

République Algérienne Démocratique et Populaire
Ministère de l'Enseignement Supérieure et de la Recherche Scientifique
Université A. Mira-Bejaia
Faculté des Sciences de la Nature et de la VIE
Département de Microbiologie



Mémoire de fin d'étude
En vue de l'obtention du diplôme de Master en Biotechnologie et Santé

Thème

Validation analytique de la méthode du dosage du principe actif 'Pyridoxine Hydrochloride' dans le produit fini Razidoxine B6 250mg/5ml par l'HPLC.

Réalisé par :

Chentir Noura

Soutenu le : 25 / 05 / 2023 à 10h30.

Devant le jury composé de :

Mme Faradji S.

M.C.A

Présidente

Mr Nabti ELH.

Pr.

Examineur

Mme Benachour K.

M.A.A

Promotrice

Sommaire

Remerciements	
Dédicace	
Liste des figures.....	
Liste des tableaux	
Liste d'abréviations.....	
Glossaire	
Introduction	1
I. Vitamine B6 : La pyridoxine.....	3
I.1 Historique.....	3
I.2 Définition et Structures	3
I.3 Rôles et bienfaits	4
I.4 Mécanisme d'action.....	5
I.5 Métabolisme de la vitamine B6.....	5
I.5.1 Absorption digestive.....	5
I.6 Source de la vitamine B6	6
I.7 Carence en vitamine B6	6
I.8 Excès de vitamine B6.....	8
II.1 Définition et objectif.....	9
II.2 Validation dans le domaine pharmaceutique et le contexte réglementaire	10
II.2.1 Pharmacopée	10
II.2.2 Documents ICH	11
II.2.3 Documents des commissions de la SFSTP	11
II.3 Validation des méthodes analytiques en industrie pharmaceutique	12
II.4 Types de procédures analytiques.....	12
II.5. Cycle de vie des méthodes analytiques.....	13
II.5.1 Principales étapes de ce cycle sont les suivantes	13
II.6 Les types et le choix des critères de la validation.....	13
II.6.1 Validation intra-laboratoire (ou in-house):.....	13
II.7 Critères de la validation analytique d'une méthode de dosage.....	14
II.7.1 Conformité du système	15
II.7.2 Spécificité	15
II.7.3 Linéarité	16

II.7.3.1 Linéarité sur standard.....	16
II.7.3.2 Linéarité sur placebo chargé	16
II.7.4 Exactitude	17
II.7.5 Fidélité	18
II.7.6 Répétabilité :	18
II.7.7 Fidélité intermédiaire	18
II.7.8 Reproductibilité	18
II.7.9 Intervalle de mesure.....	19
II.7.10 Stabilité des solutions	19
II.7.11 Robustesse.....	21
II.7.12 Limite de détection (LOD).....	21
II.7.13 Limite de quantification (LOQ).....	21
II.8 La chromatographie liquide haute performance	21
I.1 Objectif.....	24
I.2 Présentation du produit RAZIDOXINE B6® 250mg/5ml:.....	25
I.3 Propriétés physicochimiques de la vitamine B6	25
I.4 Matériel et équipements	26
I.5 Matière première et produit fini	26
I.6 Réactifs et solvants.....	27
I.7 Description de la procédure de validation analytique de la méthode de dosage du Pyridoxine HCL dans le produit fini RAZIDOXINE B6® à 250mg/5ml.....	27
I.8 Méthodologie de la validation analytique	28
I.8.1 Test de conformité système:	29
I.8.2 Test de spécificité:	29
I.8.3 Test de linéarité et intervalle de mesure:	29
I.8.4 Test de fidélité (répétabilité, fidélité intermédiaire) :.....	30
I.8.5 Test d'exactitude :	30
I.8.6 La robustesse :	31
III.9. Programme de validation analytique	32
II.1 Introduction.....	33
II.2 Résultats et discussion de la validation de la méthode du dosage de Pyridoxine HCL dans le Razidoxine B6 250mg /5ml.....	33
II.2.1 Evaluation du test conformité système	33
II.2.2 Evaluation de la spécificité	35
II.3 Fidélité (répétabilité, fidélité intermédiaire).....	38
II.3.1 Répétabilité	38

II.3.2 Fidélité intermédiaire	39
II.4 Exactitude	40
II.5 Linéarité	41
II.6 Robustesse	44
II.7 Stabilité des solutions	48
Conclusion	52
Résumé	

Remerciements



Avant tout je remercie le Dieu le tout puissant, de m'avoir donné le courage, la force et la patience durant ces longues années d'études.

Je remercie chaleureusement ma promotrice Mme Benachour-kada Karima pour avoir supervisé ce mémoire, pour son aide et sa disponibilité ;

Je présente aussi mes sincères remerciements à l'ensemble du personnel de l'entreprise SPA, les Laboratoires Frater Razes, en particulier l'équipe du laboratoire de contrôle qualité ; Ils m'ont accompagnés et orientés avec une grande attention devant mes interrogations. Merci pour votre sympathie, votre gentillesse, votre compréhension et votre disponibilité ;

J'exprime mon immense gratitude aux membres de jury qui feront l'honneur de juger mon travail de recherche ; Mme Faradji S. en qualité de présidente du jury et Mr Nabti ELH en qualité d'examineur ;

Mes remerciements vont également à tous les enseignants qui ont contribué à ma formation universitaire ;

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



Dédicace

Louange avant tout, à ALLAH le tout puissant pour la volonté, la santé et la patience qu'il m'a donné durant les années d'études afin que je puisse arriver à ce stade.

Je dédie ce projet de fin d'études

A la mémoire de mes grands-parents paternelles ; puisse Dieu les avoir en sa saine miséricorde ;

Aux deux êtres les plus chers, mes parents ; que nulle dédicace ne puisse exprimer mes sincères sentiments, pour leurs sacrifices, soutien et leurs encouragements.

Je vous rends hommage par ce modeste travail en guise de ma reconnaissance éternelle et de mon amour infini ; que dieu vous garde et vous procure santé, bonheur et longue vie ;

A mes chères sœurs Lynda, Sara, Hanane et mon petit frère Madjid ; puisse Dieu vous donne de la santé et du bonheur ;

A mon fiancé Younes qui m'as encouragé et soutenu, et à toute ma belle-famille ;

A mon beau-frère Hamid ; tu es bien plus qu'un simple beau-frère pour moi tu es un membre précieux de notre famille ;

A mon chère neveu Amir qui illumine nos vies de bonheur que ton chemin soit parsemé de succès, de bonheur et de réalisations ;

A toute ma famille, en particulier mon cousin Hakim et son ami Mr Boukerras.K., ainsi que ma tante Nouara qui m'as accueilli chez elle tout au long de mon stage pratique sur Alger, et a tous mes amis(es) : Karima, Tarek.



Liste des figures

Figure 1 : Structure chimique de la pyridine.....	3
Figure2 : Structure chimique des formes de la vitamine B6.....	4
Figure 3 : Structure chimique de l'isoniazide.....	17
Figure 4 : Courbe de linéarité.....	23
Figure 5 : : Notions de fidélité et de justesse.....	25
Figure 6 : Schéma du principe d'une chaîne HPLC.....	34
Figure 7 : Structure chimique du pyridoxine chlorhydrate.....	34
Figure 8 : Chromatogramme obtenu par HPLC des solutions essais (E1 et E 2)	35
Figure 9 : Chromatogramme obtenu par HPLC de la solution Témoin.....	36
Figure 10 : Temps de rétention, surfaces, % RSD de la solution standard 100% (ou témoin)	37
Figure 11 : Chromatographe de la solution essai (test de spécificité)	37
Figure 12 : Chromatogramme de la solution standard(spécificité).....	38
Figure 13 : Chromatographe de la phase mobile (test de spécificité)	42
Figure 14 : Résultats du test de répétabilité.....	43
Figure 15 : Résultats de l'évaluation de la linéarité et l'intervalle de mesure.....	44
Figure 16 : Courbe d'étalonnage pour la solution standard (pour le test de linéarité et intervalle de mesure)	45
Figure 17 : Paramètres à varier pour l'étude de la robustesse (variation du débit et de la longueur d'onde).....	45
Figure 18 : Les résultats expérimentaux obtenus avec le changement de la longueur d'onde et du débit lors de la mesure du critère Robustesse.....	46
Figure 19 : Chromatogramme de la solution placebo chargé a 90% (longueur d'onde 278nm/débit 0,8 ml/5min)	46
Figure 20 : Chromatogramme de la solution placebo chargé a 110% (longueur d'onde 278nm/débit 0,8 ml/5min)	46
Figure 21 : Chromatogramme de la solution placebo chargé a 90% (longueur d'onde 278nm/débit 1,2 ml/5min.....	47
Figure 22 : Chromatogramme de la solution placebo chargé a 110% (longueur d'onde 278nm/débit 1,2 ml/5min.....	47
Figure 23 : Chromatogramme de la solution placebo chargé a 110% (longueur d'onde 282nm/débit 1,2 ml/5min)	47
Figure 24 : Chromatogramme de la solution placebo chargé a 90% (longueur d'onde 282nm/débit 1,2 ml/5min)	48
Figure 25 : Chromatogramme de la solution placebo chargé a 110% (longueur d'onde 282nm/débit 1,2 ml/5min)	48
Figure 26 : Chromatogramme de la solution placebo chargé a 90% (longueur d'onde 282nm/débit 0,8 ml/5min.....	49
Figure 27 : Test de stabilité des solutions à température ambiante.....	49

Liste des tableaux

Tableau 1 : Les catégories de Guidelines ICH et leurs codes.....	12
Tableau 2 : Critères de la validation en fonction du type d'analyse.....	14
Tableau 3 : Composition de chlorhydrate de Pyridoxine C ₈ H ₁₁ NO ₃ HCL.....	26
Tableau 4 : Injection des préparations.....	28
Tableau 5 : Résultats expérimentaux de la validation analytique du test de conformité système.....	30
Tableau 6 : Programme de la validation analytique du produit injectable RAZIDOXINE B6.....	32
Tableau 7 : Résultats expérimentaux de la validation analytique du test de conformité système.....	35
Tableau 8 : Résultats de la gamme fidélité (%RSD)	39
Tableau 9 : Résultats des RSD inter et totale de fidélité intermédiaire.....	40
Tableau 10 : Les données brutes de calcul d'exactitude.....	41

Liste d'abréviation

AGE: Advanced Glycation Endproducts

ANSM: l'Agence National de Sécurité du Médicament

CV: Coefficient de Variation

EPPI: Eau Pour Préparation Injectable

FDA :Food and Drug Administration

Fs: Facteur de Similarité

ICH: International Council for Harmonisation

INH :Iso-Nicotinique Hydrazide

ISO: International Organization for Standardization

NF: National Formulary

PL: Pyridoxal

PLP: phosphate de pyridoxal

PM :Pyridoxamine

PMP: Phosphate de Pyridoxamine, phosphate de pyridoxamine

PN: Pyridoxine

PNP: Phosphate de Pyridoxine

PA: Principe Actif

R: Coefficient de corrélation

RSD :Relatif Standard Déviation

SFSTP: Société Française des Sciences et Techniques Pharmaceutiques

STP :Sciences Techniques et pratiques Pharmaceutiques

USP :United States Pharmacopeia

WS: Working Standard

Glossaire

Antagoniste : substance qui se lie aux récepteurs d'une molécule et empêche cette dernière d'agir sur le corps.

La décarboxylation : est un processus chimique qui consiste à retirer un groupe carboxyle (COOH) d'une molécule organique, libérant ainsi du dioxyde de carbone (CO₂).

La transamination : processus biochimique dans lequel un groupe amino est transféré d'un acide aminé à un autre composé organique, créant ainsi un nouvel acide aminé.

La racémisation : est un processus chimique qui consiste en la conversion d'un mélange de deux énantiomères ; des molécules qui sont des images miroirs l'une de l'autre, en une forme racémique, qui est un mélange équimolaire des deux énantiomères.

Les hépatocytes : sont les cellules du foie. Ils sont responsables de nombreuses fonctions importantes, telles que la synthèse de la bile, le stockage des nutriments et la production des protéines.

La maladie cœliaque : est une maladie auto-immune dans laquelle la consommation de gluten, l'orge et le seigle, endommage la muqueuse de l'intestin grêle.

La colite ulcéreuse : est une maladie chronique de l'intestin qui affecte principalement le côlon et le rectum.

L'homocystinurie : est une maladie génétique rare qui affecte la capacité du corps à métaboliser l'acide aminé méthionine.

L'anémie microcytaire : est une forme d'anémie caractérisée par des globules rouges plus petits que la normale.

Des anomalies électroencéphalographiques (EEG) : sont des modifications anormales de l'activité électrique du cerveau.

Une dermatite : est une inflammation de la peau.

Atrophie testiculaire : est une affection dans laquelle les testicules rétrécissent en taille et en volume.

Le nombre de plateaux théoriques : est une mesure de l'efficacité d'une colonne de distillation dans la séparation des différents composants d'un mélange liquide. Plus le nombre de plateaux théoriques est élevé, plus la colonne est efficace.

Le facteur de symétrie : est une mesure de la forme du pic d'éluion d'un composé, il est calculé en divisant le temps de rétention à mi-hauteur du pic par la largeur à mi-hauteur du pic. Un facteur de symétrie élevé peut être causés par divers facteurs, tels que des interactions entre les composés et la phase stationnaire, des problèmes avec la colonne ou des conditions

de la méthode d'analyse. Un facteur de symétrie bas est important pour garantir la précision et la fiabilité des résultats d'analyse.

La résolution : est une mesure de la capacité de la colonne de chromatographie à séparer les différents composants d'un échantillon. Elle est calculée en comparant la distance entre les pics d'élution de composants avec leur largeur à mi-hauteur. Une résolution élevée indique une bonne séparation entre les composants et la quantification précises.

Relatif Standard Déviation (RSD) : est une mesure la répétabilité et de la précision de la méthode d'analyse. Il est calculé en divisant l'écart-type des mesures par la moyenne des mesures, puis en multipliant le résultat par 100 pour exprimer le résultat en pourcentage. Un RSD inférieur ou égal à 2% est considéré comme acceptable pour la plupart des applications analytiques. Cependant, le RSD dépend de la méthode d'analyse, de la qualité des réactifs et des échantillons, ainsi que de l'expérience et de la compétence de l'analyste. Par conséquent, il est important de suivre les protocoles d'analyse standardisés et de vérifier régulièrement la précision et la répétabilité de la méthode d'analyse en utilisant des échantillons de contrôle.

Le coefficient de corrélation (coefficient de corrélation de Pearson) : est une mesure statistique utilisée pour évaluer la relation entre deux variables. Il est souvent utilisé pour évaluer la linéarité de la réponse de détection de l'instrument. Il est calculé en comparant les valeurs mesurées de la réponse de détection avec les concentrations connues des échantillons. Un coefficient de corrélation de 1 indique une relation linéaire parfaite entre la réponse de détection et la concentration de l'échantillon, tandis qu'un coefficient de corrélation de 0 indique une absence de relation linéaire. Un coefficient de corrélation élevé est important pour garantir la précision et la fiabilité des résultats d'analyse.

Le coefficient de variation (CV) : est une mesure de la précision d'une méthode d'analyse en HPLC. Le CV est calculé en divisant l'écart-type des résultats d'analyse par la moyenne des résultats, puis en multipliant le résultat par 100 pour obtenir un pourcentage. Un CV faible indique une faible variabilité des résultats d'analyse et une meilleure précision de la méthode. Il est souvent utilisé pour évaluer la précision de la répétabilité des résultats d'analyse à partir de plusieurs injections de l'échantillon. Un CV inférieur à 2% est généralement considéré comme acceptable.

Le coefficient de régression : est un paramètre statistique utilisé pour évaluer la qualité de l'ajustement d'une courbe de calibration. La courbe de calibration est une relation mathématique entre la concentration d'un composé cible et la réponse du détecteur. Il est calculé en utilisant les données de la courbe de calibration et représente la qualité de l'ajustement de la courbe aux données expérimentales. Un coefficient de régression proche

de 1 indique une bonne corrélation entre la concentration et la réponse du détecteur, tandis qu'un coefficient de régression proche de 0 indique une mauvaise corrélation. Il est souvent utilisé pour évaluer la précision et la fiabilité des résultats d'analyse en HPLC, en particulier lors de la quantification de la concentration de composés cibles dans des échantillons inconnus.

Le signal mesuré : est généralement la réponse du détecteur à la substance qui est séparée dans la colonne de chromatographie. Le détecteur mesure une propriété physique de la substance, telle que l'absorbance de la lumière ou la conductivité électrique, et génère un signal électrique proportionnel à la quantité de substance présente dans l'échantillon. Ce signal est ensuite traité par l'instrument de mesure et converti en une courbe chromatographique, qui montre la quantité de substance présente dans l'échantillon en fonction du temps. Les scientifiques peuvent utiliser cette courbe chromatographique pour identifier les composants de l'échantillon et mesurer leur quantité avec précision.

Le biais moyen : est une mesure de l'exactitude d'une méthode d'analyse. Il est calculé en divisant le résultat par la valeur théorique ou attendue. Un biais moyen faible indique une faible différence entre les résultats d'analyse et la valeur théorique ou attendue, ce qui indique une meilleure exactitude de la méthode. Il est souvent utilisé pour évaluer l'exactitude de la régression linéaire de la courbe d'étalonnage, qui est utilisée pour quantifier les composés inconnus dans les échantillons. Un biais moyen inférieur à 5% est généralement considéré comme acceptable en HPLC.

Le placebo en HPLC : est un échantillon de contrôle qui ne contient pas le composé cible ou l'analyte que l'on cherche à quantifier. Le placebo est utilisé pour évaluer la spécificité de la méthode d'analyse, c'est-à-dire pour s'assurer que les pics détectés dans l'échantillon d'essai proviennent bien du composé cible et non d'autres interférences ou contaminants. Il est également utilisé pour évaluer la précision et l'exactitude de la méthode d'analyse en mesurant le bruit de fond ou le signal de fond dans l'absence du composé cible. Les placebos peuvent être préparés en utilisant le même solvant que celui utilisé pour dissoudre l'échantillon d'essai, mais sans y ajouter le composé cible.

Les témoins : sont des échantillons utilisés pour vérifier la performance de la méthode d'analyse et pour détecter les problèmes éventuels dans le système HPLC. Ils sont généralement préparés en utilisant des solutions standard contenant des composés connus et en les injectant dans le système HPLC. Ils peuvent être utilisés pour vérifier la précision et la reproductibilité de la méthode d'analyse, pour détecter les problèmes d'alignement de la colonne, pour vérifier la performance du détecteur et pour diagnostiquer les problèmes de

contamination ou d'interférence dans le système HPLC. Les témoins sont souvent utilisés en conjonction avec des échantillons inconnus pour quantifier la quantité de composé cible dans les échantillons et pour s'assurer que les résultats sont précis et fiables. Il est important de les préparer et de les stocker correctement pour éviter la dégradation des composés cibles et pour assurer la précision et la reproductibilité des résultats.

Un biosimilaire : est un médicament biologique qui est similaire à un médicament biologique de référence, mais qui n'est pas une copie exacte. Les biosimilaires sont produits à partir de cellules vivantes et sont utilisés pour traiter une variété de maladies, notamment le cancer, les maladies auto-immunes et les troubles de la croissance.

L'oncologie : est la branche de la médecine qui étudie les cancers.

L'urologie : est une spécialité médicale qui se concentre sur les problèmes liés aux voies urinaires et aux organes reproducteurs masculins.

L'antalgie : est un traitement médicamenteux qui vise à soulager la douleur.

L'anesthésie : est un traitement médical qui consiste à endormir une personne ou à engourdir une partie de son corps pour effectuer une intervention chirurgicale ou un examen médical. Il existe plusieurs types d'anesthésie, notamment l'anesthésie générale, l'anesthésie locale et l'anesthésie régionale.

Le phosphate de pyridoxal sérique : est une forme active de la vitamine B6 qui est présente dans le sang. Il est souvent mesuré dans les analyses médicales pour évaluer le statut en vitamine B6 d'une personne, car une carence en cette vitamine peut causer divers problèmes de santé. La mesure du phosphate de pyridoxal sérique peut également aider à diagnostiquer certaines maladies, telles que l'anémie, les troubles neurologiques et les maladies cardiaques.

Sérique : est un terme qui se rapporte au sérum, qui est le liquide qui reste après la coagulation du sang. Le sérum contient des protéines, des électrolytes et d'autres nutriments, et il est souvent utilisé dans les analyses médicales pour mesurer la présence de certaines substances dans le sang, telles que les hormones, les enzymes et les anticorps.

Introduction

Introduction

La mise au point et le développement d'un médicament passe par plusieurs étapes, la découverte de la molécule active, tests au laboratoire, études précliniques, essais cliniques et approbation réglementaire. D'un point de vue éthique, réglementaire et commercial, l'industrie pharmaceutique a la responsabilité de produire et de commercialiser des médicaments de haute qualité, et cette obligation éthique de l'industrie vis-à-vis des utilisateurs l'oblige à mettre en place des systèmes d'assurance qualité à tous les niveaux de l'entreprise, depuis le développement du médicament à la commercialisation. Ce concept de base de la qualité nécessite sa validation, qui est une étape critique dans le cycle de vie d'une méthode analytique **(Clémence.D, 2006)** .

Le but de la méthode analytique est de pouvoir identifier et quantifier chaque inconnue que le laboratoire doit déterminer le plus précisément possible. La validation introduite dans ces méthodes permet de déterminer avec une précision maximale des quantités inconnues. De plus, comme les laboratoires cherchent sans aucun doute à minimiser le coût d'analyse et d'utilisation quotidienne, ces techniques doivent être aussi rapides et faciles à utiliser que possible tout en conservant la plus haute qualité **(Feinberg, 2007)** .

Le produit pharmaceutique fini Razidoxine B6 250mg/5ml fait partie à la classe thérapeutique des vitamines, il joue un rôle essentiel dans le métabolisme des acides aminés, le bon fonctionnement du système nerveux, etc. Il est indiqué dans la prévention et le traitement des états de carence en vitamine B6 ainsi que dans le traitement des convulsions pyridoxinosensibles du nourrisson, et des neuropathies dues à certains médicaments **(LEMMET, 1995)** .

Cette étude se concentre sur la validation d'une méthode de dosage pour le principe actif du Razidoxine B6 en utilisant la technique de la Chromatographie Liquide à Haute Performance (HPLC) qui est une méthode largement utilisée, notamment dans l'industrie pharmaceutique pour le contrôle qualité des médicaments. Elle est connue pour ses nombreux avantages qualitatifs et quantitatifs offrant, entre autres, une meilleure sélectivité **(Linsday, 1987)** . Toute la question se pose lors de la phase de développement, en particulier le choix des phases mobiles et stationnaires et des conditions expérimentales,

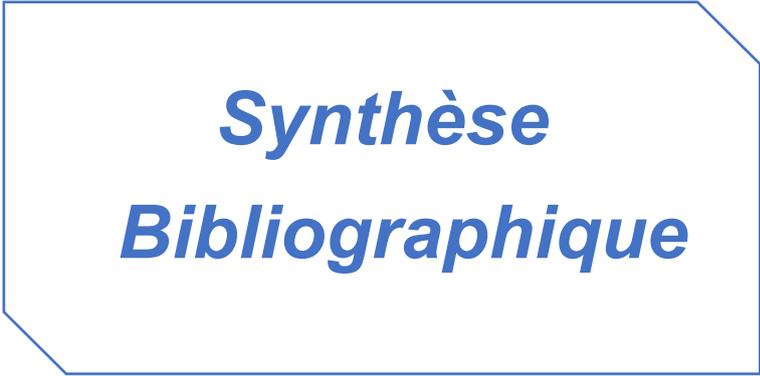
et lors de la phase de validation analytique. Cependant, toute nouvelle méthode développée doit être entièrement validée par des commissions techniques de la Société Française des Sciences et Techniques Pharmaceutiques (SFSTP), l'ICH, etc. Les guidelines décrites par le référentiel l'ICH Q2(R1) et la pharmacopée américaine et constituent le support de notre validation.

Ce travail réalisé au sein des laboratoire FRATER-RAZES porte un intérêt particulier à la validation analytique de la méthode du dosage du principe actif « chlorhydrate de pyridoxine » dans la solution injectable finie de Razidoxine B6 250mg/5ml par Chromatographie en Phase Liquide Haute Performance (CLHP).

Ce manuscrit est réparti en deux (02) parties :

- La première partie intitulée recherche bibliographique qui se compose de deux chapitres :
 - Premier chapitre : généralités sur la vitamine B6 (la pyridoxine).
 - Second chapitre : validation analytique dans ses aspects réglementaires.
- La seconde partie est réservée à la partie expérimentale subdivisée en Matériels & Méthodes et Résultats & Discussion.

Enfin, on termine par une conclusion générale quant à la validité de la méthode du dosage du principe actif 'pyridoxine HCL' dans le produit fini RAZIDOXINE B6 250mg/5ml par Chromatographie Liquide à Haute Performance



Synthèse
Bibliographique

Chapitre I :
Vitamine B6

I. Vitamine B6 : La pyridoxine

I.1 Historique

C'est en 1934 que le scientifique hongrois Paul György, alors qu'il cherchait un remède contre une maladie de peau en faisant des tests sur les rats, isola la vitamine B6. Il faudra ensuite cinq ans pour qu'elle soit synthétisée et que son nom scientifique Pyridoxine lui soit attribué qui est la forme primaire sous laquelle la vitamine B6 est présente dans les végétaux et les compléments vitaminés. En 1945, un chercheur identifie deux autres formes naturelles de la pyridoxine : le pyridoxal et la pyridoxamine (György,1939).

I.2 Définition et Structures

La vitamine B6 est une vitamine hydrosoluble dite essentielle car elle est produite par l'organisme en faibles quantité, elle doit donc impérativement être apportée quotidiennement par l'alimentation dans lesquels elle est présente sous différentes formes : La pyridoxine, le pyridoxal et la pyridoxamine. La structure de base commune aux trois molécules est celle de la pyridine (**figure 1**) (hétérocycle aromatique azoté), sur laquelle viennent se substituer aux hydrogènes différents groupes chimiques. Sa forme active dans l'organisme est nommée pyridoxal-5-phosphate ou PLP (LEMMET, 1995).

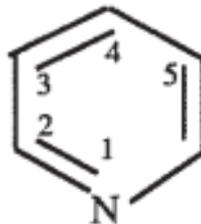


Figure 1: Structure chimique de la pyridine

Certains groupements sont communs aux trois composés : le méthyle en C2, le OH alcoolique en C3 et l'alcool primaire en C5.

Le groupement placé en C4 par contre diffère pour chacune des trois molécules. Il s'agit d'un alcool primaire (CH, OH) pour la pyridoxine, d'un aldéhyde (CHO) pour le pyridoxal, et d'une amine primaire (CH, NH) pour la pyridoxamine.

Il faut également préciser la structure de composés dérivés des 3 cités précédemment, qui existent dans l'organisme humain en tant que métabolites des vitamines alimentaires ou médicamenteuses. Ces autres composés voisins sont : le phosphate de pyridoxal (PLP) ou

Pyridoxal 5'-phosphate, le phosphate de pyridoxamine (PMP) et l'acide 4-pyridoxique (LEMMET, 1995) .

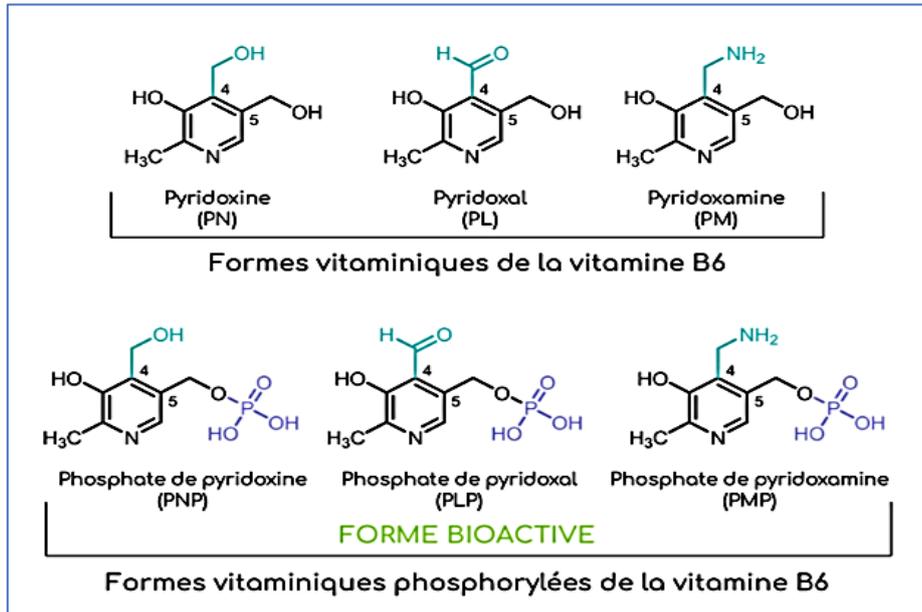


Figure 2: Structures chimiques des formes de la vitamine B6

Remarque : On peut constater l'analogie structurale avec l'isoniazide (Figure3) (antituberculeux majeur) qui est un antagoniste de la vitamine B6 (LEMMET, 1995).

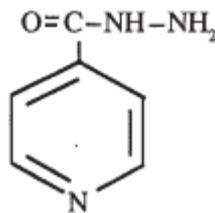


Figure 3: Structure chimique de l'isoniazide

I.3 Rôles et bienfaits

Elle a de nombreux rôles au sein de l'organisme. Citons notamment :

- Cofacteur dans plus de 140 réactions cellulaires principalement reliées à la biosynthèse et au catabolisme des acides aminés et des protéines ; fonctionnant dans les réactions de décarboxylation, de transamination, de racémisation, d'élimination et de remplacement, ainsi que dans les interconversions des groupes B (**annexe1**).
- Synthèse de certains anticorps, de l'hémoglobine et de certains neurotransmetteurs comme la sérotonine, la mélatonine, la dopamine et l'acide gamma-aminobutyrique.
- Amélioration des symptômes en phase prémenstruelle.

- Prévention cardio-vasculaire.
- Le maintien de la fonction nerveuse et de l'équilibre psychique, et d'une glycémie normale.
- La contribution à la bonne absorption de la vitamine B12 par l'organisme et à la production d'acide chlorhydrique.
- Production d'énergie à partir du glycogène musculaire (forme de stockage des sucres dans le muscle).
- Nécessaire à la production de la vitamine B3 ; à partir de l'acide aminé tryptophane.
- Contribution à la synthèse normale de la cystéine et stimule la synthèse de la kératine constituant le cheveu. Ces deux actions vont favoriser la régénération cellulaire du cuir chevelu et permettre de freiner les éventuelles chutes de cheveux.
- Maintenir la peau saine.
- Efficace en cas de nausées matinales chez les femmes enceintes.
- Elle contribue à la biosynthèse de la chlorophylle chez les végétaux (**LEMMET, 1995**) .

I.4 Mécanisme d'action

Le PLP catalyse différentes réactions telles que la transamination, la décarboxylation, la racémisation et l'élimination, sous forme libre ou liée à l'enzyme. Ces réactions sont considérablement facilitées et accélérées en présence de PLP en raison de la nature électro-attractante de la molécule, qui déstabilise les liaisons autour de l'atome de carbone alpha par le biais du système formé avec les acides aminés (**LEMMET, 1995**) .

I.5 Métabolisme de la vitamine B6

I.5.1 Absorption digestive

La pyridoxine, la pyridoxamine et le pyridoxal sont rapidement absorbés à partir des aliments et des médicaments oraux par les cellules de la muqueuse de l'intestin grêle par les phosphatases, tandis que leurs analogues phosphorylés subissent d'abord une déphosphorylation et une hydrolyse par les phosphatases alcalines intestinales, et sont ensuite absorbés au niveau du duodénum et du jéjunum par un mécanisme passif non saturable.

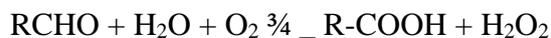
Après leur absorption, les PM et PN sont transformés en PMP et PNP par la pyridoxale kinase ; ces composés sont ensuite convertis en coenzyme PLP par l'enzyme pyridoxine (pyridoxamine) phosphate (PNP) oxydase. Ce processus ne se produit que dans les

hépatocytes et, dans une moindre mesure, dans les cellules de la muqueuse de l'intestin grêle, en raison de l'absence de PNP oxydase dans la plupart des tissus. Les membranes cellulaires étant imperméables au PLP, celui-ci est soit déphosphorylé par l'enzyme phosphohydrolase afin que le PL puisse être libéré dans la circulation sanguine, soit directement fixé à l'albumine sous forme de base de Schiff et libéré par les hépatocytes dans la circulation sous forme de complexe PLP-albumine. Le PLP est également absorbé par les érythrocytes et transporté par l'hémoglobine vers d'autres tissus.

Enfin, le PLP lié aux protéines est déphosphorylé et le produit final PL en combinaison avec le PL libre dans le plasma est ensuite transformé à l'intérieur des tissus cibles sous l'effet de l'enzyme pyridoxal kinase en coenzyme PLP, qui est la forme active de la vitamine B6. Le PLP est lié à diverses protéines à l'intérieur des tissus pour le protéger des enzymes phosphatases (LEMMET, 1995).

I.5.2 Catabolisme et élimination

Les phosphatases alcalines déphosphorylent les formes phosphorylées de la vitamine B6. L'aldéhyde oxydase catalyse la transformation du pyridoxal en acide pyridoxique selon la réaction suivante :



La vitamine B6 s'élimine dans les urines, essentiellement sous la forme d'acide pyridoxique (LEMMET, 1995).

I.6 Source de la vitamine B6

La vitamine B6 est ubiquitaire : on la trouve dans de très nombreux aliments (aussi bien animaux que végétaux). Elle possède aussi la particularité d'être synthétisée par les bactéries saprophytes du tube digestif cependant la quantité produite est insuffisante pour couvrir les besoins quotidiens de l'organisme ; il faut donc en consommer quotidiennement.

Les teneurs maximales de vitamine B soient trouvées dans :

- Les abats (foie, rein...) ;
- Les viandes rouges (porc...), la volaille (dinde, poule) ;
- Les germes de blé, les céréales entières ;
- La levure de bière ;
- Les légumineuses (lentilles, haricots secs) et certains fruits (banane) (LEMMET, 1995).

I.7 Carence en vitamine B6

La carence en vitamine B6 est rare, et est rarement due à un apport alimentaire insuffisant comme de nombreux aliments la contiennent. Néanmoins, elle apparaît car les processus auxquels sont soumis les aliments hautement transformés peuvent en éliminer cette vitamine.

Les maladies rénales en phase terminale, l'insuffisance rénale chronique et d'autres maladies rénales peuvent entraîner une carence en vitamine B6. De plus, les syndromes de malabsorption, tels que la maladie cœliaque, la colite ulcéreuse ; les troubles liés à la consommation d'alcool, ainsi que certaines maladies génétiques, telles que l'homocystinurie, et également certains médicaments, comme les antiépileptiques, l'antibiotique isoniazide, l'hydrazine (utilisée pour traiter l'hypertension artérielle), etc.

Cette carence est fréquente chez les personnes qui ont une carence sévère en protéine et en calories (dénutrition protéino-énergétique) ; les personnes atteintes ne consomment pas suffisamment de la vitB6.

La carence en vitamine B6 est associée à une anémie microcytaire, des anomalies électroencéphalographiques, une dermatite avec chéilose (desquamation sur les lèvres et fissures aux coins de la bouche) et une glossite (langue enflée), une dépression et une confusion, et une fonction immunitaire affaiblie. Les personnes présentant des concentrations limites de vitamine B6 ou une carence légère peuvent ne présenter aucun signe ou symptôme de carence pendant des mois, voire des années. Chez les nourrissons, une carence en vitamine B6 provoque une irritabilité, une audition anormalement aiguë et des crises convulsives (LEMMET, 1995) .

Le diagnostic de cette carence est habituellement clinique. Aucun test unique de laboratoire ne permet de déterminer le statut de vitamine B6 ; la mesure du phosphate de pyridoxal sérique est la plus commune.

Le traitement de cette carence repose sur la correction de la cause et à la supplémentation en vitamine B6. La pyridoxine 50 à 100 mg par voie orale une fois par jour corrige en général la carence chez l'adulte, et de 30 à 50 mg 1 fois/jour chez les patients qui prennent de l'isoniazide. Dans les carences dues à l'augmentation des besoins métaboliques, des quantités supérieures aux apports journaliers recommandés peuvent être nécessaires. Dans la plupart des cas d'anomalies congénitales du métabolisme, des posologies élevées de pyridoxine peuvent être efficace (LEMMET, 1995) .

I.8 Excès de vitamine B6

Tout comme les carences, les excès en pyridoxine sont rares car elle est très peu stockée par l'organisme. La vitamine B6 à doses très élevées peut être prescrite pour traiter des troubles tel que le syndrome du canal carpien ou le syndrome prémenstruel. Néanmoins, une prise prolongée de fortes doses de cette dernière pendant plusieurs mois peut provoquer (Cardin, 2020) :

- Une faiblesse musculaire et des difficultés à marcher ;
- Un engourdissement et une perte de sensibilité au niveau des mains et des pieds ;
- Une neuropathie, des lésions du système nerveux ;
- Une atrophie testiculaire et une réduction de la motilité des spermatozoïdes.

Certaines recherches ont montré que des niveaux élevés de B6 inhibent la multiplication des cellules tumorales hépatiques in vitro chez les rats.

Le diagnostic de cet excès est clinique et est basé sur les symptômes et l'existence d'antécédents de prise excessive de vitamine B6, et le traitement consiste à l'arrêt de la prise des suppléments de la vitB6 ; la guérison est lente et parfois incomplète chez certains patients.

Chapitre II :
Validation analytique

Les exigences de l'industrie pharmaceutique en termes de qualité sont de plus en plus élevées, et la validation des méthodes analytiques est une réglementation importante pour contrôler le système d'assurance qualité des laboratoires.

Les sociétés pharmaceutiques doivent évaluer et valider les performances de la méthode d'analyse utilisée dans des conditions analytiques bien précises, et d'assurer la fiabilité et la traçabilité de ces résultats produits par l'étude de certains paramètres (critères de validation) au moyen d'outils statistiques. En effet, la validation est une étape obligatoire dans le cycle de vie d'une procédure analytique, telle qu'elle est définie et publiée dans différents référentiels, documents et recommandations majeurs (ISO, ICH, SFSTP, FDA, etc.). Cela permet d'obtenir des produits de haute qualité, performants et sûrs, qui conservent leurs caractéristiques de la conception à la fin de la commercialisation, ainsi que de réduire fortement le risque d'apparition de non-conformité et de maîtriser la non-qualité (Feinberg,2007) .

II.1 Définition et objectif

La validation est l'opération qui intervient après la mise au point d'une nouvelle procédure analytique pour démontrer que la méthode employée pour l'application visée est valide, que les résultats obtenus sont fiables, et donc corrects par définition. Divers documents et directives réglementaires doivent être respectés, tels que ISO 8402 :1995, NF03-110-1998 USP25 2005.

Selon la norme ISO 8402 :1994, la validation est la confirmation par l'examen et la fourniture de preuves objectives que les exigences particulières d'une utilisation prévue spécifiée sont satisfaites (Feinberg, 2007).

➤ Objectif :

L'objectif principal de la validation d'une méthode analytique est de s'assurer qu'une méthode analytique particulière fournit des résultats suffisamment fiables et reproductibles pour un objectif analytique donné. Par conséquent, les conditions et le but de l'utilisation de cette méthode doivent être clairement définis. Toutes les méthodes utilisées par les entreprises pharmaceutiques, qu'elles soient ou non incluses dans la pharmacopée, sont soumises à ces principes. En d'autres termes, ' Le but de la validation d'un programme analytique est de démontrer qu'il est adapté à son objectif ' (Feinberg,2007).

II.2 Validation dans le domaine pharmaceutique et le contexte réglementaire

Le contrôle analytique d'un médicament et/ou de ses constituants est indispensable pour garantir que le médicament en question est conforme en quantité et qualité, et restera sûr et efficace pendant la durée de validité proposée, (stockage, distribution et durée d'utilisation). Les spécifications du médicament sont contrôlées par des protocoles validés ou élaborés et validés lors de sa mise au point. Ainsi, on aura l'assurance que les spécifications de qualité, et de quantité sont applicables non seulement à la préparation pharmaceutique qui a servi à établir les caractéristiques pharmaco-toxicologiques des principes actifs et excipients, mais aussi aux formes galéniques mises sur le marché, cette étape est nécessaire et reste la seule base d'acceptabilité de tous les lots ultérieurs, du moins pour les principes (Clémence.D, 2006) .

- ✚ Des directives sur la validation des méthodes analytiques sont fournies dans des guidelines et publications différentes, dont on cite :

II.2.1 Pharmacopée

Une pharmacopée est une norme opposable qui fixe, sous forme de monographie, définit les normes de pureté pour la fabrication des médicaments (à usage humain ou vétérinaire) : des matières premières ou des préparations entrant dans la fabrication des médicaments, ainsi que les méthodes utilisées pour assurer leur contrôle.

Les méthodes décrites dans les pharmacopées sont des méthodes de référence et sont considérées comme validées, cependant des instructions sont données dans les chapitres individuels relatifs à ces méthodes afin que les laboratoires puissent s'assurer de leur compétence pour les mettre en œuvre (Christelle, 2021) .

Il existe plusieurs pharmacopées : française ; compilée et publiée par l'ANSM, américaine (USP), Britannique, Japonaise, Chinoise et internationale.

- **Pharmacopée des États-Unis (USP) :** Décrit les normes de qualité, de pureté, de force et d'identité pour les médicaments, les ingrédients alimentaires et les compléments alimentaires ; et est mise à jour sous le nom de USP-NF (Shabir,2003).
- ✚ **L'USP-NF :** est une combinaison de la United States Pharmacopeia (USP) et du National Formulary (NF) ; il décrit les normes de qualité des médicaments, les méthodes d'analyse et explique la terminologie, et il intègre également les spécifications d'emballage des médicaments. Elle se réfère entre autres aux normes existantes et décrit des méthodes d'essai avec des valeurs limites (Shabir,2003).

✚ **FDA : Food and Drug Administration**, a pour mandat d'assurer la sécurité, l'efficacité ou la qualité des produits de santé qui comprennent les aliments, les médicaments, les cosmétiques, les dispositifs, les produits biologiques, les vaccins, les réactifs de diagnostic in vitro, les dispositifs ou équipements émettant des radiations et les substances dangereuses domestiques/urbaines, y compris les pesticides et les jouets, ou les produits de consommation pouvant avoir un effet sur la santé qui nécessitent des réglementations telles que déterminées par la FDA.

Entre autres, elle est également mandatée pour faire appliquer les dispositions des lois dont on cite :

- RA 9502, ou loi de 2008 sur les médicaments universellement accessibles, moins chers et de qualité ;
- RA 6675, ou la loi sur les génériques de 1988 ;
- RA 10918, ou la loi sur la pharmacie ;
- RA 8203, ou la loi spéciale sur les médicaments contrefaits (**Klaus, 1986**).

II.2.2 Documents ICH

Deux guides de l'ICH (International Conference on Harmonization) ont été dédiés à la validation analytique : Q2 : « Analytical Validation ».

- **ICHQ2A** : Validation of analyticals method « definitions and terminology » 27 October 1994 : Textes qui regroupent les définitions et la terminologie qui doivent être prises en compte au cours de la validation des méthodes analytiques.
- **ICHQ2B** : Validation of analyticals method « Methodology » 6 November 1996 : Son but est de fournir des conseils et 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.
- **ICHQ2R1** : Validation of analyticals method « Text and methodology » November 2005 : C'est une révision de l'ICHQ 2A et ICHQ 2B, dans le but de regrouper les textes de la terminologie et les définitions avec la méthodologie (**Pinguet, 2015**)

II.2.3 Documents des commissions de la SFSTP

Présentent les recommandations réglementaires communément admises et appliquées dans l'industrie pharmaceutique nationale et une démarche statistique pour la validation d'une procédure analytique.

- SFSTP « Guide de validation, rapport d'une commission SFSTP »
 - Méthodologie (en 1992)
 - Exemples d'application (en 1992)
- SFSTP « dosage dans les milieux biologiques par des méthodes chromatographiques » (1997) ;
- SFSTP « validation des procédures analytiques quantitatives : harmonisation des démarches »
 - Partie I : généralités en 2003 ;
 - Partie II : statistiques parues dans STP Pharma Pratique en 2006 ;
 - Partie III Exemples d'application, paru dans Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis en 2008 ;
 - Partie IV : exemples d'application en 2008 (**Pinguet, 2015**) .

II.3 Validation des méthodes analytiques en industrie pharmaceutique

C'est en 1985 que l'industrie pharmaceutique et les autorités d'enregistrement américaine 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 (**tableau 1**) (**Khalil, 2017**).

Tableau I : Les catégories de Guidelines ICH et leurs codes (**Khalil, 2017**)

Catégorie	Code
Qualité	Q
Sécurité	S
Efficacité, performance	E
Multidisciplinaire	M

II.4 Types de procédures analytiques

Les différents types de procédures analytiques sont comme suit (**Zerrouk, 2012**) :

- **Epreuves d'identification** : servent à vérifier l'identité de la substance analysée dans un échantillon. Elles consistent normalement à vérifier une caractéristique de l'échantillon (par exemple ses propriétés spectrales, ses caractères chromatographiques, sa réactivité chimique, etc.) avec celle d'un étalon de référence.
- **Analyse des impuretés** : peut-être un dosage quantitatif ou une vérification d'une teneur limite. Dans les deux cas, il s'agit d'évaluer avec exactitude la pureté de l'échantillon. Les caractéristiques à évaluer diffèrent selon qu'on valide une méthode de dosage ou une méthode de vérification d'une teneur limite.
- **Dosage de la partie active ou d'une ou de plusieurs autres composantes de la substance médicamenteuse ou du produit fini** : ont pour objet de mesurer la quantité de substances à analyser contenue dans un échantillon donné.

II.5. Cycle de vie des méthodes analytiques

Le cycle de vie d'une méthode (**annexe 4**) est un concept souligné dans la norme ISO 17025. L'idée de base est qu'une méthode d'analyse n'est pas statique, mais une entité vivante qui passe par plusieurs étapes interdépendantes.

II.5.1 Principales étapes de ce cycle sont les suivantes

Selon le guide de validation des méthodes d'analyses (2015) les principales étapes du cycle sont comme suit :

- Une phase de sélection où des objectifs et des conditions opératoires initiales sont définis.
- Une phase de développement, avec ou sans optimisation au moyen de plans d'expériences
- Une phase de validation (caractérisation intra-laboratoire et, au besoin, inter-laboratoires, de la méthode) précédée, selon les cas, d'une phase de pré-validation.
- Une phase d'application en routine, incluant le plus souvent une validation en routine et parfois une validation partielle ou une revalidation.

II.6 Les types et le choix des critères de la validation

On distingue deux types de validation selon Max Feinberg (2004) ; la validation intra-laboratoire et inter-laboratoires, ainsi qu'il existe divers critères de validation dont le choix dépend de la méthode d'analyse, qu'elle soit qualitative ou quantitative.

II.6.1 Validation intra-laboratoire (ou in-house):

Est une validation interne concernant l'ensemble des méthodes analytiques développées par un laboratoire. (Le sujet d'étude de ce mémoire se limite exclusivement à ce type de validation).

La spécificité, la sensibilité, la fidélité, la limite de détection et domaines de validité font partie des critères de performances qualitatives et quantitatives, tandis que la fonction d'étalonnage, la justesse, l'exactitude, linéarité et limite de quantification qui font partie des critères de performance quantitatives seulement.

II.6.2 Validation inter-laboratoires (ou en collaboration) :

Concerne principalement les méthodes analytiques destinées à être utilisées par plusieurs laboratoires, ou bien dont les résultats vont servir lors d'échanges commerciaux. Ainsi, ce type de validation se rencontre rarement dans l'industrie pharmaceutique où les méthodes sont utilisées en interne, et très fréquemment dans l'industrie agro-alimentaire. Ce type de validation permet en outre de calculer les limites de reproductibilité de la méthode.

La reproductibilité, répétabilité ainsi que d'autres critères tels que le délai, la rapidité, le cout ... sont considérés comme étant critères de performance qualitatives et quantitatives, tandis que la limite de détection, la spécificité, la sensibilité sont qualitatives uniquement et la limite de détection qui est quantitative.

✓ Il faut noter qu'on peut avoir d'autres critères selon les exigences des référentiels.

II.7 Critères de la validation analytique d'une méthode de dosage

Il importe de bien comprendre l'objectif de l'analyse, car c'est d'après ce facteur qu'on détermine quelles caractéristiques de validation doivent être évaluées. En général, selon le guide de la ligne directrice Q2(R1) : validation des méthodes d'analyses (2015), la validation porte sur les caractéristiques suivantes :

Tableau II : Critères de la validation en fonction du type d'analyse.

Type de tests caractéristiques	Identification	Recherche d'impuretés		Dosage
		Essai quantitatif	Essai qualitatif	Dissolution Teneur ou activité
Exactitude	-	+		+

Précision	-	+	+
Répétabilité	-	+	+
Fidélité intermédiaire	-	+	+
Spécificité	+	+	+
Limite de détection	-	-	-
Limite de quantification	-	+	-
Linéarité	-	+	+
Intervalle de mesure	-	+	+

(+) : À évaluer (-) : à ne pas évaluer

II.7.1 Conformité du système

Elle 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 :

- Le nombre de plateaux théoriques ;
- Le facteur de symétrie et la résolution ;
- L'écart type relatif du signal pour les différentes lectures ou injections de la solution standard 100% (Relatif Standard Déviation : RSD), la moyenne et l'écart type.

II.7.2 Spécificité

La spécificité est la propriété qui fait qu'une méthode d'analyse rend compte sans ambiguïté de la substance analysée en présence d'autres composantes normalement présentes. Ces dernières peuvent inclure des impuretés, des produits de dégradation, la matrice, etc.

Cette définition renvoie à plusieurs aspects :

- Identification : Il s'agit de vérifier l'identité de la substance analysée ;
- Pureté : Il s'agit de vérifier si les analyses permettent de déterminer avec exactitude la teneur en impuretés de la substance analysée (recherche des substances apparentées, métaux lourds, résidus de solvants, etc.) ;

- Dosage (teneur ou activité) : Il s'agit d'obtenir un résultat indiquant exactement la concentration ou l'activité de la substance analysée dans l'échantillon.

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% et la solution essai.

II.7.3 Linéarité

La linéarité d'une méthode d'analyse est sa capacité de donner des résultats qui sont directement (à l'intérieur de certaines limites) proportionnels à la concentration (quantité) de la substance analysée dans un échantillon. L'étude de la linéarité est en réalité une évaluation du biais d'exactitude.

On distingue deux types de linéarité :

II.7.3.1 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 $\mu\text{g/ml}$

R : coefficient de corrélation

II.7.3.2 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 partir de 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.

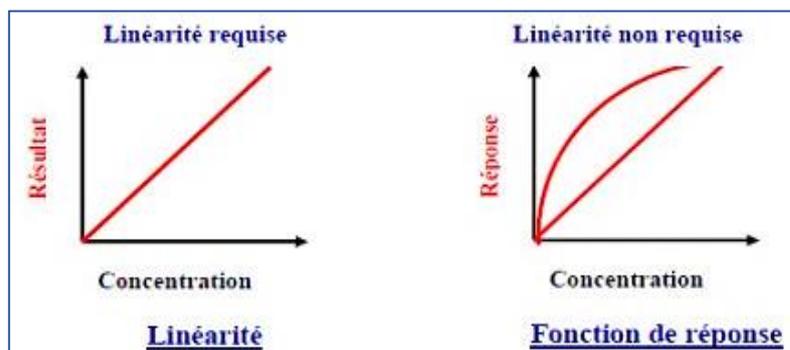


Figure 4: Courbe de linéarité.

II.7.4 Exactitude

Exprime la somme de la justesse et fidélité et correspond à « l'étroitesse de l'accord entre la valeur considérée comme vraie ou la valeur de référence et la valeur obtenue ». Elle doit être établie dans son intervalle de mesure. Elle s'exprime par le pourcentage d'erreur entre la valeur observée et la valeur réelle. Cette évaluation devra être confirmée sur 09 préparations minimum (en général 03 préparations sur 03 niveaux) en recouvrant la gamme de validation.

$$\text{L'exactitude} = |\text{Valeur de référence} - \text{Moyenne des \% de recouvrement}|$$

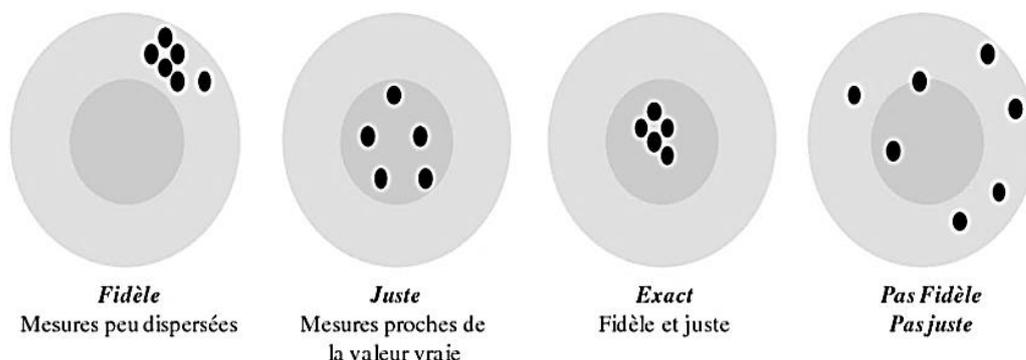


Figure 5: Notions de fidélité et de justesse.

II.7.5 Fidélité

La fidélité ou précision exprime l'étroitesse de l'accord entre une série de mesures provenant de multiples prises d'essai d'un même échantillon homogène dans des conditions prescrites afin de calculer le coefficient de variation (CV) exprimé en pourcentage.

Néanmoins, trois types de fidélité sont généralement estimés, à savoir :

II.7.6 Répétabilité :

La répétabilité est définie par les conditions de répétabilité qui regroupent les facteurs intra-séries (mêmes conditions opératoires, échantillons d'essais identiques, dont même technicien, et court intervalle de temps entre les répétitions). Il est nécessaire d'avoir des répétitions par niveau pour identifier et quantifier les sources d'erreur. Le nombre de répétitions minimal par niveau est de 2, mais il peut être porté à 3 si le nombre de niveaux étudiés est faible ($n \leq 3$).

II.7.7 Fidélité intermédiaire

Est estimée par la répétition des séries, afin de pouvoir quantifier la contribution de cette source d'erreur sur la variabilité totale ; maximiser les sources de variations dans un même laboratoire, dont différents techniciens, des jours et d'appareils différents pour effectuer les répétitions. Le nombre minimal de séries est de 3, quel que soit le nombre de niveaux étudiés.

II.7.8 Reproductibilité

Elle correspond à la concordance entre laboratoires (travaux de collaboration visant généralement la normalisation de la méthode), ou les mesures sont réalisées sur le même échantillon (Les lieux, opérateurs et équipements sont différents). Les mesures sont réalisées sur un intervalle de temps long. Elle exprime la variabilité interlaboratoire.

Cas de 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.

II.7.9 Intervalle de mesure

L'intervalle de mesure ou l'écart d'utilisation d'une méthode d'analyse est l'intervalle entre la concentration la plus élevée et la concentration la plus faible (quantités) de la substance analysée dont on a démontré qu'elles pouvaient être déterminées avec un degré acceptable de précision, d'exactitude et de linéarité.

Les intervalles de mesure minimum à considérer sont :

- 80 à 120% de la concentration théorique pour le dosage des solutions à analyser ;
- 70 à 130% de la concentration d'essai pour une uniformité de teneur ;
- Jusqu'à 120% de la limite spécifiée pour le dosage des impuretés.

II.7.10 Stabilité des solutions

La stabilité des solutions, souvent incluse dans l'étude de robustesse, est importante pour garantir que les données générées restent exactes et permet de connaître les temps de conservation de ces dernières.

La stabilité des solutions s'entend au regard du but de la procédure analytique ;

- Pour un dosage, il s'agira de vérifier que la teneur déterminée ne varie pas au-delà de la variabilité analytique classique,
- Pour la recherche d'impuretés, il faudra regarder attentivement les variations des profils chromatographiques, et vérifier qu'aucune nouvelle impureté n'apparaît ou qu'aucune impureté présente dans l'échantillon ne disparaît au fur et à mesure des analyses.

L'étude consiste à effectuer une mesure sur les solutions de standards (solutions mère et fille dans les fioles et dans les flacons, d'échantillons et de phase mobile. 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 répliques.

Il convient d'étudier la stabilité de ces solutions pendant une période moyenne de deux ou trois jours (temps moyen de validation analytique) et sous les conditions suivantes :

- a) Stabilité dans le carrousel de la chaîne HPLC ;
- b) Stabilité à température ambiante ;
- c) 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 requise 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

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 :

A₀ : signal dû à l'analyte au temps initial.

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.

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

Avec :

C0: Concentration de l'analyse au temps initial en mg/ml.

Ct : Concentration de l'analyte au temps t en mg/ml.

Ct 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.

$$Ct = \frac{At^{[(Cstd1/Astd1)+(Cstd2/Astd1)]}}{2}$$

Avec :

Cstd 1 et Cstd 2 : concentration de l'analyte dans les solutions standard 1 et 2.

Astd1 et Astd2 : signal de l'analyte dans les solutions standard 1 et 2.

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

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

II.7.11 Robustesse

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

II.7.12 Limite de détection (LOD)

Est la plus petite quantité de l'analyte dans un échantillon pouvant être détectée, mais non quantifiée comme une valeur exacte dans les conditions expérimentales décrites de la procédure.

II.7.13 Limite de quantification (LOQ)

Elle correspond à la plus faible quantité de substance analysée que la méthode permet de doser avec un degré acceptable de précision et d'exactitude.

II.8 La chromatographie liquide haute performance

La chromatographie liquide à haute performance (le terme haute pression est également employé), est une technique de séparation analytique et préparative des molécules, elle permet l'identification, la séparation et le dosage de composés chimiques dans un composé ou un mélange de composés (**Lindsay, 1987**).

C'est une technique analytique en croissante évolution pour l'analyse des médicaments. Sa simplicité, haute spécificité et large intervalle de sensibilité, font que cette méthode soit l'idéale pour le dosage des formes pharmaceutiques et des fluides biologiques

➤ **Principe de fonctionnement :**

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 avec un débit élevé, appelée 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, 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 quand ils atteignent l'extrémité inférieure de la colonne. 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 stationnaire migrent lentement. A cet endroit, la phase mobile traverse un dispositif de détection qui détermine l'ordre et le temps de sortie de chaque espèce et 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). Chaque pic correspond à la présence d'un composé, ayant préalablement effectué des chromatogrammes standards dans les mêmes conditions, il est possible de retrouver la nature chimique de chaque composé du mélange de départ grâce à son pic caractéristique. L'aire du pic et donc son amplitude peuvent également permettre le calcul de la concentration de l'espèce chimique dans la solution injectée puisqu'elle est proportionnelle à l'aire du pic (**Lindsay, 1987**) .

La combinaison de ces attributs - rapidité et résolution élevées - conduit à l'appellation « haute performance »

➤ **Un système chromatographique est composé de :**

- Soluté (éluant, substrat).
- Phase mobile (éluant, solvant).
- Phase stationnaire (support) (**Lindsay, 1987**) .

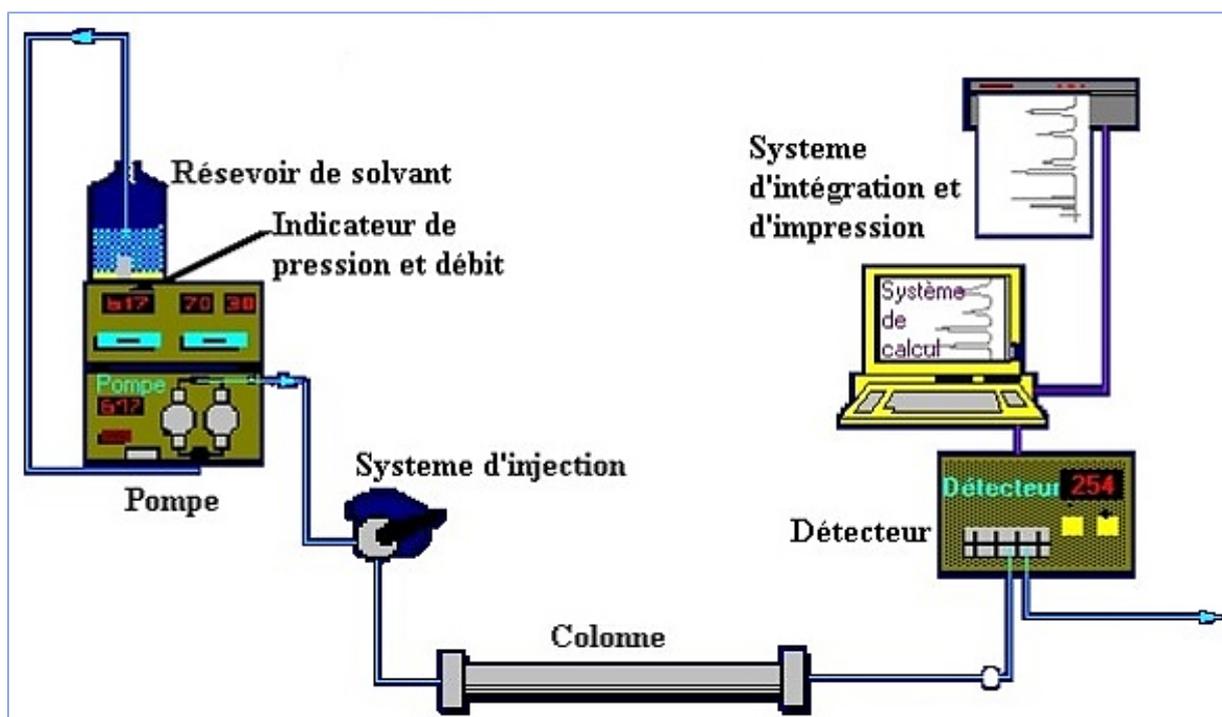


Figure 6: Schéma du principe d'une chaîne HPLC.



**Partie
expérimentale**

Chapitre I : Matériel et méthodes

I.1 Objectif

L'objectif de ce travail est l'étude de la validation analytique d'une méthode de dosage d'un principe actif (pyridoxine chlorhydrate) dans le produit fini RAZIDOXINE B6 solution injectable à 250mg/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 RAZIDOXINE B6 à 250mg/5ml est appropriée à son utilisation.

Pour réaliser ce projet de fin d'étude, j'ai bénéficiée d'un stage pratique au niveau des Laboratoires FRATER-RAZES à Alger qui m'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.

Dans ce chapitre on présentera :

- Le matériel, équipements et les méthodes utilisés au cours de l'analyse ;
- Les résultats de la validation analytique du dosage du principe actif par HPLC ;
- Une conclusion sur les résultats obtenus.

I.2 Présentation du produit RAZIDOXINE B6® 250mg/5ml :

- **Forme et présentation :**

RAZIDOXINE B6® chlorhydrate de pyridoxine 250mg/5ml, solution injectable, boîte de 10 ampoules ou de 50 ampoules.

- **Composition :**

- Principe actif : Chlorhydrate de pyridoxine.....250mg
- Excipient : Eau pour préparation injectable.....Q.S.P.5ml

- **Classe pharmaco-thérapeutique :**

Vitamine B6 (A : appareil digestif et métabolisme)

Il est indiqué dans la prévention et le traitement des états de carence en vitamine B₆ dus à un déficit congénital ou à une diminution des apports alimentaires, le plus souvent en association avec les autres vitamines du groupe B. ainsi que dans le traitement des convulsions pyridoxinosensibles du nourrisson, et des neuropathies dues à certains médicaments tels que l'INH.

I.3 Propriétés physicochimiques de la vitamine B6

La Pyridoxine (C₈H₁₁O₃N) est composée d'un noyau pyridinique substitué (LEMMET, 1995).

Sous sa forme commerciale habituelle Chlorhydrate de pyridoxine, sa formule moléculaire (C₈H₁₁O₃N, HCL) qui est une forme de vitamine B6 utilisée comme supplément nutritionnel.

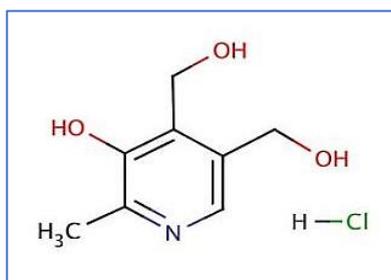


Figure 7: Structure chimique du pyridoxine chlorhydrate

- A un poids moléculaire de 205,64 g/mol
- A la composition élémentaire suivante (**Tableau 3**) :

Tableau 3 : Composition de Chlorhydrate de Pyridoxine - C₈H₁₁NO₃.HCL.

Élément	Symbole	Masse atomique	Nombre d'atomes	Pourcentage de masse
Carbone	C	12,0107 g/mol	8	46,7254%
Hydrogène	H	1,00794 g/mol	12	5,8818%
Azote	N	14,0067 g/mol	1	6,8113%
Oxygène	O	15,9994 g/mol	3	23,341%
Chlore	Cl	35,453 g/mol	1	17,2404%

- Aspect : poudre cristalline, blanche ou sensiblement blanche, sans odeur, au goût salin légèrement amer, acide ;
- A les constantes de dissociation suivantes :

$$Pka = 5,0 \text{ et } 9,0 \text{ à } 25^{\circ}\text{C} ;$$
- Solubilité : parfaitement soluble dans l'eau (vitamine dite hydrosoluble), soluble dans le propylène glycol, peu soluble dans l'alcool à 96%, pratiquement insoluble dans le chloroforme et l'éther ;
- Stable dans les conditions normales de stockage, sensible à la lumière ; elle est détruite par les radiations UV en solutions neutres ou alcalines mais pas en solution acide, et à la chaleur ;
- Se décompose entre 202 et 206°C avec fusion ;
- Se sublime ;
- Est incompatible en solution avec les alcalins et les oxydants.

I.4 Matériel et équipements

Les équipements utilisés lors de notre expérimentation sont comme suit (**annexe 3**) :

- Bain à Ultrasons « Tierratech » ;
- Balance analytique de marque « Sartorius » ;
- pH mètre « Seven Excellence » ;
- HPLC Waters e2695 « Alliance »;
- Détecteur UV ;
- Colonne C18 « X Bridge »

I.5 Matière première et produit fini

- Principe actif : pyridoxine HCL ;

- Excipient : eau pour préparation injectable (EPPI) ;
- Le produit fini RAZIDOXINE B6®.

I.6 Réactifs et solvants

- Acide acétique ;
- Acide hexanesulfonique ;
- Hydroxyde de sodium (NaOH) 1M ;
- Méthanol ;
- Eau distillée et traitée pour la HPLC

I.7 Description de la procédure de validation analytique de la méthode de dosage du Pyridoxine HCL dans le produit fini RAZIDOXINE B6® à 250mg/5ml

L'objectif principal de cette étude est d'optimiser et de valider une méthode de dosage du principe actif ' Pyridoxine HCL' présent dans la solution injectable RAZIDOXINE B6, en accord avec les recommandations internationales de la Conférence Harmonisée (ICH). Pour mettre au point le protocole expérimental, une recherche bibliographique approfondie sur les méthodes de dosage spécifiques au Pyridoxine HCL a été réalisée.

La validation de la méthode de dosage de Pyridoxine HCL dans le produit fini RAZIDOXINE B6®, solution injectable à 250mg/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 : C18 ;250×4,6mm ;5µm ; Waters ou équivalent

- Longueur d'onde : spectrophotomètre à 280nm
- Débit : 1,0ml/min
- Volume d'injection : 6 μ l

La préparation des solutions nécessaires pour l'analyse chromatographique des échantillons du standard, du placebo et du produit fini RAZIDOXINE B6® à 250mg/5ml est donnée ci-dessous :

➤ **Préparation de la phase mobile :**

On initie avec 10 ml d'acide acétique puis on ajoute 0,6 d'acide hexanesulfonique et 700 ml d'EPPI. Après avoir réalisé le mélange, on ajuste le pH à 3,0 avec l'hydroxyde de sodium (NaOH) 1M, on enchaîne avec 235ml du méthanol et on complète avec de l'EPPI jusqu'à 1 litre dans un flacon propre et sec. Le flacon est fermé hermétiquement et le mélange est agité doucement pour assurer une bonne homogénéisation des composants. La solution obtenue est ensuite versée dans le réservoir de la phase mobile, prête à être utilisée dans les analyses chromatographiques.

➤ **Diluant :** EPPI.

➤ **Standard A :** Le standard A est préparé à l'aide d'une pesée de 50 mg de pyridoxine HCL dissoute dans 100 ml d'EPPI.

➤ **Standard B :** Le standard B est préparé à l'aide d'une pesée de 50 mg de pyridoxine HCL dissoute dans 100 ml d'EPPI.

➤ **Solution essai :** La solution essai est préparée à l'aide de 1,0 ml de solution injectable dissoute dans 100 ml d'EPPI.

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

Tableau 4 : Injection des préparations.

Ordre d'injection	Nom de solution	Nombre de préparation par solution	Nombre d'injection
1ère	Standard A	1	5
2ème	Standard B	1	1
3ème	Solution essai	2	1

I.8 Méthodologie de la validation analytique

I.8.1 Test de conformité système :

La conformité du système de la méthode implique de s'assurer que tous les équipements, les réactifs et les conditions de mesure sont en conformité avec les spécifications requises.

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%
- Ecart type relatif du signal pour les 05 injections de la solution standard 100% doit être $\leq 2,0\%$
- Facteur de symétrie du pic principal doit être $\leq 2,0\%$.
- Le nombre de plateaux théoriques sera fixé durant la validation analytique, en analyse de routine il sera exigé que les valeurs soient $\geq 50\%$ de celle trouvée en validation.

I.8.2 Test de spécificité :

Elle est évaluée pour vérifier si la méthode permet une séparation précise des composants cibles de l'échantillon, en évitant toute interférence ou contamination croisée à partir du blanc avec la pyridoxine HCL et le placebo l'interférence par rapport au signal de la solution standard doit être $\leq 2,0\%$.

I.8.3 Test de linéarité et intervalle de mesure :

Sont examinés pour s'assurer que la méthode peut quantifier avec précision les concentrations dans une plage spécifiée.

- Le biais moyen doit être compris entre 95% à 105,0%.
- Le coefficient de corrélation R doit être $\geq 0,99$.

La procédure d'analyse de la gamme de linéarité sur standard :

➤ **Préparation des solutions :**

- **Préparation de solutions standards à 100% :** à l'aide d'une pesée de 50mg de pyridoxine HCL WS dans 100ml d'EPPI.
- **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, puis on complète au volume avec le diluant.

Calculs de concentrations :

On a le principe actif à 250mg/5ml
100%  50mg/100ml 

$$80\% \longrightarrow \left(\frac{80 \times 50}{100}\right) = 40\text{mg}$$

Tableau 4 : Linéarité sur standard

Linéarité sur standard	Intervalle de mesure	Pyridoxine HCL
	80%	40mg
	90%	45mg
	100%	50mg
	110%	55mg
	120%	60mg

I.8.4 Test de fidélité (répétabilité, fidélité intermédiaire) :

Est évaluée en termes de répétabilité, c'est-à-dire la cohérence des résultats lors de répétitions d'analyses, ainsi que la fidélité intermédiaire, qui mesure la variabilité entre différents opérateurs ou laboratoires.

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

I.8.5 Test d'exactitude :

Vérifiée en comparant les résultats obtenus avec une valeur de référence connue.

- 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 100 ml, peser exactement 40,0mg de Pyridoxine HCL, puis compléter au volume avec le diluant. Agiter et mettre dans un bain à ultrasons pour une dissolution.
- **Solution placebo chargés à 100%** : Dans une fiole de 100 ml, peser exactement 50,0 mg de Pyridoxine HCL, puis compléter au volume avec le diluant. Agiter et mettre dans un bain à ultrasons pour une dissolution complète.
- **Solution placebo à 120%** : Dans une fiole de 100 ml, peser exactement 60,0 mg de Pyridoxine HCL, puis compléter au volume avec le diluant. Agiter et mettre dans un bain à ultrasons pour une dissolution.

- ✚ **Pour le standard :**

La solution standard est stockée dans des conditions qui assurent la stabilité.

La stabilité de la norme est analysée sur une période déterminée, à l'aide d'une solution fraîchement préparée à chaque intervalle de temps aux fins de comparaison.

I.8.6 La 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 (longueur d'onde et débit).

Pour cela on prépare trois solutions qui sont la solution standard, la solution placebo chargé à 90% et à 110% quatre fois.

Préparation des solutions :

- Préparation de la solution standard :

Dans une fiole jaugée de 100ml, on pèse 50mg de Pyridoxine HCL, puis on complète avec de l'EPPI.

- Préparation de la solution placebo chargé à 90% :

Dans une fiole de 100ml, peser directement 45mg de pyridoxine HCL puis compléter au volume avec l'EPPI jusqu'au trait de jauge.

- Préparation de la solution placebo chargé à 110% :

Dans une fiole de 100ml, peser directement 60 mg de pyridoxine HCL puis compléter au volume avec l'EPPI.

Variation de débit et longueur d'onde :

Probabilité 1 :

- Colonne : C18 ;250×4,6 mm ;5µm ;
- Débit :0,8 ml/min ;
- Détection : spectrophotomètre à 278 nm ;
- Volume d'injection : 6 µl.

Probabilité 2 :

- Colonne : C18 ;250×4,6 mm ; 5µm ;
- Débit :0,8 ml/min ;
- Détection : spectrophotomètre à 282 nm ;
- Volume d'injection : 6 µl.

Probabilité 3 :

- Colonne : C18 ;250×4,6 mm ; 5µm ;
- Débit :1,2 ml/min ;

- Détection : spectrophotomètre à 278 nm ;
- Volume d'injection : 6 µl.

Probabilité 4 :

- Colonne : C18 ;250×4,6 mm ; 5µm ;
- Débit :1,2 ml/min ;
- Détection : spectrophotomètre à 282 nm ;
- Volume d'injection : 6 µl.

➤ 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. Ce paramètre devrait être étudiée pour une durée de 2 jours.

Un seul type de stabilité sur les solutions qui est la stabilité à température ambiante a été réalisé sur les solutions préparées. Le pourcentage de dégradation Dt doit être $\leq 2,0\%$.

Après 24 heures :

- **Préparation des solutions placebo chargé à 100% :**

Dans une fiole de 100ml, le standard est fraîchement préparé à l'aide d'une pesée de 50 mg de Pyridoxine HCL dissoute dans 100ml d'EPPI.

- **Préparation dissolutions standard :**

Dans une fiole de 100ml, le standard est fraîchement préparé à l'aide d'une pesée de 50 mg de Pyridoxine HCL dissoute dans 100ml d'EPPI.

Figure 1: Après 48 heures :

Les mêmes préparations de solutions que Jour 1.

III.9. Programme de validation analytique

L'ensemble des tests de la validation analytique du Pyridoxine HCL dans le produit fini RAZIDOXINE B6® 250mg/5ml ont été réalisés selon le programme illustré sur le tableau Suivant :

Tableau 5 : Programme de la validation analytique du produit injectable RAZIDOXINE B6®

Jour	Paramètre	Solutions à préparer	Nombre de préparations	Nombre d'injection
		Blanc	1	1
		Solution placebo	1	1

1	Conformité du système	Solution essai	1	1
		Solution standard a80% de PA	1	3
	Spécificité	Solution standard a 90% de PA	1	3
		Solution standard a 100% de PA	1	6
	Linéarité	Solution standard a 110% de PA	1	3
		Solution standard a 120% de PA	1	3
	L'intervalle de mesure	Solution placebo chargé a80% de PA	1	3
		Solution placebo chargé a90% de PA	1	3
		Solution placebo chargé a100% de PA	1	3
		Solution placebo chargé a100% de PA	1	3
		Solution placebo chargé a120% de PA	1	3
2	Fidélité/exactitude : -répétabilité	Solution standard de à 100%	2	5 et 1
		Solution essai	6	1
	-fidélité intermédiaire J1	Solution fidélité à 80% de PA M1	3	1
		Solution fidélité à 100% de PA M1	3	1
	L'intervalle de mesure	Solution fidélité à 120% de PA M1	3	1
		Solution fidélité à 80% de PA M2	3	1

	-stabilité des solutions après 24h	Solution fidélité à 100% de PA M2	3	1
		Solution fidélité à 120% de PA M2	3	1
3	L'intervalle de mesure Fidélité intermédiaire J2 Stabilité des solutions a température ambiante après 48h	Solution de standard à 100%	1	5
		Solution de standard à 100% fraîchement préparé	1	1
		Solution essai	1	1
		Solution fidélité à 80% de PA M1	1	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

Chapitre II : Résultats et discussion

II.1 Introduction

Dans le cadre de cette étude, la validation de la méthode de dosage du Pyridoxine HCL a été développée et validée en utilisant la chromatographie en phase liquide à haute performance. Les résultats présentés dans cette section sont basés sur l'analyse des échantillons effectuée à l'aide de l'HPLC pour évaluer différentes caractéristiques de la méthode dont la conformité du système, la spécificité, la linéarité, Fidélité (répétabilité, fidélité intermédiaire), l'exactitude, la stabilité des solutions, la limite de détection et quantification.

Ces résultats fournissent des données qu'on va traiter et analyser pour tirer des conclusions significatives sur la qualité et la fiabilité de la méthode de dosage du Pyridoxine HCL. La discussion des résultats est basée sur les données de l'analyse HPLC pour évaluer la performance de la méthode analytique et établir des comparaisons avec les normes.

Le traitement statistique est réalisé à l'aide de feuille de calcul Excel développée et validée par les laboratoires frater Razes permettant d'effectuer des tests statistiques pour évaluer : la linéarité, la fidélité, l'exactitude, la stabilité des solutions.

II.2 Résultats et discussion de la validation de la méthode du dosage de Pyridoxine HCL dans le Razidoxine B6 250mg /5ml

II.2.1 Evaluation du test conformité système

La conformité du système est évaluée et établit pour s'assurer que tous les aspects techniques et instrumentaux sont conformes aux exigences de l'analyse. Ainsi que la capacité à fournir des résultats reproductibles et fiables. Toutes les spécifications techniques ont été respectées. Les conditions chromatographiques, : la pression, la température, le débit de la phase mobile et le volume d'injection, ont été maintenus dans les limites requises tout au long des analyses et la calibration régulière du système HPLC a été effectuée pour assurer l'exactitude des mesures.

Les résultats expérimentaux de l'étude de la validation analytique du Pyridoxine HCL dans le produit fini RAZIDOXINE B6® à 250mg/5ml, obtenus pour le test de conformité sont représentés dans les **figures 8-9 -10**, et récapitulées sur le **Tableau 7**.

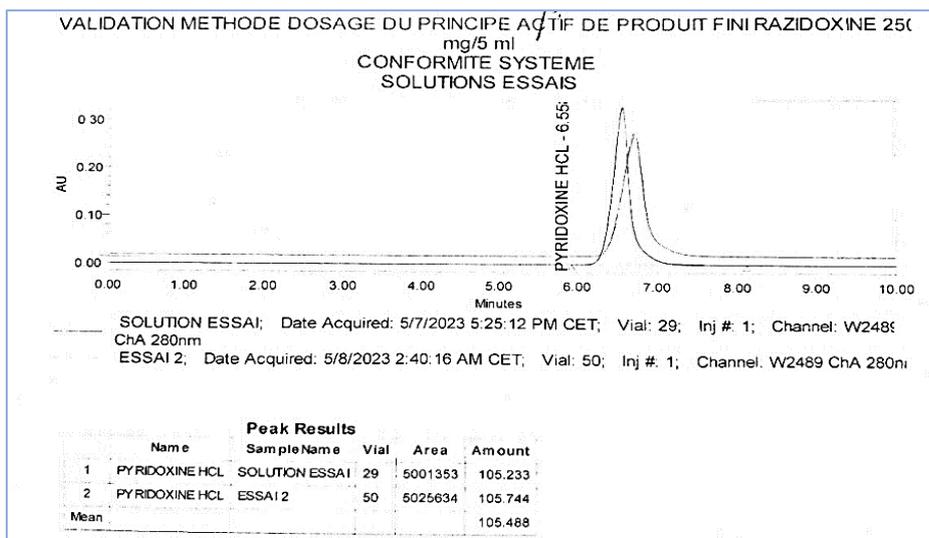


Figure 8 : Chromatogramme obtenu par HPLC des solutions essais (E1 et E 2).

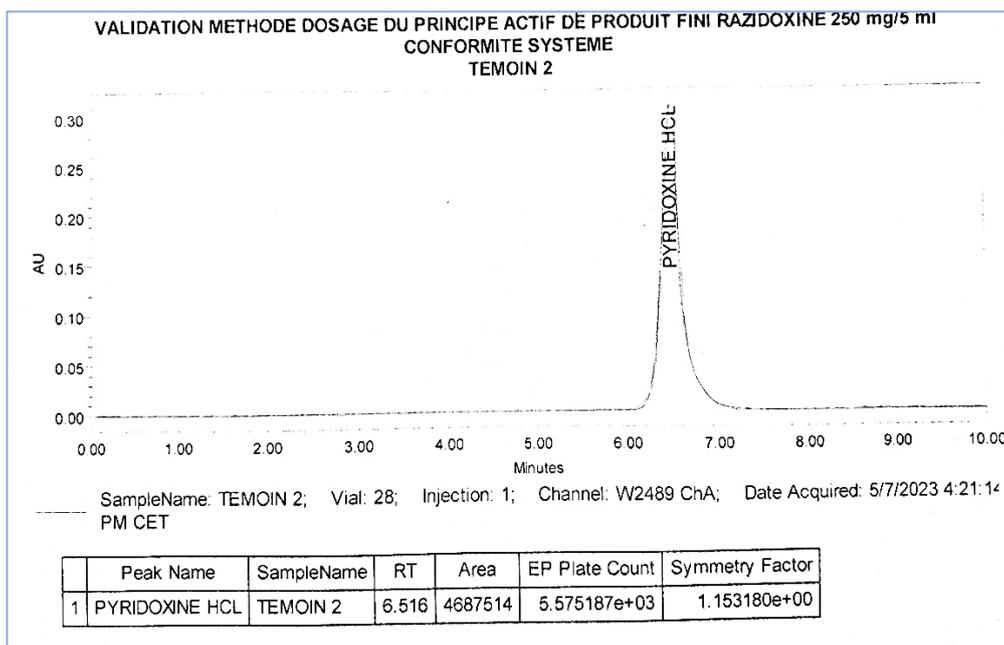


Figure 9 : Chromatogramme obtenu par HPLC de la solution Témoin

Retention Time Summarized by Name Channel: W2489 ChA					
	Sample Name	Inj	Channel	Vial	PYRIDOXINE HCL
1	TEMOIN 1	1	W2489 ChA	27	6.516
2	TEMOIN 1	2	W2489 ChA	27	6.531
3	TEMOIN 1	3	W2489 ChA	27	6.523
4	TEMOIN 1	4	W2489 ChA	27	6.549
5	TEMOIN 1	5	W2489 ChA	27	6.547
	Mean				6.533
	Std. Dev				0.015
	% RSD				0.2

Area Summarized by Name Channel: W2489 ChA					
	Sample Name	Inj	Channel	Vial	PYRIDOXINE HCL
1	TEMOIN 1	1	W2489 ChA	27	4753413
2	TEMOIN 1	2	W2489 ChA	27	4746344
3	TEMOIN 1	3	W2489 ChA	27	4780847
4	TEMOIN 1	4	W2489 ChA	27	4768897
5	TEMOIN 1	5	W2489 ChA	27	4789804
	Mean				4767861
	Std. Dev				18186
	% RSD				0.4

Figure 10 : Temps de rétention, surfaces, % RSD de la solution standard 100% (ou témoin).

Tableau 7 : Résultats expérimentaux de la validation analytique du test de conformité système.

Paramètre de validation	Critères d'acceptation	Résultats
Conformité du système	<p>-Ecart type relatif du signal pour les 05 injections de la solution standard 100% $\leq 2,0\%$</p> <p>-Le nombre de plateaux théorique doit être ≥ 1500</p> <p>-Le nombre de plateaux théoriques sera fixé durant la validation analytique, en analyse de routine. Il sera exigé que les valeurs pour ces paramètres soient supérieures ou égales à 50% de celle trouvée en validation.</p> <p>-Le facteur de symétrie doit être $\leq 2,0\%$</p>	<p>-%RSD = 0,4%</p> <p>-Ep plate = $5,575 \times 10^3$</p> <p>-Ep plate = $2,787 \times 10^3$</p> <p>Fs = 1,153%</p>

D'après les résultats regroupés dans les **figures 8-9-10**, ainsi que dans le **Tableau 7**, le système paraît conforme pour le Pyridoxine HCL dans le produit fini RAZIDOXINE B6® à 250mg/ 5 ml, ce qui implique que le système est apte à effectuer les analyses.

II.2.2 Evaluation de la spécificité

Il est essentiel de vérifier la spécificité ou la sélectivité en injectant individuellement le blanc, le placebo, le standard et la forme reconstituée (essai). Cette étape permet d'évaluer la capacité de la méthode à mesurer spécifiquement la substance d'intérêt (Pyridoxine HCL), en distinguant clairement son signal des signaux provenant des autres composés présents dans l'échantillon. Lors de l'injection de chaque composant, on observe et analyse les pics chromatographiques obtenus.

- La sélectivité de la méthode est démontrée lorsque le pic correspondant à la substance d'intérêt Pyridoxine HCL est clairement identifiable et bien résolu, sans interférence des autres composés (placebo) présents dans l'échantillon

- Si des interférences sont observées, on fait des modifications des conditions de séparation, de la phase mobile ou de la colonne chromatographique. Ces ajustements visent à optimiser la spécificité.

Le critère d'acceptation dans ce paramètre est de n'avoir aucune interférence entre le placebo et le Pyridoxine HCL. Les pics chromatographiques obtenus sont représentés dans les **figures11-12-13**.

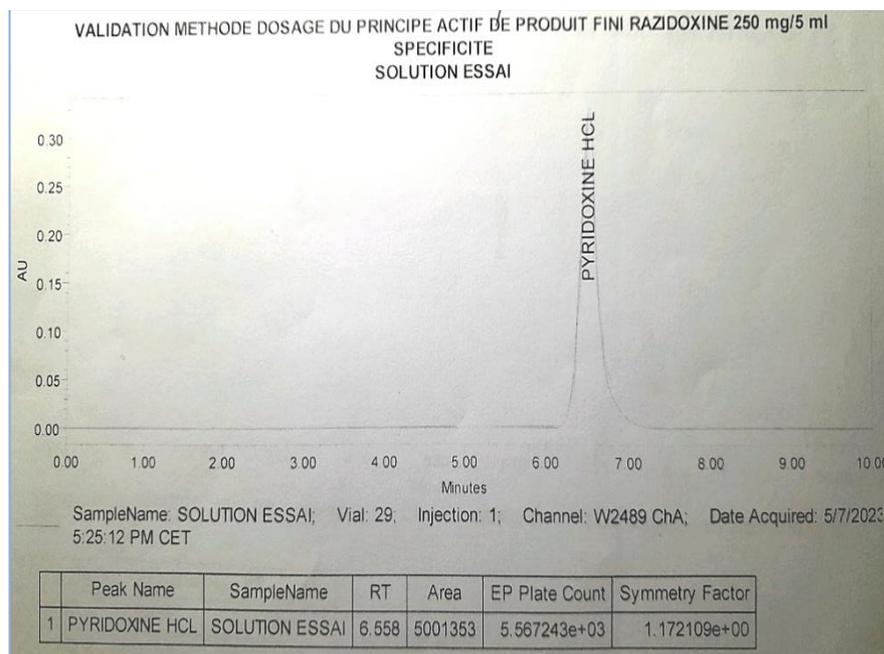


Figure 11 : Chromatographe de la solution essai (test de spécificité).

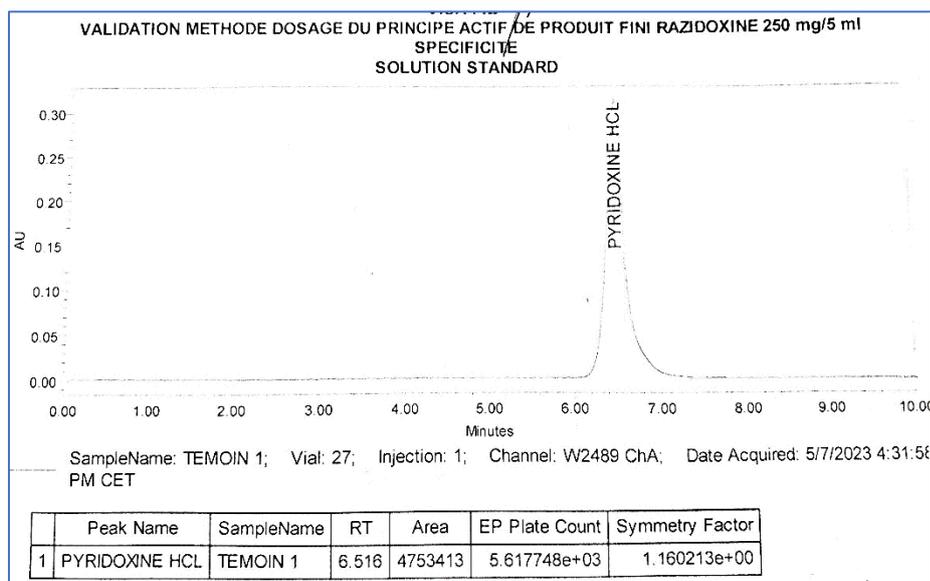


Figure 12 : Chromatogramme de la solution standard(spécificité)

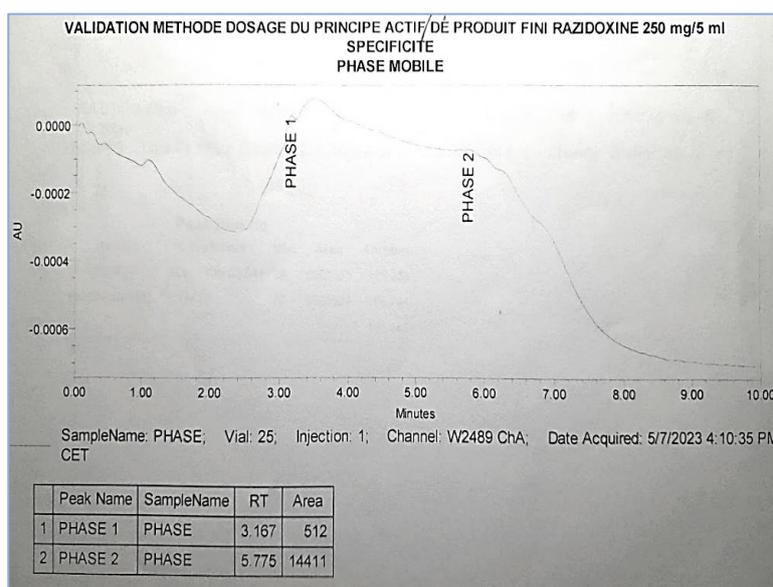


Figure 13 : Chromatographe de la phase mobile (test de spécificité).

D'après la superposition des chromatogrammes et les temps de rétention (placebo et Pyridoxine HCL) on remarque qu'il n'y a pas d'interférence avec le Pyridoxine HCL.

Aucun pic chromatographique notable n'a été détecté dans la plage de rétention du Pyridoxine HCL, ce qui indique une séparation efficace des autres composés.

Lors de l'injection du blanc, aucun pic chromatographique significatif n'a été observé, confirmant l'absence de signaux parasites ou d'interférences provenant des solvants ou du matériel de laboratoire.

L'injection de la forme reconstituée (essai) a produit des résultats similaires à ceux du standard, avec un pic chromatographique net et bien résolu correspondant au Pyridoxine HCL. Cela indique que la méthode est capable de mesurer avec précision le Pyridoxine HCL dans sa forme reconstituée, simulant ainsi les conditions réelles d'analyse.

Ces résultats confirment la spécificité de la méthode analytique de dosage du principe actif 'Pyridoxine HCL', démontrant sa capacité à mesurer de manière précise et spécifique le Pyridoxine HCL, sans interférences provenant d'autres composés. Ils valident l'aptitude de la méthode à fournir des résultats fiables et reproductibles, garantissant ainsi la qualité et la précision des analyses de Pyridoxine HCL.

D'après les résultats obtenus à partir des tests de la solution essai, de la solution standard et de la phase mobile, nous constatons qu'il n'y a aucune interférence avec la pyridoxine HCL. Ce qui permet de conclure que cette méthode est spécifique.

II.3 Fidélité (répétabilité, fidélité intermédiaire)

II.3.1 Répétabilité

La répétabilité ou la précision intra-dosage est évaluée en effectuant des dosages répétés d'un ou plusieurs échantillons dans des conditions identiques, en utilisant les mêmes réactifs, la même calibration, le même appareil et le même opérateur, dans un laps de temps le plus court possible.

On a injecté 06 préparations de la solution standard à 100%, et on a obtenu les résultats illustrés dans **la figure 14** :

Standard					
Numero de lot du WS		MP 21422			
Pureté (%)		100,32			
Pe std (mg)		50,00			
Facteur de dilution		0,01			
Echantillons	Pe Echantillon (mg)	Facteur de dilution ech	Signal echantillon	Signal Standard	Facteur de recouvrement (%)
E1	51,00	0,01	4827302,000	4767861,000	99,6
E2	51,10	0,01	4744325,000	4767861,000	97,7
E3	50,80	0,01	4839020,000	4767861,000	100,2
E4	50,50	0,01	4814071,000	4767861,000	100,3
E5	50,80	0,01	4817217,000	4767861,000	99,8
E6	50,60	0,01	4849075,000	4767861,000	100,8
Moyenne (%)					99,7
SD					1,1
RSD (%)					1,1

Figure 14 : Résultats du test de répétabilité

Le RSD est utilisé pour évaluer la précision et la variabilité des mesures répétées dans des conditions identiques. Un RSD inférieur à 2 % est considéré comme une indication de bonne répétabilité, ce qui signifie que la variation entre les mesures répétées est relativement faible par rapport à la moyenne des mesures.

Les résultats de l'étude indiquent une répétabilité exceptionnelle de la méthode du dosage, avec un RSD de 1,1% inférieure à 2 %. Cette faible variation entre les mesures répétées confirme la précision et la cohérence de la méthode dans des conditions identiques.

II.3.2 Fidélité intermédiaire

L'évaluation de la fidélité d'une méthode de dosage revêt une importance pour garantir des résultats précis, fiables et reproductibles. Le but de cette évaluation est de quantifier les erreurs dues au hasard, c'est-à-dire les variations aléatoires qui peuvent influencer les mesures analytiques.

Dans le cadre de cette étude, des dosages répétés 3 essais des solutions placebo chargées de 80 %, 100 % et 120 % sur deux jours différents ont été effectués, en utilisant deux opérateurs différents au sein du même laboratoire.

D'après les signaux obtenus à partir des solutions, les moyennes des facteurs de recouvrement des échantillons sur deux jours et avec deux manipulateurs ont été calculés (**annexe 6**). Les résultats des RSD sont présentés dans le tableau suivant :

Tableau 8 : Résultats de la gamme fidélité (%RSD).

Paramètre	Résultats
Fidélité intermédiaire	RSD intra (A1J1,80%) =0,3%
	RSD intra (A1J1,100%) =1,4%
	RSD intra (A1J1,120) =0,2%
	RSD intra (A2J1,80%) =0,6%
	RSD intra (A2J1,100%) =0,2%
	RSD intra (A2J1,120%) =0,5%
	RSD intra (A1J2,80%) =0,5%
	RSD intra (A1J2,100%) =0,5%
	RSD intra (A1J2,120%) =0,7%
	RSD intra (A2J2,80%) =0,5%
	RSD intra (A2J2,100%) =0,5%
	RSD intra (A2J2,120%) =0,6%

Les critères d'acceptation de la fidélité intermédiaire sont un RSD intra, RSD inter et RSD totales inférieur ou égal à 2 % pour s'assurer que les variations aléatoires dans les mesures sont minimales et que les écarts entre les résultats obtenus lors de différentes séries ou par différents opérateurs restent dans des limites acceptables.

- Le RSD intra : évalue la dispersion des résultats obtenus lors de mesures répétées effectuées dans une même journée sur un échantillon donné.
- Le RSD inter : mesure la variation des résultats obtenus lors de mesures répétées effectuées sur plusieurs jours différents, tout en maintenant des conditions similaires.
- Le RSD total représente la dispersion globale des résultats en considérant à la fois la variabilité intra-jour et inter-jour, offrant ainsi une estimation complète de la variabilité totale des mesures.

Tableau 9 : Résultats des RSD inter et totale de fidélité intermédiaire.

Concentration (%)	RSD inter	RSD total
80%	0,2	0,2
100%	0,2	
120%	0,8	

D'après les résultats toutes les valeurs de RSD intra, inter et total sont inférieures à 2 %, cela implique que les mesures obtenues sont cohérentes et fiables, avec une précision acceptable.

La faible variabilité entre les répétitions intra indique que les mesures sont stables et constantes dans des conditions identiques. De plus, la faible variabilité inter démontre la capacité de la méthode à produire des résultats similaires même sur des jours différents.

Nous pouvons alors juger que la méthode de dosage chromatographique du principe actif pyridoxine HCL dans le produit fini RAZIDOXINE B6® à 250mg/5ml est fidèle.

II.4 Exactitude

Lors de l'évaluation de l'exactitude Le critère d'acceptation est que l'erreur relative absolue doit être inférieure à 2,5%. En comparant les résultats obtenus par la méthode de dosage avec des valeurs de référence (100%) de dosage connu, cette dernière doit être comprise entre la limite supérieure et la limite inférieure.

Dans notre étude, pour évaluer l'exactitude de la méthode de dosage, nous avons comparé la somme des facteurs de recouvrement % obtenus de résultats de la gamme de fidélité des échantillons à la valeur cible de dosage 100%.

Le tableau suivant regroupe les résultats des données de calcul d'exactitude :

Tableau 10 : Les données brutes de calcul d'exactitude.

Concentration (%)	Recouvrement	Moyenne inter	SDinter	RSDinter	Moyenne total	SDtotal	RSD total	Valeur cible	Exactitude	FR			
80%	99	99,35	0,2	0,3	99,1	0,2	0,2	100,0	0,9	99,1073545			
	99,46												
	99,37												
	99,38												
100%	99,88	99,80	0,2	0,2	99,1	0,2	0,2	100,0	0,9	99,1073545			
	99,74												
	99,04												
	99,10												
120%	98,39	99,07	0,6	0,4	99,1	0,2	0,2	100,0	0,9	99,1073545			
	100,01												
	98,38												
	99,50												
								Limite inférieure		98,6%			
											Limite supérieure		99,7%

Ces résultats impliquent une exactitude égale à 0,9 % inférieure à 2,5 % indique que les concentrations retrouvées dans les échantillons analysés sont très proches des concentrations introduites. Cela suggère une faible erreur systématique et une grande précision de la méthode de dosage.

L'exactitude implique de s'assurer que la valeur de référence de la solution standard 100% se situe dans la plage spécifiée entre les limites inférieure et supérieure. Cela garantit que les mesures analytiques sont en accord avec la valeur attendue.

La limite inférieure et supérieure représente la valeurs minimale et maximale acceptable pour la mesure analytique. Nos résultats montrent que la valeur de solution standard est de 99,80% compris entre la valeur inférieure 98,6% et la valeur supérieure 99,7%.

II.5 Linéarité

Les résultats de la linéarité sont obtenus en analysant des échantillons de principe actif Pyridoxine HCL : solution standard à différentes concentrations : [80 % - 120 %] (l'intervalle de validation), ainsi que des échantillons de forme reconstituée : placebo contenant une quantité connue de Pyridoxine HCL.

L'objectif est de déterminer si la méthode analytique du dosage du Pyridoxine HCL présente une réponse linéaire en fonction de la concentration.

➤ **Le biais moyen %**

Pour l'évaluation de la linéarité, l'un des paramètres importants à considérer est le biais moyen qui représente l'écart moyen entre les valeurs expérimentales (X_i') et les valeurs théoriques attendues (X_i réelle), exprimé en pourcentage situe dans la plage de 95 % à 105 % cela indique que les valeurs mesurées sont en accord satisfaisant avec les valeurs théoriques attendues. L'équation pour calculer le biais moyen est la suivante :

$$\text{Biais moyen \%} = \frac{(\text{Somme des différences en pourcentage})}{(\text{Nombre total d'essais})}$$

Les résultats obtenus sont présentés dans **la figure 15** montrent les données de concentrations réelle et théorique ainsi que les résultats de calcul de biais moyenne que ce soit pour la solution standard ou pour la forme reconstituée.

LINEARITE SUR PRINCIPE ACTIF						
Date d'analyse		07/05/2023				
Concentration theorique (X_i) en %	Concentration réelle (X_i réel) en %	Signal (Y_i)	Moyenne (Y_i)	X_i'	B_j	Biais moyen (%)
80	79,8	3758248,000	3758706,000	79,59	99,74	100,00
		3763002,000		79,69	99,86	
		3754868,000		79,52	99,65	
90	93,8	4460583,000	4459954,333	94,40	100,64	
		4458374,000		94,35	100,59	
		4460906,000		94,41	100,65	
100	102	4807121,000	4798202,667	101,71	99,71	
		4787095,000		101,29	99,30	
		4800392,000		101,57	99,57	
110	111,8	5273724,000	5293677,000	111,55	99,77	
		5324893,000		112,63	100,74	
		5282414,000		111,73	99,94	
120	120	5680371,000	5671056,333	120,12	100,10	
		5655820,000		119,61	99,67	
		5676978,000		120,05	100,04	

Y= a X + b	
a	47419,388415
b	-15800,269670
R	0,999669
R ²	0,999337

Figure 15 : Résultats de l'évaluation de la linéarité et l'intervalle de mesure/calcul statistique des biais moyens sur gamme standard et gamme forme reconstituée.

Les résultats obtenus, avec un biais moyen de 100% signifie que les valeurs

mesurées expérimentalement se rapprochent étroitement des valeurs théoriques attendues, dans une relation linéaire. Cela indique que la méthode de dosage HPLC/UV a une réponse proportionnelle et prévisible en fonction des concentrations sur toute la gamme évaluée.

✚ Coefficient de corrélation

Pour vérifier la linéarité le coefficient de corrélation doit être $\geq 0,99$ proche de 1, Une corrélation élevée entre les concentrations et les réponses instrumentales indique que la méthode est capable de fournir des résultats précis et cohérents sur toute la gamme de concentrations évaluée.

Pour calculer le coefficient de corrélation en utilise l'équation suivante :

$$r = \frac{\sum [(X - \bar{X})(Y - \bar{Y})]}{\sqrt{[\sum (X - \bar{X})^2 * \sum (Y - \bar{Y})^2]}}$$

Avec :

X : concentrations des échantillons

Y : les réponses instrumentales

\bar{X} : moyenne des concentrations

\bar{Y} : moyenne des réponses

Dans notre cas on a utilisé l'Excel pour les calculs statistiques des coefficients de corrélation et le tracée des droites d'étalonnage de principe actif et placebo chargée et obtention de leurs équations linéaires.

Les résultats présentés dans la **figure 15** ont permis de tracer une droite de régression de la linéarité en traçant la courbe représentative des surfaces des pics du principe actif dans les standards en fonction de sa concentration.

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.

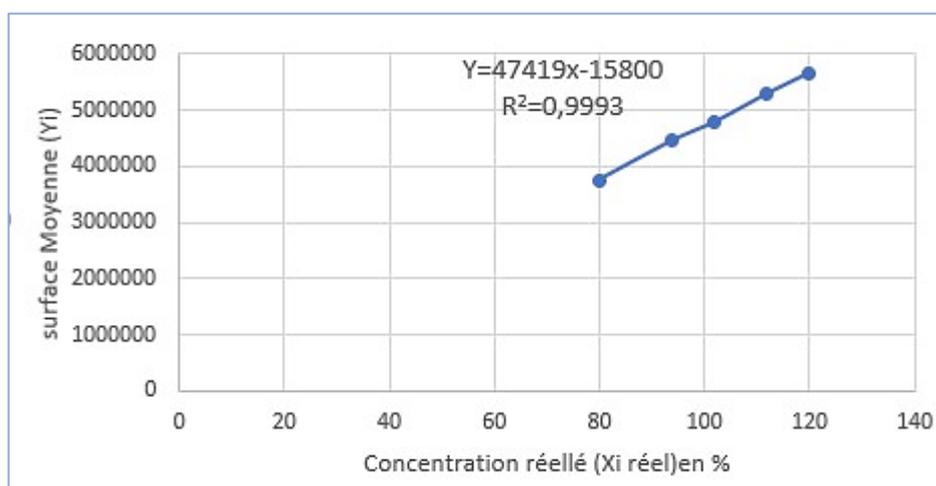


Figure 16 : Courbe d'étalonnage pour la solution standard (pour le test de linéarité et intervalle de mesure).

La courbe obtenue est linéaire et ne passe pas par l'origine ($y = 47419x - 15800$). En utilisant les données de la droite de régression, nous avons calculé le coefficient de corrélation (R)=0,999669 et le coefficient de régression (R^2) =0,999337.

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

En effet, la courbe illustrée par la **Figure 16** 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 0,999 qui est proche de 1, ce qui permet de déduire que le modèle linéaire est acceptable pour le dosage chromatographique de pyridoxine HCL dans le produit fini RAZIDOXINE B6 à 250mg/5ml.

Le biais moyen est égal à 100% ; est donc compris entre 95,0 % et 105,0 % ; ce qui permet de dire que les paramètres sont satisfaisants.

II.6 Robustesse

→ Variation de la longueur d'onde et du débit

Le plan réalisé est représenté dans les **figures 17 et 18** :

Concentration std (mg/ml)	
Numero de lot du Y9	MP 21422
Pe std (mg)	50,1
Pureté (%)	100,32
Volume de fiole	100
Facteur de dilution supplémentaire	1
Concentration std (mg/ml)	0.5026032

Concentration éch (mg/ml)	
Numero de lot de la matiere premiere	MP 21422
Pureté de la matiere premiere (%)	100,32
Volume de fiole	100
Facteur de dilution supplémentaire	1

	Paramètre A	Paramètre B	Paramètre C
	Teneur en PA (%)	Débit	Longueur d'onde
Valeur nominale	100	1	280
Variation	±10	±0,2	±2
Niveau bas (-)	90	0,8	278
Niveau haut (+)	110	1,2	282

Figure 17 : Paramètres à varier pour l'étude de la robustesse (Variation du débit et de la longueur d'onde).

N° échantillon	Echantillon	Pe échantillon (mg)	Signal standard	Signal échantillon	Concentration calculée (mg/ml)	Concentration introduite(mg/ml)	Facteur de recouvrement (%)
1	échantillon 90 %	45,4	5216604,000	4751235,000	0,4576	0,4555	100,5
2	échantillon 110 %	58,4	5216694,000	5949074,000	0,5728	0,5658	101,2
3	échantillon 90 %	45,4	6664265,000	6077733,000	0,4584	0,4555	100,6
4	échantillon 110 %	58,4	6664265,000	7611391,000	0,5740	0,5658	101,5
5	échantillon 90 %	45,4	3475652,000	3165393,000	0,4577	0,4555	100,5
6	échantillon 110 %	58,4	3475652,000	3984316,000	0,5762	0,5658	101,8
7	échantillon 90 %	45,4	4416681,000	4015000,000	0,4569	0,4555	100,3
8	échantillon 110 %	58,4	4416681,000	5058129,000	0,5754	0,5658	101,7
Ecartype							0,6

Calcul des effets	
Nombre d'essai	8
t_{student}	2,3646
B	C
AB	AC
BC	ABC
0,0	0,1
0,0	0,1
0,0	0,1
0,0	0,1
0,0	0,1
0,0	0,1

Résultat	Intervalle de confiance		Résultats de l'effet	Conclusion
B	-0,5	0,5	Non significatif	Robuste
C	-0,4	0,6	Non significatif	Robuste
AB	-0,5	0,5	Non significatif	Robuste
AC	-0,4	0,6	Non significatif	Robuste
BC	-0,6	0,4	Non significatif	Robuste
ABC	-0,5	0,5	Non significatif	Robuste

Figure 18 : Les résultats expérimentaux obtenus avec le changement de la longueur d'onde et du débit lors de la mesure du critère Robustesse

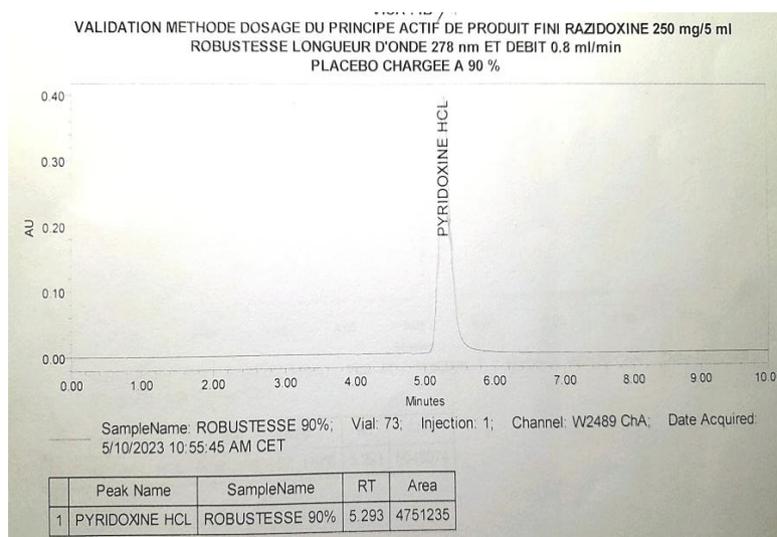


Figure 19 : Chromatogramme de la solution placebo chargé a 90% (longueur d'onde 287nm/débit 0,8 ml/5min)

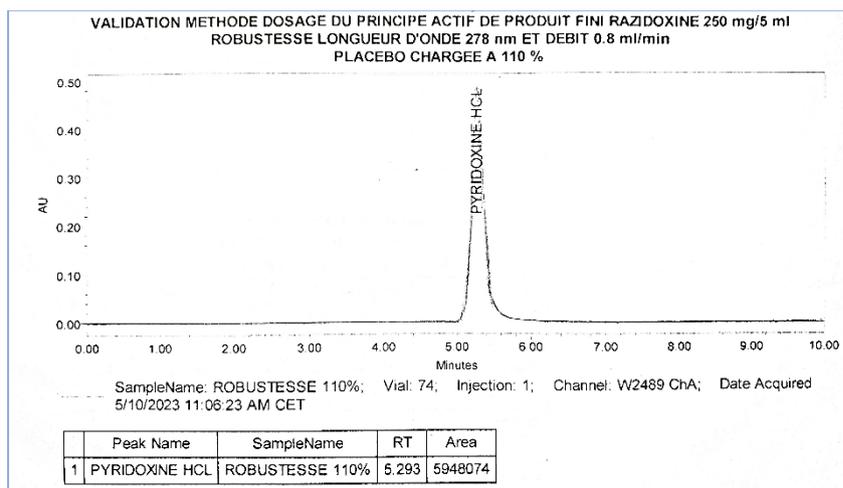


Figure 20 : Chromatogramme de la solution placebo chargé a 110% (longueur d'onde 278nm/débit 0,8 ml/5min)

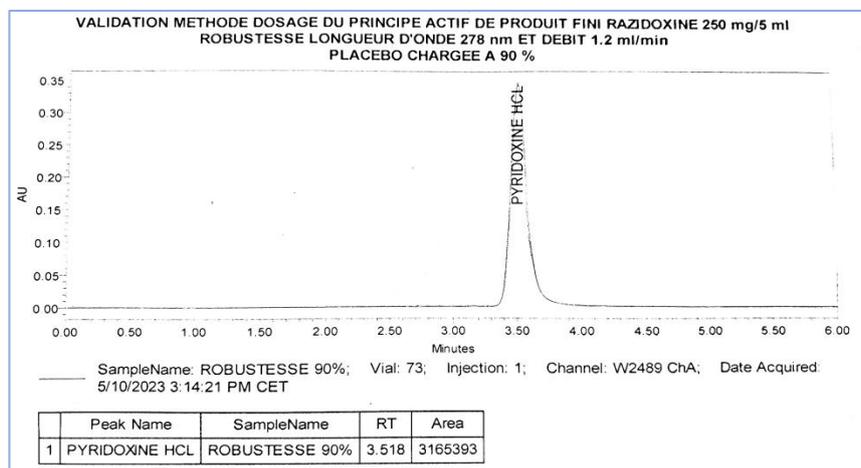


Figure 21 : Chromatogramme de la solution placebo chargé a 90% (longueur d'onde 278nm/débit 1,2 ml/5min)

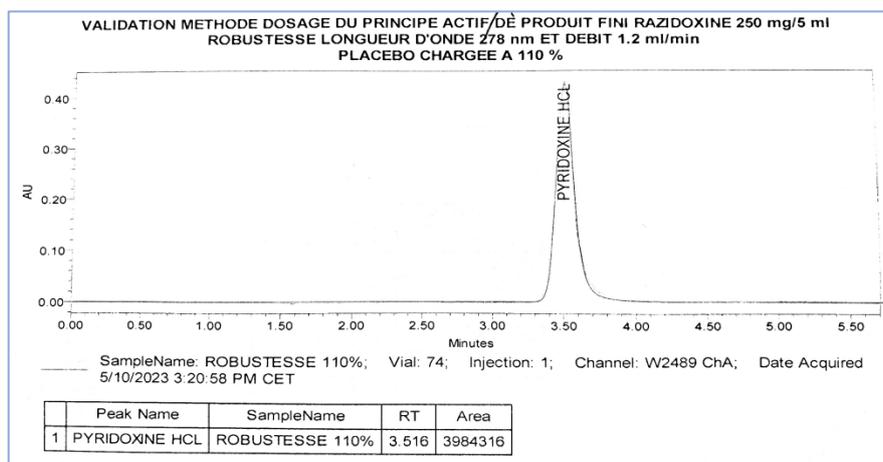


Figure 22 : Chromatogramme de la solution placebo chargé a 110% (longueur d'onde 278nm/débit 1,2 ml/5min)

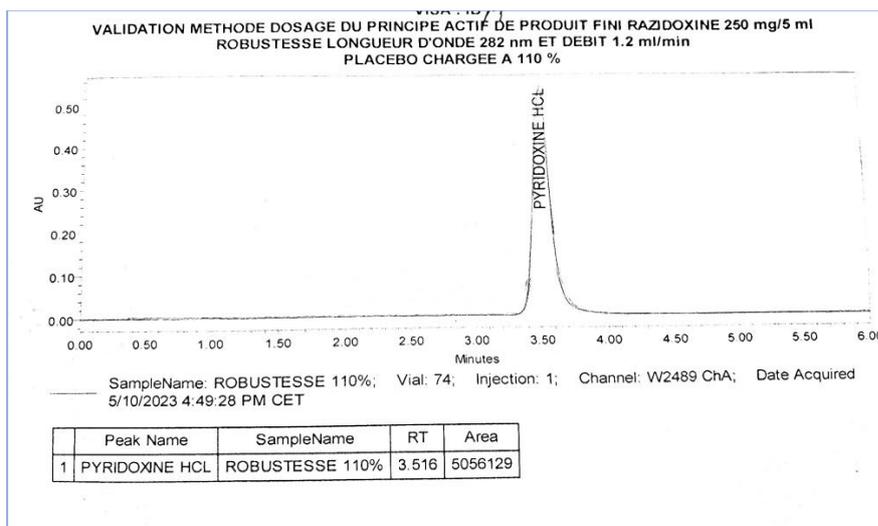


Figure 23 : Chromatogramme de la solution placebo chargé a 110% (longueur d'onde 282nm/débit 1,2 ml/5min)

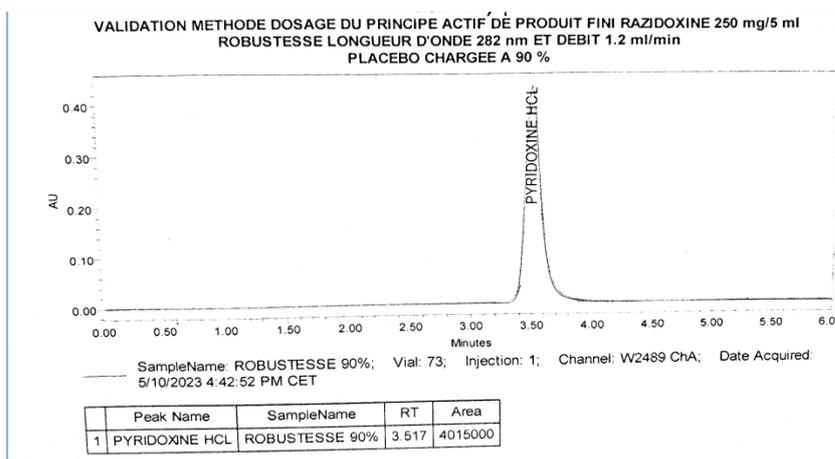


Figure 24 : Chromatogramme de la solution placebo chargé a 90% (longueur d'onde 282nm/débit 1,2 ml/5min)

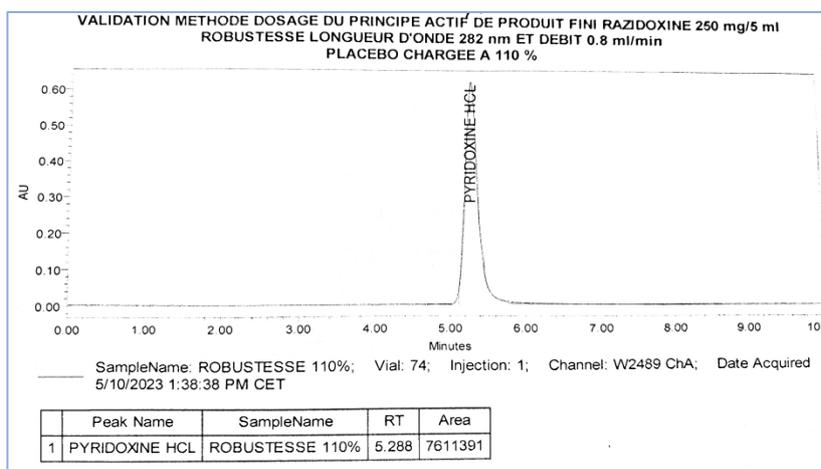


Figure 25 : Chromatogramme de la solution placebo chargé a 110% (longueur d'onde 282nm/débit 0,8 ml/5min)

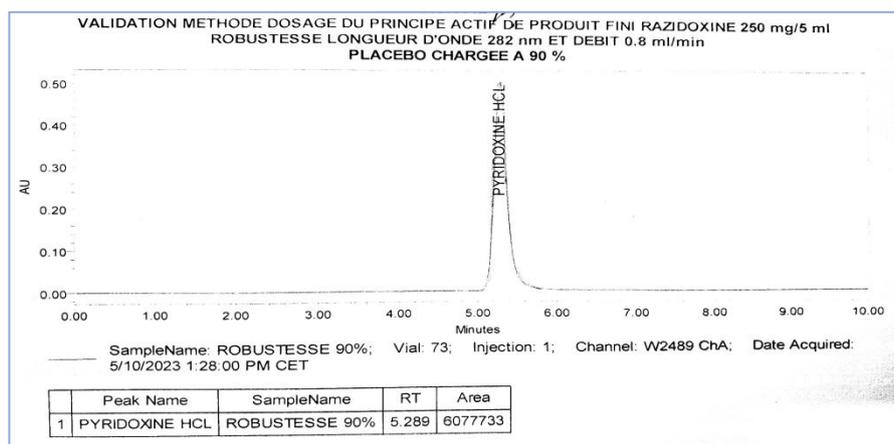


Figure 26 : Chromatogramme de la solution placebo chargé a 90% (longueur d'onde 282nm/débit 0,8 ml/5min)

Paramètre	Critères d'acceptation	Résultats
Robustesse	-Si la valeur 0 est comprise entre l'intervalle de confiance de tous les paramètres et interactions, les effets sont donc non significatifs et la méthode est jugée robuste.	- la valeur 0 est comprise entre l'intervalle de confiance de tous les paramètres et interactions, les effets sont donc non significatifs et la méthode est jugée robuste.

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

II.7 Stabilité des solutions

L'injection des solution standard et placebo chargé à t=0, t=24h et t=48h nous a donné les résultats de stabilité des solutions dans la **figure 27** :

Stabilité des solutions à température ambiante (Aire/temps)				
Temps		t=0h	t=24h	t=48h
Aire STD	solution 1	4767861,000	4817310,000	4731287,000
	solution 2	4820260,000	4812122,000	4833652,000
	solution 3	4822556,000	4847084,000	4852200,000
	moyenne	4803559,000	4825505,333	4805713,000
Aire Placebo chargé	solution 1	4801356,000	4837611,000	4904628,000
	solution 2	4719793,000	4904206,000	4782306,000
	solution 3	4817740,000	4799373,000	4945261,000
	moyenne	4779629,667	4847063,333	4877398,333

Stabilité des solutions à température ambiante (% de dégradation/temps)			
Temps		t=24h	t=48h
Dt STD	solution 1	1,037	0,767
	solution 2	0,169	0,278
	solution 3	0,509	0,615
	moyenne	0,572	0,553
Dt Placebo chargé	solution 1	0,755	2,151
	solution 2	3,907	1,324
	solution 3	0,381	2,647
	moyenne	1,681	2,041

Figure 27 : Test de stabilité des solutions à température ambiante

Le pourcentage de dégradation D_t doit être $\leq 2,0\%$. ; En comparant avec les résultats obtenus (D_{std} (après 24h) = 0,572 ; D_{tp} chargée (après 24h) = 1,681 ; D_{tstd} (après 48h) = 0,553 et D_{tp} chargée (après 48h) = 2,041), nous pouvons juger que la méthode de dosage chromatographique est stable à température ambiante pour le pyridoxine HCL dans le produit fini RAZIDOXINE B6 à 250 mg/5 ml.

Vu que les résultats obtenus de l'ensemble des paramètres étudiés (Conformité système, spécificité, fidélité, exactitude, linéarité et intervalle de mesure, répétabilité, robustesse et la stabilité des solutions à température ambiante) satisfont aux critères d'acceptation, nous concluons que la méthode de dosage du principe actif « pyridoxine HCL » est validée pour le produit fini RAZIDOXINE B®250mg/5ml, fabriqué par les Laboratoires Frater Razes.

Conclusion

Conclusion

La validation analytique est reconnue comme indispensable à la gestion de la qualité dans l'industrie pharmaceutique. Dans notre travail, je me suis intéressée à la validation analytique du dosage d'un principe actif « Pyridoxine HCL » dans le produit fini RAZIDOXINE B6® solution injectable 250mg/5ml, 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 conformité du système, de spécificité, de linéarité, de fidélité, de l'exactitude, de stabilité et de robustesse.

En effet, bien qu'il existe de nombreux documents officiels décrivant les critères de validation à tester, les sources proposant des solutions pratiques en termes de protocole expérimentaux sont rares. La méthode de la pharmacopée américaine et une proposition de protocole de validation s'appuyant sur le guide ICH Q2(R1) a été testé en conditions réelles.

Les résultats obtenus lors de notre travail de recherche ont montré que la méthode est spécifique pour le principe actif « Pyridoxine HCL », 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 à température ambiante, nous remarquons que la solution injectable étudiée est stable jusqu'à 48 heures.

Nous concluons que la méthode du dosage du principe actif 'Pyridoxine HCL' est validée pour le produit fini Razidoxine B6 solution injectable à 250 mg/5ml, fabriquée aux Laboratoires FRATER-RAZES

Bibliographie

- Cardin-Changizi, P. (2020, Mars 03). Vitamine B6 : bienfaits, dosage, aliments. Le journal des femmes santé. Consulté le Avril 29, 2023, sur <https://sante.journaldesfemmes.fr/fiches-nutrition/2616297-vitamine-b6-pyridoxine-bienfaits-surdosage-dangers-dosage-sanguin/>
- Christelle, R. V. (2021, Mai 25). ansm. Consulté le juin 02, 2023, sur document de référence pharmacopée: <https://ansm.sante.fr/documents/referance/pharmacopee>
- Clémence.D, A. L. (2006). Les acteurs métiers de l'industrie pharmaceutique. nice: Université Nice Sophia antipolis . Département Génie Biologique.
- Feinberg, M. (2007, juillet 27). Validation of analytical methods based on accuracy profiles. Journal of Chromatography A, Volume 1158(1-2), pp. 174-183. doi:<https://doi.org/10.1016/j.chroma.2007.02.021>
- Group, Appropriate ICH Expert Working. (2005). Validation of analytical procedures:Text and Methodology ICH Harmonised Tripartite Guideline. guideline pdf. Retrieved Mai 28, 2023, from <https://database.ich.org/sites/default/files/Q2%28R1%29%20Guideline.pdf>
- György, P. (1939). Vitamin B6 and Skin Lesions in Rats. Nature, 144(3646), 512-512.
- khalil, H. (2017, Janvier 18). La validation des méthodes analytiques dans les industries pharmaceutiques,selon les guidelines ICH Q2(R1). Validation analytique selon le guilines ICH Q2. Alger, wanylab, Algérie.
- Klaus, C. C. (1986, Février 06). Zwic Roell. (la société ZwickROELL) Consulté le Juin 05, 2023, sur medical pharma Pharmacopée américaine ;United States Pharmacopeia (USP):<https://www.zwickroell.com/fr/secteurs-dactivite/medicalpharma/pharmacopee-americaine-united-states-pharmacopeia/>
- LEMMET, A. (1995). La vitamine B6 intérêt et mise au point d'une méthode de dosage dans le plasma humain par chromatographie liquide haute performance. thèse de doctorat en pharmacie, Université de LIMOGES faculté de pharmacie, LimogesConsulté le Avril 15, 2023, sur <https://aurore.unilim.fr/theses/nxfile/default/9899e21b-5d8f-43b8-8bc6-dd289bda3742/blobholder:0/P1995316.pdf>
- Les Laboratoire FRATER RAZES. (s.d.). Consulté le Mars 05, 2023, sur Les Laboratoire FRATER RAZES: <https://frater-razes.com/>
- Lindsay, S. (1987). High Performance Liquid Chromatography. London.

Max Feinberg, B. B. (2004, Septembre 09). New advances in method validation and measurement uncertainty. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* , pp. 1-2. doi:10.1007/s00216-004-2791-y

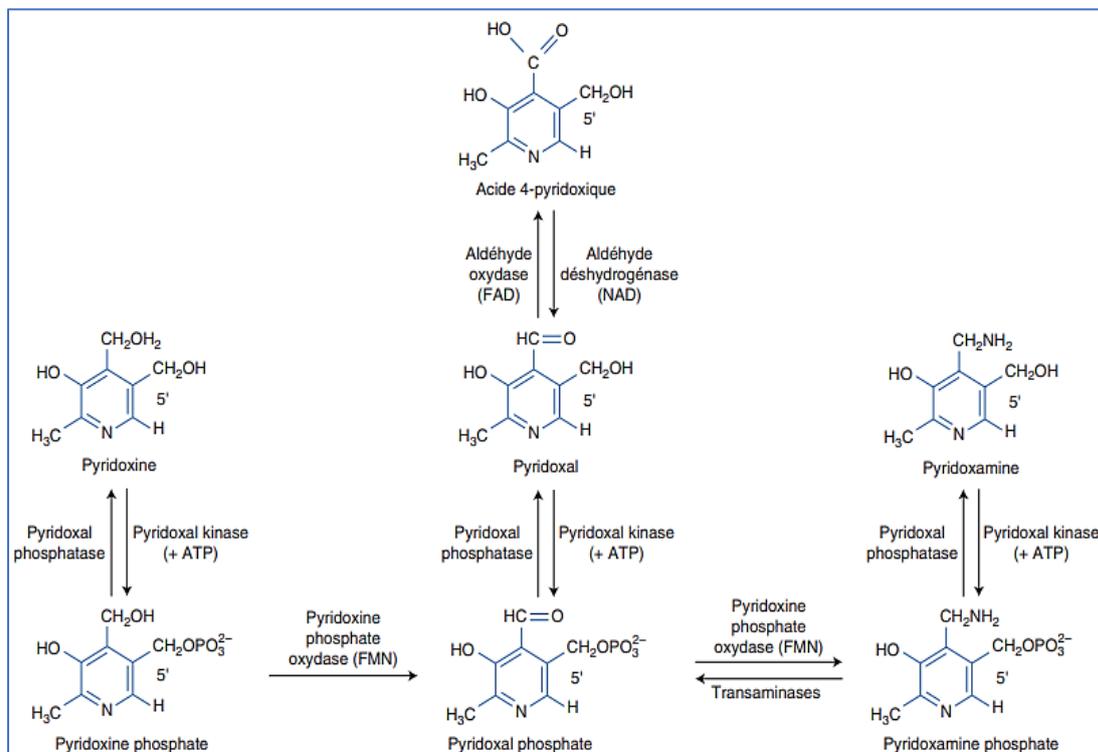
PINGUET, I. (2015). Validation analytique : application de la procédure SFSTP 2003-. UNIVERSITE DE BORDEAUX U.F.R. DES SCIENCES PHARMACEUTIQUES. Bordeaux: UNIVERSITE DE BORDEAUX U.F.R. DESSCIENCES PHARMACEUTIQUES. Consulté le Juin 03, 2023, sur <https://dumas.ccsd.cnrs.fr/dumas-01188779/document>

Shabir, G. A. (2003). Validation of high-performance liquid chromatography methods for pharmaceutical analysis: Understanding the differences and similarities between validation requirements of the US Food and Drug Administration, the US Pharmacopeia and the International Conference on Harmonization. *Journal of chromatography A*, 987(1-2), 57-66.

Zerrouk, M., Hamidi, D., Benkortbi, O., & Belalia, M. (2012). Validation, contrôle physico-chimique d'un médicament psychotrope riperol 4mg.

Annexe

Annexe 1 : Interconversion des différentes formes de la vitamine B6.



Annexe 2 : Présentation des Laboratoires FRATER-RAZES

Le groupe des Laboratoires FRATER RAZES est l'un des leaders dans l'industrie pharmaceutique en Algérie, et ce, grâce à son autonomie et à la qualité de ses solutions. Ce groupe a été fondé en 1992 par le Docteur Abdelhamid Cherfaoui. Il fait partie des premières entreprises privées créées après la libération du marché du médicament en Algérie, et il s'agit de la deuxième unité industrielle en forme injectable en Algérie.

1 Historique

En 1992 : Création de la société de distribution de produits pharmaceutiques par le docteur Cherfaoui Abdelhamid, qui était la neuvième en Algérie.

Cette étape de la distribution a permis de prendre connaissance progressivement du secteur pharmaceutique de notre pays avec ses exigences réglementaires, ses besoins, ses circuits et ses attentes.

En 1994 : L'importation de produits pharmaceutiques ; et qui s'agit d'une étape stratégique cruciale de la politique nationale de santé en Algérie qui vise à garantir l'équité, l'accessibilité

aux thérapeutiques tout en maîtrisant les coûts. Le but ultime est de satisfaire au mieux les besoins de la population.

En 1999 : Réalisation de la première unité industrielle spécialisée dans la forme sèche.

En 2003 : Lancement de l'unité de fabrication des produits de forme injectable Après une maîtrise totale de la fabrication de la forme sèche destinée spécialement au marché officinal, il était impératif pour les Laboratoires FRATER-RAZES de pénétrer le marché hospitalier dédié presque exclusivement à la forme galénique injectable. Pour ce faire, ces derniers se sont dotés d'outils industriels à la pointe de la technologie à travers d'une unité spécialisée dans la forme injectable (ampoule et flacon).

En 2010 : Centre de recherches et de développement.

Fabrication du paracétamol injectable à 100 ml. Ce sont les premiers à le produire à l'échelle africaine et les neuvièmes à l'échelle mondiale.

En 2013 : Lancement des travaux du pôle de production biotechnologique sous forme de flacons et seringues pré remplies, pour la fabrication de biosimilaires.

En 2014 : Réalisation d'une nouvelle unité dédiée à la forme sèche pour la production de sachets, gélules et comprimés, avec une capacité de production de 50 millions de boîtes par an.

En 2018 : Réalisation de deux nouvelles lignes de fabrication de flacons-Ampoules permettant d'augmenter les capacités de production des flacons à 250 millions d'unités et à 150 millions d'unités pour les ampoules.

En 2019 : Début d'exportation et naissance de deux nouveaux projets :

- Projet 1 : Les Laboratoires FRATER-RAZES visent à devenir un pôle régional et continental en biotechnologie.
- Projet 2 : Oncologie ; ils veulent contribuer à la production nationale de médicaments utilisés en oncologie à hauteur de 60%.

En 2020 : Mise sur le marché du premier biosimilaire en Algérie.



Laboratoires FRATER-RAZES, situé à Oued El Karma Saoula Alger.

2 Activités et filiales

- La distribution / SomePharm ;
- Importation et Production / SPA PROVIVO ;
- La promotion médicale / LFR promotion ;
- FRATER-RAZES forme sèche ;
- FRATER-RAZES forme injectable ;

3 Formes galéniques des Laboratoires FRATER –RAZES

- Comprimé ;
- Gélule ;
- Sachet (Micro granulé) ;
- Solution buvable ;
- Ampoule ;
- Solution injectable intramusculaire ;
- Solution à seringue injectable préremplie par voie sous-cutanée ou intraveineuse.

4 Spécialités et exemple de médicaments fabriqués par les Laboratoires FRATER RAZES

- **Anesthésie** : KETARAZ 500mg/10ml
- **Antalgie** : Sapramol 500mg
- **Divers** : Eau pour préparations injectables RAZES 2ml ;5ml ;10ml
- **Gastro-Entérologie** : Orolax 4g

- **Infectiologie Parasitologie** : Gentaxyn 40mg /2ml
- **Inflammation** : Fradene 20mg
- **Métabolisme** : Vitamine D3 RAZES 200 000 UI/1ml
- **Neuro psychiatrie** : Depridol 5 mg/ml
- **Oncologie** : Zolidro 5mg/4ml
- **Rhumatologie** : Articosamine 500mg
- **Urologie** : Prostasir LP 0,4mg
- **Sang et Hémostase** : Razifer 100mg/5ml
- **Système Cardiovasculaire** : Tensodipine 5mg ; 10mg

- **Système respiratoire : Salbutamol Razes 0,5 mg/1ml. (Les Laboratoire FRATER RAZES, s.d.).**

Annexe 3 : Appareillages utilisés

Équipements	Propriétés
<p>Bain à ultrason</p> 	<p>Bain à ultrasons « TIERRATECH » ou nettoyage à ultrasons on sonicateur est une procédure accélérée de nettoyage de pièces ou de dissolution de produits contient un sélecteur de température de 0 à 80°C. *tierratech® ultrasonic cleaning systems LT-100 PRO.</p>
<p>Balance analytique</p> 	<p>La Sartorius QUINTIX224-1S est une balance d'une grande fiabilité qui exclut les risques d'erreurs de pesage dues à une mauvaise utilisation et élimine les longues corvées de réglage. Plage de pesée : 220 g. Précision de lecture :0, 1mg.Dimensions (DxWxH) 216 x 360 x 320 mm. Poids 4,9 kg</p>
<p>pHmètre et l'agitateur magnétique chauffant</p> 	<p>-L'appareil numérique de mesure de précision pH 7110 permet d'effectuer des mesures de pH et de potentiel Redox rapides et fiables. Offre un maximum de confort d'utilisation, de fiabilité et de sûreté de mesure dans tous les domaines d'application.</p> <p>- « iStir HP550 » permet d'homogénéiser une solution à doser, accélérer la dissolution, effectuer une recristallisation, ou encore faire un chauffage à reflux avec un bain-marie.</p>
<p>Le détecteur UV/Vis 2489</p> 	<p>Est le détecteur d'absorbance polyvalent à double longueurs d'onde le plus sensible et le plus polyvalent en chromatographie liquide haute performance. Conçu pour associer une source hautement énergétique, le deutérium, à une optique d'une grande précision, un faible niveau de bruit et une électronique ultra-rapide, ce détecteur élève les limites de la détection à des niveaux de performance inégalés.</p>

HPLC



Colonne C18

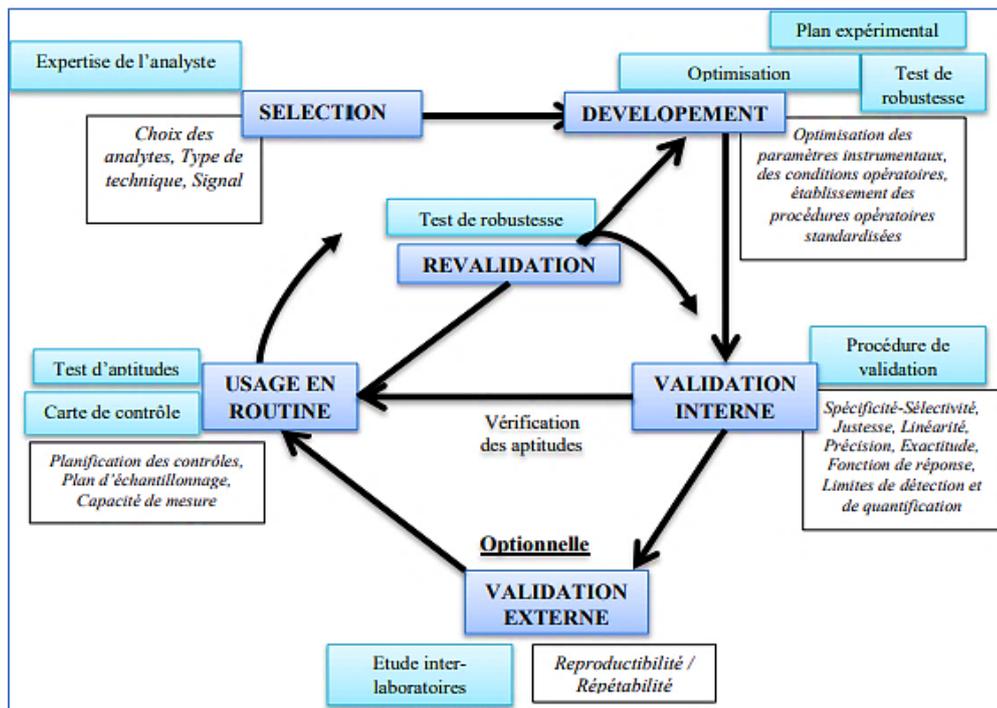


L'analyse chromatographique HPLC est réalisée sur un appareil de type Waters alliance e2695, lié à un détecteur de type UV/visible 2489 connecté à un ordinateur pour le traitement des données, d'un module de marque Waters 2695 qui fait l'injection automatique, d'une pompe à deux pistons, d'une électrovanne, d'un dégazeur, d'un four dans lequel se trouve une colonne (250 mm × 4,6 mm) avec une phase stationnaire C (5 μm) Thermo C18.

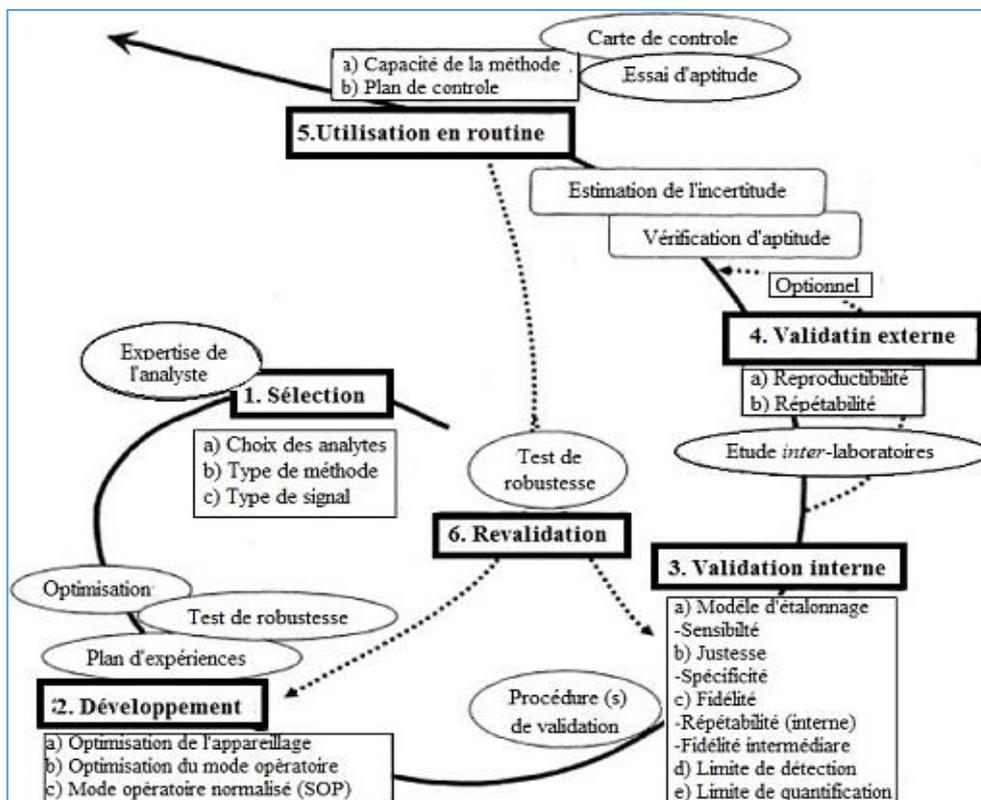
Le petit matériel de laboratoire et la verrerie utilisée pour le travail expérimental est donnée ci-dessous :

- Micropipette (avec embouts jetables) ;
- Pipette jaugée à un et à deux traits ;
- Propipette ;
- Fioles jaugées de 100ml ;
- Epruvettes graduée ;
- Evier ;
- Pissettes à eau ;
- Spatule ;
- Béchers ;
- Erlen Meyer ;
- Barreau magnétique, etc.

Annexe 4 : Cycle de vie d'une méthode analytique



Annexe 5 : Critères et procédures de validation liés au cycle de vie d'une méthode d'analyse



Annexe 6 : Fidélité, exactitude

Standard	
Numero de lot du V/S	MP 21422
Pureté (%)	100,32
Facteur de dilution	0,01

Jour 1	
Date d'analyse	07/05/2023
Pe std (mg)	50,00

Analyse	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	39,90	0,01	3748254,00	4767861,00	98,83	99,00	0,3	0,3
		E2	40,30	0,01	3805568,00	4767861,00	99,35			
		E3	40,10	0,01	3765436,00	4767861,00	98,81			
	100,00%	E1	51,00	0,01	4801356,00	4767861,00	98,04	98,68	1,3	1,4
		E2	51,10	0,01	4710793,00	4767861,00	97,17			
		E3	50,80	0,01	4817740,00	4767861,00	98,77			
	120,00%	E1	60,00	0,01	5649006,00	4767861,00	99,05	99,14	0,2	0,2
		E2	64,10	0,01	6055335,00	4767861,00	99,38			
		E3	61,50	0,01	5767006,00	4767861,00	98,99			
A2	80,00%	E1	41,70	0,01	3986064,00	4767861,00	100,06	99,48	0,6	0,6
		E2	41,10	0,01	3889762,00	4767861,00	99,49			
		E3	41,10	0,01	3861063,00	4767861,00	98,83			
	100,00%	E1	50,50	0,01	4734940,00	4767861,00	98,84	98,74	0,2	0,2
		E2	50,80	0,01	4762253,00	4767861,00	98,82			
		E3	50,60	0,01	4758984,00	4767861,00	98,85			
	120,00%	E1	66,90	0,01	5668892,00	4767861,00	99,53	100,01	0,5	0,5
		E2	61,10	0,01	5807878,00	4767861,00	100,00			
		E3	61,70	0,01	5684227,00	4767861,00	100,50			

Jour 2	
Date d'analyse	07/05/2023
Pe std (mg)	50,10

Analyse	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	39,90	0,01	3785775,00	4817310,00	98,99	99,57	0,5	0,5
		E2	40,30	0,01	3654732,00	4817310,00	99,90			
		E3	41,30	0,01	3655760,00	4817310,00	98,93			
	100,00%	E1	50,90	0,01	4807752,00	4817310,00	98,55	99,04	0,5	0,5
		E2	51,70	0,01	4907194,00	4817310,00	99,03			
		E3	50,80	0,01	4846810,00	4817310,00	98,54			
	120,00%	E1	59,90	0,01	5664680,00	4817310,00	98,10	98,39	0,7	0,7
		E2	60,20	0,01	5646568,00	4817310,00	97,86			
		E3	61,00	0,01	5737226,00	4817310,00	98,13			
A2	80,00%	E1	41,30	0,01	3914615,00	4817310,00	98,89	98,36	0,5	0,5
		E2	40,70	0,01	3873025,00	4817310,00	99,28			
		E3	41,70	0,01	3982473,00	4817310,00	98,89			
	100,00%	E1	60,70	0,01	4837811,00	4817310,00	99,55	98,16	0,5	0,5
		E2	51,90	0,01	4904208,00	4817310,00	98,59			
		E3	50,40	0,01	4798373,00	4817310,00	99,35			
	120,00%	E1	60,00	0,01	5781875,00	4817310,00	100,19	98,50	0,6	0,6
		E2	61,00	0,01	5803784,00	4817310,00	99,27			
		E3	61,80	0,01	5847340,00	4817310,00	99,04			

Concentration (%)	Recouvrement (%)	Moyenne inter	SD inter	RSD inter	Moyenne totale	SD total	RSD total	Valeur cible	Exactitude	PR
80,00%	99,00	98,35	0,2	0,3	99,1	0,2	0,2	100,0	0,9	99,10735458
	99,48									
	99,57									
	99,36									
100,00%	98,88	98,90	0,2	0,2	99,1	0,2	0,2	100,0	0,9	99,10735458
	98,74									
	99,04									
	98,16									
120,00%	98,39	98,07	0,8	0,8	99,1	0,2	0,2	100,0	0,9	99,10735458
	100,01									
	98,39									
	99,50									
									Limite inférieure	98,6
									Limite supérieure	99,7

✚ Calcul du facteur de recouvrement

Les facteurs de recouvrement (FR) sont calculés pour chaque échantillon en utilisant cette formule :

$$FR = \left(\frac{Se}{Sst} \times \frac{Cst}{Ce} \right) 100$$

Se : surface de pic thiamine HCL obtenu dans la solution essai

Sst : surface de pic thiamine HCL obtenu dans la solution standard

Cst : concentration de la solution standard en mg par ml

Ce : concentration de la solution essai en mg par ml

Ensuite, les FR de chaque gamme de concentration est sommés et la moyenne est obtenue en divisant cette somme par le nombre total d'échantillons dans la gamme.

La moyenne du FR donne une estimation de la récupération moyenne pour chaque gamme de concentration évaluée.

Résumé

Ce travail consiste à réaliser une étude de validation analytique de la méthode de dosage du principe actif « Pyridoxine HCL » dans le produit fini RAZIDOXINE B6® solution injectable à 250mg/5ml ; appartenant à la classe thérapeutique des vitamines ; par la technique d'analyse de la Chromatographie Liquide à Haute Performance (HPLC), en se basant dans cette démarche sur les critères décrite par le référentiel ICH thème Q2(R1) et la pharmacopée américaine.

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 sont conformes aux critères d'acceptation exigés. Ceci confirme alors la validation de la méthode d'analyse chromatographique du dosage du principe actif « Pyridoxine HCL » dans le produit fini RAZIDOXINE B6®, fabriquée par les Laboratoires FRATER-RAZES.

Mots clés : RAZIDOXINE B6®, Pyridoxine HCL, Validation analytique et HPLC

Abstract

The aim of this project is to carry out an analytical validation study of the method for dosing the active ingredient "Pyridoxine HCL" in the finished product RAZIDOXINE B6® solution for injection 250mg/5ml; belonging to the therapeutic class of vitamins; using the High-Performance Liquid Chromatography (HPLC) analysis technique, based on the criteria described in the ICH reference standard theme Q2(R1) and the American Pharmacopoeia.

Analytical validation of an active ingredient dosage method by HPLC corresponds to an in-depth evaluation of its performance. It consists in verifying, determining and estimating several validation criteria, namely system conformity, specificity, linearity, precision, accuracy, stability and robustness. Any new method described in a Marketing Authorization Application (MAA) must be accompanied by a full validation.

The experimental results obtained in the application comply with the required acceptance criteria. This confirms the validation of the chromatographic analysis method for the determination of the active ingredient "Pyridoxine HCL" in the finished product RAZIDOXINE B6®, manufactured by FRATER-RAZES laboratory.

Keys words: RAZIDOXINE B6®, Pyridoxine HCL, Analytical validation et HPLC.