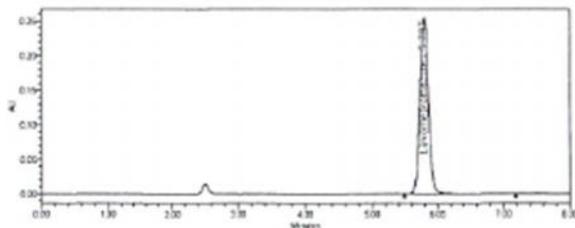
Peak Name	RT	Area	Height
1 Levomeproprazine	6.021	229731	29641

SAMPLE INFORMATION			
Sample Name:	ECN Analyst 1	Acquired By:	System
Sample Type:	Unknown	Sample Set Name:	Repeatability 050415
Vial:	7	Acq. Method Set:	Dosage notman MS
Injection #:	1	Processing Method:	Filefile 060915
Injection Volume:	20.00 µl	Channel Name:	VQ396 250.0mm 1.2
Run Time:	8.0 Minutes	Proc. Chnl. Descr.:	VQ396 PDA 250.0 mm at 1.2
Date Acquired:	06/04/2015 14:27:28 CEST		
Date Processed:	06/04/2015 15:44:41 CEST		



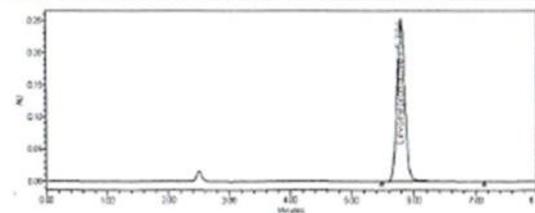
Peak Name	RT	Area	Height
1 Levomeproprazine	6.024	231731	29759

SAMPLE INFORMATION			
Sample Name:	p-charge J2 M1 65	Acquired By:	System
Sample Type:	Unknown	Sample Set Name:	Dosage notman 070415
Vial:	9	Acq. Method Set:	Dosage MS
Injection #:	1	Processing Method:	Dosage notman MP
Injection Volume:	20.00 µl	Channel Name:	VQ489 CNA
Run Time:	8.0 Minutes	Proc. Chnl. Descr.:	VQ489 CNA 250mm
Date Acquired:	4/7/2015 1:52:09 PM CET		
Date Processed:	4/8/2015 8:35:47 AM CET		



Peak Name	RT	Area	% Area	Height
1 Levomeproprazine	5.797	2207973	100.00	254508

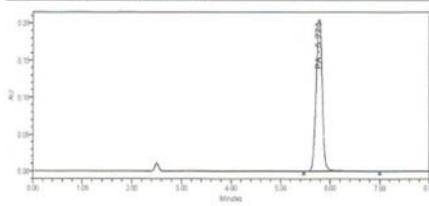
SAMPLE INFORMATION			
Sample Name:	p-charge J2 M1 66	Acquired By:	System
Sample Type:	Unknown	Sample Set Name:	Dosage notman 070415
Vial:	5	Acq. Method Set:	Dosage MS
Injection #:	1	Processing Method:	Dosage notman MP
Injection Volume:	20.00 µl	Channel Name:	VQ489 CNA
Run Time:	8.0 Minutes	Proc. Chnl. Descr.:	VQ489 CNA 250mm
Date Acquired:	4/7/2015 2:00:43 PM CET		
Date Processed:	4/8/2015 8:30:47 AM CET		



Peak Name	RT	Area	% Area	Height
1 Levomeproprazine	5.794	2204214	100.00	254075

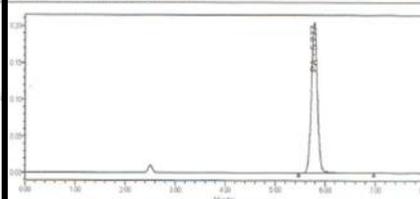
Répetabilité

SAMPLE INFORMATION	
Sample Name:	dd a 80%
Sample Type:	Standard
Vial:	3
Injection #:	1
Injection Volume:	20.00 ul
Run Time:	8.0 Minutes
Date Acquired:	4/13/2015 1:51:45 PM CET
Date Processed:	4/19/2015 10:52:40 AM CET



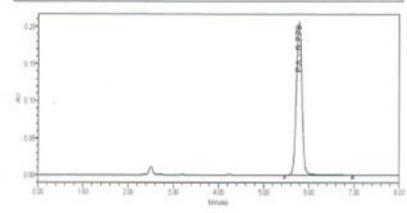
PeakName	RT	Area	% Area	Height
1 PA	5.773	1754814	100.00	205778

SAMPLE INFORMATION	
Sample Name:	dd a 80%
Sample Type:	Standard
Vial:	3
Injection #:	2
Injection Volume:	20.00 ul
Run Time:	8.0 Minutes
Date Acquired:	4/13/2015 2:00:28 PM CET
Date Processed:	4/19/2015 10:52:40 AM CET



PeakName	RT	Area	% Area	Height
1 PA	5.777	1752271	100.00	205607

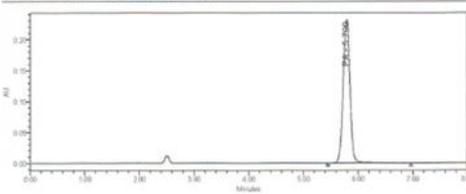
SAMPLE INFORMATION	
Sample Name:	dd a 80%
Sample Type:	Standard
Vial:	3
Injection #:	3
Injection Volume:	20.00 ul
Run Time:	8.0 Minutes
Date Acquired:	4/13/2015 2:30:10 PM CET
Date Processed:	4/19/2015 10:52:40 AM CET



PeakName	RT	Area	% Area	Height
1 PA	5.779	1750387	100.00	208415

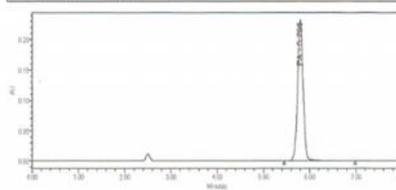
Standard 80%

SAMPLE INFORMATION	
Sample Name:	dd a 90%
Sample Type:	Standard
Vial:	4
Injection #:	1
Injection Volume:	20.00 ul
Run Time:	8.0 Minutes
Date Acquired:	4/13/2015 2:17:53 PM CET
Date Processed:	4/19/2015 10:55:09 AM CET



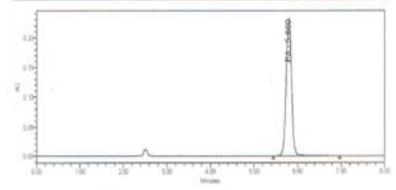
PeakName	RT	Area	% Area	Height
1 PA	5.790	1990520	100.00	232312

SAMPLE INFORMATION	
Sample Name:	dd a 90%
Sample Type:	Standard
Vial:	4
Injection #:	2
Injection Volume:	20.00 ul
Run Time:	8.0 Minutes
Date Acquired:	4/13/2015 2:29:35 PM CET
Date Processed:	4/19/2015 10:55:09 AM CET



PeakName	RT	Area	% Area	Height
1 PA	5.795	1989423	100.00	232148

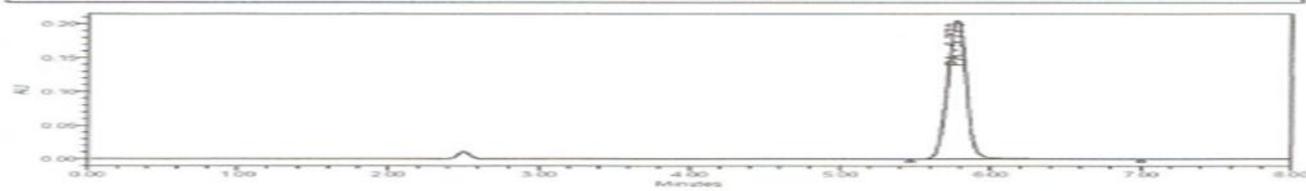
SAMPLE INFORMATION	
Sample Name:	dd a 90%
Sample Type:	Standard
Vial:	4
Injection #:	3
Injection Volume:	20.00 ul
Run Time:	8.0 Minutes
Date Acquired:	4/13/2015 2:35:32 PM CET
Date Processed:	4/19/2015 10:55:10 AM CET



PeakName	RT	Area	% Area	Height
1 PA	5.800	1992103	100.00	232819

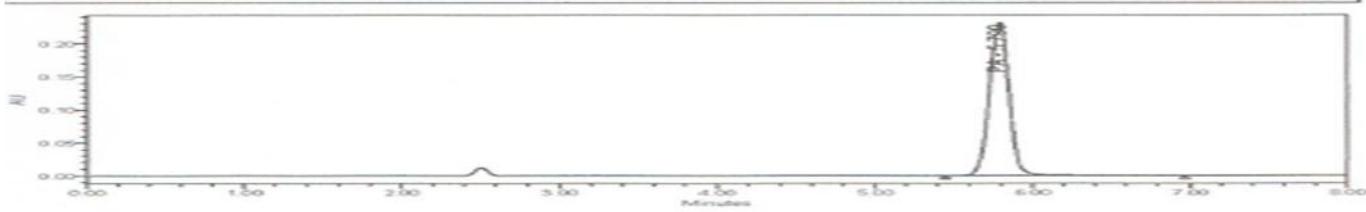
Standard 90%

SAMPLE INFORMATION		
Sample Name:	dd a 80%	Acquired By: System
Sample Type:	Standard	Sample Set Name: linearite 130415
Vial:	3	Acq. Method Set: Dosage MS
Injection #:	1	Processing Method: Linearite ST MP
Injection Volume:	20.00 ul	Channel Name: VQ489 ChA
Run Time:	8.0 Minutes	Proc. Chnl. Descr.: VQ489 ChA 250nm
Date Acquired:	4/13/2015 1:51:45 PM CET	
Date Processed:	4/19/2015 10:52:40 AM CET	

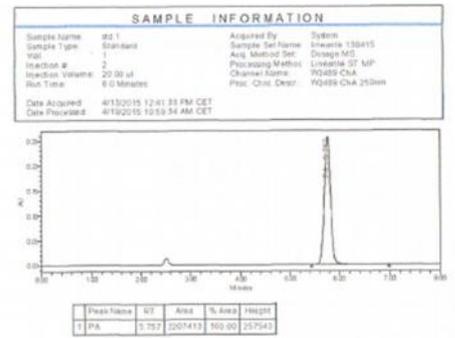
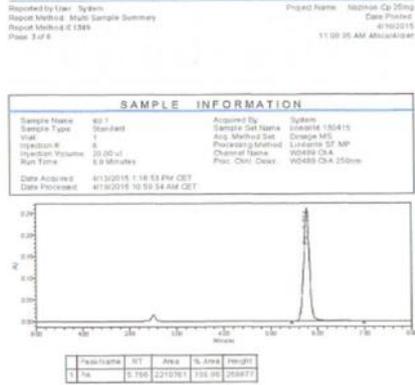
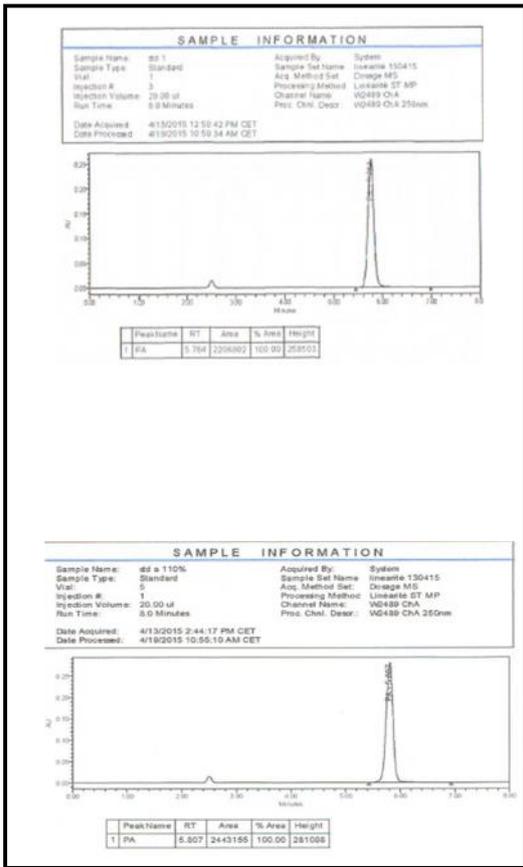


PeakName	RT	Area	% Area	Height
1 PA	5.773	1754814	100.00	205776

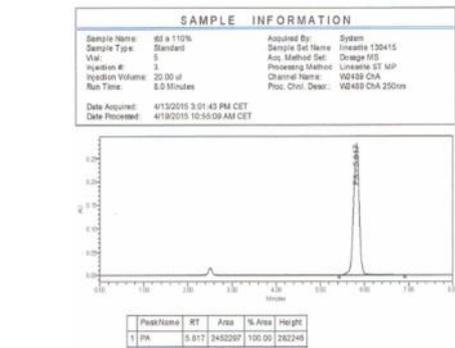
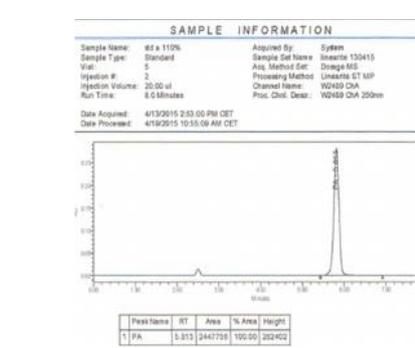
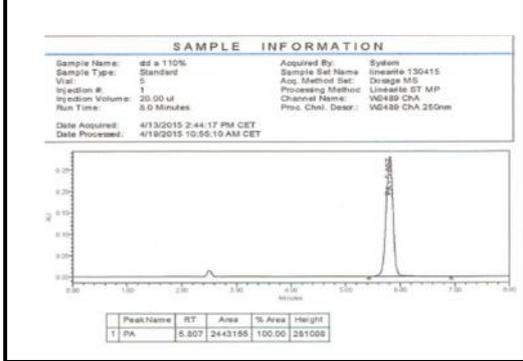
SAMPLE INFORMATION		
Sample Name:	dd a 90%	Acquired By: System
Sample Type:	Standard	Sample Set Name: linearite 130415
Vial:	4	Acq. Method Set: Dosage MS
Injection #:	1	Processing Method: Linearite ST MP
Injection Volume:	20.00 ul	Channel Name: VQ489 ChA
Run Time:	8.0 Minutes	Proc. Chnl. Descr.: VQ489 ChA 250nm
Date Acquired:	4/13/2015 2:17:53 PM CET	
Date Processed:	4/19/2015 10:55:09 AM CET	



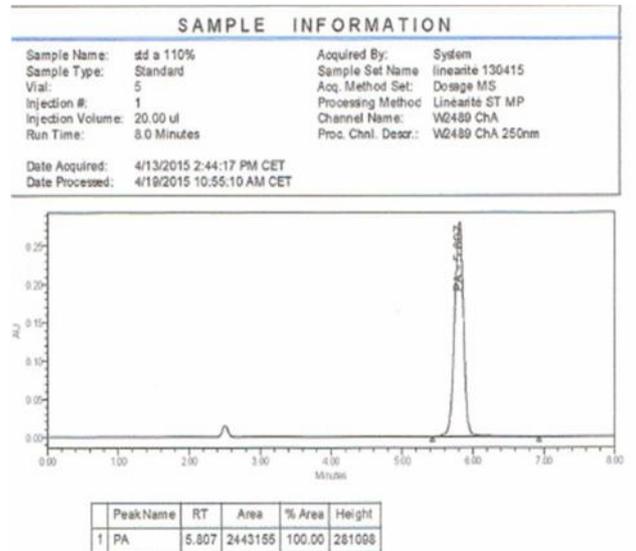
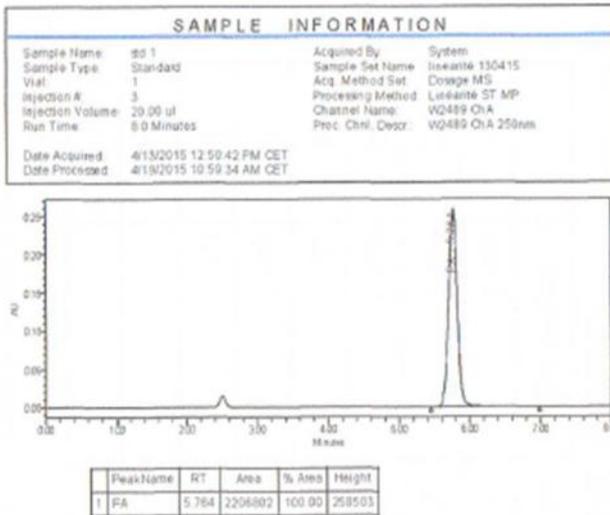
PeakName	RT	Area	% Area	Height
1 PA	5.790	1990520	100.00	232312



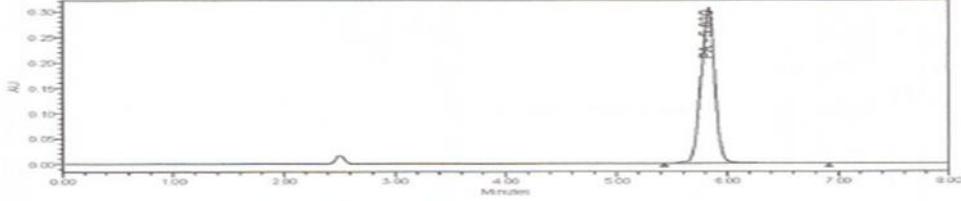
Standard 100%



Standard 110%

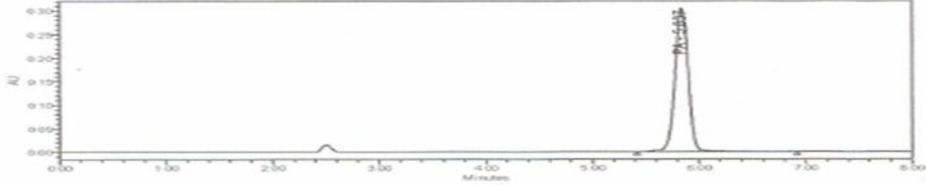


SAMPLE INFORMATION			
Sample Name:	std a 120%	Acquired By:	System
Sample Type:	Standard	Sample Set Name:	lineanté 130415
Vial:	6	Acq. Method Set:	Dosage MS
Injection #:	1	Processing Method:	Lineanté ST MP
Injection Volume:	20.00 ul	Channel Name:	W2459 ChA
Run Time:	8.0 Minutes	Proc. Chnl. Descr.:	W2459 ChA 250nm
Date Acquired:	4/13/2015 3:10:26 PM CET		
Date Processed:	4/19/2015 10:55:09 AM CET		



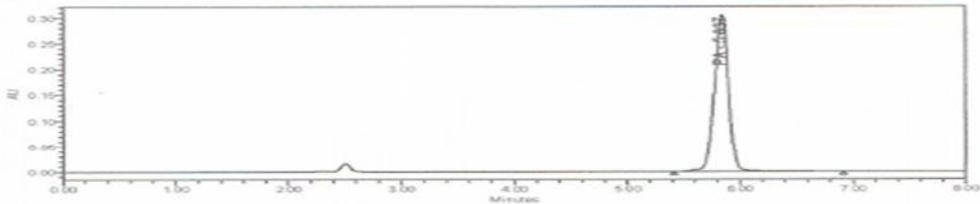
PeakName	RT	Area	% Area	Height
1 PA	5.830	2661460	100.00	306768

SAMPLE INFORMATION			
Sample Name:	std a 120%	Acquired By:	System
Sample Type:	Standard	Sample Set Name:	lineanté 130415
Vial:	6	Acq. Method Set:	Dosage MS
Injection #:	2	Processing Method:	Lineanté ST MP
Injection Volume:	20.00 ul	Channel Name:	W2459 ChA
Run Time:	8.0 Minutes	Proc. Chnl. Descr.:	W2459 ChA 250nm
Date Acquired:	4/13/2015 3:19:09 PM CET		
Date Processed:	4/19/2015 10:55:09 AM CET		



PeakName	RT	Area	% Area	Height
1 PA	5.837	2670709	100.00	305987

SAMPLE INFORMATION			
Sample Name:	std a 120%	Acquired By:	System
Sample Type:	Standard	Sample Set Name:	lineanté 130415
Vial:	6	Acq. Method Set:	Dosage MS
Injection #:	3	Processing Method:	Lineanté ST MP
Injection Volume:	20.00 ul	Channel Name:	W2459 ChA
Run Time:	8.0 Minutes	Proc. Chnl. Descr.:	W2459 ChA 250nm
Date Acquired:	4/13/2015 3:27:51 PM CET		
Date Processed:	4/19/2015 10:55:09 AM CET		



PeakName	RT	Area	% Area	Height
1 PA	5.837	2694321	100.00	300047

Standard 120%

Résumé

Dans le domaine de l'industrie pharmaceutique, la validation des méthodes analytiques est une des parties essentielles de l'assurance qualité. De ce fait, valider une méthode consiste à prouver qu'elle est adaptée aux objectifs que l'on s'est fixés.

A travers ce travail, nous avons effectué une étude de deux méthodes analytiques : dosage et substances apparentées par des techniques chromatographiques HPLC et CCM d'un neuroleptique sous forme de comprimé à 25mg.

La validation des méthodes utilisées dans cette étude a permis de vérifier la spécificité de ces méthodes, linéarité, fidélité, exactitude, robustesse, stabilité des solutions ainsi que la limite de détection.

Mots clés :

Contrôle qualité, validation, dosage, substances apparentées, HPLC, CCM.

Abstract

In the pharmaceutical domain, the validation of the analytical methods is among the key points of quality assurance, thus validating method improve that it is adapted to the objectives fixed by manufacturer's .

Through this work we have carried out a study of two analytical methods: assay and related substances by chromatographic techniques HPLC and TLC of a neuroleptic compound presented at forms "tablet 25mg"

Validation of methods used in this study to verify the specificity of these methods, linearity, precision, accuracy, robust; stability of the solution and the detection limit.

Keywords:

Quality control, validation, dosage, related substances, HPLC, TLC