République Algérienne Démocratique et Populaire
Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique
Université a. Mira de Bejaia

Faculté de Technologie
Département de Génie des Procédés
Laboratoire des Matériaux Organiques

Mémoire

EN VUE DE L'OBTENTION DU DIPLOME DE

Master

Domaine : Sciences et Technologie **Filière : Génie des Procédés**

Spécialité : Génie Pharmaceutique

Présenté par

SAHI Fatima & BENOUARET Thiziri

Thème

Validation analytique de la méthode de dosage d'une solution injectable à base d'un Psychotrope «Chlorpromazine» par Chromatographie Liquide à Haute Performance (HPLC)

Soutenue en Juillet 2022

Devant le jury composé de :

BELHADJ Nadra	*Présidente du jury*	*Université de Bejaia*
CHABANE Ahmed	*Examinateur*	*Usine Antibiotical Medea /Saidal*
BOUDIBA Abderrahmane	*Invité*	*Laboratoires FRATER RAZES*
KETRANE Rachid	*Invité*	*Université de Bejaia*
BOUCHAL Fatiha	*Promotrice*	*Université de Bejaia*

Année Universitaire : 2021/2022

Remerciements

Nous remercions Dieu pour nous avoir donné le courage et la volonté de réaliser ce présent travail

Nous remercions chaleureusement notre promotrice Dr BOUCHAL Fatiha pour l'aide qu'elle nous a apporté et pour tous ses encouragements continuels, son soutien et sa disponibilité à réaliser ce modeste travail.

Il est judicieux de présenter nos plus humbles remerciements à Monsieur BOUDIBA Abderrahmane, Cadre Chercheur aux Laboratoires FRATER RAZES, qui nous a offert l'opportunité de bénéficier d'un stage pratique et les bonnes conditions pour passer un séjour agréable au niveau des Laboratoires FRATER RAZES

Un grand remerciement à toute l'équipe du laboratoire de contrôle qualité FRATER RAZES d'avoir mis à notre disposition le nécessaire pour réaliser ce travail
Merci pour votre sympathie, votre gentillesse, votre compréhension et votre disponibilité.

Nous exprimons notre immense gratitude aux membres de jury qui feront l'honneur de juger notre travail de recherche
Dr BELHADJ Nadra en qualité de Présidente du jury
Dr CHABANE Ahmed en qualité d'examinateur
Dr BOUDIBA Abderrahmane et Dr KETRANE Rachid en qualité d'invités d'honneur

Nos remerciements vont également à tous les enseignants qui ont contribué à notre formation universitaire

Enfin, nous tenons à remercier tous ceux qui nous ont soutenu et prêté main pour la réalisation de ce modeste travail de près ou de loin.

Dédicaces

Dédicaces

Je dédie ce modeste travail :

À ma très chère maman ***Hania****,*
À mon très cher père ***Hmanou****,*

Aucune dédicace ne saurait exprimer mon respect, mon amour éternel et ma considération pour les sacrifices que vous avez consenti pour instruction et mon bien être.
Je vous remercie pour tout le soutien et l'amour que vous me portez depuis mon enfance.

En ce jour, j'espère réaliser l'un de vos rêves, et j'espère ne jamais vous décevoir, ni trahir votre confiance. Que dieu vous garde et vous procure santé, bonheur et longue vie pour que vous demeureraient à jamais le flambeau illuminant mon chemin.

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

À mes chers amis : ***Célia, Manel, Mélissa, Fadila, Djihane, Nadia, Billal et Walid,*** *qui m'ont toujours soutenu et encouragé durant toutes les années passées ensemble.*

À toi ma binôme ***Thizir****i ensemble; nous avons pu mener ce travail à terme.*

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

Fatima

Dédicaces

Je dédie ce modeste travail

A celle qui a veillé pour que j'arrive là où je suis, celle qui m'a encouragé durant toute ma vie et elle m'a donné l'espoir de poursuivre ce chemin jusqu'au bout ma chère ***MAMAN***

A mon cher ***PAPA****, qui ne m'a rien refusé pour que je réussisse, pour qui l'honneur d'être sa fille*

A ma grande sœur ***LYDIA*** *et mon frère* ***CHAFAA*** *ainsi sa femme* ***CELIA*** *qui n'ont jamais cessé de me soutenir et m'encourager*

A mes grands parents qui m'ont toujours aimé et comblé de bénédiction

A mes chères tantes et oncles paternels et maternels

A tous mes cousins et cousines

A mes chères amies

Et particulièrement a ma chère binôme ***SAHI Fatima*** *sans elle je ne pourrait donne vie a ce travail*

A toute la promotion pharmaceutique 2021/2022

A tous ceux qui sont trop chers et que j'ai omis de cité et a tous ceux qui ont contribué de prés ou de loin à l'élaboration de ce travail

THIZIRI

Sommaire

Introduction générale……...……..**1**

Partie théorique

CHAPITRE I

Les psychotropes

I.1. Introduction ……..…...……**3**

I.2. Présentation des laboratoires FRATER-RAZES ……**3**

I.3. Les psychotropes ...……...…….……..…… **8**

I.3.1. Mécanisme d'action d'un psychotrope…….……**8**

I.3.2. Différents médicaments psychotrope …….…… **9**

I.4. Les neuroleptiques……..**10**

I.5. La chlorpromazine……...…**11**

I.5.1. Découverte de la Chlorpromazine……...……**11**

I.5.2. Classe et effets thérapeutiques…….**11**

I.5.3. Effets indésirables de la Chlorpromazine……**12**

I.5.4. Interactions médicamenteuses de la Chlorpromazine……..…**12**

I.5. Pharmacocinétique de la chlorpromazine …….…..……**13**

CHAPITRE II

Formes galéniques destinées à l'administration parentérale

II.1. Introduction…….……...…**14**

II.2. Qualités requises pour préparations injectables……....**14**

II.3. Classification des préparations parentérales……..…….**15**

II.4. Principales voies d'administration.……**16**

II.5. Avantages des préparations parentérales ……**17**

II.6. Conditionnement des préparations parentérales …….....**17**

II.7. Chlorpromazine Chlorhydrate, solution injectable à 25mg/5ml …….....**18**

II.8. Produit de référence Chlorpromazine Chlorhydrate, solution injectable à 25mg/5ml **20**

Sommaire

CHAPITRE III

Validation Analytique

III.1 Introduction ……**22**

III.2 Définition de la validation analytique……**22**

III.3 Contexte réglementaire……**23**

III.4 Objectifs d'une validation analytique……**24**

III.5 Types de procédures analytiques ……**24**

III.6 Validation des méthodes analytiques à l'industrie pharmaceutique ……**25**

III.7 Paramètres de la validation analytique……**25**

III.7.1. Conformité du système……**26**

III.7.2. Spécificité……**26**

III.7.3. Intervalle de mesure……**27**

III.7.4. Linéarité……**27**

III.7.5. Fidélité……**28**

III.7.6 Exactitude……**30**

III.7.7 Stabilité des solutions……**30**

III.7.8 Robustesse……**32**

Partie expérimentale

CHAPITRE IV

Matériel et Méthodes

Objectif……**33**

IV.1. Présentation du produit Chlorpromazine, solution injectable à 25mg/5ml……**34**

IV.2. Matériel et équipements……**35**

IV.3. Réactifs utilisées……**35**

IV.4. Principe et appareillage de la HPLC……**36**

IV.5. Description de la procédure de validation analytique de la méthode de dosage du Chlorpromazine à 25mg/5ml ……**38**

IV.6. Méthodologie de la validation analytique……**40**

IV.7. Programme de validation analytique……**44**

Sommaire

CHAPITRE V

Résultats et Discussion

V-1 : Test de conformité système…….……**46**
V-2 : Spécificité……**47**
V-3 : Linéarité……..……..**49**
V-4 : Fidélité…….……**52**
V-5 : Exactitude……...**53**
V-6 : Stabilité des solutions……..**54**
V-7: Robustesse……....**55**
Conclusion …….……..……**61**

***Conclusion Générale*……...…….……..62**

Références bibliographiques

Annexes

Liste des figures

Liste des figures

Chapitre I: Les psychotropes

Figure I.1: Mécanisme d'action des psychotropes ……..…..4

Figure I.2: Les médicaments fabriqués par les laboratoires FRATER-RAZES……...…8

Figure I.3 : Mécanisme d'action des psychotropes……...9

Chapitre II: Formes galéniques destinées à l'administration parentérale

Figure II.1: Voies d'introduction des préparations injectables ……...16

Figure II.2: Récipients utilisés pour les préparations injectables ……...17

Figure II.3: Formule développée de chlorpromazine ……19

Figure II.4: Produit de référence Largactil®, solution injectable à 25mg/5ml ……..20

Chapitre III: Validation analytique

Figure III.1: Représentation schématique des notions de fidélité et de justesse ……....28

Chapitre IV: Matériel & Méthodes

Figure IV.1.: Principe de fonctionnement d'un appareil HPLC ……37

Figure IV.2: Procédure de réalisation des essais de stabilité ……..42

Chapitre V: Résultats & discussion

Figure V.1 : Chromatographe de la solution essai (Spécificité) ……47

Figure V.2: Analyse Chromatographique de la solution placebo concernant la spécificité ...48

Figure V.3: Linéarité et intervalle de mesure (Standard) ……50

Figure V.4: Linéarité et intervalle de mesure (Placebo chargé)……50

Liste des tableaux

Liste des tableaux

Chapitre II : Formes galéniques destinée à l'administration parentéral

Tableau II.1: Caractéristiques physico-chimiques et pharmacologiques de la Chlorpromazine..14

Tableau II.2: Produit de référence Largactil®, solution injectable à 25mg/5ml.....15

Chapitre IV: Matériel & Méthodes

Tableau IV.1: Composition qualitative de la solution injectable Chlorpromazine à 25mg/5ml……..29

Tableau IV.2: Propriétés physico-chimiques…….....29

Tableau IV.3: Injection des préparations ……..…….……34

Tableau IV.4: Programme de la validation analytique produit injectable Chlorpromazine 25mg/5m …….……39

Chapitre V: Résultats & discussion

Tableau V.1: Résultats expérimentaux de la validation analytique du test conformité système……..…41

Tableau V.2: Résultats expérimentaux de la validation analytique du chlorpromazine 25 mg/5 ml pour le test de spécificité ……..…42

Tableau V.3: Résultats expérimentaux de la validation analytique du chlorpromazine 25 mg/5 ml pour le test de la Linéarité …….……..…….44

Tableau V.4: Résultats expérimentaux de la Fidélité ……..……...47

Tableau V.5: Résultats expérimentaux obtenus pour le test de l'Exactitude …….…….....48

Tableau V.6: Etude de la stabilité des solutions ……...…..49

Tableau V.7: Résultats expérimentaux obtenus pour le test de la Robustesse …….....50

Tableau V.8: Changement de colonne pour le standard A …….50

Liste des tableaux

Tableau V.9: Changement de la colonne pour le standard B ……..……...……51

Tableau V.10 : Changement de la colonne pour la solution essai ……..…..…..51

Tableau V.11 : Changement de la longueur d'onde …….……..52

.

Tableau V.12 : Changement de longueur d'onde pour standard B …….……52

Tableau V.13 : Changement de longueur d'onde pour la solution essai ……...…….53

Tableau V.14 : Changement de longueur d'onde et du débit pour le standard A …….…....53

Tableau V.15 : Changement de longueur d'onde et du débit pour le standard B ……...54

Tableau V.16 : Changement de longueur d'onde et du débit pour la solution essai …...…..…..54

Tableau V.17 : Changement du débit pour le standard A …….…..55

Tableau V.18 : Changement du débit pour le standard B ……..……..…55

Tableau V.19 : Changement du débit pour la solution essai ……...……..…56

Liste des abréviations

Liste des abréviations

HPLC : Chromatographie Liquide à Haute Performance

IV : Intraveineuse

IM : Intramusculaire

% : Pourcentage

EPPI : Eau Pour Préparation Injectable

QSP : Quantité Suffisante Pour

AMM : Autorisation de mise sur le Marché

ICH : International Council for Harmonisation of Technical Requirements for Pharmaceuticals for Human Use. **(**Conseil international d'harmonisation des exigences techniques pour l'enregistrement des médicaments à usage humain)

SFSTP : Société Française des Sciences et Techniques Pharmaceutiques

Q : Qualité

S : Sécurité

E : Efficacité

M : Multidisciplinaire

RSD : Relatif Standard Déviation

a : Pente

b : Ordonnée à l'origine

Y: Signal mesuré

X: Concentration de l'analyte en µg/ml

R: Coefficient de corrélation

° : Degré

C : Celsius

$\mathbf{A_0}$: Signal dû à l'analyte au temps initial

$\mathbf{A_t}$: Signal dû à l'analyte au temps t

$\mathbf{D_t}$: Le pourcentage de dégradation

$\mathbf{C_0}$: Concentration de l'analyse au temps initial en mg/ml

$\mathbf{C_t}$: Concentration de l'analyte au temps t en mg/ml

Cstd : Concentration de l'analyte dans les solutions standard

Astd : Signal de l'analyte dans les solutions standard

$\mathbf{A_t}$: Signal du pic de l'analyte dans la solution analysée à un temps t

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

Liste des abréviations

HCL : Hydrochloride

mm: Millimètre

nm : Nanomètre

min : Minute

µl : Microlitre

mg : Milligramme

Fs : Facteur de similarité

C 18 : Colonne 18

PA : Principe actif

M1 : Manipulateur 1

M2 : Manipulateur 2

J : Jour

H : Heure

T : Température

$\mathbf{R_2}$: Coefficient de régression

Introduction générale

Introduction générale

La mise au point d'un médicament passe par plusieurs phases, la découverte de la molécule active, des tests de laboratoire, des études précliniques, des essais cliniques et des homologations réglementaires. Avant sa commercialisation, les organismes de réglementation exigent que le médicament soit analysé en fonction de son origine, de sa résistance, de sa pureté et de sa stabilité.

Les laboratoires pharmaceutiques doivent d'un point de vue éthique, de produire et de mettre sur le marché des médicaments d'un haut degré de qualité. Ces obligations réglementaires et commerciales exigent de mettre en place un système d'assurance qualité à tous les niveaux de l'entreprise depuis le développement du médicament jusqu'à sa mise sur le marché. Ce concept essentiel de qualité requiert sa validation. Elle est menée sur la base de principes scientifiques afin d'établir la respectabilité des méthodes et de veiller à la conformité du médicament. En effet, si la validité d'une méthode analytique n'est pas confirmée, la décision de conformité ou non des produits finis basée sur les données obtenues par le contrôle qualité en utilisant cette procédure analytique deviennent contestables.[1]

Pour cette raison, assurer la fiabilité de la méthode garantie par la validation ne constitue pas seulement une exigence réglementaire, mais aussi un critère essentiel d'assurance qualité.

Pour cela, toutes les nouvelles méthodes d'analyse mises en œuvre au laboratoire doivent systématiquement faire l'objet d'une validation analytique, avant d'être utilisées de façon routinière. Celle-ci repose sur une série de mesures expérimentales et des tests statistiques permettant de prouver qu'une procédure est suffisamment précise et fiable.

Cette exigence de validation est pratiquement courante dans le domaine industriel, où toute nouvelle méthode décrite dans un dossier d'Autorisation de Mise sur le Marché (AMM), doit être accompagnée d'une validation complète.

Le principe de la validation des procédures analytiques quantitatives est aujourd'hui largement répondu dans tous les domaines d'activité où des mesures sont réalisées. Le champ d'application de la validation analytique s'étend à toute procédure d'analyse utilisée dans le contrôle de la matière première, le développement galénique, le contrôle en cours de fabrication, le contrôle de produits finis et les essais de stabilité de tous les produits pharmaceutiques.[2]

Introduction générale

Ce présent travail de recherche réalisé au niveau des laboratoires FRATER-RAZES s'intéresse particulièrement à la validation analytique d'une méthode de dosage du Chlorpromazine par Chromatographie en phase Liquide à Haute Performance (HPLC).

Ce mémoire de fin de cycle est réparti en deux grandes parties :

- La première partie intitulée recherche bibliographique qui se compose de trois chapitres:
  - Premier chapitre : les psychotropes,
  - Second chapitre : les formes galéniques destinées à l'administration parentérale
  - Troisième chapitre : la validation analytique.

- Une partie expérimentale subdivisée en Matériels & Méthodes et Résultats & Discussion.

Enfin, nous terminons par une conclusion générale.

Partie théorique

CHAPITRE I

Les psychotropes

Chapitre I : Les psychotropes

I.1. Introduction

Les médicaments utilisés pour traiter les troubles psychiques sont appelés médicaments psychotropes. Leur objectif principal est de soulager la souffrance de la personne et de diminuer les troubles psychiques afin d'avoir la meilleure vie possible.

Les médicaments psychotropes, suivant leurs propriétés spécifiques, se fixent au niveau des récepteurs neuronaux et entraînent des modifications biochimiques dans le but d'améliorer la neurotransmission. Tous les médicaments, en particulier les neuroleptiques, n'agissent pas sur les mêmes récepteurs, ce qui explique la variabilité des réponses à ces médicaments.

La mise au point d'une nouvelle molécule nécessite au moins dix années de recherche clinique, pendant lesquelles toutes les informations sont recensées et font l'objet de nombreuses expertises et essais cliniques, avant la mise sur le marché.

Après sa commercialisation, un nouveau médicament fait l'objet d'une surveillance continue par les centres régionaux de Pharmacovigilance. Tout effet grave ou inattendu causé par un médicament doit être signalé rapidement par tout personnel soignant **[3]**.

I.2 Présentation des Laboratoires FRATER-RAZES :

Le groupe FRATER - RAZES Laboratoires est l'un des leaders de l'industrie pharmaceutique algérienne, en raison de son autonomie et de la qualité de ses solutions

Avec plus de 30 ans d'activité, les laboratoires FRATER –RAZES bénéficient d'un savoir-faire qui leur permet de couvrir l'ensemble de la chaîne de valeur pharmaceutique**.**

De la production du médicament à sa distribution et à sa promotion, leur savoir-faire agit à chacune de ces étapes**.**

Les laboratoires FRATER –RAZES interviennent pendant toute la vie du médicament**.**

La figure 1 montre les laboratoires FRATER –RAZES, situés à Saoula, Alger.

Figure I.1: Les laboratoires FRATER-RAZES.

Chapitre I : Les psychotropes

Historique :

En 1992, la compagnie de distribution de produits pharmaceutiques a été fondée par le docteur CHERFAOUI Abdelhamid, qui était la neuvième en Algérie.

Cette étape de la distribution a permis d'en apprendre progressivement davantage sur le secteur pharmaceutique de notre pays avec ses exigences réglementaires, ses besoins, ses circuits et ses attentes.

En 1996, elle a procédé à l'importation de produits pharmaceutiques, ce qui constitue un suivi logique du premier stade de la distribution. Il s'agit d'une étape stratégique cruciale de la politique nationale de santé algérienne, qui vise à garantir l'équité, l'accès, tout en maîtrisant les coûts. Le but ultime est de répondre au mieux aux besoins de la population.

En 2000, ils créent la première unité industrielle spécialisée dans la forme sèche. L'aventure industrielle commence par le conditionnement des produits d'abord sous forme sèche puis leur fabrication à partir de matières premières. C'est à ce moment que le développement des médicaments a commencé.

En 2009, après une parfaite maîtrise de la fabrication de la forme sèche destinée spécifiquement au marché officinal, c'était impératif pour les Laboratoires FRATER RAZES de pénétrer le marché des hôpitaux consacré quasiment seulement aux formes galéniques injectables.

Pour ce faire, les Laboratoires FRATER –RAZES se sont disposés d'outils industriels ultramodernes par le biais d'une unité spécialisée dans la forme injectable (ampoule et flacon).

En 2010, les Laboratoires FRATER –RAZES étaient les premiers à produire du paracétamol injectable à 100 ml à l'échelle africaine et neuvième à l'échelle mondiale.

En 2011, devant l'ampleur que prenaient leur activité et les exigences du marché national, le regroupement de nos sociétés sous l'égide d'une seule holding était nécessaire. La holding Spa FRATER-RAZES est née avec ses diverses filiales ayant chacune une autonomie financière et juridique.

Chapitre I : Les psychotropes

En 2013, lancement des travaux de développement des produits du pôle de production biotechnologique sous forme de flacons et de seringues pré-remplies, destinés à la fabrication de produits similaires.

En 2014, une nouvelle unité de production de sachets, gélules et comprimés, d'une capacité de production de 50 millions de boîtes par an, a été mise en place et consacrée pour la forme sèche.

En 2017, y'a eu le lancement de la deuxième unité forme sèche. Cette nouvelle unité nous permet d'accroître la production de 10 millions à 50 millions d'unités par an, en utilisant les derniers équipements.

En 2018, devant la croissance sans cesse des besoins en produits pharmaceutiques, le groupe est parvenu à produire deux nouvelles lignes de production pour Flacons-Ampoules, portant la capacité de production des flacons à 25 millions d'unités et 150 millions d'unités pour les ampoules.

En 2019, Naissance de deux nouveaux projets :

★ Projet 1: BIOTECHNOLOGIE

FRATER-RAZES Laboratoires vise à devenir un pôle régional et continental dans le domaine des biotechnologies.

★ Projet 2: ONCOLOGIE

La deuxième ambition de FRATER-RAZES Laboratoires est de coopérer à la production nationale de médicaments utilisés en oncologie à hauteur de 60%.

Chapitre I : Les psychotropes

Formes galéniques des Laboratoires FRATER –RAZES :

- Comprimé;
- Gélule;
- Ampoule;
- Sachet (Micro granulé);
- Solution à seringue injectable pré-remplie par voie sous-cutanée ou intraveineuse;
- Solution injectable I.M;
- Solution buvable;

Spécialités des Laboratoires FRATER –RAZES [4] :

- Biosimilaires ⇨exp : varenox 0,4 ; 0.6 ; 0.8ml
- Rhumatologie ⇨ fradene ampoule 20mg/1ml et comprimé 20mg….
- Cardiologie ⇨ nicardex 10mg/10ml
- Gastro-Entérologie ⇨ duspaverine 100 ; 200mg
- Diabétologie ⇨ methofage 850mg
- Gynécologie ⇨ secnidolex 2g
- Urologie ⇨ fraxal lp 5 ; 10mg
- Pédiatrie ⇨ sapramol 100 mg ; 150mg
- Neurologie ⇨ ricabaline 50mg ; 150mg ; 300mg
- Oncologie ⇨ zolidro 4 mg/5ml
- Réanimation ⇨ lidocaïne razes 1% 100 mg/10 ml ; 2% 200mg/20ml
- Psychiatrie ⇨ cymoxitine 30mg ; 60mg
- Divers ⇨ sapramol razes
- Hématologie ⇨ vitamine b12 razes
- Infectiologie ⇨ gentaxine 40mg/2ml ; 80mg/2ml

Médicaments fabriqués par les laboratoires FRATER-RAZES :

Figure I.2 : Les médicaments fabriqués par les laboratoires FRATER-RAZES.

I.3. Les psychotropes :

Un **psychotrope** est une substance qui donne une direction (un trope) à l'esprit. Selon Jean Delay, «on appelle **psychotrope** une substance chimique d'origine naturelle ou artificielle, qui a un tropisme psychologique, c'est-à-dire qui est susceptible de modifier l'activité mentale, sans préjuger du type de cette modification» **[5]**. Autrement dit, un psychotrope est un médicament qui agit sur les mécanismes neurobiologiques du cerveau afin d'améliorer les troubles ou les dysfonctionnements de l'activité psychique **[6]**.

I.3.1. Mécanisme d'action psychotrope :

Les médicaments psychotropes modulent les effets des neurotransmetteurs naturels les psychotropes agissent sur les récepteurs des neurotransmetteurs naturels-ou interagissent avec

les mécanismes de neurotransmission (synthèse, stockage, libération, recapture, dégradation). La **figure I.3** montre le mécanisme d'action des psychotropes.

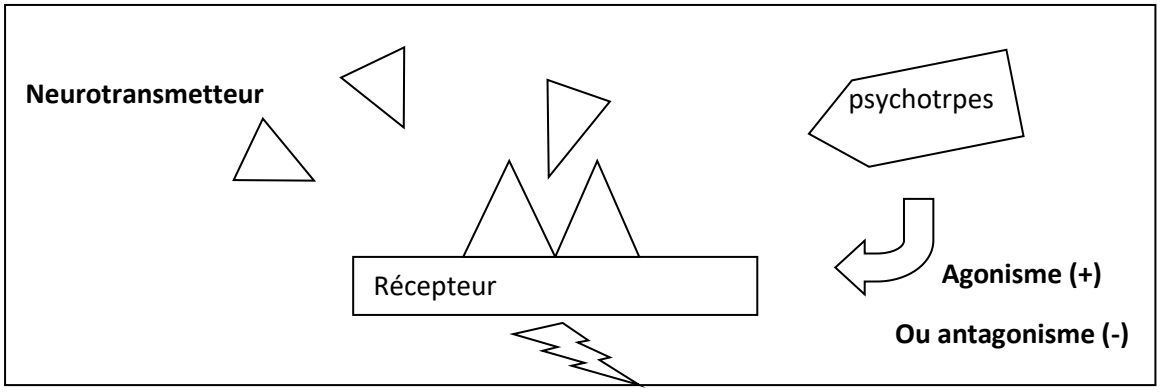


Figure I.3. Mécanisme d'action des psychotropes **[6].**

Les psychotropes augmentent ou réduisent la neurotransmission (et ainsi une activité neuronale particulière. Ils améliorent ou stabilisent les anomalies de fonctionnement des neurones (Anomalie de neurotransmission) : action de modification ou de correction **[6].**

Tous les antipsychotiques sont des antagonistes des récepteurs dopaminergique de type D2.
La dopamine freine la libération d'acétylcholine. Le blocage des récepteurs dopaminergique, cible principale des antipsychotiques, lève ce frein et induit une libération excessive d'acétylcholine et un déséquilibre entre des concentrations de dopamine et d'acétylcholine, à l'origine des mouvements anormaux **[7].**

I.3.2. Différents médicaments psychotropes

Les principales classes thérapeutiques des médicaments psychotropes sont **les antidépresseurs** qui agissent sur les symptômes de la dépression, **les neuroleptiques** (dits aussi a**ntipsychotiques)** qui ont une action tranquillisante sur certains délires ou sur la désorganisation des pensées, les **anxiolytiques** (tranquillisants) qui soulagent la tension anxieuse physique et psychique, les **hypnotiques** (somnifères) qui facilitent l'endormissement et améliorent la durée de sommeil et enfin les **stabilisants de l'humeur** (dits aussi régulateurs de l'humeur, thymorégulateurs, ou parfois normothymiques) qui soignent les troubles de l'humeur.

Des médicaments dits correcteurs sont parfois utilisés avec certains psychotropes, dans le but d'atténuer certains effets indésirables **[6]**.

Dans notre cas, on s'intéressera à la classe thérapeutique des « neuroleptiques », vu que notre étude repose sur le médicament «Chlorpromazine» qui fait partie de cette classe.

I.4. Les neuroleptiques :

Les neuroleptiques sont des médicaments qui participent à la prise en charge des patients atteints de psychose. Les neuroleptiques sont classés selon différents critères :

- Leur structure chimique,
- Leurs propriétés antipsychotiques (action sur le délire et les hallucinations),
- Leur durée d'action, leur présentation.

Les effets thérapeutiques et les effets indésirables peuvent varier, d'une molécule à l'autre, et ils sont également variables suivant les sensibilités de réponse des patients. Depuis une dizaine d'années, le terme « antipsychotique », d'origine anglo-saxonne, est utilisé pour désigner la nouvelle génération de médicaments neuroleptiques, qu'on appelle aussi parfois neuroleptiques de seconde génération, ou antipsychotiques atypiques de deuxième génération. Dans quelques cas toutefois, certains symptômes « résistent » à l'action de ces médicaments. Les neuroleptiques de 1ère et 2nde génération n'entraînent pas de dépendance psychique **[6].**

Délai d'action des neuroleptiques

La réponse au traitement neuroleptique apparaît en 02 ou 06 semaines. Une réponse insuffisante après 06 semaines impose une modification de posologie ou un changement de molécule **[8].**

Un neuroleptique d'action prolongée prend le relais d'une forme orale, suivant l'équivalence de la dose orale, mais il est parfois utile de réévaluer la posologie du neuroleptique d'action prolongée après la troisième ou quatrième injection, en fonction des effets ressentis par le patient **[3].**

I.5. La chlorpromazine :

La chlorpromazine est le premier traitement antipsychotique de l'histoire. Utilisé dans les années 1950 et 1960 et vendu sous le nom de chlorhydrate de chlorpromazine (LARGACTIL®), il a des effets sédatifs, hypotenseurs, antiémétiques, anticholinergiques et anti dopaminergiques. Il est maintenant considéré comme un antipsychotique classique. Il est classé comme un antipsychotique de faible puissance **[9].**

I.5.1. Découverte de la Chlorpromazine :

Courvoisier S. démontra au cours de ses expériences l'action antihistaminique ainsi que parasympathique de la chlorpromazine lors d'essais chez le rongeur et le chien. Des essais ont été menés chez l'être humain lors de l'association avec les barbituriques en tant qu'adjuvant de l'anesthésiant. Il observa que les patients présentaient en préopératoire une attitude calme et détendue alors qu'il s'agit d'un moment particulièrement stressant pour ceux-ci. Cela aboutit à la commercialisation en 1952 du LARGACTIL® avec de nombreuses indications thérapeutiques pour celui qui fut nommé le « stabilisateur végétatif » dans le domaine de l'anesthésie, du stress chirurgical, des brûlures sévères et des troubles cardiovasculaires (Syndrome de Raynaud) **[9].**

I.5.2. Classe et effets thérapeutiques :

La chlorpromazine est un antipsychotique. Elle est utilisée pour traiter les troubles psychotiques aigus et chroniques tels que la schizophrénie, empêcher et traiter les nausées et les vomissements**.**

La chlorpromazine a pour effet de modifier l'équilibre de certains produits chimiques cérébraux et de traiter les troubles sévères liés à la croissance chez l'enfant avec agitation et agressivité **[10]**.

I.5.3. Effets indésirables de la Chlorpromazine :

Beaucoup de médicaments peuvent entraîner des effets secondaires. Un effet secondaire est une réaction à un médicament lorsqu'il est pris à des doses normales. Il peut être léger ou grave, temporaire ou permanent. Un grand nombre de ces effets secondaires sont gérables et certains peuvent disparaître d'eux-mêmes avec le temps. Au moins 1 % des personnes qui prennent ce médicament ont révélé les effets secondaires ci-après **[11]** :

- de l'agitation;
- une congestion nasale;
- de la constipation;
- des étourdissements;
- un gain de poids;
- des maux de tête;
- des nausées ou des vomissements;
- une perte d'intérêt envers l'activité sexuelle;
- une sécheresse de la bouche ou des yeux;
- une sensibilisation de la peau au soleil.
- de la somnolence;
- une sudation accrue;
- des troubles du sommeil.

I.5.4. Interactions médicamenteuses de la Chlorpromazine :

Il est possible que la chlorpromazine interagisse avec l'un des agents suivants **[11]** :

- l'aclidinium ;
- les agents antiparkinsoniens (par ex: l'amantadine, l'apomorphine, la bromocriptine, la lévodopa, le pramipexole, le ropinirole) ;
- les agonistes alpha (par ex. la clonidine, le méthyldopa) ;
- l'alcool ;
- les alphabloquants (par ex. l'alfuzosine, la doxazosine, la tamsulosine) ;

- les amphétamines (par ex. la dextroamphétamine, la lisdexamfétamine) ;
- les antagonistes du calcium (par ex. l'amlodipine, le diltiazem, le vérapamil).

I.6. Pharmacocinétique de la chlorpromazine :

Les propriétés pharmacocinétiques de la chlorpromazine sont récapitulées comme suit :

A. Absorption :

L'absorption de la chlorpromazine est bonne et rapide par toutes les voies. Elle se distribue à tous les tissus et se fixe essentiellement au niveau des poumons, du foie et du cerveau.

B. Métabolisme :

Le métabolisme hépatique de la chlorpromazine aboutit à de nombreux métabolites complexes avec auto-induction sur le cytochrome p450.

C. .Elimination :

L'élimination urinaire de la chlorpromazine est avec 1% sous forme inchangée, 50% sous forme métabolisé (il existe 156 métabolites) et 40% par voie fécale sous forme métabolisée.

Le délai d'action de la chlorpromazine est de quelques minutes par voie IV, de 15 à 30 minutes en IM et de 60 à 90 minutes en per os **[12].**

CHAPITRE II

Les Formes galéniques destinées à l'administration parentérale

II.1. Introduction :

Selon la Pharmacopée européenne, les préparations parentérales sont des préparations stériles destinées à être injectées, perfusées ou implantées dans le corps humain ou animal **[13]**. Elles sont préparées par des méthodes visant à assurer leur stérilité et à empêcher l'introduction de contaminants, la présence de pyrogènes et la croissance de micro-organismes.

Les récipients de conditionnement doivent, autant que possible, consister en un matériau suffisamment transparent pour permettre la vérification visuelle de l'apparence du contenu et doivent satisfaire aux exigences de qualité requises.

II.2. Qualités requises des préparations parentérales :

Les préparations injectables sont destinées à franchir par effraction les barrières biologiques protectrices; la peau et les muqueuses. De ce fait, elles doivent satisfaire à un certain nombre d'exigences de qualité. Les qualités requises pour les préparations injectables sont la stérilité, l'absence de pyrogènes et endotoxines bactériennes, la neutralité, la limpidité et l'isotonie au sang.

Stérilité :
Une préparation injectable ne doit pas contenir aucun micro-organisme vivant susceptible de causer une infection lors de l'injection.

Absence de pyrogènes et endotoxines bactériennes :
Une préparation injectable ne doit pas renfermer de substances pyrogènes susceptibles de provoquer une fièvre excessive.

Limpidité :
Les solutions doivent être claires et exemptes de particules visibles à l'œil nu. Les émulsions doivent avoir une apparence homogène et ne présenter aucune séparation de phases. La suspension peut subir une sédimentation, mais une faible agitation doit rétablir une suspension assez stable pour permettre un échantillonnage homogène.

Neutralité :

Le pH d'une préparation injectable doit être proche du pH plasmatique.

Isotonie par rapport au sang :

Une préparation injectable doit présenter une pression osmotique la plus proche possible de celle du sang de manière à ne pas risquer la destruction des globules rouges. La pression osmotique varie selon la quantité de produits dissous dans l'eau. L'isotonie revêt une importance particulière en ce qui concerne les solutés massifs. Dans le cas d'hypertonie, il faudra procéder à une injection lente, dans le cas d'hypotonie il faudra procéder à une injection très lente. **[14].**

II.3. Classification des préparations parentérales :

On distingue 03 principales catégories de préparations parentérales; les préparations injectables, les préparations pour perfusion I.V et les poudres pour injection ou perfusion I.V.

1. Préparations injectables :

Les préparations injectables peuvent être des solutions, des émulsions ou des suspensions stériles. Elles doivent être apyrogènes.

2. Préparations pour perfusion I.V :

Les préparations pour perfusion IV sont des solutions aqueuses ou des émulsions en phase hydrophile externe (L/H) stériles et apyrogènes. Elles sont destinées à être administrées en grand volume.

3. Poudres pour injection ou perfusion I.V:

Il s'agit de substances solides stériles, réparties dans leur récipient final. Ces poudres constituent rapidement une solution limpide ou une suspension homogène après mélange et agitation avec le volume prescrit d'un liquide adapté et stérile.

Il existe aussi des préparations parentérales sous forme d'implants ; préparations solides stériles d'une taille et d'une forme adéquates pour l'implantation parentérale. Ils garantissent

la libération des principes actifs sur une période étendue. Ils sont conditionnés sous forme de récipients stériles individuels.

II.4. Principales voies d'administration :

Parmi les principales voies d'administration parentérale, on peut citer la voie intramusculaire, la voie sous-cutanée, la voie intraveineuse et la voie intradermique. La **figure II.1** schématise les principales voies d'introduction des préparations injectables **[15, 16]**.

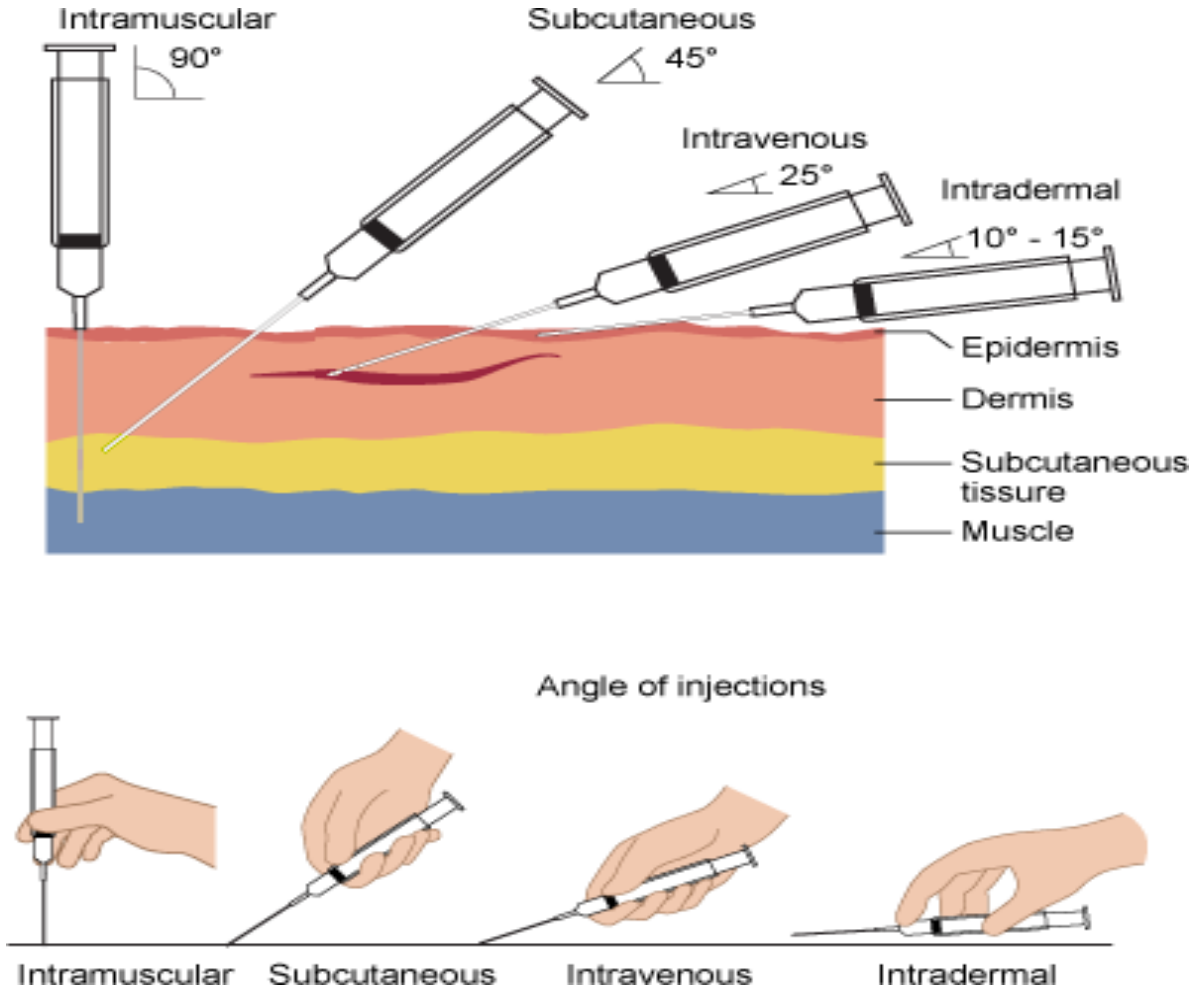


Figure II.1 : Voies d'introduction des préparations injectables **[16]**

II.5. Avantages des préparations parentérales :

Les principaux avantages des préparations injectables se résument comme suit **[13]** :

- ➔ Rapidité maximale (rapidité d'action) ;
- ➔ Obtention d'une biodisponibilité maximale ;
- ➔ Administration de substances à faible durée d'activité et de faible marge de sécurité ;
- ➔ Administration de produit non absorbable par d'autres voies ;
- ➔ Apport massif des liquides ;
- ➔ Évite la destruction du principe actif par le suc digestif ;
- ➔ Garantie l'absorption de la dose totale du médicament.

Ces préparations présentent aussi certains inconvénients, à savoir le risque d'infection, les effets douloureux et l'obligation d'un appareillage approprié **[15].**

II.6. Conditionnement des préparations parentérales :

Les récipients utilisés pour le conditionnement des préparations injectables sont regroupés sur la **figure II.2** ci-dessous **[16]**.

Figure II.2 : Récipients utilisés pour les préparations injectables **[17]**

En général, les ampoules et les flacons doivent être en verre incolore. Parmi les atouts des ampoules en verre, on peut citer la transparence, la résistance à la chaleur, l'inertie chimique et l'imperméabilité aux gaz.

Les flacons, les poches et les seringues pré-remplis doivent être en plastique transparent, pour leur légèreté et leur résistance aux chocs **[18].**

II.7. Chlorpromazine Chlorhydrate, solution injectable à 25mg/5ml :

Lors de notre travail de recherche, nous avons procédé à l'étude de la validation analytique de la méthode de dosage de la chlorpromazine Chlorhydrate dans le produit fini Chlorpromazine Chlorhydrate, solution injectable à 25mg/5ml.

La chlorpromazine est le premier traitement anti-psychotique de l'histoire. Utilisé dans les années 1950 et 1960 et vendu sous le nom de chlorhydrate de chlorpromazine (surnommé "matraque liquide"). Ce médicament a des effets sédatifs, hypotenseurs, antiémétiques, anticholinergiques et anti-dopaminergiques. Il est maintenant considéré comme un antipsychotique classique.

La chlorpromazine est classée comme un antipsychotique de faible puissance et est utilisée pour traiter la manie et les maladies psychotiques tels que la schizophrénie, empêcher et traiter les nausées et les vomissements. Ce principe actif a pour effet de modifier l'équilibre de certains produits chimiques cérébraux**.** Il est également utilisé pour traiter les états psychotiques aigus, les prémédications avant anesthésie et les troubles sévères du comportement chez l'enfant avec agitation et agressivité **[10, 11]**.

Quelques informations générales sur la substance active Chlorpromazine Chlorhydrate sont résumées ci-dessous :

Dénomination internationale commune (DCI) : Chlorpromazine Chlorhydrate

Poids moléculaire : 355,3 g/mol

Structure chimique : $C_{17}H_{19}ClN_2S$

Chlorhydrate de 3-(2-chloro-10H-phenothiazin-10-yl)-N, Dimethyl Propan-1-amine **[19]**.

La formule développée de la chlorpromazine est donnée par la **figure II.3** suivante :

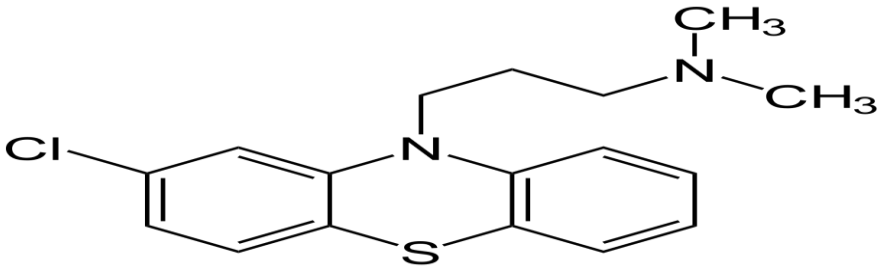


Figure II.3 : Formule développée de chlorpromazine **[20]**

La chlorpromazine Chlorhydrate appartient à la classe thérapeutique des antipsychotiques**.** Son mode d'administration parentérale est soit par voie intramusculaire (IM) ou par voie intraveineuse (IV). En voie IM, la solution injectable en ampoule devrait être injectée profondément dans le muscle. Étant donné que l'injection est irritante, les injections intramusculaires superficielles devraient être évitées pour réduire les réactions locales. En voie IV, la solution injectable en ampoule doit être administrée par perfusion afin de minimiser les réactions locales **[21]**

Les principales caractéristiques physico-chimiques et pharmacologiques de la Chlorpromazine sont données par le **tableau II.1** suivant **[19]**:

Tableau II.1 : Caractéristiques physico-chimiques et pharmacologiques de la Chlorpromazine **[1]**

Aspect	Poudre cristalline blanche,
Solubilité	Facilementsoluble dans l'éthanol à 96% et très soluble dans l'eau.
Décomposition	Le chlorhydrate de Chlorpromazine se décompose quand il est exposé à l'air et à la lumière.
Polymorphisme	Le chlorhydrate de Chlorpromazine présente le phénomène du polymorphisme**.**
Biodisponibilité	10 à 70 %
Demi-vie d'élimination	16 à 30 heures

II.8. Produit de référence Chlorpromazine Chlorhydrate, solution injectable à 25mg/5ml

Pour réaliser l'étude de la validation analytique de la méthode de dosage de la chlorpromazine Chlorhydrate dans le produit fini Chlorpromazine Chlorhydrate, solution injectable à 25mg/5ml, nous avons utilisé comme produit de référence, le médicament Largactil®, solution injectable à 25mg/5ml (**Figure II.4**). C'est un neuroleptique appartenant aux phénothiazines **[22, 23].**

Figure II.4 :¨Produit de référence Largactil®, solution injectable à 25mg/5ml **[23]**

Le **tableau II.2** résume quelques informations générales sur le produit de référence Largactil®, solution injectable à 25mg/5ml **[24].**

Tableau II.2 : Produit de référence Largactil®, solution injectable à 25mg/5ml

DCI	Chlorpromazine chlorhydrate
Dosage	25 mg/ 5 ml
Forme	Solution injectable
Voie d'administration	I.M ou I.V en perfusion
Conditionnement	5 ml en ampoule (verre ambré). Boîte de 5, 10 ou 50 ampoules.
Validité	36 mois
Conservation	A conserver à l'abri de lalumière. Après ouverture, le produitdoit être utilisé immédiatement.
Liste	< PSYCHOTROPE >

La composition qualitative du produit de référence est la suivante **[24]** :

- Chlorhydrate de Chlorpromazinequantité correspondante à Chlorpromazine base
- Sulfite de sodium(E221)
- Disulfite de sodium (E223)
- Chlorure de sodium
- Citrate de sodium
- Acide ascorbique
- EPPI…. Qsp.5ml

CHAPITRE III

La validation analytique

III.1 Introduction :

Le contexte industriel oblige les industries pharmaceutiques à démontrer que tous les processus et les méthodes utilisées pour le développement d'un produit de santé conduisent effectivement au résultat attendu.

Les sociétés pharmaceutiques doivent démontrer la validité et la fiabilité des méthodes analytiques utilisées. Si la qualité d'une méthode analytique n'est pas confirmée, la décision de conformité ou de non-conformité des produits finis, fondée sur les données obtenues par le Contrôle de la Qualité au moyen de la présente procédure analytique devient discutable. C'est pourquoi l'assurance de la fiabilité de la méthode garantie par la validation analytique est non seulement une exigence réglementaire, mais également un critère essentiel de l'assurance dela Qualité.

Actuellement, de nouvelles tendances et de nouveaux concepts scientifiques voient le jour pour faire progresser la validation des méthodes analytiques, avec l'émergence du profil de précision comme outil de décision. Ces nouveaux outils et concepts ont pour la plupart comme objectif commun de remettre les résultats obtenus au centre de la notion de validation analytique.

Les anciennes procédures de validation, plus orientées vers la qualité de l'analyse statistique, ne prennent pas suffisamment en compte le produit concerné, ses spécificités et laqualité des résultats qui seront finalement obtenus avec la méthode d'analyse validée **[13]**.

III.2 Définition de la validation analytique :

La validation est la confirmation par examen et apport de preuves objectives du fait que les exigences particulières en vue d'une utilisation prévue déterminée sont remplies [**25]**. La validation des méthodes analytiques est une étape fondamentale permettant aux laboratoires pharmaceutiques de se conformer aux exigences réglementaires lorsqu'ils remplissent un dossier d'Autorisation de Mise sur le marché (AMM) **[26].**

III.3 Contexte réglementaire :

Des directives sur la validation des méthodes analytiques sont fournies dans des publications comme les guidelines ICH, notamment le guideline ICH Q2 (R1) : « Validationof Analytical Procedures: Text and Methodology » **[27].** Le but de ces lignes directrices est de fournir des recommandations sur la manière d'appréhender les différentes caractéristiques de la validation pour chaque méthode analytique. En outre, le document fournit une indication sur les données qui devraient être présentées dans un dossier d'enregistrement. Ce guideline ICH est une exigence réglementaire ; toute validation de méthode analytique présentée dans un dossier d'AMM (Autorisation de Mise sur le Marché) doit répondre à ses exigences. Ces guides ont été élaborés dans le but d'aider les industries à valider leurs procédures analytiques en appliquant les recommandations réglementaires, dans le but d'obtenir une AMM **[28].**

Il existe également des publications ne constituant pas des exigences réglementaires, comme les guides de validation analytique de la SFSTP :

- SFSTP « Guide de validation analytique – Rapport d'une commission SFSTP »
  - ✓ Méthodologie, paru dans STP Pharma Prat. en 1992
  - ✓ Exemples d'application, paru dans STP Pharma Prat. en 1992

- SFSTP « Méthodes chromatographiques de dosage dans les milieux biologiques : Stratégie de validation. Rapport d'une commission SFSTP » paru dans STP Pharma Prat. en 1997
- SFSTP « Validation des procédures analytiques quantitatives : Harmonisation des démarches »
  - ✓ Généralités, paru dans STP Pharma Prat. en 2003 ;
  - ✓ Statistiques, paru dans STP Pharma Prat. en 2006 ;
  - ✓ Exemples d'application, paru dans STP Pharma Prat. en 2006 ;
  - ✓ Exemples d'application, paru dans Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis en 2008.

III.4 Objectifs d'une validation analytique :

La validation analytique vise principalement à démontrer la pertinence et la fiabilité d'une méthode par rapport aux exigences réglementaires et normatives actuelles. Elle garantit que chaque mesure à réaliser régulièrement respecte une limite d'acceptation appropriée au type de procédure d'analyse et au produit concerné. Il faut donc définir correctement à la fois les conditions et le but dans lesquels la méthode sera utilisée.

Ces principes s'appliquent à toutes les méthodes utilisées par un fabricant de médicaments, qu'elles soient ou non décrites dans une pharmacopée.

Les objectifs de la validation consistent non seulement à obtenir une estimation de la justesse, du biais ou de la fidélité de la méthode, mais également d'évaluer le risque statistique lié à son utilisation, qui peut être exprimé par l'incertitude de mesure associée au résultat.

Par rapport aux méthodes de validation classiques antérieures basées sur l'estimation des critères de validation tels que la justesse, la fidélité ou la linéarité, l'introduction du concept de profil d'exactitude représente une avancée pour l'évaluation de ce risque. L'idée principale derrière ce concept est qu'une procédure analytique peut être validée s'il est très probable, ou bien s'il existe un risque limité, que la différence entre chaque mesure x d'un échantillon et sa vraie valeur inconnue µ soit à l'intérieur de limites d'acceptabilité prédéfinies, selon les objectifs de la méthode. Il est alors possible de démontrer sans ambiguïté l'aptitude à l'emploi de cette méthode **[29]**.

III.5 Types de procédures analytiques :

Les différents types de procédures analytiques sont comme suit **[30]** :

- **Les identifications** qui permettent de confirmer l'identité d'une substance à analysercontenue dans un échantillon.
- **Les essais de pureté** qui peuvent être, soit des tests quantitatifs, soit des tests limitesportant sur les impuretés contenues dans un échantillon.
- **Les dosages** qui ont pour objet de mesurer la quantité de substances à analyser contenue dans un échantillon donné.

III.6 Validation des méthodes analytiques à l'industriepharmaceutique :

C'est en 1985 que l'industrie pharmaceutique et les autorités d'enregistrement américainne et européenne commencent à se préoccuper de formaliser les validations des procédures analytiques selon les guidelines ICH. Les guidelines ICH Q2(R1) représentent un projet d'harmonisation regroupant les autorisations réglementaires d'Europe, des États-Unis et du Japon ainsi que les représentants des industries pharmaceutiques de ces trois régions. Ils existent quatre (04) catégories de Guidelines ICH et chaque une d'entre elles, est repérée par un code :

- Catégorie Qualité : Code Q
- Catégorie Sécurité : Code S
- Catégorie Efficacité, Performance : Code E
- Catégorie Multidisciplinaire : Code M

On distingue quatre (04) catégories de Méthodes analytiques :

- **Catégorie I** : Procédure analytique de quantification d'un principe actif ou d'un conservateur ;
- **Catégorie II** : Procédure analytique de détermination des impuretés ;
- **Catégorie III** : Procédures analytique d'évaluation des caractéristiques de performances (dissolution,..) ;
- **Catégorie IV** : Tests d'identification.

III.7 Paramètres de la validation analytique :

Parmi les principaux paramètres de validation analytique, on peut citer ; la conformité système, la spécificité, l'intervalle de mesure, la linéarité, la fidélité, l'exactitude, la robustesse et la stabilité des solutions.

III.7.1. Conformité du système :

La conformité du système renseigne sur l'aptitude du système à effectuer l'analyse suivant les critères préétablis. Il sera mis en évidence en analysant 05 ou 06 fois la solution standard. Les paramètres à évaluer sont [**31**]:

- L'écart type relatif du signal pour les différentes lectures ou injections de la solution standard (Relatif Standard Déviation : RSD), la moyenne et l'écart type ;
- Le nombre de plateaux théoriques, le facteur de symétrie et la résolution.

III.7.2. Spécificité :

La spécificité d'une procédure d'analyse quantitative réside dans la possibilité d'établir sans équivoque l'existence de l'analyse en présence d'autres composants potentiellement présents. La spécificité de la méthode analytique à l'égard de l'analyse sera démontrée par l'étude de l'interférence du blanc et du placebo, par la préparation et l'analyse des différentes solutions suivantes :

- La phase mobile ;
- Le diluant ;
- La solution placebo ;
- La solution standard à 100% ;
- La solution essai.

Une procédure d'analyse est qualifiée de « spécifique » lorsqu'elle permet de s'assurer que le signal mesuré ne provient que de la substance à analyser ou qu'elle permet d'en mesurer quantitativement un paramètre physico-chimique ou un groupement fonctionnel d'une ou de plusieurs substance(s) dans l'échantillon **[32].**

La spécificité correspond au pourcentage des résultats négatifs constatés parmi les négatifs attendus. Dans tous les cas, la spécificité vise à évaluer la capacité de la méthode soumise à validation à ne pas donner de réponse quand la cible n'est pas présente **[33].**

III.7.3. Intervalle de mesure :

L'intervalle de mesure d'une procédure analytique est l'intervalle entre la concentration supérieure et inférieure de l'analyse dans l'échantillon pour lequel il a été prouvé que la procédure analytique présente un niveau souhaitable de fidélité, d'exactitude et de linéarité [**31**].

III.7.4. Linéarité :

La linéarité d'un procédé analytique est sa capacité dans l'intervalle étudié, à obtenir des résultats d'essai qui sont directement proportionnels à la concentration (quantité) de l'analyse dans l'échantillon. L'étude de la linéarité est en réalité une évaluation du biais d'exactitude. On distingue deux types de linéarité ; la linéarité sur standard et la linéarité sur placebo chargé **[32]**.

III.7.4.1 Linéarité sur standard :

La linéarité de la réponse au cours de la détection de l'analyte est démontrée par la préparation des solutions de l'analyte à l'intérieur d'un intervalle spécifié à partir de la concentration étudiée (minimum 05 niveaux de concentration). Ces solutions seront analysées au minimum trois fois et le signal provenant de ces solutions sera déterminé et consigné.

L'équation de la droite de la concentration relative au signal, le coefficient de corrélation ainsi que le biais seront déterminés.

La droite de régression signal en fonction de la concentration de l'analyte sera tracée. La pente **a** et l'ordonnée à l'origine **b** de la droite ainsi que le coefficient de corrélation **R** seront calculés et l'équation de la droite de régression sera établie.

Équation de la droite de régression : **Y= a X + b**

Avec: **Y:** signal mesuré

X: concentration de l'analyte en µg/ml

R: coefficient de corrélation

III.7.4.2 Linéarité sur placebo chargé :

La linéarité de la réponse pendant la détection de la substance à analyser est démontrée par la préparation de solutions placebo chargées dans une plage déterminée à partir de la concentration étudiée (minimum 05 niveaux de concentration). Ces solutions seront analysées au minimum 03 fois et le signal obtenu à partirde ces solutions sera déterminé et enregistré.

L'équation de la droite de la concentration en fonction du signal, le coefficient de corrélation ainsi que le biais seront déterminés. Si les critères d'acceptation sont satisfaits, la méthode est dite linéaire sur le standard et le placebo chargé dans l'intervalle de mesure **[31]**.

III.7.5. Fidélité :

La fidélité exprime l'étroitesse de l'accord entre une série de mesures issues de multiples prises d'un même échantillon homogène dans des conditions prescrites. La **figure III.1** représente schématiquement les notions de fidélité et de justesse **[34].** Elle s'exprime en de termes de coefficient variation provenant de diverses mesures **[29].**

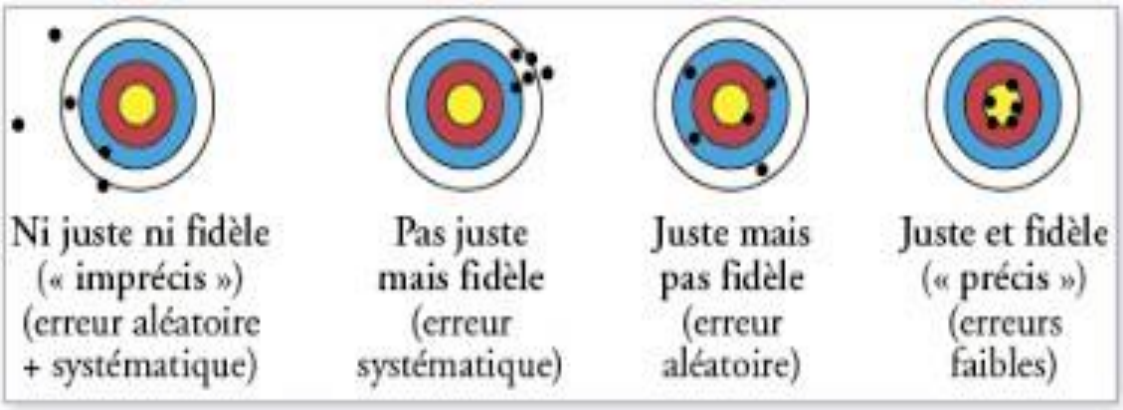


Figure III.1 : Représentation schématique des notions de fidélité et de justesse **[34].**

La fidélité peut être évaluée en fonction de trois critères ; la répétabilité exprimant la fidélité dans des conditions de fonctionnement identiques et sur un laps de temps réduit, la fidélité intermédiaire exprimant des variations intra-laboratoires : différentes journées, différents analystes, différents matériels…etc. et la reproductibilité exprimant la fidélité inter-laboratoire, et qui a la plus grande variabilité: différent fonctionnement, différents équipements, longue durée…etc. **[34].**

La répétabilité d'une méthode d'analyse montre la qualité de l'harmonie entre les mesures répétées effectuées sur le même échantillon dans des conditions constantes et déterminées **[28].** Les conditions de répétabilité sont :

- Même mode opératoire ;
- Même observateur ;
- Même instrument de mesure utilisé dans les mêmes conditions ;
- Même lieu, répétition durant une courte période de temps.

On peut dire que la répétabilité des résultats d'une mesure est la fidélité de la mesure sous des conditions de répétabilité **[32].** On estime la fidélité intermédiaire en répétant la série, dans le but de quantifier la contribution de cette source d'erreur sur la variabilité globale (maximiser les sources de variations dans un même laboratoire, dont différents techniciens, pour effectuer les répétitions). Le nombre minimal de séries est de 03, quel que soit le nombre de niveaux étudiés **[33].**

- **Cas du dosage, dosage unitaire et impuretés:**

Cette étude s'étalera sur 02 jours et requerra la participation de 02 manipulateurs (ou analystes) :

- Le manipulateur 01: préparera une série de 03 solutions du placebo chargées pour chacun des 03 niveaux de concentration de l'intervalle de mesure par jour (ex: 80%; 100%, 120%).
- Le manipulateur 02: préparera une série de 03 solutions du placebo chargées pour chacun des 03 niveaux de concentration de l'intervalle de mesure par jour (ex : 80%,100%, 120%).

On obtient 06 séries de 03 résultats chacune par jour.

- **Cas de la dissolution :**

Cette étude s'étalera sur 02 jours et requerra la participation de 02 manipulateurs (ou analystes) :

-Manipulateur 01: préparera une série de 06 solutions échantillon ou du placebo chargée à 100% par jour. (Jour 1)

-Manipulateur 02: préparera une série de 06 solutions échantillon ou du placebo chargée à 100% par jour. (Jour 2).

Si la répétabilité et la fidélité intermédiaire sont démontrées, la méthode sera dite fidèle [**31**].

III.7.6 Exactitude:

Le dosage d'un produit fini doit fournir des résultats très étroits à la réalité. Les critères d'acceptation seront établis en fonction des caractéristiques du produit à analyser. On déterminera l'exactitude (ou justesse) en comparant une valeur de concentration théorique à la valeur expérimentale. En général exprimé sous forme de % de recouvrement. Cette évaluation devra être confirmée sur 09 préparations minimum (en général 03 préparations sur 03 niveaux) en recouvrant la gamme de validation **[36].**

L'exactitude = | Valeur de référence - Moyenne des % de recouvrement |

III.7.7 Stabilité des solutions :

Les solutions concernées par l'étude de stabilité sont la solution standard et la solution échantillon. Chaque solution doit être préparée en trois exemplaires, le résultat de stabilité à un moment t pour une condition déterminée sera la moyenne arithmétique des 03 réplicas. Il convient d'étudier la stabilité de ces solutions pendant une période moyenne de 03 jours (temps moyen de validation analytique) et sous les conditions suivantes **[37]** :

1. Stabilité dans le carrousel de la chaîne HPLC ;
2. Stabilité à température ambiante ;
3. Stabilité au réfrigérateur (2 à 8 °C).

La dégradation ou l'évaporation éventuelle des solutions sera évaluée par la variation de la concentration des composés étudiés. Une diminution de concentration témoigne d'une dégradation. La comparaison sera faite par rapport à des solutions standard fraîchement préparées.

Le standard de quantification doit être préparé en double, le facteur de similarité doit être compris entre 0 ,99 – 1,01. Cette exigence est requiert afin d'attribuer la différence de concentration des solutions analysées à la dégradation réelle des composés (ou à une évaporation des solutions) et non pas aux variations tolérées dans la préparation des solutions **[32].**

Expression des résultats de la stabilité des solutions :

A. Stabilité des solutions dans le carrousel et Stabilité à température ambiante :

Pour chaque temps d'analyse, on définit le pourcentage de variation X,exprimé par la formule ci-dessous :

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

Avec :

$\mathbf{A_0}$: signal dû à l'analyte au temps initial.

$\mathbf{A_t}$: signal dû à l'analyte au temps t.

B. Stabilité des solutions au réfrigérateur

Pour ces conditions de stabilité, le pourcentage de dégradation Dt. L'évaporation de solutions n'est pas envisageable car les fioles contenant les solutions soumises à l'étude devront être hermétiquement fermées **[26]**.

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

Avec :

$\mathbf{C_0}$: Concentration de l'analyse au temps initial en mg/ml.

$\mathbf{C_t}$: Concentration de l'analyte au temps t en mg/ml.

$\mathbf{C_t}$ 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.

$$C_t = \frac{A_t \ [(C_{std\ 1}/A_{std\ 1}) + (C_{std\ 2}/A_{std\ 2})]}{2}$$

Avec :

$C_{std\ 1}$ et **$C_{std\ 2}$** : 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).

III.7.8 La robustesse :

La robustesse étudie l'influence des petites variations qui peuvent survenir aléatoirement en laboratoire. La présente étude indique donc qu'une méthode est plus ou moins sensible aux risques pouvant perturber les conditions d'utilisation d'une méthode.

On étudie la robustesse en simulant intentionnellement de légères variations de plusieurs paramètres (une variation à la fois). A titre d'exemple, nous étudions la variation légère d'une longueur d'onde, d'un pH, d'une phase mobile ou d'une température de colonne.

Partie expérimentale

CHAPITRE IV

Matériel et méthodes

Objectif :

L'objectif de notre travail de recherche est l'étude de la validation analytique de la méthode de dosage du Chlorpromazine HCL dans le produit fini chlorpromazine 25mg/5ml fabriqué aux laboratoires FRATER-RAZES.

Le but de la validation analytique de ce médicament est de démontrer que la méthode de dosage du produit fini chlorpromazine 25mg/5ml est appropriée à son utilisation.

Pour réaliser ce projet de fin d'étude, nous avons bénéficié d'in stage pratique de courte durée (03 semaines) au niveau des Laboratoires FRATER-RAZES à Alger qui nous a permis de côtoyer le milieu professionnel industriel dans le domaine pharmaceutique, d'instaurer l'esprit d'équipe de recherche et de maîtriser l'utilisation des appareils d'analyse ainsi que les techniques de mesures des différents tests de validation d'une méthode de dosage d'un médicament par Chromatographie en phase liquide.

IV.1. Présentation du produit Chlorpromazine, solution injectable à 25mg/5ml

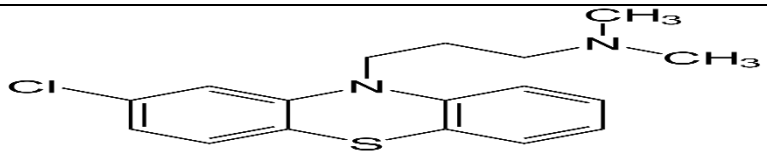
La Chlorpromazine est historiquement le premier médicament antipsychotique. La composition qualitative de la solution injectable Chlorpromazine à 25mg/5ml développée par le laboratoire FRATER RAZES est donnée par le **tableau IV.1** suivant :

Tableau IV.1 : Composition qualitative de la solution injectable Chlorpromazine à 25mg/5ml

Constituant	**Rôle du constituant**
Chlorpromazine HCL	Principe actif
Chlorure de sodium	Agent isotonique
Métabisulfite de Sodium	Antioxydant
Citrate de sodium	Agent tampon
Acide ascorbique	Antioxydant
Sodium sulfite	Conservateur
EPPI	Solvant

Les propriétés physico-chimiques et pharmacologiques du principe actif Chlorpromazine sont résumées dans le **tableau IV.2** ci-dessous :

Tableau IV.2 : Propriétés physico-chimiques

DCI	Chlorpromazine Chlorhydrate
Structure chimique	$C_{17}H_{19}ClN_2S$
formule de chlorpromazine	
Poids moléculaire Chlorpromazine HCL	355,3 g/mol
Monographie	EP, Édition courante
Masse molaire Chlorpromazine	318,86 g/mol
Biodisponibilité	de 10 à 70 %
Demi-vie d'élimination	16 à 30 heures.
Aspect	Est une poudre cristalline blanche
Solubilité	Facilement soluble dans l'éthanol à 96% et très soluble dans l'eau.

Sachant que la Chlorpromazine est très sensible à la lumière, le produit fini injectable à 25mg/5ml est conditionné dans des ampoules en verre ambré.

IV.2. Matériel et équipements :

Les équipements utilisés lors de notre expérimentation sont comme suit (cf. **Annexe 1**) :

- Balance analytique de marque « Sartorius » ;
- HPLC Waters e2695 « Alliance » ;
- pH mètre « Seven Excellence » ;
- Bain à Ultrasons « Tierratech » ;
- Dispositif de filtration sous vide ;
- Agitateur magnétiques.

Le petit matériel de laboratoire et la verrerie utilisée pour notre de travail expérimental est donnée ci-dessous :

- Fioles ;
- Pipettes automatiques (avec embouts jetables);
- Béchers ;
- Eprouvettes ;
- Erlen Meyer ;
- Barreaux magnétiques [2];
- Parafilm, Spatules,…etc.

IV.3. Réactifs utilisées :

Pour procéder à la validation analytique du produit injectable Chlorpromazine à 25 mg/5 ml, nous avons utilisé plusieurs réactifs chimiques (cf. liste ci-dessous).

- Méthanol ;
- Acétonitrile ;
- Triéthylamine ;
- Acide perchlorique.

IV.4. Principe et appareillage de la HPLC

Principe de la technique d'analyse HPLC :

La chromatographie liquide haute performance est une technique utilisée pour séparer des composés chimiques dans un mélange. Son principe repose sur la séparation de ces composés dans une colonne contenant du gel de silice, appelée phase stationnaire par pompage d'un solvant, appelée phase mobile, à travers la colonne selon l'affinité unique de chaque composant existant entre la phase mobile et stationnaire. Les composés migrent le long de la colonne à différentes vitesses et ressortent à différents temps, établissant ainsi une séparation du mélange. Les composés qui ont une grande affinité envers la phase mobile migrent plus rapidement vers le bas de la colonne, tandis que ceux qui ont une grande affinité envers la phase stationnaires migrent lentement **[38].**

Appareillage :

Un système chromatographique est composé d'un soluté (éluant, substrat), d'une phase mobile (éluant, solvant) et d'une phase stationnaire (Support).

Nous avons utilisé l'appareil HPLC de marque Waters qui se compose d'un détecteur UV-Visible de marque waters 2489, connecté à un ordinateur pour le traitement des données, d'un module de marque Waters 2695 qui fait l'injection automatique, d'une pompe à deux pistons, d'une électrovanne, d'un dégazeur, d'un four dans le quel se trouve une colonne (250 mm × 4,6 mm) avec une phase stationnaire C (5 µm) Thermo C18.

Principe de fonctionnement :

Au départ, le mélange à séparer est déposé en une couche mince au sommet d'une colonne, là où s'entasse la phase stationnaire sous forme de particules de petite taille. L'échantillon à analyser est poussée par un débit élevé de la phase mobile, ce qui entraîne une augmentation de la pression dans le système. Ainsi, le mélange à séparer se déplace progressivement vers le haut, à grande vitesse et sous une très forte pression.

En descendant, ils tendent à se séparer quand ils atteignent l'extrémité inférieure de la colonne. A cet endroit, la phase mobile traverse un dispositif de détection qui permet de déceler la présence des composés dans la phase mobile, et de tracer un chromatogramme (évolution des pics à une longueur d'onde donné dans UV-visible, en fonction du temps). Les pics obtenus sont plus étroits, donc la séparation de la solution est améliorée. Le seuil de détection est également plus bas. La **figure IV.1** montre le principe de fonctionnement d'un appareil HPLC **[39].**

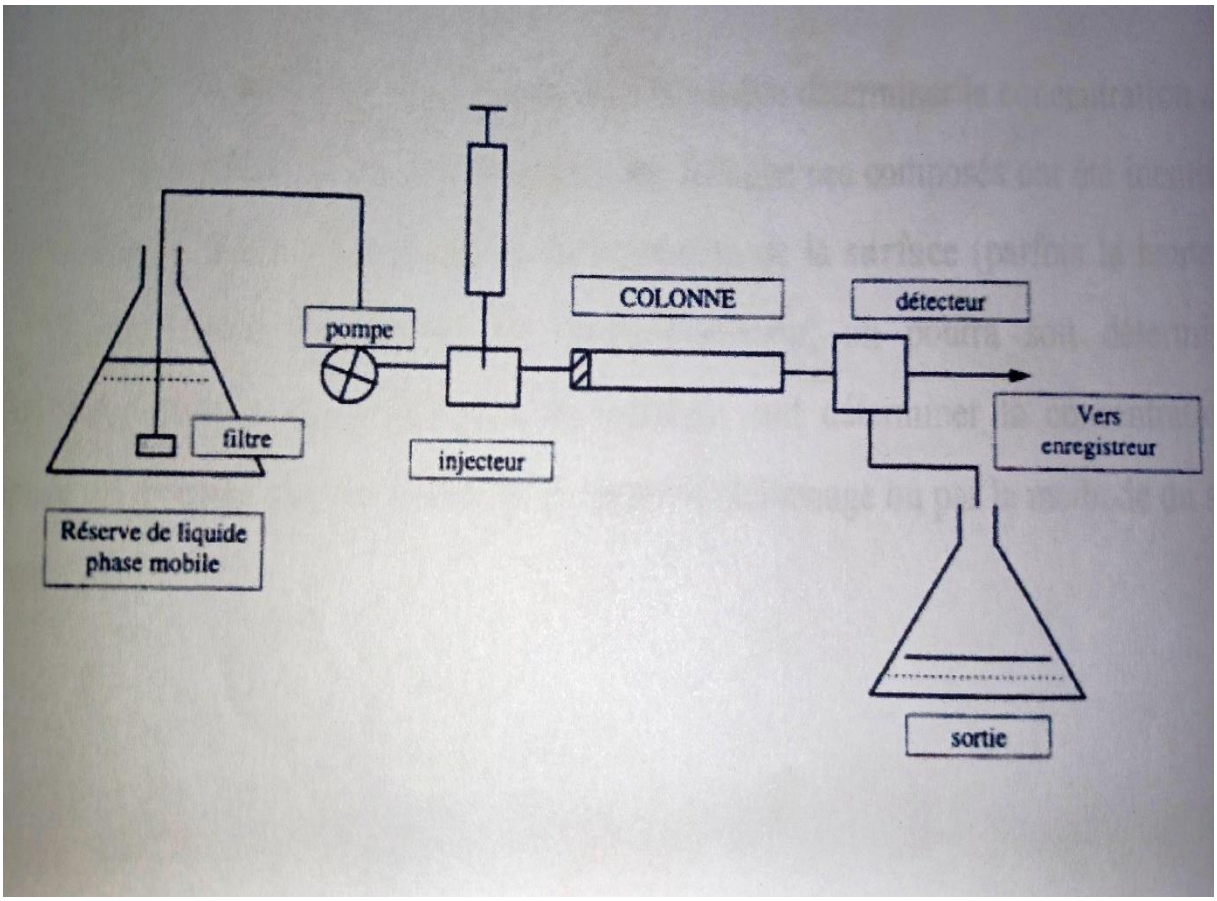


Figure IV.1 : Principe de fonctionnement d'un appareil HPLC

IV.5. Description de la procédure de validation analytique de la méthode de dosage du Chlorpromazine à 25mg/5ml :

La validation analytique de la méthode de dosage du principe actif dans le produit fini chlorpromazine 25mg/5ml a été réalisée selon la procédure interne de validation analytique en vigueur au niveau des Laboratoires Frater Razes.

La validation de la méthode de dosage de la chlorpromazine dans le produit fini chlorpromazine, solution injectable à 25mg/5ml a porté sur les paramètres suivants :

- Conformité système ;
- Spécificité ;
- Intervalle de mesure ;
- Linéarité ;
- Fidélité (répétabilité, fidélité intermédiaire) ;
- Exactitude ;
- Stabilité des solutions ;
- Robustesse.

Le dosage du principe actif dans le produit fini a été réalisé par Chromatographie en Phase Liquide (HPLC) à l'aide d'un Chromatographe « Alliance – Waters ». Les conditions opératoires de l'analyse chromatographique sont résumées comme suit :

- Colonne : 250×4,6 mm C18 ou équivalent (150×4,6 mm C18)
- Longueur d'onde : 220 nm – 254nm
- Débit : 1,0ml/min – 1,3 ml/min
- Volume d'injection : 5 µl

La préparation des solutions nécessaires pour l'analyse chromatographique des échantillons du standard, du placebo et du produit fini Chlorpromazine injectable à 25mg/5ml est donnée ci-dessous :

- **Phase mobile**
    - Méthanol : 35%
    - L'eau ultra purifiée : 35%
    - Acétonitrile : 30%
    - Triéthylamine : 0,1%

Après avoir réalisé le mélange (Méthanol /l'eau ultra purifiée / Acétronitrile / Triéthylamine), ajuster le pH à 3,5 avec l'acide phosphorique.

- **Standard A** :

Le standard A est préparé à l'aide d'une pesée de 56,0 mg de chlorpromazine hydrochloride dissoute dans 100 ml de phase mobile.

- **Standard B** :

Le standard B est préparé à l'aide d'une pesée de 56,0 mg de chlorpromazine hydrochloride dissoute dans 100 ml de phase mobile.

- **Préparation de la solution placebo :**

La solution placebo est composée de 25,0 mg de sodium metabisulfite, 15,0 mg de sodium sulfite anhydre et 50,0 mg d'acide ascorbique, dissous dans 50,0 ml d'eau ultra purifiée.

- **Solution essai :**

La solution essaie est préparée à l'aide de 5,0 ml de solution injectable dissoute dans 50,0 ml de phase mobile.

La procédure pour le dosage des standards et de l'échantillon est donnée par le **tableau IV.3** ci-dessous :

Tableau IV.3 : Injection des préparations

Ordre d'injection	**Nom de solution**	**Nombre de préparation par solution**	**Nombre d'injection**
1ere	Standard A	1	5
2eme	Standard B	1	1
3eme	Solution essai	2	1
4eme	Placebo	1	1

IV.6. Méthodologie de la validation analytique

- **Test de conformité système :**

La conformité du système de la méthode est intégrée pour qualifier chaque essai. Les tests doivent répondre aux critères de conformité du système pour être considères comme valides. Les critères d'acceptation de conformité du système sont récapitulés comme suit :

- Le facteur de similarité (Fs) doit être compris entre 98,0% et 102,0%
- RSD des 05 injections du standard A ≤ 2,0%
- Facteur de symétrie du pic principal < 2,0%
- Le nombre de plateaux théoriques sera fixé durant la validation analytique, en analyse de routine il sera exigé que les valeurs pour ce paramètre soient ≥ 50% de celle trouvée en validation.

- **Test de spécificité :**

Dans les résultats obtenus à partir du blanc et du placebo, il ne doit y avoir aucune interférence avec chlorpromazine, l'interférence par rapport au signal de la solution standard doit être ≤ 2,0 %

- **Test de linéarité et intervalle de mesure :**

Le biais moyen doit être compris entre 95% à 105,0%. Le coefficient de corrélation R doit être ≥ 0,99. Les **tableaux IV.4** et **IV.5** donnés en **annexe 2** récapitulent la procédure d'analyse de la gamme de linéarité sur le standard et sur le placebo chargé.

- **Test de fidélité (répétabilité, fidélité intermédiaire) :**

Pour la répétabilité, le RSD des facteurs de recouvrement pour les 06 préparations de la solution essai doit être inférieure ou égale à 2,0 %. Pour la fidélité intermédiaire, le RSD intermédiaire et RSD total doivent être inférieures ou égal à 2,0%.

- **Test d'exactitude :**

L'exactitude doit être inférieure ou égale à 2,5%. Pour réaliser la gamme fidélité/ exactitude nous avons procédé à la préparation des solutions de fidélité à 80%, 100% et 120% selon l'intervalle de mesure sur placebo chargé :

- **Solution placebo chargés à 80% :**

Dans une fiole de 50,00 ml, peser exactement 22,4 mg de Chlorpromazine HCL et ajouter 5,0 ml de placebo. Agiter et mettre dans un bain à ultrasons pour une dissolution complète puis compléter au volume avec la phase mobile.

- **Solution placebo chargés à 100% :**

Dans une fiole de 50,0 ml, peser exactement 28,0 mg de Chlorpromazine HCL et ajouter 5,0 ml de placebo. Agiter et mettre dans un bain à ultrasons pour une dissolution complète puis compléter au volume avec la phase mobile.

- **Solution placebo à 120% :**

Dans une fiole de 50,0 ml, peser exactement 33,6 mg de Chlorpromazine HCL et ajouter 5,0 ml de placebo. Agiter et mettre dans un bain à ultrasons pour une dissolution complète puis compléter au volume avec la phase mobile.

- **Test de stabilité des solutions :**

Ce paramètre a pour objectif de dégager les conditions et la durée de stabilité des différentes solutions analysées. Les solutions concernées par l'étude sont la solution standard et l'échantillon du produit fini étudié. Chacune de ces solutions doit être préparée en triple, le résultat de stabilité à un temps t pour une condition donnée sera la moyenne arithmétique des 3 répétitions. La stabilité de ces solutions devrait être étudiée pour une durée moyenne de 3 jours.

L'écart type relatif du signal pour les 05 injections de la solution standard 100% ≤ 2,0%. Trois (03) types de stabilité sur les solutions ont été réalisés sur les solutions préparées :

- Stabilité dans le carrousel de la chaîne HPLC ;
- Stabilité à température ambiante ;
- Stabilité au réfrigérateur (2 °C - 8°C).

Les solutions ont été préparées comme suit :

A. Stabilité dans le carrousel de la chaîne HPLC :

Le standard est fraichement préparé à l'aide d'une pesée de 56,0 mg de Chlorpromazine HCL dissoute dans 100,0 ml phase mobile.

B. Stabilité à température ambiante :

Le standard est fraichement préparé à l'aide d'une pesée de 56,0 mg de Chlorpromazine HCL dissoute dans 100,0 ml phase mobile.

C. Stabilité au réfrigérateur (2°C - 8°C)

Un standard préalablement préparée à l'aide d'une pesée de 56,0 mg de Chlorpromazine HCL dissoute dans 100.0 ml phase mobile sera injecté après 24 heures, 48 heures et 72 heure**s.** Un autre standard fraichement préparé à l'aide d'une pesée de 56,0 mg de Chlorpromazine HCL dissoute dans 100,0 ml phase mobile sera injecté dans l'immédiat. La procédure de réalisation des essais de stabilité est décrite selon le schéma présenté par la figure **IV.2.**

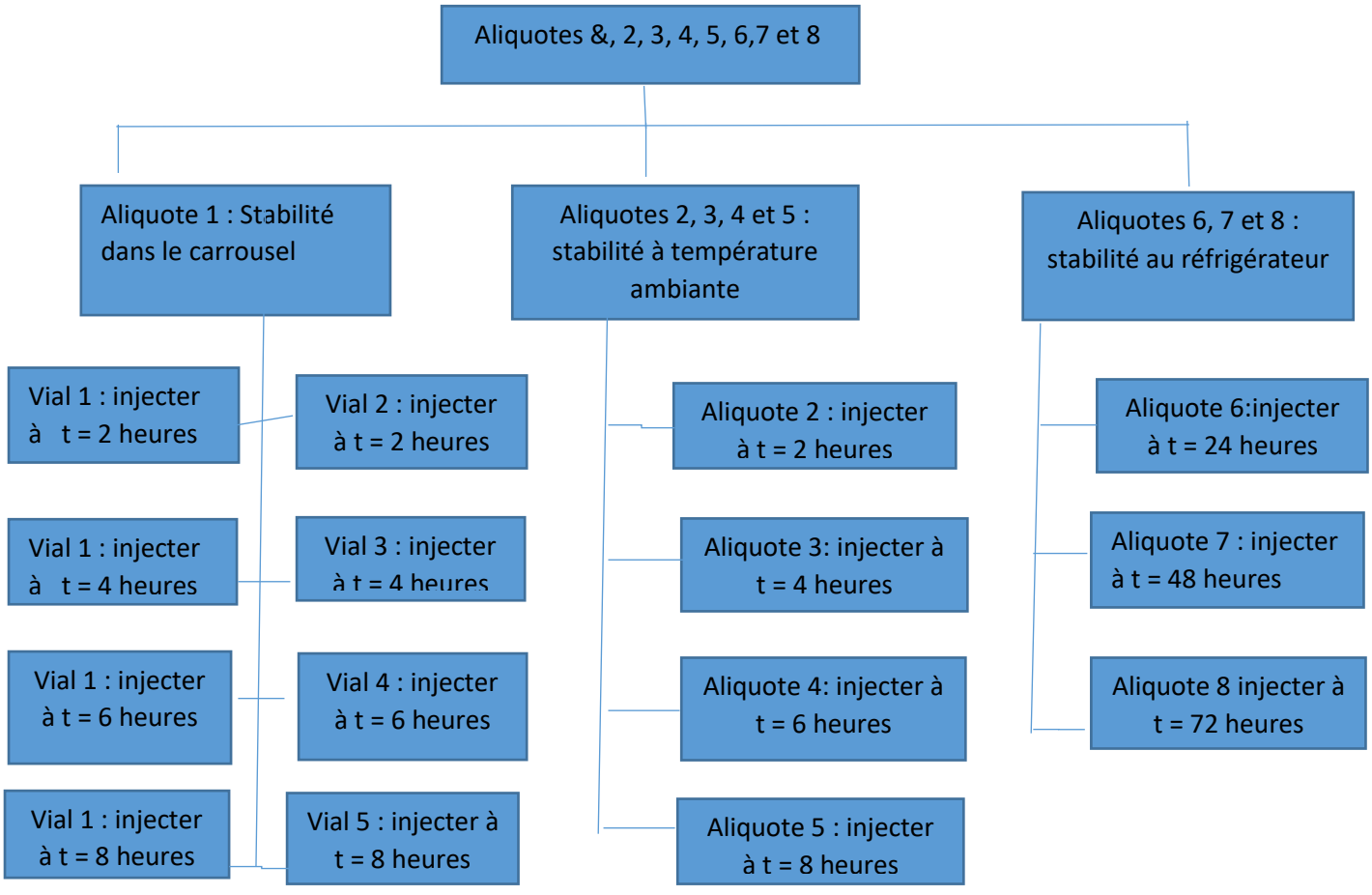


Figure IV.2 : Procédure de réalisation des essais de stabilité

- **Robustesse :**

La robustesse est la capacité du protocole de rester non affecté par les variations faibles mais délibérément introduites dans les paramètres de la méthode; fournit une indication sur sa fiabilité dans des conditions normales d'utilisation (variation de phase, colonne). L'écart type relatif du signal pour les 05 injections de la solution standard 100% ≤ 2,0%. Les conditions opératoires de ce test sont comme suit :

Variation de la longueur d'onde :

- **Débit :** 1,3ml/min ;
- **Colonne :** 250*4,6 mm ; 5 mm ; C18 ;
- **Détection :** spectrophotomètre à 254 nm ;
- **Volume d'injection :** 5 ml ;
- **Températures de l'échantillon :** ambiante ;
- **Temps d'injection :** 6 min.

Variation du débit :

- **Colonne :** 250*4,6 mm ; 5 mm ; C18 ;
- **Débit :** 1,0 ml/min ;
- **Détection :** spectrophotomètre à 254 nm ;
- **Volume d'injection :** 5 ml ;
- **Températures de l'échantillon :** ambiante ;
- **temps d'injection :** 6 min.

Variation de la colonne HPLC et du débit :

- **Colonne :** 150*4,6 mm ; 5 mm ; C18 ;
- **Débit :** 1,0 ml/min ;
- **Détection :** spectrophotomètre à 254 nm ;
- **Volume d'injection :** 5 ml ;
- **Températures de l'échantillon :** ambiante ;
- **Temps d'injection :** 6 min.

IV.7 : Programme de validation analytique :

Pour l'ensemble des tests de la validation analytique du principe actif dans le produit fini chlorpromazine 25mg/5ml a été réalisée selon le programme illustré sur le **tableau IV.6** suivant :

Tableau IV.4 : Programme de la validation analytique produit injectable Chlorpromazine 25mg/5ml

Jour	Paramètre	Solution à préparer	Nombre de préparation	Nombre d'injection
1	Conformité du système	blanc	1	1
		Solution placebo	1	1
	Spécificité	Solution de standard à 100%	2	5 et 1
		Solution essai	1	1
	Linéarité	Solution standard à 80% de PA	1	3
		Solution standard à 90% de PA	1	3
	Intervalle de mesure	Solution standard à 100% de PA	1	3
		Solution standard à 110% de PA	1	3
		Solution standard à 120% de PA	1	3
		Solution placebo chargé à 80% de PA	1	3
		Solution placebo chargé à 90% de PA	1	3
		Solution placebo chargé à 100% de PA	1	3
		Solution placebo chargé à 110% de PA	1	3
		Solution placebo chargé à 120% de PA	1	3
	Fidélité / Exactitude : Répétabilité	Solution de standard à 100%	2	5 et 1

2	-Fidélité intermédiaire j 1 - Intervalle de mesure	Solution fidélité à 80% de PA M1	3	1
		Solution fidélité à 100% de PA M1	3	1
		Solution fidélité à 120% de PA M1	3	1
		Solution fidélité à 80% de PA M2	3	1
		Solution fidélité à 100% de PA M1	3	1
		Solution fidélité à 120% de PA M2	3	1
3	Fidélité intermédiaire j 2	Solution de standard à 100% fraîchement préparé	2	5 et 1
		Solution fidélité à 80% de PA M1	3	1
		Solution fidélité à 100% de PA M1	3	1
		Solution fidélité à 120% de PA M1	3	1
		Solution fidélité à 80% de PA M2	3	1
		Solution fidélité à 100% de PA M2	3	1
		Solution fidélité à 120% de PA M2	3	1
4	- Stabilité des Solutions (à T ambiante / frigo) après 24H, 48H, 72H	Solution standard à 100%	2	5 et 1
	- Robustesse	Solution essai fraîchement préparé	3	1

CHAPITRE V

Résultats et discussion

V.1. Test de conformité système :

Les résultats expérimentaux de l'étude de la validation analytique du produit fini Chlorpromazine à 25mg/5ml, obtenus pour le test de conformité sont récapitulés sur le **Tableau V.1** suivant :

Tableau V.1 : Résultats expérimentaux de la validation analytique du test de conformité système.

Paramètre de validation	**Résultats**	**Critères d'acceptation**
Conformité du système	-RSD de la Chlorpromazine = 0,5%	-Écart type relatif du signal pour les 05 injections de la solution standard 100% ≤ 2,0%.
	-Nombre de plateaux théoriques = 3,86 * 10^3.	-Le nombre de plateaux théoriques sera fixé durant la validation analytique, en analyse de routine. Il sera exigé que les valeurs pour ce paramètre soient supérieures ou égale à 50% de celle trouvée en validation.
	-Facteur de symétrie = 1,33%.	-Le facteur de symétrie doit être ≤ 2,0%.

- **Observations et interprétations :**

D'après les résultats regroupés dans le **Tableau V.1** ci-dessus, le système paraît conforme pour la Chlorpromazine à 25 mg/ 5 ml dans la méthode à λ = 220 nm, ce qui implique que le système est apte à effectuer les analyses.

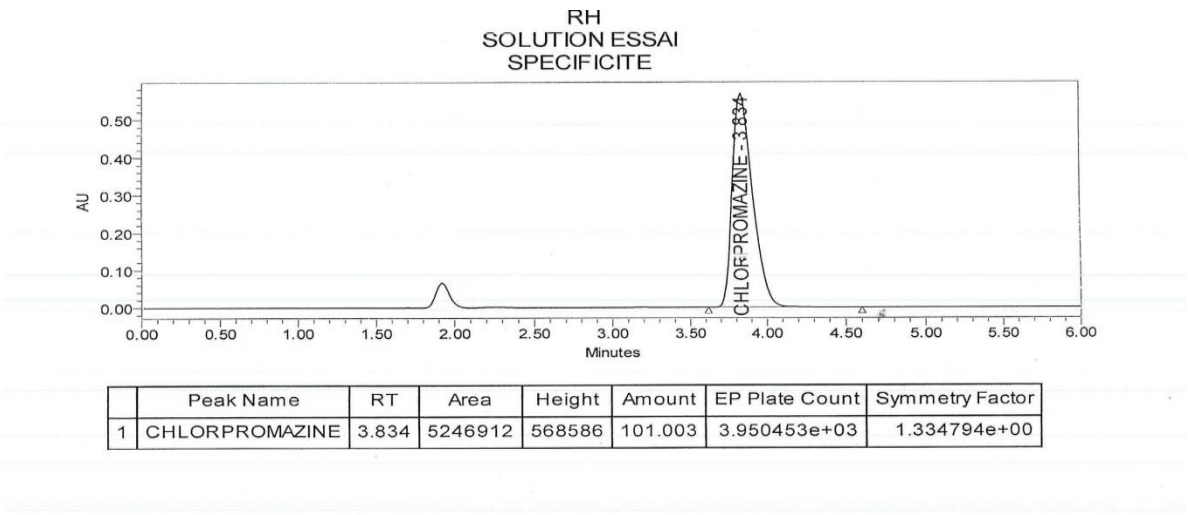
V.2. Spécificité :

Les résultats expérimentaux de l'étude de la validation analytique du produit fini Chlorpromazine à 25mg/5ml, obtenus pour le test de spécificité sont récapitulés sur le **Tableau V.2**suivant :

Tableau V.2 : Résultats expérimentaux de la validation analytique du Chlorpromazine 25 mg/5 ml pour le test de spécificité.

Paramètre de validation	Résultat	Critères d'acceptation
Spécificité	Dans les résultats obtenus à partir du blanc, et du placebo, il n'y a eu aucune interférence entre la Chlorpromazine le blanc et le placebo.	Dans les résultats obtenus à partir du blanc et du placebo, il ne doit y avoir aucune interférence avec Chlorpromazine. L'interférence par rapport au signal de la solution standard doit être ≤ 2,0%.

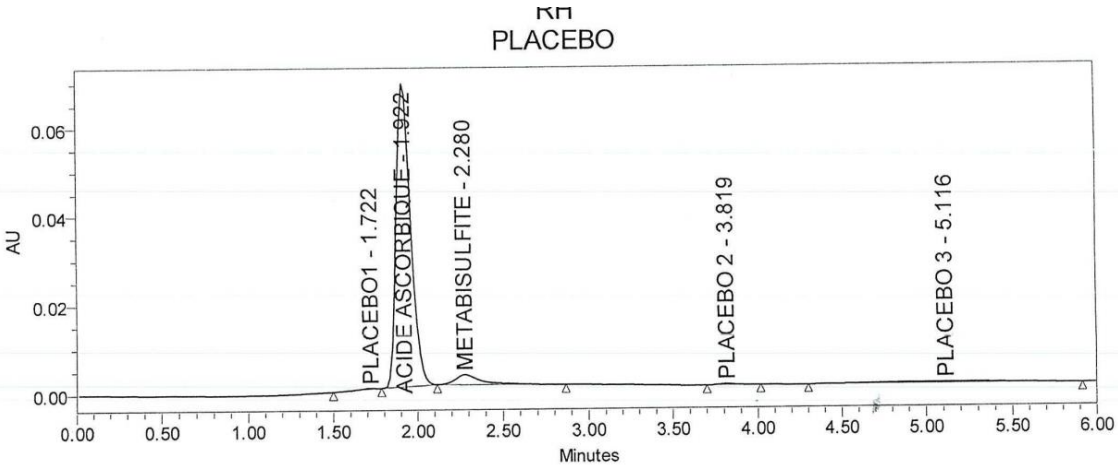
Dans la **Figure V.1** ci-dessous présente le résultat de l'analyse chromatographique de la solution essai concernant la spécificité :



	Peak Name	RT	Area	Height	Amount	EP Plate Count	Symmetry Factor
1	CHLORPROMAZINE	3.834	5246912	568586	101.003	3.950453e+03	1.334794e+00

Figure V.1 : Chromatographe de la solution essai (Spécificité).

Dans la **Figure V.2** présente le résultat d'analyse chromatographique de la solution placebo concernant la spécificité :



	Peak Name	RT	Area	Height
1	PLACEBO1	1.722	1471	225
2	ACIDE ASCORBIQUE	1.922	407092	68495
3	METABISULFITE	2.280	25164	2270
4	PLACEBO 2	3.819	2018	286
5	PLACEBO 3	5.116	17987	315

Figure V.2 : Analyse Chromatographique de la solution placebo concernant la spécificité.

- **Observations et interprétations:**

D'après les résultats obtenus à partir du blanc, et du placebo, nous constatons qu'il n'y aucune interférence avec la Chlorpromazine. Ce qui permet de conclure que cette méthode est spécifique.

V.3.Linéarité :

Dans le **Tableau V.3,** nous résumons les résultats expérimentaux obtenus pour le test de la linéarité réalisé sur le standard et sur le placebo chargé lors de la validation analytique du produit fini Chlorpromazine à 25 mg/5 ml.

Tableau V.3: Résultats expérimentaux de la validation analytique du Chlorpromazine 25 mg/5 ml pour le test de la Linéarité.

Paramètre de validation	**Résultats**	**Critères d'acceptation**
Linéarité sur standard et intervalle de mesure	R(Chlorpromazine)= 0,999%. Le biais moyen (Chlorpromazine)=100%.	Le coefficient de corrélation R doit être $\geq$ 0,99%. Le biais moyen doit être compris entre 95% à 105%.
Linéarité sur placebo chargé et intervalle de mesure	R(Chlorpromazine) = 0,999% Le biais moyen (Chlorpromazine) = 99,98%.	Le coefficient de corrélation R doit être $\geq$ 0,99%. Le biais moyen doit être compris entre 95% à 105%.

Les résultats du **Tabelau V.3** ci-dessus, nous ont permis de tracer une droite de régression de la linéarité en traçant la courbe représentative des surfaces des pics du principe actif dans le standard et dans le placebo chargé en fonction de sa concentration **(Figure V.3 et V.4)**. La pente **a**, l'ordonnée à l'origine **b** de la droite ainsi que le coefficient de corrélation R sont calculés et l'équation de la droite de régression est établie.

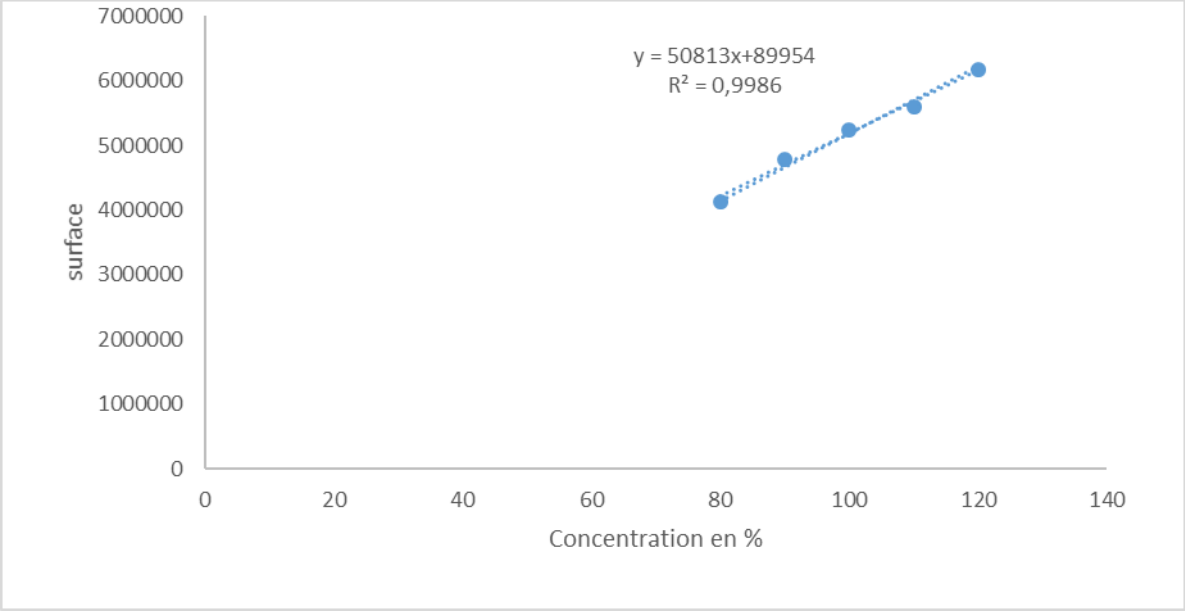


Figure V.3 : Linéarité et intervalle de mesure (Standard).

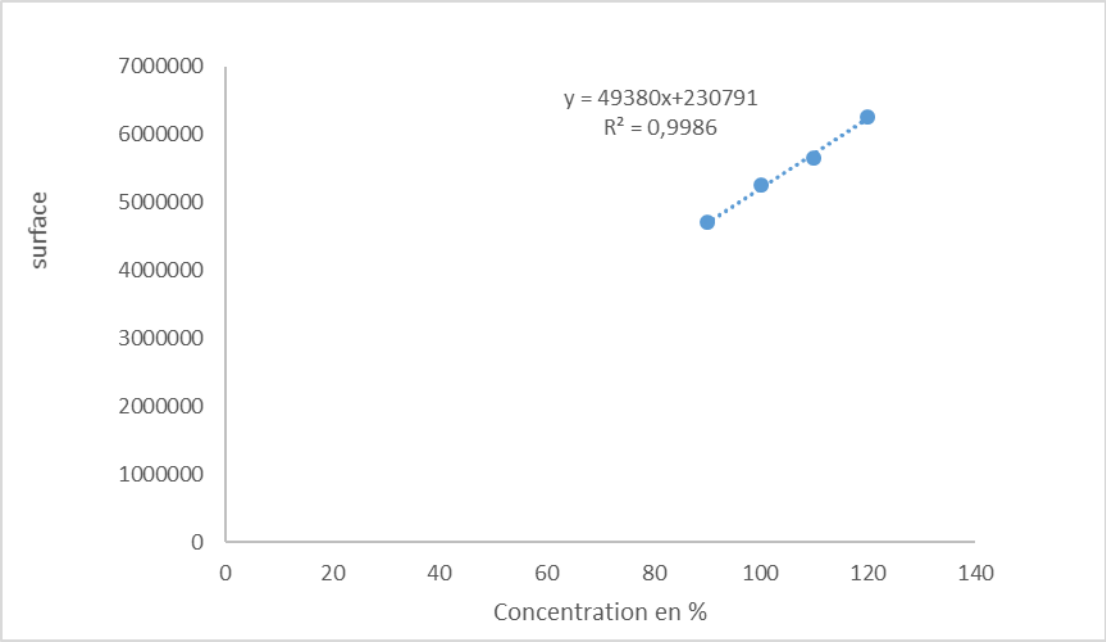


Figure V.4 : Linéarité et intervalle de mesure (Placebo chargé).

- **Observations et interprétations :**

La courbe obtenue dans la **Figure V.3** est linéaire et ne passe pas par l'origine (y=50813 x + 89954). En utilisant les données de la droite de régression, nous avons calculé le coefficient de corrélation (R) = 0,999301 et le coefficient de régression(R^2) = 0,998603.

La courbe obtenue dans la **Figure V.4** est linéaire et ne passe pas par l'origine (y= 49380 x + 230791). En utilisant les données de la droite de régression, nous avons calculé le coefficient de corrélation (R) = 0,999282 et le coefficient de régression(R^2) = 0,998564.

Les résultats expérimentaux obtenus lors du test de la linéarité sur le standard et sur le placebo chargé se trouvent en accord avec les spécifications établies, par conséquent la méthode dans l'intervalle étudié est linéaire.

En effet, les courbes illustrées par les **Figures V.3** et **V.4** (cf .**Annexe 4**) montrent une linéarité des données, marquée par un bon ajustement des valeurs avec la droite, ceci est prouvé par les coefficients de corrélation de principe actif 0,998 et placébo chargé 0,999 qui sont proche de 1, ce qui permet de déduire que le modèle linéaire est acceptable pour le dosage chromatographique de la Chlorpromazine 25 mg/5 ml à λ = 220 nm.

Le biais moyen est compris entre 95,0 % et 105,0 % ; ce qui permet de dire que les paramètres sont satisfaisantes.

V.4. Fidélité :

Dans le **Tableau V.4** suivant regroupent les résultats expérimentaux obtenus pour le test de la fidélité donnés par la répétabilité et la fidélité intermédiaire.

Tableau V.4 : Résultats expérimentaux de la Fidélité.

Fidélité	Résultats	Critères d'acceptation
Répétabilité	-RSD =1,2 %.	-Le RSD des facteurs de recouvrement pour les 6 préparations de la solution d'essai doit être ≤ à 2,0%.
Fidélité intermédiaire	-RSD intra (A1J1, 80%)=0,9% -RSD intra (A1J1, 100%)=0,7% -RSD intra (A1J1, 120%)=0,2% -RSD intra (A2J1, 80%)=1,1% -RSD intra (A2J1, 100%)=1,0% -RSD intra (A2J1, 120%)=0,7% -RSD intra (A1J2, 80%)=1,2% -RSD intra (A1J2, 100%)=0,3% -RSD intra (A1J2, 120%)=0,4% -RSD intra (A2J2, 80%)=0,1% -RSD intra (A2J2, 100%)=0,0% -RSD intra (A2J2, 120%)=0,4% -RSD inter (80%)=0,6% -RSD inter (100%)=0,8% -RSD inter (120%)=0,1% -RSD total= 0,5%	-Le RSD intra, RSD inter et RSD total doivent être inférieurs ou égal à 2,0%.

- **Observations et interprétations :**

D'après les résultats de la fidélité exprimés par la mesure de la répétabilité et de la fidélité intermédiaire, les RSD intra, RSD inter et RSD total sont inférieurs à 2,0%. Ce qui montre que les résultats sont conformes aux normes exigées. Nous pouvons alors juger que la méthode de dosage chromatographique de la chlorpromazine à 25mg/5ml (λ= 220 nm) est fidèle.

V.5. Exactitude :

Les résultats expérimentaux obtenus pour l'exactitude de la validation analytique du Chlorpromazine à 25 mg/5 ml sont regroupés dans le **Tableau V.5** ci-dessous.

Tableau V.5: Résultats expérimentaux obtenus pour le test de l'Exactitude.

Paramètre de validation	Résultats	Critères d'acceptation
Exactitude	-Exactitude = 0,1% -Limite inférieure =98,9% -Limite supérieure=101,3%	-L'exactitude doit être ≤ 2,5%. -La valeur de référence (100%) doit être comprise entre la limite supérieure et la limite inférieure.

● **Observations et interprétations:**

D'après les résultats obtenus, nous pouvons juger que la méthode de dosage chromatographique à 220 nm est exacte pour le produit fini Chlorpromazine 25 mg/5 ml.

V.6. Stabilité des solutions :

Le **Tableau V.6** regroupe les résultats expérimentaux obtenus pour le test de la stabilité des solutions du Chlorpromazine 25 mg/5 ml dans le carrousel, à Température ambiante et au réfrigérateur de 2 à 8 °C.

Tableau V.6 : Etude de la stabilité des solutions.

Paramètre	Résultats	Critères d'acceptation
Stabilité des solutions dans le carrousel	**-(X) dans le carrousel :** 2H = 0,166% 4H = 1,12% 6H= 1,673% 8H= 3,68%	**Stabilité dans le carrousel/ Température ambiante:** -Le pourcentage de variation(x) doit être ≤ 2,0% -Le pourcentage de dégradation (Dt) doit être ≤ 2,0%
A une T° ambiante	**-(X) à une T° ambiante :** 2H =0,25% 4H = 1,436% 6H= 0,99% 8H = 3,548%	
Au réfrigérateur	**-(Dt) à une T°= (2-8) °C:** 24H = 0,67% 48H= 0,807% 72H = 0,344%	

● **Observations et interprétations :**

D'après les résultats obtenus, nous remarquons que les vials non perforées sont stable jusqu'à06 heures, par contre les vials perforées sont moins stables avec une durée qui ne dépasse pas les 04 heures. En revanche, les solutions dans le réfrigérateur sont stables jusqu'à 72 heures.

V.7. Robustesse :

Le **Tableau V.7** regroupe les résultats expérimentaux de la Robustesse de la validation analytique du Chlorpromazine 25 mg/5 ml.

Tableau V.7 : Résultats expérimentaux obtenus pour le test de la Robustesse.

Paramètre	Résultats	Critères d'acceptation
Robustesse	-**RSD** =0,6%.	Écart type relatif du signal pour les 5 injections de la solution standard 100% ≤ 2,0%.

- **Variation de colonne :**

Le **Tableau V.8** se regroupe les résultats expérimentaux obtenus par le standard A pour le changement de la colonne du critère Robustesse.

Tableau V.8 : Changement de colonne pour le standard A.

Standard A	Surface
1	1927843
2	1928049
3	1902519
4	1912533
5	1823984
Moyenne	1918985,7
% RSD	0,6 %
Pesée	78,6 mg

Le **Tableau V.9** regroupe les résultats expérimentaux obtenus par le standard B pour le changement de la colonne du critère Robustesse.

Tableau V.9 : Changement de la colonne pour le standard B.

Standard B	
Pesée	79,3
Surface	1938641

L**e facteur de similarité Fs** de la Chlorpromazine obtenu avec le changement de la colonne, est égal à 99,87%.

Le **Tableau V.10** regroupe les résultats expérimentaux du standard B obtenus avec le changement de la colonne du critère Robustesse.

Tableau V.10 : Changement de la colonne pour la solution essai.

Solution essai	
Surface	1997525
Dosage	104,339 %

- **Variation de la longueur d'onde :**

Le **Tableau V.11** regroupe les résultats expérimentaux du standard A obtenus avec le changement de la longueur d'onde lors de la mesure du critère Robustesse.

Tableau V.11 : Changement de la longueur d'onde.

Standard A	**Surface**
1	11311178
2	11241150
3	11214096
4	11222520
5	11248020
Moyenne	**11247393**
% RSD	0,3 %
Pesée	28,1 mg

Le **Tableau V.12 regroupe** les résultats expérimentaux du standard A obtenus avec le changement de la longueur d'onde lors de la mesure du critère Robustesse.

Tableau V.12 : changement de longueur d'onde pour standard B.

Standard B	
Surface	11021991
Peser	28,0 mg

Le **facteur de similarité Fs** de la Chlorpromazine obtenu avec le changement de la longueur d'onde est égal à 101,68%.

Le **Tableau V.13** regroupe les résultats expérimentaux obtenus pour de la solution essai avec le changement de la longueur d'onde lors de la mesure du critère Robustesse.

Tableau V.13 : Changement de longueur d'onde pour la solution essai.

Solution essai	
Surface	110464593
Dosage	99,0 %

- **Variation de la longueur d'onde et du débit :**

Le **Tableau V.14** regroupe les résultats expérimentaux obtenus pour le standard A avec le changement de la longueur d'onde et du débit lors de la mesure du critère Robustesse.

Tableau V.14 : Changement de longueur d'onde et du débit pour le standard A.

Standard A	**Surface**
1	14149229
2	14203362
3	14179350
4	14174308
5	14182791
Moyenne	**14177808**
RSD %	0,1 %
Pesée	28 mg

Le **Tableau 15** regroupe les résultats expérimentaux obtenus par le standard B avec le changement de la longueur d'onde et du débit lors de la mesure du critère Robustesse

Tableau V.15 : Changement de longueur d'onde et du débit pour le standard B.

Standard B	
Surface	14454259
Pesée	28,1 mg

Le f**acteur de similarité Fs** de la Chlorpromazine obtenu avec le changement de la longueur d'onde est égal à 101,68%.

Le **Tableau V.16** regroupe les résultats expérimentaux obtenus par le dosage de la solution essai avec le changement de la longueur d'onde et du débit lors de la mesure du critère Robustesse.

Tableau V.16 : Changement de longueur d'onde et du débit pour la solution essai.

ESSAI	
Surface	14002881
Dosage	99,2 %

- **Variation du débit :**

Le **Tableau V.17** regroupe les résultats expérimentaux obtenus par le standard A avec le changement du débit pour le critère robustesse.

Tableau V.17 : Changement du débit pour le standard A.

Standard A	**Surface**
1	6807800
2	6825780
3	6838761
4	6820926
5	6829899
Moyenne	**6824633**
RSD %	**0,2 %**
Pesée	**28,0 mg**

Le **Tableau V.18** regroupe les résultats expérimentaux du standard Ben ce qui concerne le changement du débit pour le critère robustesse.

Tableau V.18 : Changement du débit pour le standard B.

Standard B	
Pesée	28,1 mg
Surface	6987002

Le **facteur de similarité Fs** de la Chlorpromazine obtenu avec le changement de la longueur d'onde il est égal à 98,02%.

Le **Tableau V.19** regroupe les résultats expérimentaux obtenus par le dosage de la solution essai avec variation du débit lors de la mesure du critère Robustesse.

Tableau V.19 : Changement du débit pour la solution essai.

Solution essai	
Surface	6734944
Dosage	99,2 %

- **Observations et interprétations :**

L'étude de la robustesse a montré que la méthode est robuste pour le changement des paramètres étudiés ; à savoir la longueur d'onde, la colonne et de débit.

Conclusion :

Vu que les résultats obtenus de l'ensemble des paramètres étudiés (Conformité système, spécificité, fidélité, exactitude…) satisfont aux critères d'acceptation, nous concluons que la méthode de dosage de la chlorpromazine est validée pour le produit fini chlorpromazine 25 mg/5ml, fabriqué par les Laboratoire FRATER-RAZES.

Conclusion générale

Conclusion générale

La validation analytique est reconnue comme indispensable à la gestion de la qualité dans l'industrie pharmaceutique. Dans notre travail, nous nous sommes intéressées à la validation analytique du dosage d'un principe actif d'une préparation injectable à base d'un psychotrope « Chlorpromazine » par la technique d'analyse de Chromatographie en phase Liquide à Haute Performance (HPLC).

La validation de la méthode de dosage d'un principe actif par HPLC, concerne la vérification des critères de spécificité, de linéarité, de fidélité, de l'exactitude, de stabilité et de robustesse.

Les résultats obtenus lors de notre travail de recherche ont montrés que la méthode est spécifique pour le principe actif Chlorpromazine, présente un profil linéaire valide, fidèle et exacte. Les résultats de répétabilité et de reproductibilité des essais sont valides, ce qui implique que la méthode est précise.

En outre, les résultats trouvés dans l'application au produit fini de la méthode du dosage sont adéquats, ce qui confirme l'étude de validation de la méthode de dosage d'analyse.

D'après les résultats obtenus par l'étude de stabilité des solutions, nous remarquons que la solution injectable étudiée est stable jusqu'à 06 heures à température ambiante et jusqu'à 72 heures au réfrigérateur.

Nous concluons que la méthode de dosage de la chlorpromazine est validée pour le produit fini Chlorpromazine, solution injectable à 25 mg/5ml, fabriquée aux Laboratoires FRATER-RAZES.

Références bibliographiques

Références bibliographiques

[1] Agence Française de sécurité sanitaire des produits de santé. Bonne pratique de fabrication. Paris : Bulletin officiel,2009. P.143. Vol.2009/ 9 bis.

[2] Arling E.R.2004. Beyond GMPs :The latest approaches to good manufacturing practices.The BioPharm International Guide.2004, pp. 26-25.

[3] Rachel STOEHR, Les médicaments psychotropes, Psychiatrie et Santé mentale, PSYCOM guide médicament, édition 2014.

[4] Les laboratoires FRATER-RAZES – Notre savoir nourrit votre santé.

[5] Jean DELEY, Définition psychotrope, dictionnaire médical, 1957.

[6] Dr. Emna JAOUED, Dr. Hana ZIDI, Dr. Maroua CHEKIR, médicaments psychotropes, Docteurs en Pharmacie de la faculté de Pharmacie de Monastir, année 2016/2017.

[7] Vincent RICHARD, Antipsychotiques, fiche de PHARMACO médical, mise à jour le 13 mai 2022.

[8] Sujet: 63 Schizophrénie, cours De Résidanat**,** N° Validation: 0663202221, Mai 2022.

[9] M. Robin, Luc, CHARRETEUR, Le Mésusage des antipsychotiques de seconde génération : une approche à l'aide de la base mondiale de pharmacovigilance, VigiBase™ , THÈSE POUR LE DIPLÔME D'ÉTAT DE DOCTEUR EN PHARMACIE, Université Aix Marseille, le 12 Octobre 2018.

[10] Les neuroleptiques Centre hospitalier Léon Binet, PROVINS.2004.

[11] Apo-Chlorpromazine, Quels sont les effets secondaires possibles de ce médicament? Santé chez nous.

[12] Philosophiæ doctor (PhD). Marcel-Louis Viallard MD, Bases de pharmacologie, université Sorbonne Paris

[13] Charifa BOUDOUH, étude sur les produits stériles liquides injectables, Master professionnel en pharmacie industrielle, Université Blida 1, Promo 2013/2014.

[14] Les formes pharmaceutiques, cours de pharmacologie, le 06 Janvier 2006.

[15] Les préparations parentales, cours, département pharmacie, Université de Batna 2.

[16] Dr Sarra ABBAD, les préparations injectables, Département de pharmacie, Université Abu Bekr Belkaid Tlemcen, slideplayer.

[17] Dr Anne Emmanuelle FAGOUR, Pharmacien des hôpitaux, Les préparations injectables, Cours IFSI U.E. 2.11.S1, le 03 Novembre 2015.

[18] Les formes pharmaceutiques, cours de pharmacologie, le 06 Janvier 2006.

[19] Pharmacopée Européenne 10ème édition.

[20] Largactil® banque d'image et photos, alamy.

[21] Posologie et mode d'administration, LARGACTIL® 25 mg/5 ml, solution injectable en ampoule de 5 ml, santé magazine, source de données base Claude Bernard, le 7 Juin 2021.

[22] Dans quel cas le médicament LARGACTIL® est-il prescrit ? Gamme de médicament LARGACTIL®, l'intelligence médicale au service du soin, le 22 Mars 2022.

[23] Ayoub BENSEKHRIA, la toxicité des médicaments neuroleptiques, Analytical Toxicology, le 13 Décembre 2014.

[24] Fiche de validation de la substance active (Chlorpromazine).

[25] Michèle DÉSENFANT, Marc PRIEL et Cédric RIVIER, Validation de méthode, Évaluation des incertitudes des résultats d'analyse, exigences de la norme ISO/CEI 17025, le 10 déc. 2005, relu et validé le 01 Juillet 2018.

[26] Saad BELABDA, validation analytique d'une méthode de dosage de l'atorvastatine, thèse de pharmacie, Université Mohammed V Rabat, le 03 Mai 2021.

[27] Note for guidance on validation of analytical procedures: Text and methodology. ICH Q2 (R1) Validation of Analytical Procedures: Text and Methodology, CPMP/ ICH/ 381/ 95,
European Medicines Agency, Juin 1995.

[28] Karima AIT TALEB, Messaouda BELLIK, Validation d'une méthode de dosage du bisoprolol fumarate dans des comprimés de 5 mg par hplc, master chimie pharmaceutique, Université Mouloud Mammeri Tizi-ouzou, le 12 Octobre 2017.

[29] ISABELLE PINGUET, Thèse n°55 pour l'obtention du diplôme d'état de docteur en pharmacie, Validation analytique : application de la procédure SFSTP 2003- 2006 au domaine de la phytothérapie, université de bordeaux u.f.r des sciences pharmaceutiques, le 29 Mai 2015.

[30] Dr. L.AZZOUZ, Validation des méthodes analytiques, Conférences 5eme année pharmacie, Laboratoire de Chimie Analytique, Département de Pharmacie, Faculté de Médecine de Blida, 2019-2020.

[31] Mr Khalil HASSAM, la validation des méthodes analytiques dans les industries pharmaceutiques, selon les guidelines ICH Q2(R1), le 18 Janvier 2017.

[32] Nacéra MIMOUN, Nawel SARAOUI, Validation analytique d'une méthode de dosage du diclofénac de sodium dans les suppositoires à 100 mg par HPLC. Application de la démarche harmonisée, en vue de l'obtention du diplôme de Docteur en Pharmacie, Université Mouloud MAMMERI Faculté de médecine Tizi-Ouzou, Le 23 juin 2016.

[33] Guide de validation des méthodes d'analyses, Anses – Pôle Recherche et Référence, le 28 octobre 2015.

[34] Dr BOUTARAA, Notions de répétabilité et reproductibilité de la mesure Justesse et de Fidélité, Cours de Métrologie, Faculté de Génie Civil et d'Architecture, Université Hassiba Benbouali Chlef, le Février 2020.

[35] JF Perrin, Les définitions VIM de fidélité, répétabilité, reproductibilité, Justesse, fidélité (répétabilité, reproductibilité) de mesure, Définitions ISO 3534-1 et (5725-1), 2004/2020.

[36] Leslie LEFEBVRE, la validation des méthodes analytiques selon les guidelines ICH, efor healthcare, le 20 Février 2020.

[37] Protocole de validation de la méthode de dosage du Chlorpromazine 25 mg/ 5 ml.

[38] Y. Shen, R.D. Smith, Electrophoresis, High performance liquid Chromatography, TELEDYNE ISCO, 2008.

[39] S. Lindsay, high performance liquid Chromatography, acol. London, (1987) P 244.

Annexes

Annexe 1 Méthodologie de validation analytique du produit chlorpromazine 25mg/5ml

Gamme de linéarité sur standard :

Dans une fiole de 50.0 ml, peser selon le niveau de linéarité l'intervalle de mesure (80 à 120%) du principe actif suivant le tableau ci-après, complétez au volume avec la phase mobile.

Tableau IV.4: Linéarité sur standard

	Intervalle de mesure	Chlorpromazine
Linéarité sur standard	80 %	22.4 mg
	90%	25.2 mg
	100%	28.0 mg
	110%	30.8 mg
	120%	33.6 mg

Gamme de linéarité sur placebo chargé :

Dans une fiole de 50 ml, peser selon le niveau de linéarité (80 à 120%) du principe actif et suivant le tableau ci-après, dissoudre et ajouter 5.0 ml du placebo puis compléter au volume avec la phase mobile.

Tableau IV.5: linéarité sur placébo chargé

	Intervalle de mesure	**Chlorpromazine**
Linéarité sur placebo chargé	80 %	22.4 mg
	90%	25.2 mg
	100%	28.0 mg
	110%	30.8 mg
	120%	33.6 mg

Annexe 1 Méthodologie de validation analytique du produit chlorpromazine 25mg/5ml

Stabilité des solutions :

La lecture de la procédure se fait selon le **tableau IV.6** suivant :

N°	Concentration de l'échantillon	Nombre de préparation à partir du même échantillon	Nombre de lecture
1	Standard fraîchement préparée	02	05 et 01
2	Standard préalablement préparée (24h/ 48h / 72h)	01	03
3	Solution essai fraîchement préparée	01	01

- Le facteur de similarité entre le standard fraîchement préparé et le standard préalablement préparé doit être compris entre 0.99-1.01
- Cette exigence est requise afin d'attribuer la différence de concentration des solutions analysées à la dégradation réelle des composés ou à une évaporation des solutions

Remarque : Chacune des solutions standard et placebo chargé 100% ou échantillon est fractionnée en 01 à 08 aliquote (en fonction du plan de travail) notés de 01 à 08 et injectés selon le diagramme présenté dans le chapitre « Matériel et méthodes ».

Annexe 2 : Équipements utilisés

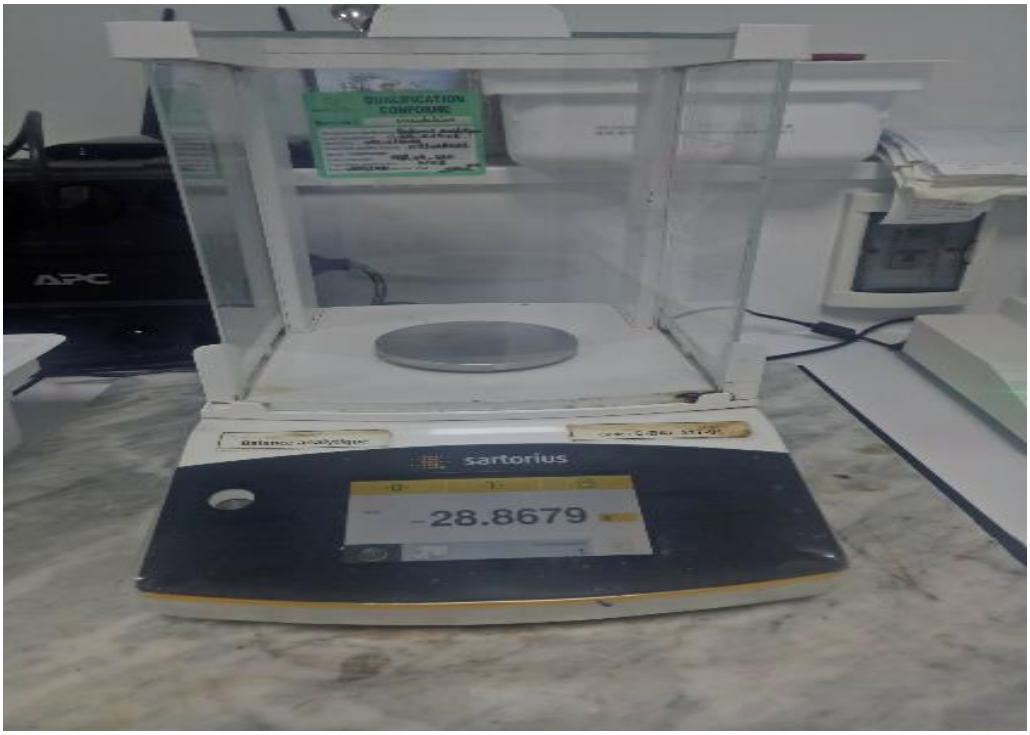


Figure 1 : Balance analytique de marque « Sartorius ».

Figure 2 : Appareil de l'HPLC pour injection automatique Waters e2695 « Alliance ».

Annexe 2 : Équipements utilisés

Figure 3 : pH mètre « Seven Excellence ».

Figure 4 : Bain à Ultrasons « Tierratech »

Annexe 2 : Équipements utilisés

Figure 5 : Colonne C18.

Annexe 3 : Conformité système

Chromatogramme du critère de conformité système

Préparation du Chlorpromazine à l'échelle laboratoire

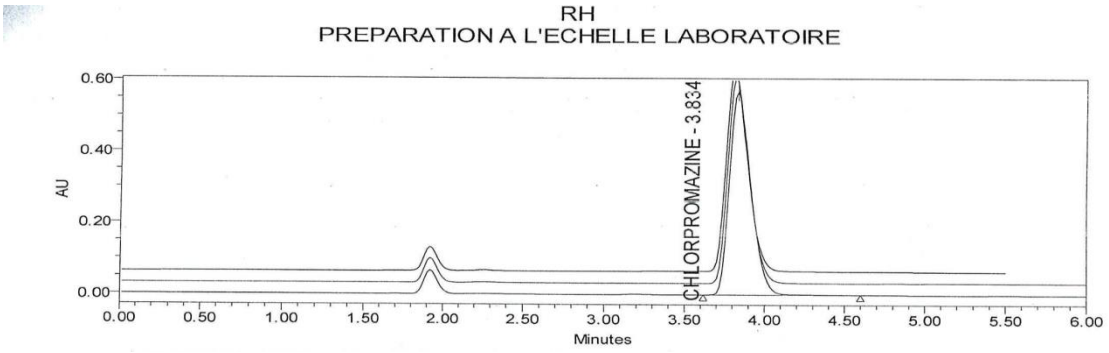


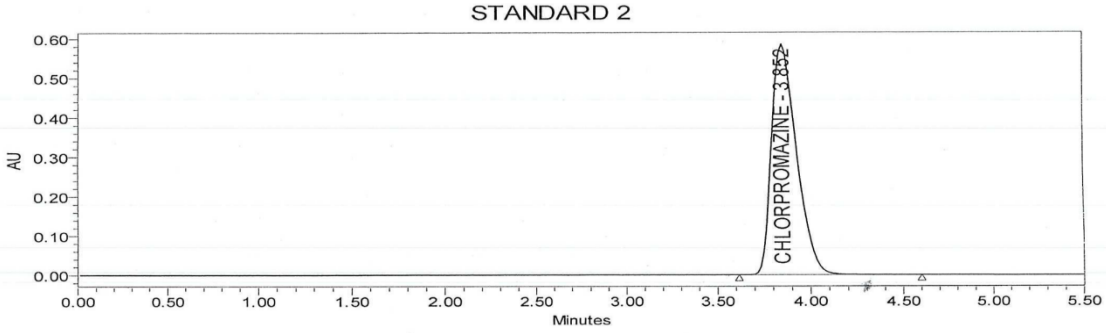
Tableau 1 : Résultats des pics :

Peak Results

	Name	RT	Area	Height	Amount	Units	SampleName
1	CHLORPROMAZINE	3.813	5187075	564345	99.851	%	E1 SOLUTION FRECH PREP
2	CHLORPROMAZINE	3.822	5308593	578153	102.191	%	E3 PREP A LECH LAB
3	CHLORPROMAZINE	3.834	5246912	568586	101.003	%	E2 PREP A LECH LAB
Mean					101.0		
% RSD					1.2		

Chromatogramme du critère de conformité système

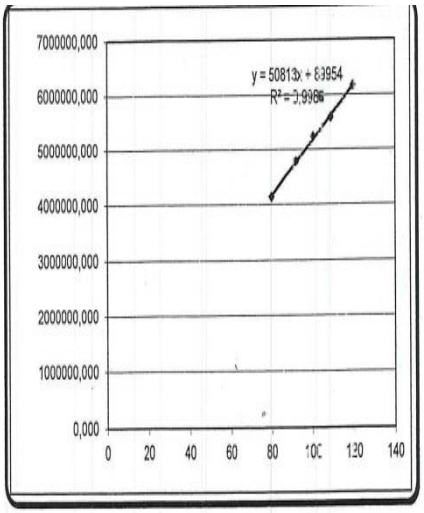
standard 2



	Peak Name	RT	Area	Height	EP Plate Count	Symmetry Factor
1	CHLORPROMAZINE	3.852	5466246	585521	3.869952e+03	1.331587e+00

Annexe 4 : Linéarité et intervalle de mesure

Concentration theorique (Xi) en %	Concentration réelle (Xi réel) en %	Signal (Yi)	Moyenne (Yi)	Xi'	Bj	Biais moyen (%)
80	80	4133372,000	4135389,333	79,57	99,47	100,00
		4135719,000		79,62	99,53	
		4137077,000		79,65	99,56	
90	92,14	4774598,000	4782547,667	92,19	100,06	
		4781466,000		92,33	100,20	
		4791579,000		92,53	100,42	
100	100,375	5237002,000	5233128,000	101,29	100,92	
		5227015,000		101,10	100,72	
		5235367,000		101,26	100,88	
110	108,928	5600664,000	5593092,667	108,45	99,56	
		5582858,000		108,10	99,24	
		5595756,000		108,35	99,47	
120	119,6428	6234588,000	6167327,333	120,93	101,07	
		6141226,000		119,09	99,54	
		6126168,000		118,79	99,29	

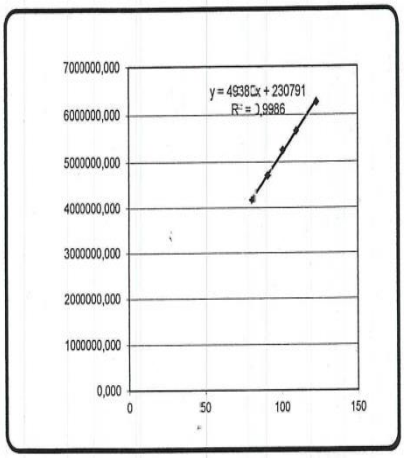


Y= a X + b

a	50813,087613
b	89953,668580
R	0,999301
R^2	0,998603

Figure 1 : Linéarité et intervalle de mesure (Standard).

Concentration theorique (Xi) en %	Concentration réelle (Xi réel) en %	Signal (Yi)	Moyenne (Yi)	Yi calculé par la droite de linearité du Placebo chargé	Yi calculé par la droite de linearité du Principe actif	Bi (%)	Biais moyen (%)
80%	80,357	4167392,000	4174605,667	4198853,820	4173140,950	100,62	99,99
		4177331,000		4198853,820	4173140,950	100,62	
		4178494,000		4198853,820	4173140,950	100,62	
90%	90,714	4700391,000	4705286,667	4710286,847	4699412,098	100,23	
		4690378,000		4710286,847	4699412,098	100,23	
		4725391,000		4710286,847	4699412,098	100,23	
100%	100,71428	5308920,000	5251240,333	5204104,891	5207557,202	99,93	
		5270891,000		5204104,891	5207557,202	99,93	
		5173910,000		5204104,891	5207557,202	99,93	
110%	109,642857	5557264,000	5553168,333	5645001,788	5661245,767	99,71	
		5558819,000		5645001,788	5661245,767	99,71	
		5552422,000		5645001,788	5661245,767	99,71	
120%	122,85714	6297576,000	6263475,000	6297528,655	6332704,287	99,44	
		6258505,000		6297528,655	6332704,287	99,44	
		6249344,000		6297528,655	6332704,287	99,44	



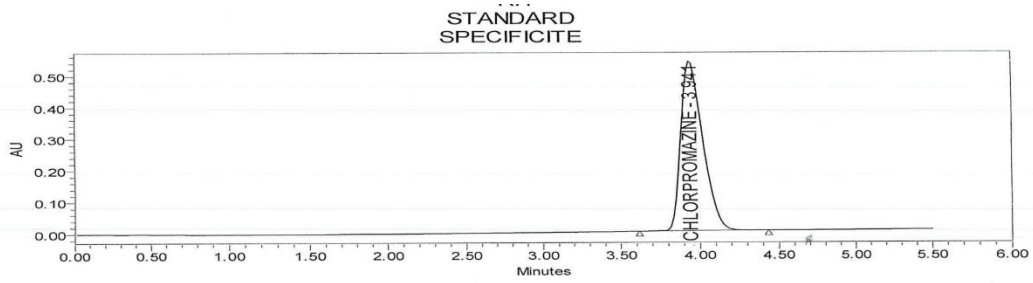
Y= a' X + b'

a'	49380,421665
b'	230791,274322
R	0,999282
R^2	0,998564

Figure 2: Linéarité et intervalle de mesure (Placebo chargé).

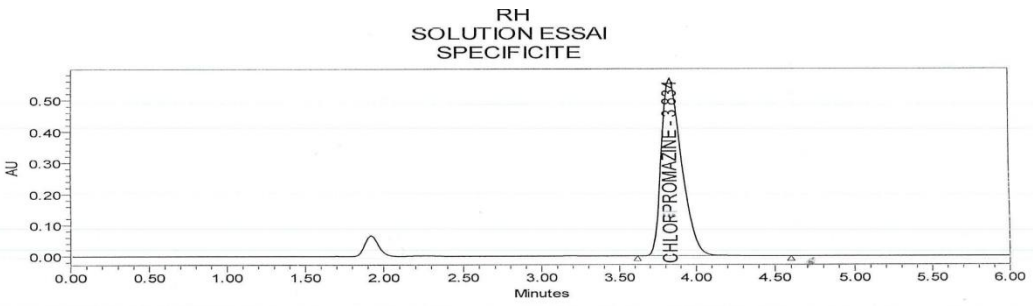
Annexe 5 : Spécificité

Chromatogramme du critère de spécificité pour le standard



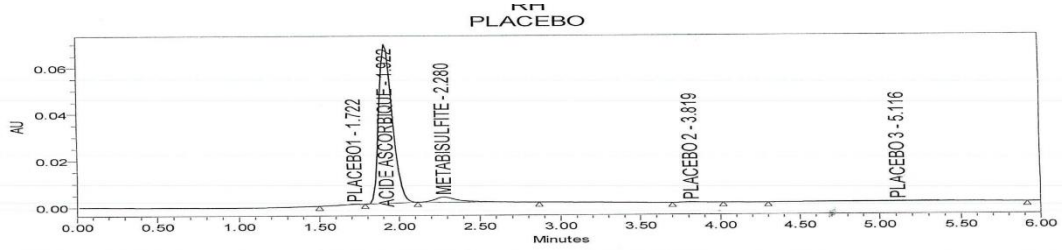
	Peak Name	RT	Area	Height	Amount	EP Plate Count	Symmetry Factor
1	CHLORPROMAZINE	3.941	5142292	541053	99.766	3.841486e+03	1.336862e+00

Chromatogramme du critère de spécificité pour la solution essai



	Peak Name	RT	Area	Height	Amount	EP Plate Count	Symmetry Factor
1	CHLORPROMAZINE	3.834	5246912	568586	101.003	3.950453e+03	1.334794e+00

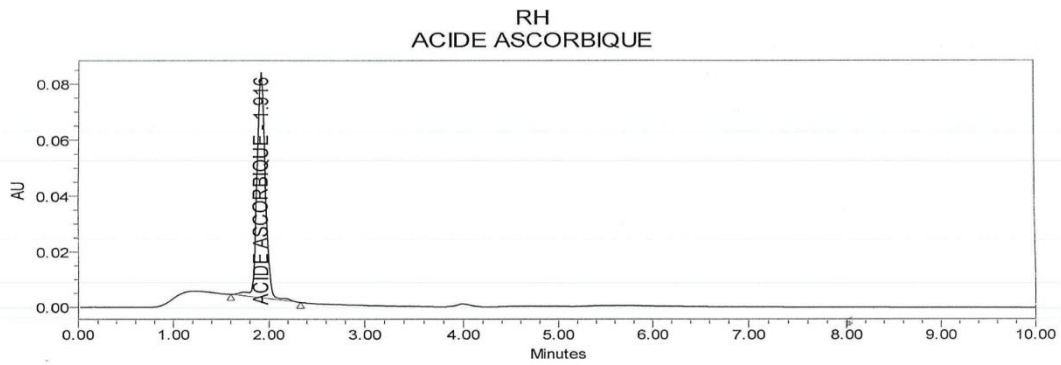
Chromatogramme du critère de spécificité pour le placebo



	Peak Name	RT	Area	Height
1	PLACEBO1	1.722	1471	225
2	ACIDE ASCORBIQUE	1.922	407092	68495
3	METABISULFITE	2.280	25164	2270
4	PLACEBO 2	3.819	2018	286
5	PLACEBO 3	5.116	17987	315

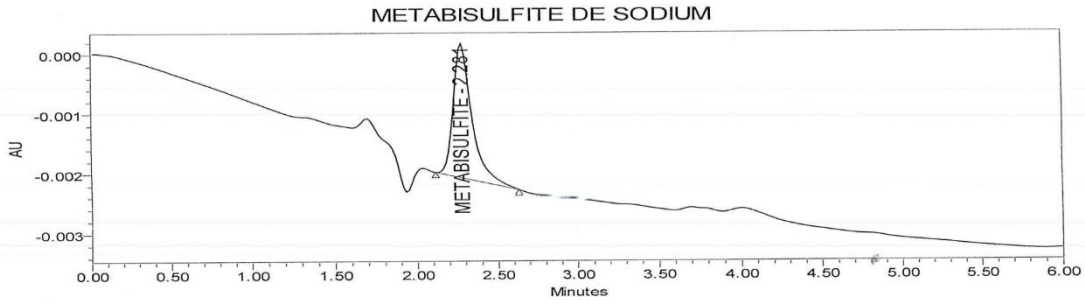
Annexe 5 : Spécificité

Chromatogramme du critère de spécificité pour l'acide ascorbique



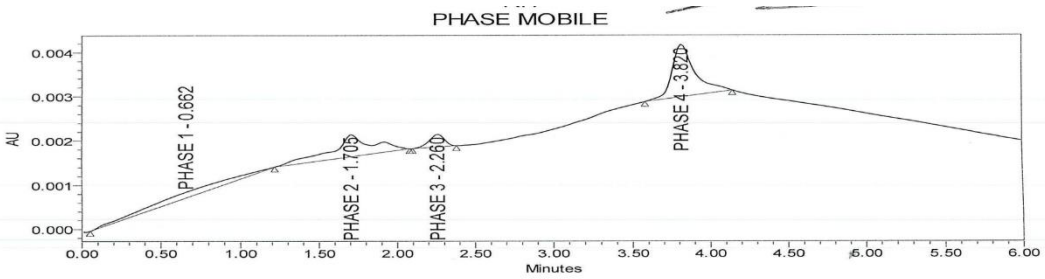
	Peak Name	RT	Area	Height	EP Plate Count	Symmetry Factor
1	ACIDE ASCORBIQUE	1.916	499077	80253	2.368499e+03	1.162160e+00

Chromatogramme du critère de spécificité pour métabisulfite de sodium



	Peak Name	RT	Area	Height	EP Plate Count	Symmetry Factor
1	METABISULFITE	2.281	17996	2248	2.168384e+03	1.669061e+00

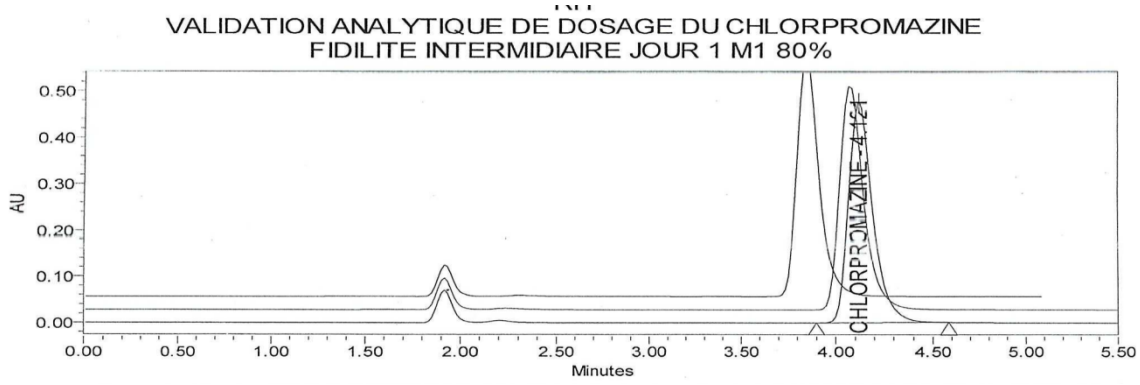
Chromatogramme du critère de spécificité pour la Phase mobile



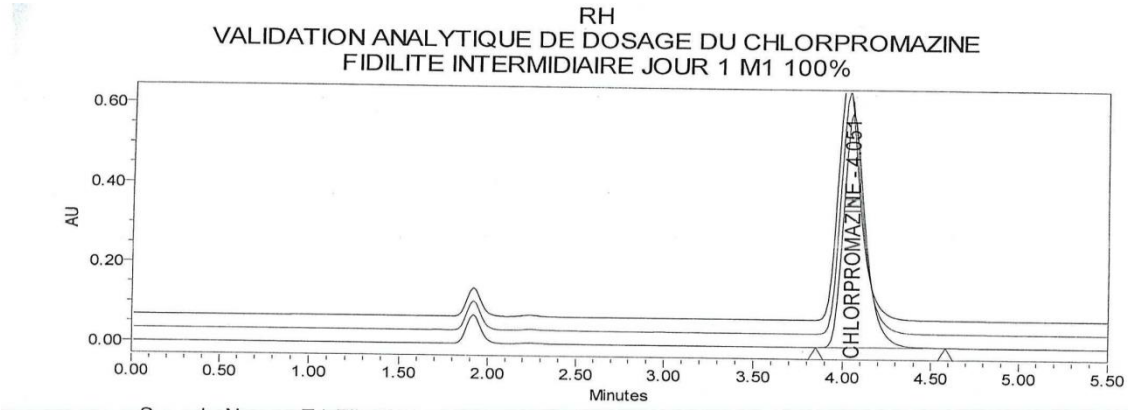
	Peak Name	RT	Area	Height	EP Plate Count	Symmetry Factor
1	PHASE 1	0.662	5800	133	7.610181e+00	9.478087e-01
2	PHASE 2	1.705	9040	497	6.598921e+02	8.731833e-01
3	PHASE 3	2.260	1969	289	2.523324e+03	8.664813e-01
4	PHASE 4	3.820	12233	1190	4.554129e+03	1.289241e+00

Annexe 6: Fidélité intermédiaire/ Exactitude jour 1

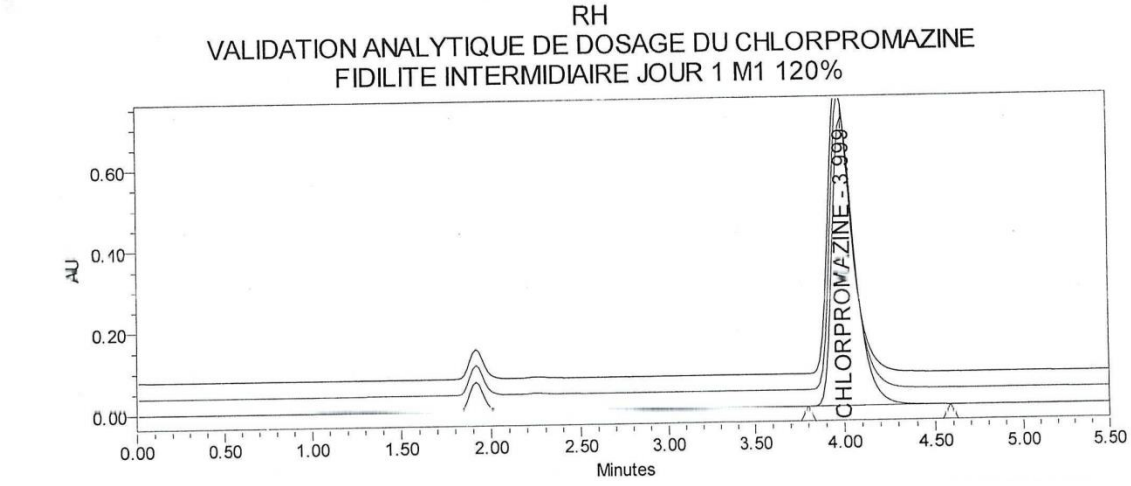
Chromatogramme du critère Fidélité intermédiaire jour 1 M1 80%



Chromatogramme du critère Fidélité intermédiaire jour 1 M1 100%

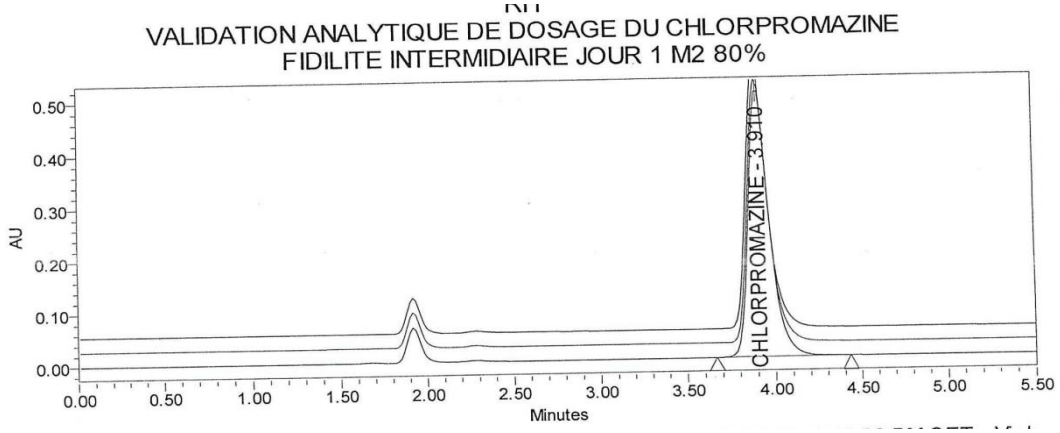


Chromatogramme du critère Fidélité intermédiaire jour 1 M1 120%

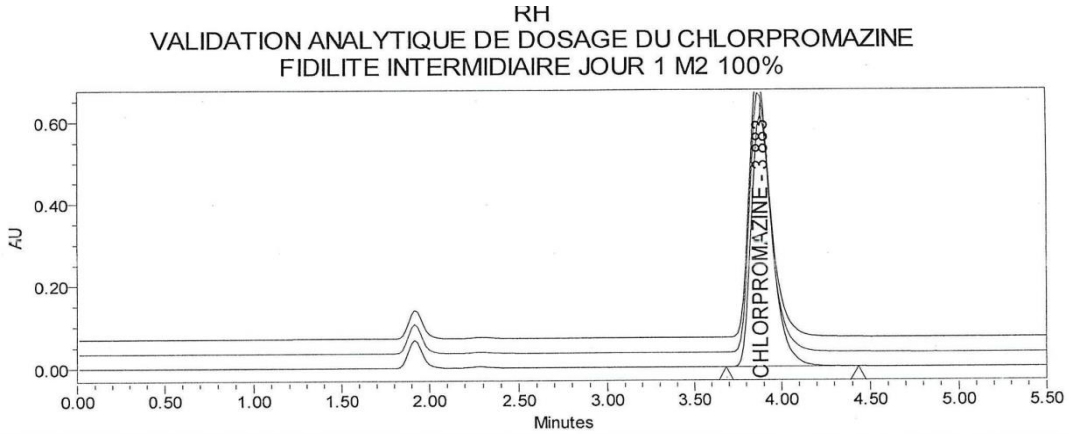


Annexe 6: Fidélité intermédiaire/ Exactitude jour 1

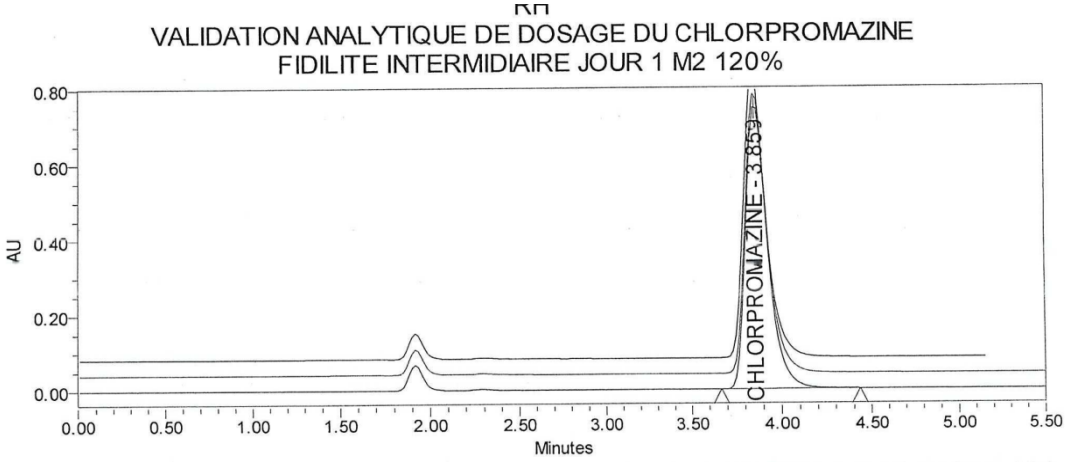
Chromatogramme du critère Fidélité intermédiaire jour 1 M2 80%



Chromatogramme du critère Fidélité intermédiaire jour 1 M2 100%



Chromatogramme du critère Fidélité intermédiaire jour 1 M2 80%



Annexe 6: Fidélité intermédiaire/ Exactitude jour 1

Evaluation de la fidélité intermédiaire / Exactitude jour 1

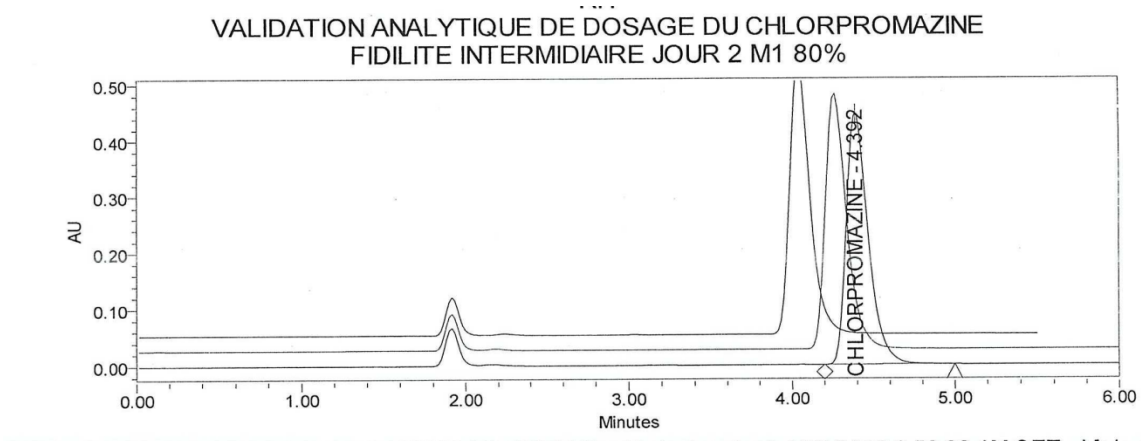
Standard	
Numero de lot du WS	MP21332
Pureté (%)	100,02
Facteur de dilution	0,02

Jour 1	
Date d'analyse	21/04/2022
Pe std (mg)	27,90

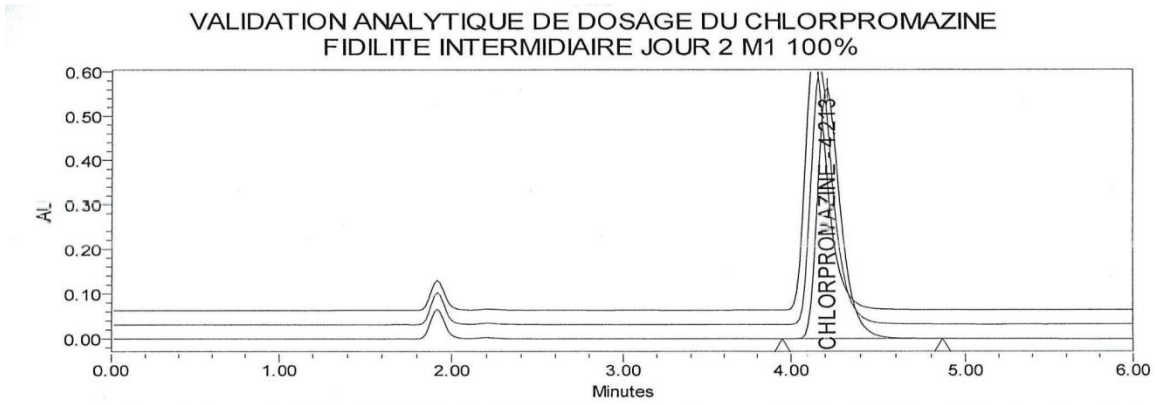
Analyste	Gamme de Concentration en %	Echantillons	Pe Echantillon (mg)	Facteur de dilution ech	Signal echantillon	Signal Standard	Facteur de recouvrement (%)	Moyenne (%)	SD	RSD (%)
A1	80,00%	E1	22,70	0,02	4158722,00	5150379	99,21	100,03	0,9	0,9
		E2	22,40	0,02	4173276,00	5150379	100,94			
		E3	22,50	0,02	4150135,00	5150379	99,94			
	100,00%	E1	28,30	0,02	5137210,00	5150379	98,35	98,99	0,7	0,7
		E2	28,90	0,02	5276163,00	5150379	98,92			
		E3	28,70	0,02	5281248,00	5150379	99,70			
	120,00%	E1	33,80	0,02	6180913,00	5150379	99,08	99,23	0,2	0,2
		E2	34,40	0,02	6309125,00	5150379	99,37			
		E3	34,20	0,02	6211586,00	5150379	98,41			
A2	80,00%	E1	22,40	0,02	4231466,00	5150379	102,35	101,23	1,1	1,1
		E2	22,20	0,02	4105319,00	5150379	100,19			
		E3	22,20	0,02	4144346,00	5150379	101,15			
	100,00%	E1	28,10	0,02	5258580,00	5150379	101,39	100,57	1,0	1,0
		E2	27,80	0,02	5100649,00	5150379	99,41			
		E3	28,60	0,02	5325635,00	5150379	100,89			
	120,00%	E1	34,30	0,02	6332774,00	5150379	100,03	99,53	0,7	0,7
		E2	34,10	0,02	6215208,00	5150379	98,75			
		E3	34,60	0,02	6374005,00	5150379	99,81			

Annexe 7: Fidélité intermédiaire/ Exactitude jour 2

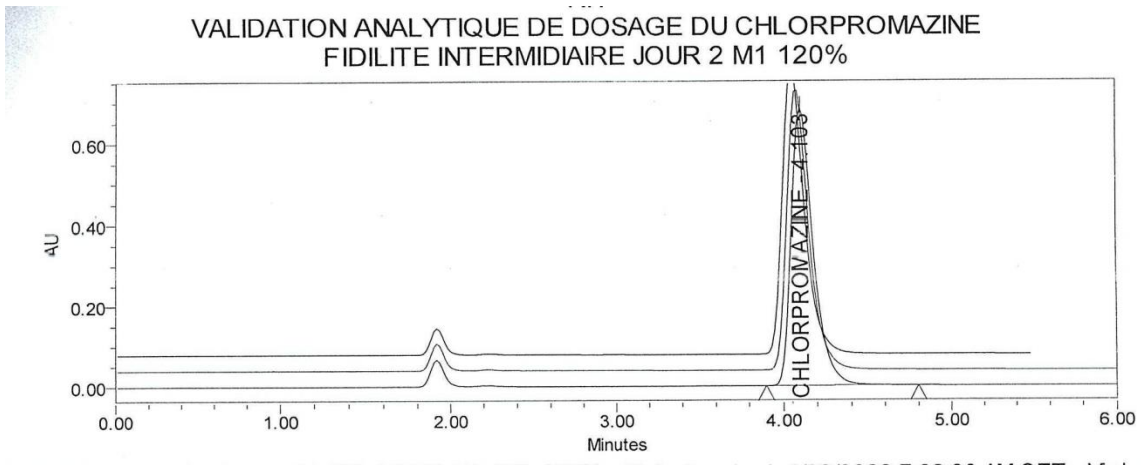
Chromatogramme du critère Fidélité intermédiaire jour 2 M1 80%



Chromatogramme du critère Fidélité intermédiaire jour 2 M1 100%

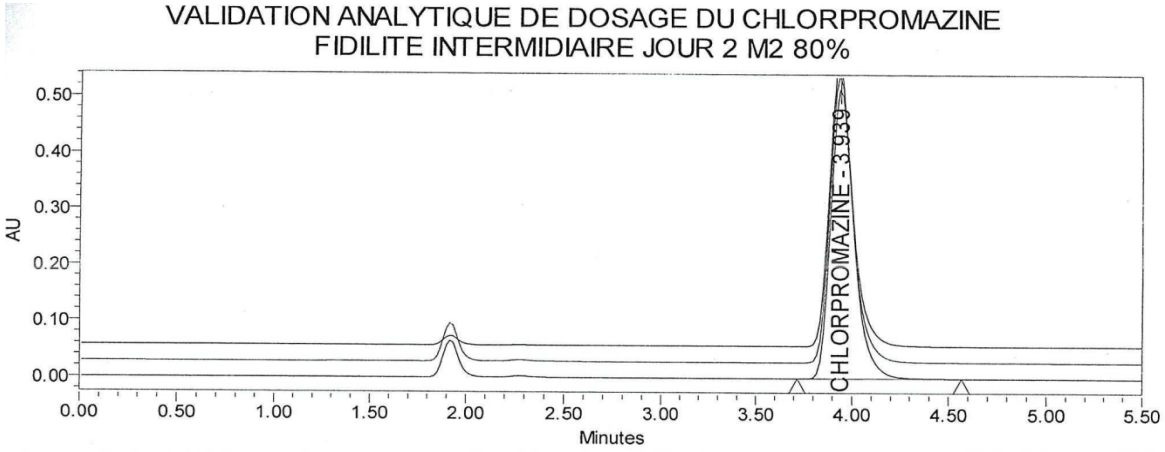


Chromatogramme du critère Fidélité intermédiaire jour 2 M1 120%

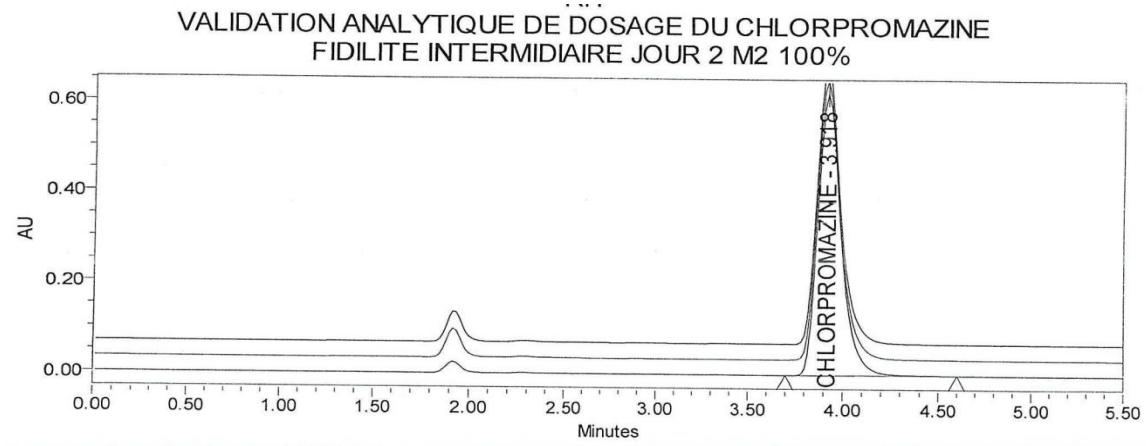


Annexe 7: Fidélité intermédiaire/ Exactitude jour 2

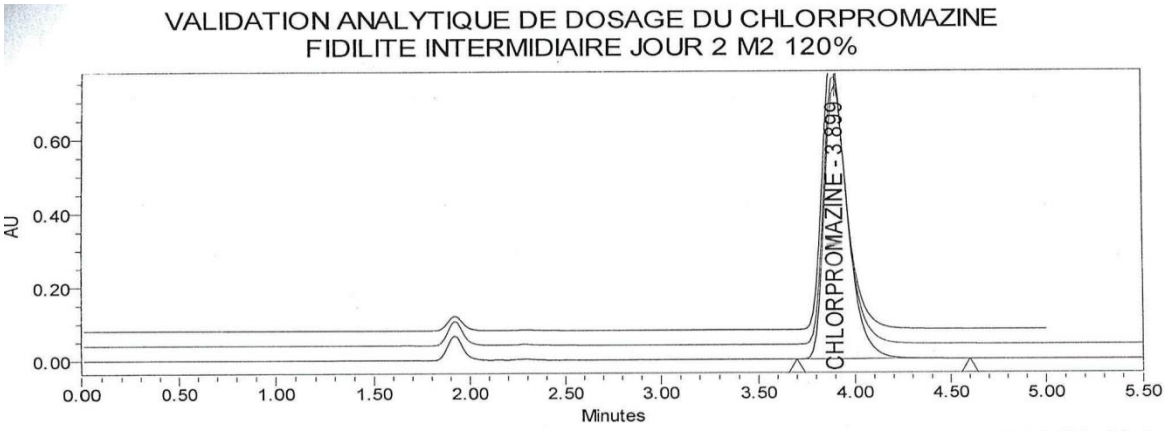
Chromatogramme du critère Fidélité intermédiaire jour 2 M2 80%



Chromatogramme du critère Fidélité intermédiaire jour 2 M2 100%



Chromatogramme du critère Fidélité intermédiaire jour 2 M2 120%



Annexe 7: Fidélité intermédiaire/ Exactitude jour 2

Evaluation de la fidélité intermédiaire / Exactitude jour 2

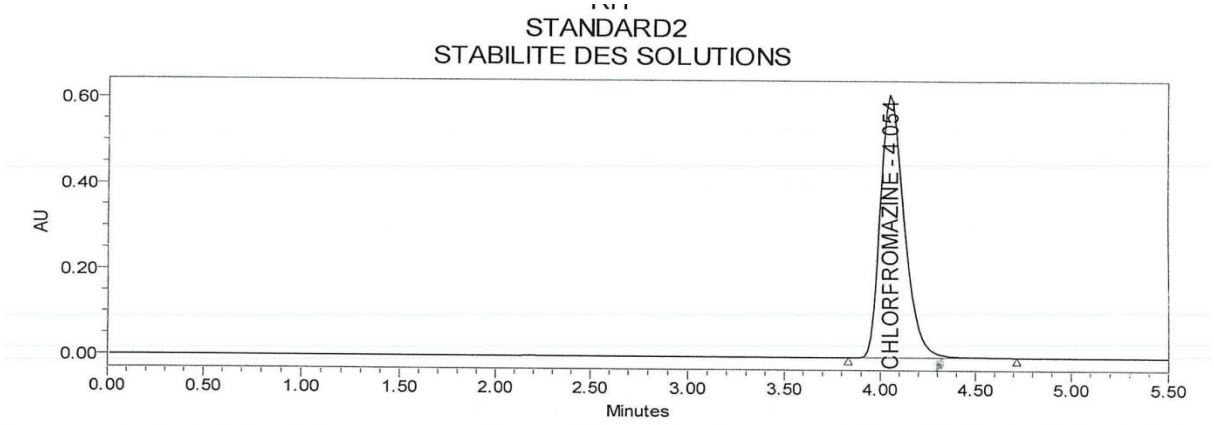
Jour 2	
Date d'analyse	23/04/2022
Pe std (mg)	20,20

Analyste	Gamme de Concentration en %	Echantillons	Pe Echantillon (mg)	Facteur de dilution ech	Signal echantillon	Signal Standard	Facteur de recouvrement (%)	Moyenne (%)	SD	RSD (%)
A1	80,00%	E1	22,40	0,02	4160885,00	5182844	101,09	100,26	1,2	1,2
		E2	23,30	0,02	4167429,00	5182844	97,34			
		E3	22,50	0,02	4110547,00	5182844	99,42			
	100,00%	E1	28,00	0,02	5121044,00	5182844	99,53	99,75	0,3	0,3
		E2	27,90	0,02	5173864,00	5182844	100,92			
		E3	28,00	0,02	5143757,00	5182844	99,97			
	120,00%	E1	33,90	0,02	6192021,00	5182844	99,40	99,77	0,4	0,4
		E2	33,90	0,02	6212142,00	5182844	99,73			
		E3	34,50	0,02	6351188,00	5182844	100,19			
A2	80,00%	E1	23,00	0,02	4273636,00	5182844	101,12	100,38	1,0	1,0
		E2	23,10	0,02	4229724,00	5182844	99,65			
		E3	22,40	0,02	4151280,00	5182844	100,86			
	100,00%	E1	28,10	0,02	5121044,00	5182844	99,18	100,56	1,3	1,3
		E2	27,80	0,02	5200565,00	5182844	101,81			
		E3	27,80	0,02	5143366,00	5182844	100,69			
	120,00%	E1	34,20	0,02	6282534,00	5182844	99,97	99,33	0,7	0,7
		E2	33,90	0,02	6138295,00	5182844	98,54			
		E3	34,00	0,02	6214422,00	5182844	99,47			

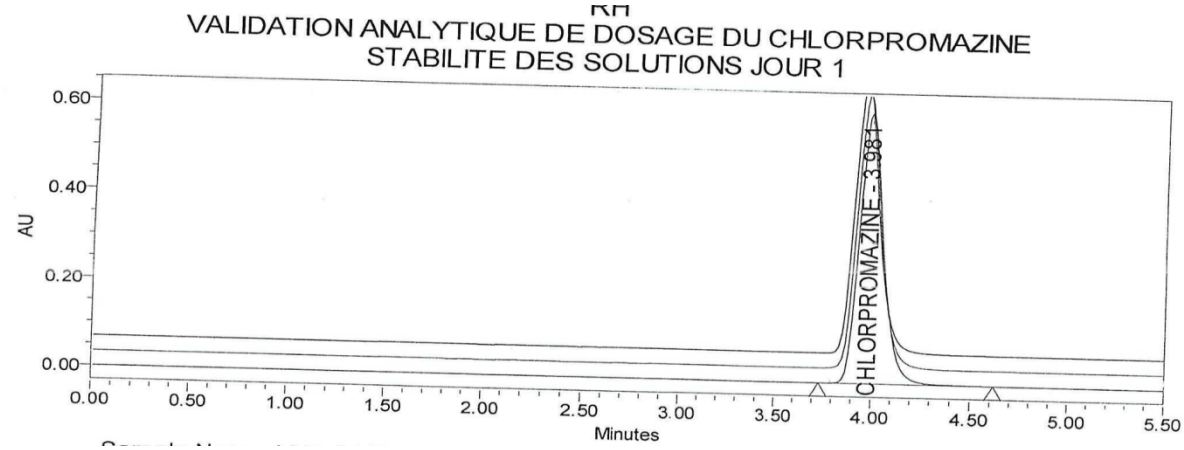
Concentration (%)	Recouvrement (%)	Moyenne inter	SD inter	RSD inter	Moyenne totale	SD total	RSD total	Valeur cible	Exactitude	PR
80,00%	100,03	100,48	0,5	0,5						
	101,23									
	100,26									
	100,38									
100,00%	98,99	99,97	0,8	0,8	100,0	0,4	0,4	100,0	0,0	100,0
	100,67									
	99,75									
	100,56									
120,00%	99,77	99,60	0,2	0,2						
	99,53									
	99,77									
	99,33									
								Limite inferieure		98,9
								Limite superieure		101,1

Annexe 8 : Stabilité des solutions jour 1

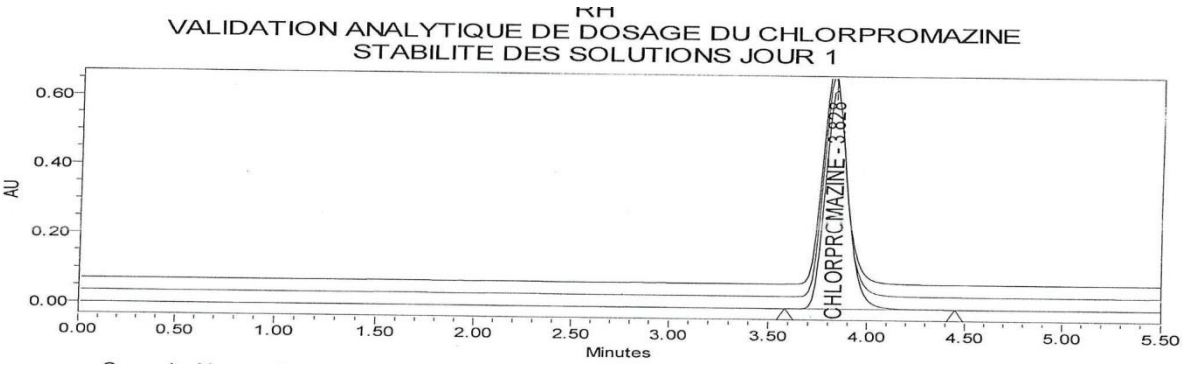
Chromatogramme du critère de stabilité des solutions du standard 2



Chromatogramme du critère de stabilité des solutions jour 1 à T= 2H dans la carrousel

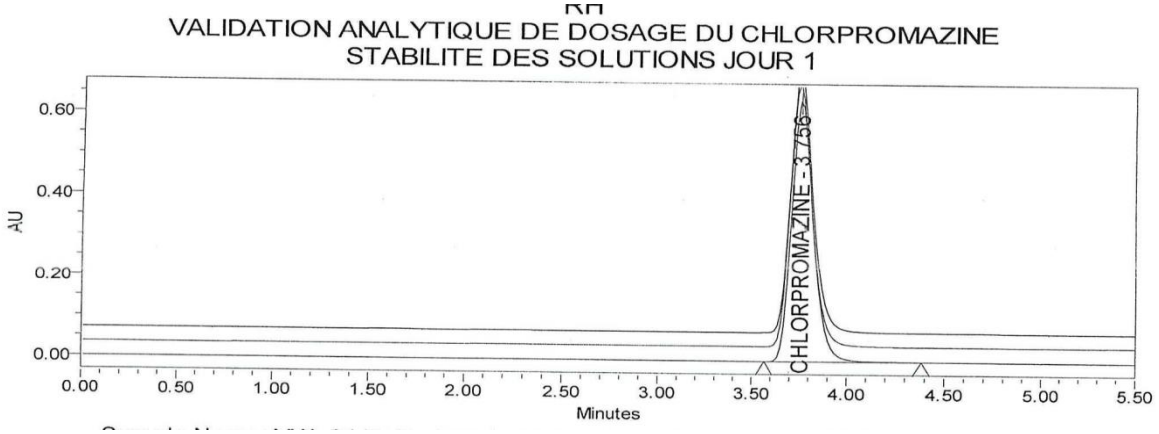


Chromatogramme du critère de stabilité des solutions jour 1 à T= 4H dans le carrousel

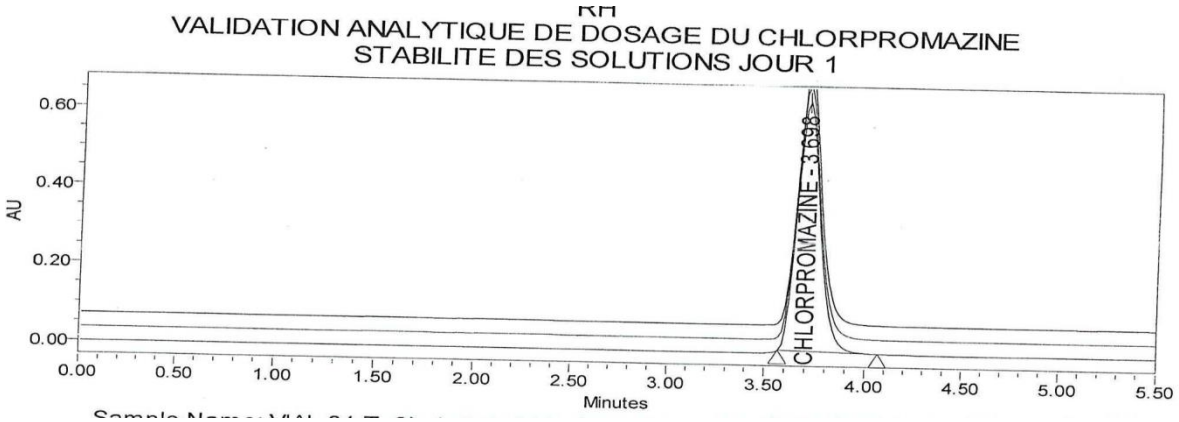


Annexe 8 : Stabilité des solutions jour 1

Chromatogramme du critère de stabilité des solutions jour 1 à T= 6H dans la carrousel



Chromatogramme du critère de stabilité des solutions jour 1 à T= 8H dans la carrousel



Standard	
Numero de lot du WS	MP21332
Pureté (%)	100,02
Pe std (mg)	56,10
Facteur de dilution	0,01

Temps	Signal standard au temps initial	Signal standard au temps T differentes viales	Pourcentage de variation (X) % differentes viales	Signal standard au temps T viale pérforée	Pourcentage de variation (X) % viale pérforée
2H	52422<7,000	5233569	0,166	5192526,000	0,94846733
4H	52422<7,000	5184199	1,120	5175230,000	1,27840218
6H	52422<7,000	5155979	1,673	5127411,000	2,19058736
8H	52422<7,000	5055988	3,684	4995997,000	4,69741315
Moyenne (%)		5157433,750		5122791,000	
SD		74847,203		88902,34677	
RSD (%)		1,451		1,735427949	

Calcul du pourcentage de variations(x) dans la Carrousel

Annexe 8 : Stabilité des solutions jour 1

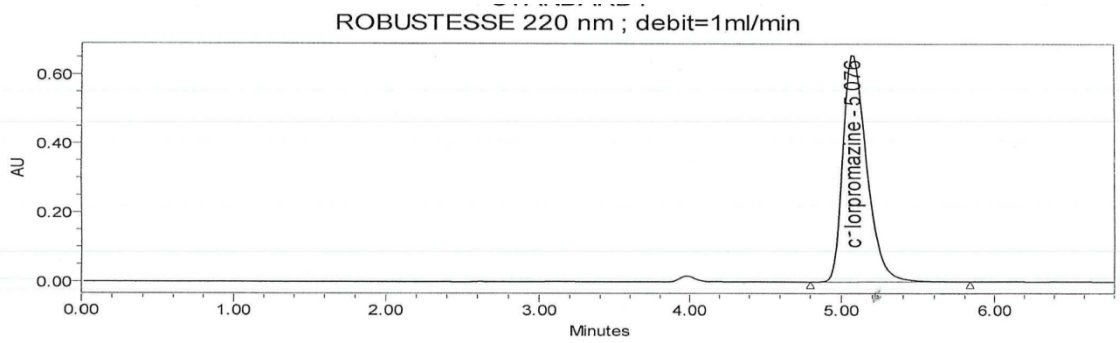
Standard	
Numero de lot du WS	MP21332
Pureté (%)	100,02
Pe std (mg)	56,10
Facteur de dilution	0,01

Temps	Signal standard au temps initial **(T0)**	Signal standard au temps T differentes viales	Pourcentage de variation (X) % differentes viales
2H	5242247,000	5229180	0,250
4H	5242247,000	5168043	1,436
6H	5242247,000	5190853	0,990
8H	5242247,000	5067053	3,458
Moyenne (%)		5163782,250	
SD		69244,478	
RSD (%)		1,341	

Calcul du pourcentage de variations(x) a une T° ambiante

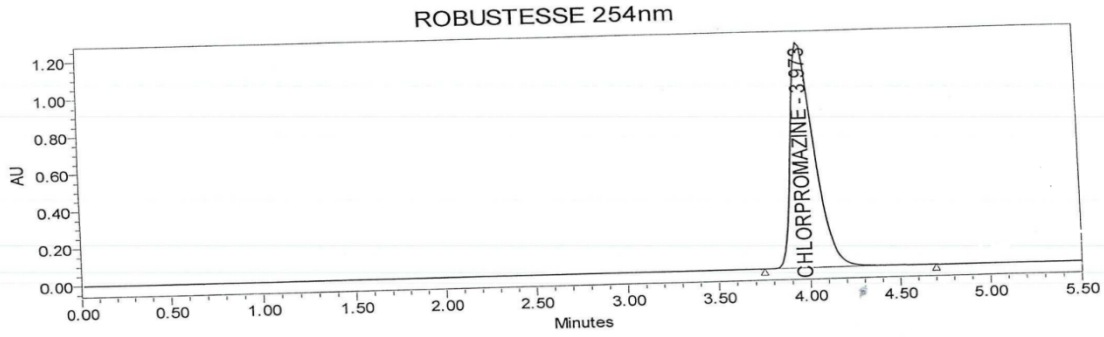
Annexe 10: Test de Robustesse

Chromatogramme du critère de robustesse de longueur d'onde à 220 nm et débit à 1ml /min



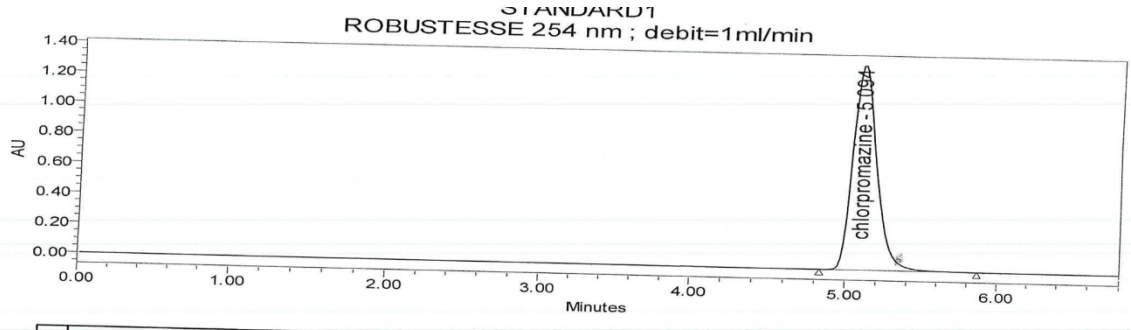
	Peak Name	RT	Area	Height	EP Plate Count	Symmetry Factor
1	chlorpromazine	5.076	6987002	661760	5.422681e+03	1.355402e+00

Chromatogramme du critère de robustesse de longueur d'onde à 254 nm



	Peak Name	RT	Area	Height	EP Plate Count	Symmetry Factor
1	CHLORPROMAZINE	3.973	11021991	1217646	4.550288e+03	1.342444e+00

Chromatogramme du critère de robustesse de longueur d'onde à 254 nm et débit à 1ml /min



	Peak Name	RT	Area	Height	Amount	EP Plate Count	Symmetry Factor
1	chlorpromazine	5.094	14454259	1351227	102.443	5.371205e+03	1.382928e+00

Résumé

Ce travail consiste à réaliser une étude de validation analytique de la méthode de dosage d'un Psychotrope «Chlorpromazine» dans une solution injectable à 25mg/5ml par la technique d'analyse de la Chromatographie Liquide à Haute Performance (HPLC).

La validation analytique de la méthode de dosage d'un principe actif par HPLC, correspond à l'évaluation approfondie de ses performances. Elle consiste à vérifier, déterminer et estimer plusieurs critères de validation à savoir la conformité du système, la spécificité, la linéarité, la fidélité, l'exactitude, la stabilité et la robustesse. Toute nouvelle méthode décrite dans un dossier d'Autorisation de Mise sur le Marché (AMM) doit être accompagnée d'une validation complète.

Les résultats expérimentaux obtenus dans l'application au produit fini Chlorpromazine sont conformes aux critères d'acceptation exigés. Ceci confirme alors la validation de la méthode d'analyse chromatographique du dosage de la solution injectable Chlorpromazine, fabriquée par les Laboratoires FRATER-RAZES.

Abstract

This work consists in carrying out an analytical validation study of the method of dosing a Psychotropic "Chlorpromazine" in an injectable solution at 25mg/5ml by the analysis technique of High Performance Liquid Chromatography (HPLC).

The analytical validation of the method for assaying an active ingredient by HPLC corresponds to the in-depth evaluation of its performance. It consists of verifying, determining and estimating several validation criteria, namely system conformity, specificity, linearity, fidelity, accuracy, stability and robustness. Any new method described in a Marketing Authorization (AMM) file must be accompanied by full validation.

The experimental results obtained in the application to the finished product Chlorpromazine comply with the required acceptance criteria. Which then confirms the validation of the method of chromatographic analysis of the dosing of the solution for injection Chlorpromazine, manufactured by FRATER-RAZES Laboratories.