



HAL
open science

De la difficulté à valider des durées d'utilisation de réactifs en solution

Capucine Plante

► **To cite this version:**

Capucine Plante. De la difficulté à valider des durées d'utilisation de réactifs en solution. Sciences pharmaceutiques. 2007. dumas-01498678

HAL Id: dumas-01498678

<https://dumas.ccsd.cnrs.fr/dumas-01498678>

Submitted on 30 Mar 2017

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

AVERTISSEMENT

Ce document est le fruit d'un long travail approuvé par le jury de soutenance et mis à disposition de l'ensemble de la communauté universitaire élargie.

Il n'a pas été réévalué depuis la date de soutenance.

Il est soumis à la propriété intellectuelle de l'auteur. Ceci implique une obligation de citation et de référencement lors de l'utilisation de ce document.

D'autre part, toute contrefaçon, plagiat, reproduction illicite encourt une poursuite pénale.

Contact au SID de Grenoble :
bump-theses@univ-grenoble-alpes.fr

LIENS

Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 122. 4

Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 335.2- L 335.10

<http://www.cfcopies.com/juridique/droit-auteur>

<http://www.culture.gouv.fr/culture/infos-pratiques/droits/protection.htm>



UNIVERSITE JOSEPH FOURIER
FACULTE DE PHARMACIE DE GRENOBLE

1^{er} exemplaire

Année 2007

N° 7053

DE LA DIFFICULTE
A
VALIDER DES DUREES D'UTILISATION DE REACTIFS EN SOLUTION

THESE
PRESENTEE POUR L'OBTENTION DU TITRE DE DOCTEUR EN PHARMACIE

DIPLÔME D'ETAT

Capucine PLANTE

[Données à caractère personnel]

THESE SOUTENU PUBLIQUEMENT A LA FACULTE DE PHARMACIE DE GRENOBLE*

Le 19 décembre 2007



DEVANT LE JURY COMPOSE DE

Président du jury : Mme Danielle ESNAULT

Maître de conférences à la Faculté de Pharmacie de Grenoble

Directeur de thèse : Mme Danielle ESNAULT

Membres : Mme Catherine GROSSET

Maître de conférences à la faculté de Pharmacie de Grenoble

M. Frédéric LAFFAY-GOURIER

Directeur du service d'Assurance Qualité des Laboratoires SOPHARTEX

**La Faculté de Pharmacie de Grenoble n'entend donner aucune approbation ni improbation aux opinions émises dans les thèses ; ces opinions sont considérées comme propres à leurs auteurs*

**UNIVERSITE JOSEPH FOURIER
FACULTE DE PHARMACIE DE GRENOBLE**

DE LA DIFFICULTE

A

VALIDER DES DUREES D'UTILISATION DE REACTIFS EN SOLUTION

THESE

PRESENTEE POUR L'OBTENTION DU TITRE DE DOCTEUR EN PHARMACIE

DIPLÔME D'ETAT

Capucine PLANTE

[Données à caractère personnel]

THESE SOUTENU PUBLIQUEMENT A LA FACULTE DE PHARMACIE DE GRENOBLE*

Le 19 décembre 2007



DEVANT LE JURY COMPOSE DE

Président du jury : Mme Danielle ESNAULT

Maître de conférences à la Faculté de Pharmacie de Grenoble

Directeur de thèse : Mme Danielle ESNAULT

Membres : Mme Catherine GROSSET

Maître de conférences à la faculté de Pharmacie de Grenoble

M. Frédéric LAFFAY-GOURIER

Directeur du service d'Assurance Qualité des Laboratoires SOPHARTEX

**La Faculté de Pharmacie de Grenoble n'entend donner aucune approbation ni improbation aux opinions émises dans les thèses ; ces opinions sont considérées comme propres à leurs auteurs*

UNIVERSITE JOSEPH FOURIER
FACULTE DE PHARMACIE DE GRENOBLE
Domaine de la Merci 38700 LA TRONCHE

Doyen de la faculté : Mme le Professeur **Renée GRILLOT**
Vice-Doyen : Mme **Edwige NICOLE**

Année 2007-2008

LISTE DES ENSEIGNANTS DE L'UFR DE PHARMACIE

Professeurs à l'UFR de pharmacie

| | | |
|--------------|------------|--|
| BAKRI | Aziz | Pharmacie Galénique et Industrielle, Formulation et Procédés Pharmaceutiques (GRNR,) |
| BURMEISTER | Wilhem | Physique (U.V.H.C.I.) |
| CALOP | Jean | Pharmacie Clinique (CHU) |
| DANEL | Vincent | SAMU-SMUR et Toxicologie (CHU) |
| DECOUT | Jean-Luc | Chimie Bio Inorganique (D.P.M.) |
| DROUET | Emmanuel | Immunologie/Microbiologie/Biotechnologie (U.V.H.C.I.) |
| FAVIER | Alain | Biochimie (L.C.I.B./CHU) |
| GODIN-RIBUOT | Diane | Physiologie-Pharmacologie (HP2) |
| GRILLOT | Renée | Parasitologie-Mycologie Médicale (Directeur UFR et CHU) |
| MARIOTTE | Anne-Marie | Pharmacognosie (D.P.M.) |
| PEYRIN | Eric | Chimie Analytique (D.P.M.) |
| RIBUOT | Christophe | Physiologie-Pharmacologie (HP2) |
| ROUSSEL | Anne-Marie | Biochimie L.B.F.A.) |
| WOUESSIDJEWÉ | Denis | Pharmacotechnie et Vectorisation (D.P.M.) |

Professeurs associés (PAST)

| | | |
|---------|----------|--------------------------|
| CHAMPON | Bernard | Pharmacie Clinique (CHU) |
| RIEU | Isabelle | Qualitologie (CHU) |

CHU : Centre Hospitalier Universitaire

DPM : Département de Pharmacochimie Moléculaire

GRNR : Groupe de Recherche sur les Nouveaux Radio pharmaceutiques

HP2 : Hypoxie Physiopathologie Respiratoire et Cardiovasculaire

LBFA : Laboratoire de Bioénergétique Fondamentale et Appliquée

LCIB : Laboratoire de Chimie Inorganique et Biologie

UVHCI : Unit of Virus Host Cell Interactions

UNIVERSITE JOSEPH FOURIER
FACULTE DE PHARMACIE DE GRENOBLE
Domaine de la Merci 38700 LA TRONCHE

Doyen de la faculté : Mme le Professeur **Renée GRILLOT**
Vice-Doyen : Mme **Edwige NICOLE**

Année 2007-2008

Maîtres de conférences

| | | |
|-------------------|-----------------|--|
| ALDEBERT | Delphine | Parasitologie-Mycologie (L.A.P.M.) |
| ALLENET | Benoît | Pharmacie Clinique (ThEMAS TIMC-IMAG / CHU) |
| BATANDIER | Cécile | Nutrition et Physiologie (L.B.F.A.) |
| BOUMENDJEL | Ahcène | Pharmacognosie (D.P.M.) |
| BRETON | Jean | Biologie Moléculaire / Biochimie (L.C.I.B.) |
| BUDAYOVA SPANO | Monika | Biophysique Structurale (U.V.H.C.I.) |
| CHOISNARD | Luc | Pharmacotechnie et Vectorisation D.P.M.) |
| COLLE | Pierre Emmanuel | Anglais |
| DELETRAZ-DELPORTE | Martine | Droit Pharmaceutique Economie Santé (Lyon) |
| DEMEILLIERS | Christine | Biochimie (N.V.M.C.) |
| DESIRE | Jérôme | Chimie Bio-organique (D.P.M.) |
| DURMORT-MEUNIER | Claire | Virologie (I.B.S.) |
| ESNAULT | Danielle | Chimie Analytique (D.P.M.) |
| FAURE | Patrice | Biochimie (HP2 / CHU) |
| GEZE | Annabelle | Pharmacotechnie et Vectorisation (D.P.M.) |
| GERMI | Raphaële | Microbiologie (U.V.H.C.I. / CHU) |
| GILLY | Catherine | Chimie Thérapeutique (D.P.M.) |
| GROSSET | Catherine | Chimie Analytique (D.P.M.) |
| HININGER-FAVIER | Isabelle | Biochimie (L.B.F.A.) |
| JOYEUX-FAURE | Marie | Physiologie-Pharmacologie (HP2) |
| KRIVOBOK | Serge | Botanique – Cryptogamie (L.E.C.A.) |
| MORAND | Jean-Marc | Chimie Thérapeutique (D.P.M.) |
| MOUHAMADOU | Bello | Cryptogamie, Mycologie Générale (L.E.C.A.) |
| MELO DE LIMA | Christelle | Biostatistiques (L.E.C.A.) |
| NICOLLE | Edwige | Chimie Organique (D.P.M.) |
| PINEL | Claudine | Parasitologie-Mycologie Médicale (CIB / CHU) |
| RACHIDI | Walid | Biochimie (L.C.I.B.) |
| RAVEL | Anne | Chimie Analytique (D.P.M.) |
| RAVELET | Corinne | Chimie Analytique (D.P.M.) |
| SEVE | Michel | Biotechnologie (CHU / CRI IAB) |
| SOUARD | Florence | Pharmacognosie (D.P.M.) |
| TARBOURIECH | Nicolas | Biophysique (I.V.M.S.) |
| VANHAVERBEKE | Cécile | Chimie Bio organique (D.P.M.) |
| VILLET | Annick | Chimie Analytique (D.P.M.) |

ENSEIGNANTS ANGLAIS

FITTE Andrée

GOUBIER Laurence

POSTES D'ATER

| | | |
|--------|------------------|---|
| ½ ATER | RECHOUM Yassine | Immunologie |
| ½ ATER | MESSAI Radja | Mathématiques |
| ½ ATER | GLADE Nicolas | Biophysique |
| 1 ATER | KHALEF Nawale | Pharmacie Galénique et Industrielle, Formulation et Précédés Pharmaceutiques |
| 1 ATER | NZENGUE Yves | Biologie Cellulaire |
| 1 ATER | PEUCHMAUR Marine | Chimie Organique |

PROFESSEUR AGREGE (PRAG)

ROUTABOUL Christel Chimie Inorganique (D.P.M.)

CHU : Centre Hospitalier Universitaire

CIB : Centre d'Innovation en Biologie

DPM : Département de Pharmacochimie Moléculaire

HP2 : Hypoxie Physiopathologie Respiratoire et Cardiovasculaire

IAB : Institut Albert Bonniot, Centre de Recherche « Oncogenèse et Ontogenèse »

IBS : Institut de Biologie Structurale

LAPM : Laboratoire Adaptation et Pathogénèse des Microorganismes

LBFA : Laboratoire de Bioénergétique Fondamentale et Appliquée

LCBM : Laboratoire de Chimie Inorganique et Biologie des Métaux

LCIB : Laboratoire de Chimie Inorganique et Biologie

LECA : Laboratoire d'Ecologie Alpine

NVMC : Nutrition, Vieillesse, Maladies Cardiovasculaires

TIMC-IMAG : Laboratoire Technique de l'Imagerie, de la Modélisation et de Cognition

UVHCI : Unit of Virus Host Cell Interactions

REMERCIEMENTS

Merci à Mme Esnault pour avoir accepté d'être mon directeur de thèse.

Merci aux Laboratoires Sophartex et plus particulièrement à Mr Clairc, responsable du laboratoire de contrôle, et à toute l'équipe du laboratoire de contrôle physico-chimique pour leur accueil et leur suivi, sans oublier Mr Laffay-Gourier pour sa participation à mon jury.

Et merci à Mme Rorive, auditrice de l'AFSSAPS, qui a répondu à mes questions.

TABLES DES MATIERES

| | |
|---|----|
| Remerciements | 5 |
| Tables des matières..... | 6 |
| Figures | 9 |
| Abréviations, acronymes, symboles et unités | 11 |
| Abréviations, acronymes, symboles et unités | 11 |
| Revue générale de la littérature..... | 15 |
| 1. Contexte | 16 |
| 1.1. Demande des autorités compétentes : l'AFSSAPS..... | 16 |
| 1.2. Les textes officiels | 17 |
| 2. Durée d'utilisation | 18 |
| 2.1. Définition..... | 18 |
| 2.2. Stabilité..... | 19 |
| 2.3. Fournisseurs..... | 22 |
| 3. Validation | 23 |
| 4. Exemple d'une étude de stabilité sur l'hypochlorite de sodium 0,5%..... | 25 |
| Matériel et Méthodes | 28 |
| 1. Validation des durées d'utilisation des phases mobiles pour HPLC..... | 29 |
| 1.1 Généralités sur l'HPLC | 29 |
| 1.2. Conduite du laboratoire vis-à-vis des phases mobiles | 30 |
| 1.3. Protocole..... | 31 |
| 1.4. Précision sur les tests analytiques | 31 |
| 1.5. Exigences de la Pharmacopée Européenne par rapport à la composition de la phase mobile | 40 |
| 2. Validation des durées d'utilisation des réactifs titrés en solution | 41 |
| 2.1. Généralités sur les réactifs titrés et leur date de péremption | 41 |
| 2.2. Protocole..... | 42 |

| | |
|--|-----------|
| 2.3. Rappels sur les méthodes de détermination..... | 43 |
| 2.4. Expérimentation..... | 46 |
| 3. Validation des durées d'utilisation des réactifs non titrés en solution..... | 60 |
| 3.1. Protocole (annexe 3, page 93) | 60 |
| 3.2. Méthodes | 60 |
| Résultats..... | 62 |
| 1. Validation des durées d'utilisation des phases mobiles pour HPLC | 63 |
| 1.1. Etude analytique..... | 63 |
| 1.2. Dosage HPLC | 65 |
| 1.3 Conclusion | 66 |
| 2. Validation des durées d'utilisation des réactifs titrés en solution | 67 |
| 2.1 Loi d'évolution du titre | 67 |
| 2.2. Elaboration d'une carte de contrôle | 70 |
| 2.3. Conclusion | 72 |
| 3. Validation des durées d'utilisation des réactifs non titrés en solution..... | 72 |
| Discussion | 73 |
| 1. Validation des durées d'utilisation des phases mobiles pour HPLC | 74 |
| 2. Validation des durées d'utilisation des réactifs titrés en solution | 76 |
| 3. Validation des durées d'utilisation des réactifs non titrés en solution..... | 77 |
| Conclusion | 78 |
| Bibliographie..... | 80 |
| Annexes | 83 |
| Liste des annexes..... | 84 |
| Annexe 1 : Protocole de validation des durées d'utilisation des phases mobiles pour HPLC.. | 85 |
| Annexe 2 : Protocole de validation des durées d'utilisation des réactifs titrés en solution..... | 89 |
| Annexe 3 : Protocole de validation des durées d'utilisation des réactifs non titrés en solution | 92 |

| | |
|--|-----|
| Annexe 4 : Essais de sensibilité et réactions d'identification utilisés pour valider les durées d'utilisation des réactifs non titrés en solution..... | 95 |
| Annexe 5 : Graphes du pH et de la conductivité de PM0002, PM0006, PM0007 en fonction du temps..... | 98 |
| Annexe 6 : Spectres UV de la phase PM0001 (acétonitrile) utilisée dans le dosage HPLC de M..... | 100 |
| Annexe 7 : Rapports des dosages HPLC de M à T_0 et T_{final} | 102 |
| Annexe 8 : Résultats bruts des réactifs titrés en solution..... | 106 |
| Annexe 9 : Recherche des valeurs aberrantes par le test de Dixon sur les trois lots de nitrate d'argent 0,1 M..... | 108 |
| Annexe 10 : Table de Dixon..... | 110 |
| Annexe 11 : Exemple de régressions polynomiales de degré 2, 3 et 4 appliquées au nitrate d'argent 0,1 M..... | 112 |
| Le Serment de Galien..... | 114 |

FIGURES

| | |
|--|----|
| Figure 1 - Schéma d'un système HPLC en mode isocratique..... | 29 |
| Figure 2 - L'échelle de pH..... | 32 |
| Figure 3 - Principe du réfractomètre..... | 33 |
| Figure 4 - Principe d'un conductimètre..... | 34 |
| Figure 5 - Illustration du comportement de la lumière lors de son passage dans une solution..... | 36 |
| Figure 6 - Pic chromatographique gaussien..... | 38 |
| Figure 7 - Facteur de symétrie | 39 |
| Figure 8 - Titrage potentiométrique – localisation des points de fin de titrage..... | 45 |
| Figure 9 - Formule développée du chlorure de benzéthonium | 49 |
| Figure 10 - Courbe potentiométrique du titrage de l'hydroxyde de sodium 0,1 M | 54 |
| Figure 11 - Courbe potentiométrique du titrage du nitrate d'argent 0,1 M..... | 56 |
| Figure 13 - Graphique de l'évolution du titre du nitrate d'argent 0,1 M..... | 67 |
| Figure 14 - Graphique de l'évolution du titre du nitrate d'argent 0,1 M sans valeur aberrante | 68 |
| Figure 15 - Evolution du titre du nitrate d'argent 0,1 M de J0 à J4 et de J10 à J30..... | 69 |
| Figure 16 - Carte de contrôle du nitrate d'argent 0,1M : application aux trois lots étudiés. | 71 |

TABLEAUX

| | |
|--|----|
| Tableau I - Cas général des conditions de stockage en fonction du type d'étude de stabilité... | 21 |
| Tableau II - Délais de péremption et durées d'utilisation de réactifs liquides | 22 |
| Tableau III - Perte en chlore actif de l'hypochlorite de sodium 0,5% | 26 |
| Tableau IV - Critères retenus selon le type de phase mobile pour HPLC..... | 31 |
| Tableau V - Formules développées et notations des réactifs utilisés pour le titrage du chlorure de benzéthonium 0,004 M..... | 51 |
| Tableau VI - Récapitulatif des mesures de pH pour PM0002, PM0006 et PM0007 | 63 |
| Tableau VII - Récapitulatif des mesures de conductivité pour PM0002, PM0006 et PM000764 | |
| Tableau VIII - Indice de réfraction (χ) et variation ($\Delta\chi$) par rapport à la mesure initiale (T_0) | 64 |
| Tableau IX - Mesures d'absorbance à 240 nm de PM0001..... | 64 |
| Tableau X - Conditions de dosages de M (témoin, chaîne et colonne chromatographique) | 65 |
| Tableau XI - Evolution des paramètres chromatographiques entre T_0 et T_{final} | 65 |
| Tableau XII - Coefficients de variation des R_f par phase (PM0002, PM0006, PM0007)..... | 66 |

ABREVIATIONS, ACRONYMES, SYMBOLES ET UNITES

a : activité d'un ion

A : absorbance d'une solution ou aire d'un pic

As : facteur de symétrie ou traînée

b : épaisseur en centimètre (cm)

BPF : Bonnes Pratiques de Fabrication

BPL : Bonnes Pratiques de Laboratoire

C ou c : concentration

CCM : Chromatographie sur Couche Mince

CLHP : Chromatographie Liquide Haute Performance

CV ou %RSD : coefficient de variation

d : distance entre la perpendiculaire abaissée du maximum du pic et le bord d'entrée du pic au vingtième de sa hauteur

DLU : Date Limite d'Utilisation

D_m : coefficient de distribution massique

E : potentiel d'une électrode, force électromotrice en volt (V)

F : constante de Faraday

f.e.m. : force électromotrice en volt (V)

G : conductance en siemens (S)

h : hauteur

HPLC : High Performance Liquid Chromatography

I : intensité en ampère (A) ou intensité d'un faisceau lumineux

I₀ : intensité incidente

I_a : intensité absorbée

I_r : intensité réfléchie

I_t : intensité transmise

ICH : International Conference of Harmonization

k : constante de cellule

k' : facteur de capacité

K_c : coefficient de distribution à l'équilibre

l : distance en centimètre (cm)

m : masse en gramme (g) ou en milligramme (mg)

M : masse molaire en gramme par mole (g.mol⁻¹) ou molarité

N : nombre de plateaux théoriques

pe : prise d'essai

Ph Eur : Pharmacopée Européenne

R : résistance électrique ou constant des gaz parfaits

R_f : facteur de réponse

S : surface

t : titre en moles par litre (mol.L^{-1}) ou en gramme par litre (g.L^{-1})

T : température absolue en kelvin (K)

t₀ : temps mort en minute (min)

T₀ : temps initial, jour de préparation

t_m : temps de rétention d'un composé non retenu par une colonne chromatographique

T_r ou **RT** : temps de rétention

U : tension en volt (V)

UV : UltraViolet

V : volume en millilitre (mL)

V₀ : volume mort

V_M : volume de la phase mobile

V_S : volume de la phase stationnaire

w_h : largeur à mi-hauteur d'un pic chromatographique

w_i : largeur au points d'inflexion d'un pic chromatographique

w_{0,05} : largeur du pic au vingtième de sa hauteur

χ : indice de réfraction (sans unité)

λ : longueur d'onde en nanomètre (nm)

ρ : résistivité en ohmmètre ($\omega.m$)

σ ou **κ** : conductivité en siemens par mètre (S.m^{-1})

σ : écart type

v₀ : fréquence d'un photon de faisceau

[] : concentration

INTRODUCTION

Dans un souci de qualité vis-à-vis de leurs clients et de la législation, les laboratoires pharmaceutiques contrôlent leurs produits aux différentes étapes de fabrications : de la réception des matières premières aux produits finis. Ces contrôles sont de différents ordres :

- Visuels (aspects du médicament, de son emballage, de la notice, des étiquettes),
- Physico-chimiques (identification des composants, teneurs en principe(s) actif(s) et en excipients, respect des monographies de la Pharmacopée Européenne),
- Microbiologique (charge microbienne des produits non stériles, efficacité des conservateurs, stérilité).

Dans le cadre des contrôles physico-chimiques, la validité des tests ne peut être certaine que si le matériel est qualifié et en état, que les procédures analytiques soient validées et que les réactifs chimiques soient de qualité appropriée pour l'analyse des produits.

C'est dans ce cadre que j'ai effectué mon stage de master « Contrôle Qualité, Assurance Qualité et Méthodes de Validation » validant ma sixième année de pharmacie au sein des Laboratoire Sophartex. Dans cette optique et sous l'impulsion de l'AFSSAPS, le laboratoire de contrôle physico-chimique des Laboratoires Sophartex s'est lancé dans la validation des durées d'utilisation des réactifs titrés et non titrés en solution et des phases mobiles pour HPLC.

Peu de références sont disponibles sur ce sujet. Fixer une durée d'utilisation dépend des conditions de stockage et surtout de sa destination. En fonction de cette destination, un réactif peut être utilisé plus ou moins longtemps et être ensuite recyclé dans une autre application analytique. Il n'est donc pas aisé de l'évaluer et de généraliser une durée d'utilisation. Dans ce contexte, il n'y a aucune information dans la littérature sur les durées d'utilisation des réactifs en solution.

REVUE GENERALE DE LA LITTERATURE

1. Contexte

1.1. Demande des autorités compétentes : l'AFSSAPS

Suite à une inspection de l'AFSSAPS en 2005, le laboratoire de contrôle physico-chimique a dû mettre au point des protocoles de validation des dates de péremption pour trois catégories de produits utilisés dans l'analyse des médicaments fabriqués sur le site des Laboratoires SOPHARTEX :

- les phases mobiles pour HPLC,
- les réactifs titrés,
- les réactifs non titrés.

En effet, les durées d'utilisation étaient déterminées empiriquement, sans validation ou documentation particulière attestant de ces délais d'utilisation. En 2006, l'AFSSAPS a demandé la mise en œuvre des protocoles.

Cette demande a été faite afin que les laboratoires Sophartex puissent attester avec preuve à l'appui que les réactifs employés ont une qualité appropriée pour l'analyse des produits. Dans le cas où les réactifs seraient de qualité insuffisante, il y aurait un risque de libérer un lot non-conforme en réalité. Et inversement, un lot conforme pourrait être déclaré non conforme. Cela aurait des répercussions d'une part sur la santé des futurs utilisateurs et d'autre part économique pour le fabricant et les distributeurs.

Dans cette optique, il est important d'avoir une preuve documentée de la fiabilité des réactifs. Les autorités compétentes et les clients des laboratoires pharmaceutiques ne peuvent pas se contenter de leur expérience. Les auditeurs de l'AFSSAPS ont proposé comme mode de détermination des durées d'utilisation de re-tester les réactifs à différents temps.

1.2. Les textes officiels

1.2.1. Les Bonnes Pratiques de Fabrication (BPF)

Elles soulignent que « le contrôle de la qualité fait partie des BPF » (9). Et, elles donnent quelques précisions sur les réactifs utilisés dans sa pratique :

- « Une attention toute particulière doit être portée à la **qualité des réactifs**, de la verrerie graduée, **des solutions titrées**, des étalons et des milieux de culture. Leur préparation doit se faire selon des procédures écrites. »
- « Les produits ou solutions de réactifs préparés en vue d'un usage prolongé doivent porter la date de leur préparation et la signature de celui qui les a préparés. **La date de péremption des réactifs instables** et des milieux de culture doit être **indiquée sur l'étiquette**, de même que les conditions particulières de conservation. De plus, pour les **solutions titrées**, la **dernière date de titrage et le titre en cours** doivent être indiqués. »
- « Lorsque cela s'avère nécessaire, la date de réception des produits utilisés pour les analyses (par exemple les réactifs et les substances de référence) doit être indiquée sur le récipient. Les instructions pour l'utilisation et la conservation doivent être respectées. **Dans certains cas, il peut être nécessaire d'effectuer une identification et d'autres contrôles des réactifs lors de leur réception ou avant leur emploi.** »

La « qualité appropriée » d'un réactif n'est pas définie. Il n'y a aucune précision sur les études de stabilité et la détermination des durées d'utilisation.

1.2.2. Les Bonnes Pratiques de Laboratoires (BPL)

Le laboratoire de contrôle physico-chimique est un pôle unique réalisant les contrôle de routine, la validation et la mise au point de procédures analytiques. Bien qu'il ne soit pas strictement un laboratoire de recherche et qu'il soit régi par les Bonnes Pratiques de

Fabrication, nous pouvons quand même dire qu'il devrait se conformer aux BPL au niveau des réactifs :

«Il faut disposer d'information sur l'origine, la date de préparation et la stabilité. La date de péremption peut être prorogée sur la base d'une évaluation ou d'une analyse étayée par des documents.» (11)

Le laboratoire dispose des informations suivantes :

- Réactifs titrés : celles fournies par le fournisseur de réactifs titrés en solution, par la Pharmacopée Européenne et de l'expérience acquise lors de leur utilisation.
- Réactifs non titrés : celles indiquées par la Pharmacopée Européenne et acquises empiriquement.
- Phases mobiles pour HPLC : indiquées par la Pharmacopée Européenne et acquises empiriquement.

1.2.3. La Pharmacopée Européenne (Ph Eur)

Elle donne des indications sur les conditions de conservations de certains réactifs (16, 27). Dans d'autres cas, elle précise que l'utilisation doit être extemporanée ou que selon les procédures mises en jeu, les réactifs utilisés ont été récemment préparés. Il n'y a aucune précision sur les phases mobiles pour HPLC. La sixième édition de la Pharmacopée Européenne, valable à partir de janvier 2008, n'apporte pas vraiment plus de précision.

2. Durée d'utilisation

2.1. Définition

Il ne faut pas la confondre avec la date de péremption qui est la date au-delà de laquelle un produit ne doit plus être utilisé (shelf life ou expiration date en anglais (12)). Cette échéance est fixée pour un produit dont l'emballage n'est pas ouvert, stocké dans des

conditions définies. On parle aussi de date limite d'utilisation (DLU). Après ouverture, il s'agit de la durée d'utilisation (2).

Il est difficile de prédire la durée de vie d'un produit post ouverture. Beaucoup de paramètres sont en jeu : la nature du produit par lui-même, ses conditions de conservation, sa stabilité vis-à-vis de la température, de l'humidité et de la lumière entre autres (1, 4).

Ici, on s'intéresse à ce qui se passe après ouverture d'un réactif prêt à l'emploi ou après la préparation d'un réactif au laboratoire. Nous avons donc réalisé des études de « stabilité » post-ouverture et post-préparation.

2.2. Stabilité

Dans cette partie, la stabilité est développée au sens pharmaceutique selon la norme ICH Q1A(R2) : Stability Testing of New Drug Substances and Products (12) et la norme ICH Q1E : Evaluation for Stability Data (13). Nous pouvons assimiler les réactifs en solution à des principes actifs.

2.2.1. Définition

Les tests de stabilité doivent :

- mettre en évidence comment la qualité d'un principe actif varie au cours du temps sous l'influence d'un ensemble de facteurs environnementaux (température, humidité et lumière),
- et établir une période de re-vérification des spécifications du principe actif ou une date limite d'utilisation pour le médicament et des conditions de conservation.

Les données des études de stabilité devraient provenir d'au moins trois lots de principe actif. Les études de stabilité devraient être réalisées sur les principes actifs emballés dans un

système de conteneur clos qui est le même ou qui simule l'emballage proposé pour le stockage et la distribution. Dans notre cas, les réactifs sont conservés dans les récipients des fournisseurs ou dans flacons en verre blanc ou brun.

Elles devraient inclure des essais prenant en compte les paramètres susceptibles de changer lors du stockage et influençant la qualité, la sécurité et/ou l'efficacité. Les essais devraient couvrir les attributs physiques, chimiques, biologiques et microbiologiques. Les procédures analytiques validées indiquant la stabilité devraient être appliquées.

2.2.2. Fréquence des essais

Pour les études à long termes, la fréquence des essais doit être suffisante pour établir le profil de stabilité du principe actif. Avec une période de re-vérification d'au moins douze mois, la fréquence des essais sous condition de stockage à long terme devrait être :

- tous les trois mois la première année,
- tous les six mois la seconde année,
- puis annuellement tout au long de la période de retest.

Sous condition de stockage accéléré, pour une étude de six mois, un minimum de trois fois est recommandé, incluant les temps initial et final (0, 3 et 6 mois). Lorsqu'une probabilité existe que les résultats des études accélérées montrent des critères de changements significatifs, des essais supplémentaires devraient être conduits en ajoutant des échantillons au temps final ou en incluant un quatrième temps dans l'étude.

Quand l'étude accélérée a montré des changements significatifs, un essai sous conditions intermédiaires de stockage est effectué. Pour une étude de douze mois, un minimum de quatre temps est recommandé, incluant les temps initial et final (0, 6, 9, et 12 mois).

2.2.3. Conditions de stockage

En général, un principe actif devrait être évalué sous des conditions de stockage (avec les tolérances appropriées) pour tester sa stabilité thermique et si possible sa sensibilité à l'humidité. Les conditions de stockage et les durées des études choisies devraient être suffisantes pour couvrir le stockage, l'expédition et l'utilisation ultérieure.

L'essai à long terme devrait couvrir un minimum de douze mois sur au moins les trois premiers lots et devrait continuer sur une période suffisante pour couvrir la période de retest proposée. Les données de l'étude accélérée, et si c'est approprié, de l'étude intermédiaire peuvent être utilisées pour évaluer l'effet à court terme des excursions en dehors des conditions de stockage indiquées sur l'étiquette (telles que celles qui peuvent se produire lors du transport).

| Etude | Condition de stockage | Période minimale couverte par les données de soumission |
|------------------|--|---|
| Long terme * | 25°C ± 2°C/60% RH ± 5% RH ou 30°C ± 2°C/65% RH ± 5% RH | 12 mois |
| Intermédiaire ** | 30°C ± 2°C/65% RH ± 5% RH | 6 mois |
| Accélérée | 40°C ± 2°C/75% RH ± 5% RH | 6 mois |

* C'est au demandeur de décider si les études de stabilité à long terme sont réalisées à 25°C ± 2°C/60% RH ± 5% RH ou 30°C ± 2°C/65% RH ± 5% RH.

** Si 30°C ± 2°C/65% RH ± 5% RH es la condition à long terme, il n'y a pas de condition intermédiaire.

Tableau I - Cas général des conditions de stockage en fonction du type d'étude de stabilité

A la différence des principes actifs et des médicaments, ces types d'études sont réalisés par les fournisseurs, sur des réactifs emballés et non ouverts. De plus les emballages sont étudiés pour prolonger leur stabilité, donc leur durée de vie (30).

2.3. Fournisseurs

Les réactifs utilisés sont de marques MERCK et VWR PROLABO. Après ouverture, les délais de péremption dépendent de nombreux paramètres : nature même du produit (stabilité chimique), conditions de stockage (température, lumière, ...), fréquence d'ouverture (contamination par produits sous forme gazeuse : H₂O, CO₂, O₂, ...), procédures de prélèvement (contamination par instruments de prélèvement), criticité du produit dans son application (impact du produit sur la qualité du résultat final), entre autres.

La fixation d'une date de péremption après ouverture n'est donc pas chose aisée. L'expérience de MERCK et VWR PROLABO et celles de leurs utilisateurs leur a suggéré une durée de conservation comprise entre la moitié et un cinquième de la durée totale de péremption. La date découlant de ce calcul ne peut être postérieure à la date de péremption initiale. Mais les fournisseurs ne veulent pas s'engager en donnant une durée d'utilisation, ils ne donnent que des délais de péremption pour les flacons non ouverts :

| Réactifs | Délais de péremption | Durée d'utilisation (à titre indicatif) |
|------------------------------------|----------------------|---|
| Acides et bases | 3 à 5 ans | 7,2 à 30 mois |
| Sels et produits inorganiques | 5 ans | 18 à 30 mois |
| Solvants | 3 à 5 ans | 7,2 à 30 mois |
| Produits organiques | 5 ans | 30 mois |
| Solutions étalon, tampon et titres | 1 à 3 ans | 2,4 à 18 mois |

Tableau II - Délais de péremption et durées d'utilisation de réactifs liquides

Des fournisseurs de standards conseillent de ne pas les conserver plus d'un an voire six mois après ouverture, à partir du moment où les conditions de stockage et d'utilisation sont strictes pour éviter toutes contaminations, évaporations ou erreurs humaines (30,31).

3. Validation

Couramment, les validations concernent des méthodes voire du matériel, mais on ne parle pas de validation de durée d'utilisation pour les réactifs chimiques. En général, la durée de validité d'un réactif est déterminée à partir des études de stabilité. L'objectif et le principe de validation d'une méthode sont décrits ci-dessous.

Quantifier le plus précisément possible des quantités inconnues : voilà l'objectif d'une procédure analytique quantitative (3, 14). La procédure doit donner un résultat avec un écart minimal par rapport à la vraie valeur de l'échantillon (notion de limite d'acceptation). Le but de la validation est de :

- démontrer que la procédure analytique correspond à l'usage pour lequel elle est prévue,
- donner aux laboratoires et aux autorités compétentes les garanties que chaque mesure qui sera réalisée ultérieurement en routine sera suffisamment proche de la vraie valeur inconnue de l'échantillon ou du moins comprise dans une limite acceptable, en fonction de la finalité de la procédure,
- minimiser le risque tant au niveau du producteur que du futur consommateur.

Les réactifs chimiques font partie intégrante des procédures analytiques et leur qualité est primordiale pour l'obtention de résultats corrects.

Les principaux critères de validation sont :

- la spécificité-sélectivité (capacité d'une procédure à établir l'existence de l'analyte recherché en présence d'autres composés),

- la fonction de réponse (courbe d'étalonnage, relation existant entre la réponse (signal) et la concentration (quantité) en analyte dans un échantillon) ,
- la linéarité (capacité d'obtention de résultats directement proportionnels à la quantité),
- la fidélité (répétabilité, répétabilité intermédiaire) (étroitesse de l'accord entre une série de mesures provenant de multiples prises d'un même échantillon homogène),
- la justesse (biais, étroitesse de l'accord entre la valeur moyenne obtenue et une valeur acceptée comme une valeur vraie ou comme une valeur de référence),
- l'exactitude (étroitesse de l'accord entre le résultat d'essai et la valeur de référence ou valeur vraie),
- la limite de détection (la plus petite quantité d'analyte pouvant être détectée mais non quantifiée),
- la limite de quantification (la plus petite quantité d'analyte pouvant être dosée),
- l'intervalle de dosage (intervalle pour lequel la procédure est appropriée quant à sa justesse, sa fidélité et sa linéarité),
- la sensibilité (rapport de la variation de la réponse de la méthode d'analyse à la variation de la quantité d'analyte).

Malheureusement ces critères ne sont pas applicables à la validation d'une durée d'utilisation d'un réactif : les essais sont réalisés sur un même lot à des jours différents, et dans la plupart des cas les lots ne sont pas testés simultanément.

Pour certaines méthodes, la stabilité de la substance à analyser doit être testée pendant la phase de développement et confirmée au terme de la validation de la procédure de dosage puisqu'elle conditionne la validité des autres critères. La stabilité est évaluée sur un minimum

de trois échantillons par mesure dans des conditions de conservation variées, telles que la lumière, l'obscurité, la température et le pH.

Autre point de vue, dans la production de logiciel, la validation d'une méthode d'analyse consiste à valider séparément chacun de ses éléments : l'échantillonnage, le mode opératoire, l'équipement et enfin le résultat. Encore une fois, si on applique cette procédure, nous ne contrôlons pas les réactifs .

La validation aboutit à la préparation d'un dossier contenant deux types d'information :

- Une description des moyens (équipement et réactifs) et du mode opératoire à mettre en œuvre pour appliquer la méthode d'analyse,
- Les résultats numériques d'un ensemble d'expériences et de calculs statistiques qui serviront à établir que ces moyens et ce mode opératoire sont efficaces.

En général, pour chaque paramètre ou critère, il faut réaliser trois séries de mesure sur trois lots différents. Pour chaque niveau de concentration, trois mesures sont nécessaires.

4. Exemple d'une étude de stabilité sur l'hypochlorite de sodium 0,5% (5000ppm de chlore actifs).

Cette étude a été réalisée pour démontrer la stabilité et l'efficacité antimicrobienne de l'eau de javel en milieu hospitalier tropical (1). C'est un bon agent d'antisepsie et de désinfection. C'est avant tout un réactif chimique. Peu onéreux et facile à préparer, sa conservation n'est pas toujours aisée. Ainsi, la validité de cette solution a été testée dans des conditions défavorables : température, air, lumière.

L'étude comportait trois temps :

L'étude comportait trois temps :

- Détermination de la teneur en chlore actif lors d'une exposition de la solution à la lumière, à l'air et à la chaleur (37°C),
- Etude du pouvoir anti-bactérien sur des seringues contaminées par *Staphylococcus aureus*,
- Recherche de trace de chlore sur le matériel désinfecté par une solution contenant 0,5 % de chlore actif.

Plusieurs contenants ont été testés : flacons en verre teinté, flacons en verre blanc et flacons en PVC (Chlorure de Polyvinyle). La teneur en chlore actif est déterminée à J0, J7, J14, J21, J28 et J35 par la méthode titrimétrique décrite dans la Pharmacopée Française (X^{ème} édition). En parallèle, l'action décontaminante de la solution est recherchée sur des seringues en prenant comme témoin l'eau. La quantité résiduelle d'hypochlorite de sodium persistante après rinçage est évaluée pour éviter toute interaction avec des médicaments ou un risque toxique pour l'endothélium veineux.

Ainsi, Ballereau, Merville, Lafleurriel et Schrive ont montré que :

- Lorsque le contenant est conservé à l'air et à la lumière, la concentration diminue moins avec un flacon en verre teinté ou en PVC. La concentration des flacons fermés varie peu pendant les 35 jours de l'étude.

| | Conservation à la lumière | | Conservation à l'obscurité | |
|-----------------------------|---------------------------|--------|----------------------------|--------|
| | Fermé | Ouvert | Fermé | Ouvert |
| Flacon en verre blanc | 20 % | 50 % | 5 % | - |
| Flacon en verre teinté | 3 % | 20 % | - | - |
| Flacon en PVC haute densité | 20 % | - | - | - |

Tableau III - Perte en chlore actif de l'hypochlorite de sodium 0,5%

- La température n'a pas d'influence lorsque l'hypochlorite de sodium est conservé dans un flacon en PVC (à 25°C et 37°C : diminution respective de 7 et 4% de la teneur en chlore actif).
- L'eau de javel conserve son activité bactéricide vis-à-vis de *Staphylococcus aureus*, avec une teneur en chlore actif de 2300 ppm.
- Trois rinçages l'eau sont nécessaires pour éliminer les traces d'hypochlorite de sodium dans les seringues.

Cette étude a démontré une relative stabilité de l'hypochlorite de sodium 0,5% et surtout le maintien de son efficacité bactéricide malgré une baisse de teneur en chlore actif. Ainsi, nous constatons qu'il n'est pas suffisant de doser le réactif au cours du temps pour définir sa stabilité, il est aussi nécessaire de contrôler son efficacité par rapport à son domaine d'utilisation.

MATERIEL ET METHODES

1. Validation des durées d'utilisation des phases mobiles pour HPLC

1.1 Généralités sur l'HPLC

1.1.1 Définition de l'HPLC

La chromatographie liquide haute performance (CLHP ou HPLC en anglais) est une technique de séparation basée sur un processus de migration différentielle (6, 7, 16, 17, 8). C'est une chromatographie dite sur colonne : la **phase stationnaire** remplit un tube où circule une **phase mobile**. L'échantillon est introduit en début de colonne, et est élué pour être détecté en sortie. La séparation des composés est fonction de leur affinité préférentielle pour la phase mobile ou la phase stationnaire. L'HPLC peut être qualitative ou quantitative.

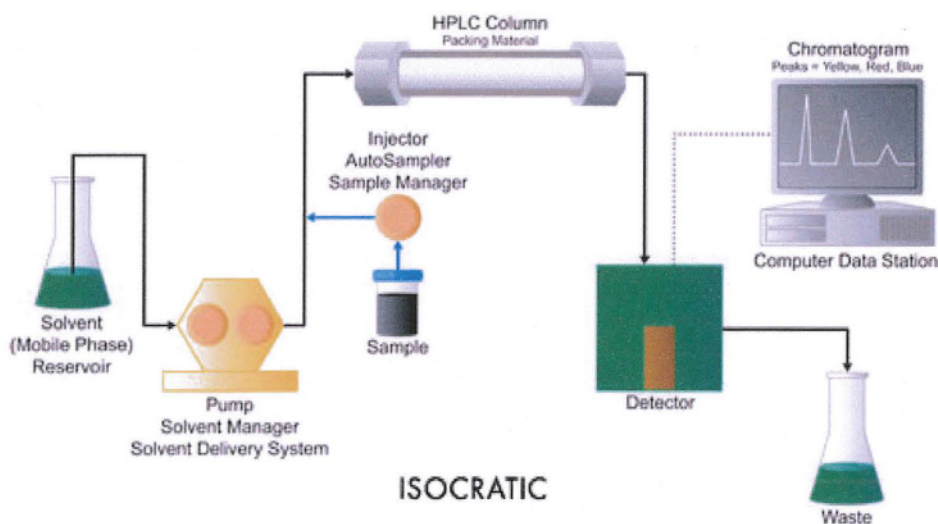


Figure 1 - Schéma d'un système HPLC en mode isocratique (d'après : <http://www.waters.com/WatersDivision/ContentD.asp?watersit=JDRS-6UXGYA&WT.svl=1>)

1.1.2. Phase stationnaire

La nature de la phase stationnaire conditionne le type d'équilibre subi par les analytes et ainsi leur mécanisme de séparation (17). Elle peut être :

- solide (chromatographie d'adsorption)
- liquide : polaire ou apolaire (chromatographie de partage) avec des greffons,
- un gel polymérique (chromatographie d'exclusion),

- une résine échangeuse d'ions (chromatographie d'échange d'ions).

1.1.3. Phase mobile

Elle est constituée d'un mélange de solvant ou de tampon (17). Elle est aussi importante que la phase stationnaire :

- Les analytes doivent s'y solubiliser,
- Elle conditionne la séparation des analytes par son débit et sa composition. Toute variation de l'un de ces deux paramètres entraîne une modification de la forme ou de la position du pic d'éluion enregistré sur le chromatogramme.

Ainsi, il est nécessaire de connaître la stabilité de la phase mobile, et l'impact de ses modifications. En cas de réutilisation, les résultats ne doivent pas être erronés car il s'agit d'analyse quantitative.

1.2. Conduite du laboratoire vis-à-vis des phases mobiles

En général, les volumes préparés de phases aqueuses et des mélanges constitués sont ajustés au dosage à réaliser. Les phases aqueuses et les mélanges constitués peuvent être conservés au maximum 4 semaines et les solvants organiques ont un délai d'utilisation de 3 ans après ouverture (moins si la date de péremption arrive à échéance avant). Les solvants courants sont utilisés dans le mois.

En pratique, les phases mobiles sont consommées avant la date limite d'utilisation. Certains tampons et phases aqueuses sont conservés au froid afin de prolonger leur durée de vie : en effet dès qu'une phase se trouble ou qu'il apparaît un dépôt ou un précipité, la phase est détruite.

Les phases aqueuses et les mélanges constitués sont filtrés sur 0,45 µm avant toute utilisation. Les phases organiques simples : méthanol ou acétonitrile ne le sont pas. En

routine, aucune analyse n'est faite sur les phases. Seul l'aspect des phases aqueuses est pris en compte.

1.3. Protocole

Cette validation porte sur la durée d'utilisation des phases mobiles pour HPLC (annexe 1, page 85). Dans un premier temps, elle a été effectuée sur les phases mobiles qui servent aux produits les plus courants. L'étude a une durée maximale de six semaines et porte sur l'observation et le suivi de critères définis. Trois cas sont testées : les systèmes « deux voies » où la phase aqueuse et la phase organique sont distinctes, les mélanges constitués (phases aqueuse et organique réunies dans un même flacon), et les phases aqueuses seules.

| Critères | Phase aqueuse | Phase organique | Mélanges constitués |
|---|---------------|-----------------|---------------------|
| Aspect de la solution : limpidité et coloration | | | |
| pH | | | |
| Conductivité | | | |
| Indice de réfraction | | | |
| Spectre UV (200-360 nm) | | | |
| Dosage HPLC à T0 et en fin de validation | | | |

Tableau IV - Critères retenus selon le type de phase mobile pour HPLC

1.4. Précision sur les tests analytiques

1.4.1. Limpidité et coloration

D'après la Pharmacopée Européenne 5^{ème} édition (16, 27):

- « Un liquide est considéré comme *limpide* si sa limpidité correspond à celle de l'eau R »
- « Une solution est dite *incolore* si elle a l'aspect de l'eau R ou du solvant, ou si elle n'est pas plus colorée que la solution témoin B₉. »

La définition moderne du pH repose sur le travail de normalisation et de recommandation du National Bureau of Standard aux Etats-Unis. La différence de pH entre deux solutions E (solution étalon) et X (solution de pH inconnu) est donnée par :

$$\text{pH}(X) - \text{pH}(E) = \frac{E_x - E_s}{2,3RT / F}$$

où E_x et E_s sont les f.c.m. des solutions mesurées par des électrodes à hydrogène ou une seule électrode de verre. Dans le cadre de cette étude, le pH a été mesuré avec un pHmètre PHM 210 (Radiometer) muni d'une électrode de verre. La variation observée ne doit pas excéder 0,5 unités pH par rapport à la valeur mesurée à T_0 .

1.4.3. Indice de réfraction

D'après la Pharmacopée Européenne (16, 27) : l'indice de réfraction d'un milieu rapporté à l'air est égal au rapport du sinus de l'angle d'incidence d'un rayon lumineux dans l'air au sinus de l'angle de réfraction du rayon réfracté dans le milieu considéré.

Cet indice est une caractéristique de tous les milieux liquides, voire pâteux (20, 26). Le principe de mesure de cet indice est le suivant : un rayon lumineux qui passe d'un milieu dans un autre change de direction, déterminant ainsi un angle de réfraction, spécifique du milieu traversé. Un mélange homogène de deux composants réfracte donc la lumière différemment selon la composition et la concentration de ce mélange .

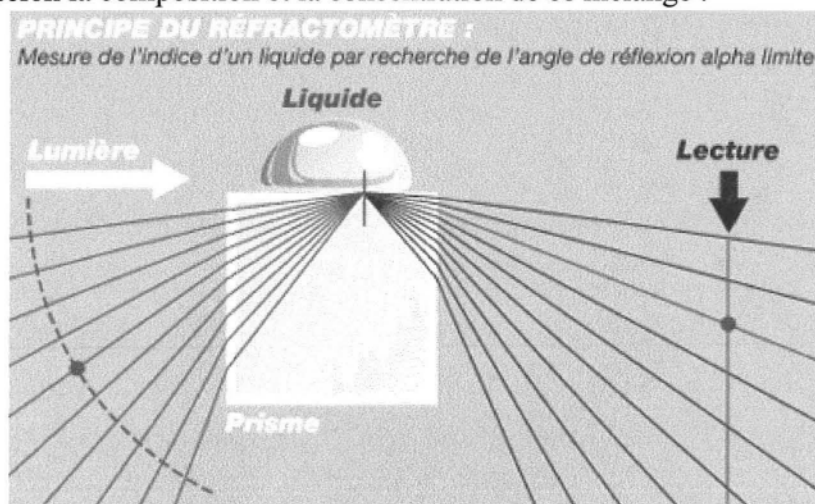


Figure 3 - Principe du réfractomètre (d'après www.refractometre.com/fr/savoir.htm).

Les indices de réfraction ont été mesurés avec un réfractomètre de marque Soplelem. L'indice de réfraction étant fortement dépendant de la température, on pourra corriger la valeur trouvée à $t^{\circ}\text{C}$ (température à l'instant t) pour la ramener à sa valeur à $t_0^{\circ}\text{C}$ ($t_0^{\circ}\text{C}$ étant la température de la mesure initiale). La valeur de l'indice ne devra pas excéder $\pm 0,0010$ de la valeur initiale à T_0 .

Formule de correction : $\chi_{D(t_0)}^{2O} = \chi_{D(t)}^{2O} - a(t_0 - t)$ avec $a = 0,0005$

1.4.4. Conductivité

Elle est déterminée avec un conductimètre qui mesure en réalité l'intensité d'un courant parcourant une solution aqueuse (19, 29).

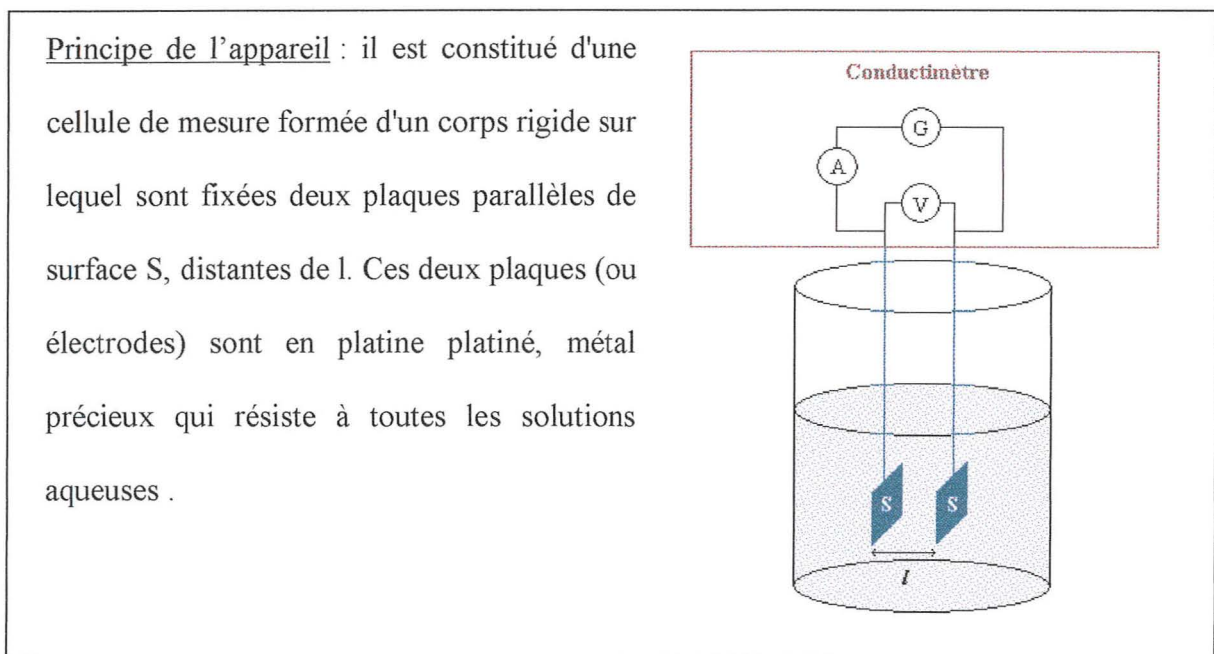


Figure 4 - Principe d'un conductimètre (d'après : freephysique.free.fr/cours%206.html)

La cellule de mesure est plongée dans une solution aqueuse ionique. On applique entre ses deux électrodes une tension alternative de valeur efficace U (en Volt) produite par un générateur G . Un courant électrique d'intensité efficace I (en Ampère) apparaît qui vérifie la loi d'Ohm : $U = R I$. R est la résistance (en Ohm) de la portion de solution ionique se trouvant essentiellement entre les électrodes de la cellule de mesure du conductimètre.

Le conductimètre donne la valeur de la conductance $G = \frac{1}{R}$ en Siemens (S). G

dépend des caractéristiques de la cellule (l et S). On note k la constante de cellule : $k = \frac{S}{l}$.

Donc $G = k\sigma = \frac{S}{l} \times \sigma$. La conductivité σ (ou κ dans la Pharmacopée Européenne) dépend :

- de la nature des ions en solution,
- des concentrations des ions,
- d'une grandeur caractéristique de chaque ion, la conductivité molaire volumique λ ,
- de la température.

Les relations $G = \frac{1}{R}$ et $G = \sigma \frac{S}{l}$ permettent d'écrire : $R = \rho \frac{L}{S}$ en posant $\rho = \frac{1}{\sigma}$ (ρ ,

inverse de la conductivité, est appelée résistivité de la portion de solution étudiée et s'exprime en ohm.mètre ($\Omega \cdot m$)). La conductivité σ d'une solution donnée (chlorure de sodium, par exemple) est proportionnelle à la concentration C du soluté. Cette proportionnalité est vérifiée pour des concentrations comprises entre 10^{-5} mol / L et 10^{-2} mol / L.

Remarque : La solvation des ions intervient dans leur mobilité. Cela explique, par exemple, que l'ion Na^+ bien que plus petit que l'ion K^+ possède une conductivité ionique plus faible (Na^+ , plus solvaté que K^+ , traîne avec lui davantage de molécules d'eau).

Dans le cas particulier de l'ion H^+ ce n'est pas l'ion qui se déplace mais sa charge. Cette charge positive se déplace très vite le long des liaisons que l'ion H^+ crée avec les molécules H_2O .

L'unité de conductivité dans le système international est le siemens par mètre ($\text{S} \cdot \text{m}^{-1}$). Dans la pratique, la conductivité électrique d'une solution est exprimée en millisiemens par centimètre ($\text{mS} \cdot \text{cm}^{-1}$) ou en microsiemens par centimètre ($\mu\text{S} \cdot \text{cm}^{-1}$).

Le suivi de ce critère a été réalisé à titre indicatif sur les solutions tampons avec un conductimètre CDM 230 (Radiometer) avec une électrode à 4 pôles possédant 4 anneaux de platine. L'interprétation de ces résultats se fera en association avec les résultats des autres tests.

1.4.5. Spectre UV : spectrométrie d'absorption dans l'ultraviolet

La spectrophotométrie correspond à l'étude des variations de grandeurs photométriques spectrales ou de leurs équivalents énergétiques résultant de l'interaction du rayonnement avec une substance placée sur le faisceau (6). On mesure une densité de photons. Lorsqu'un faisceau de photons de fréquence ν_0 traverse une solution de molécule absorbante, le faisceau transmis présente une intensité I inférieure à I_0 (intensité du faisceau incident).

En effet, quand une lumière monochromatique ou polychromatique arrive dans un milieu homogène une partie de la lumière incidente I_0 est réfléchi (I_r), une autre est absorbée (I_a) par le milieu et le reste est transmis (I_t) : $I_0 = I_a + I_t + I_r$. L'intensité réfléchi est généralement supprimée de l'équation en prenant une cuve de référence.

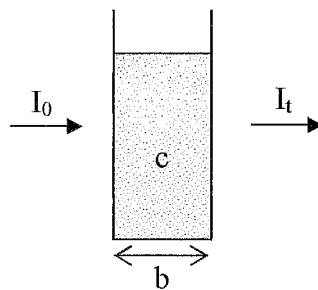


Figure 5 - Illustration du comportement de la lumière lors de son passage dans une solution (I_0 : intensité de la lumière incidente, I_t : intensité transmise, c : concentration de la solution, b : longueur du trajet)

Le spectre UV-visible d'une molécule en solution se définit comme la variation de l'absorbance A en fonction de la longueur d'onde λ : $A = f(\lambda)$. Pour déterminer ce spectre, on utilise la loi de Beer-Lambert décrite comme suit dans la Pharmacopée Européenne (16, 27) :

« L'absorbance (A) d'une solution est le logarithme décimal de l'inverse de la transmittance (T) pour un rayonnement monochromatique. Elle s'exprime par l'équation :

$$A = \log \left(\frac{1}{T} \right) = \log \left(\frac{I_0}{I} \right)$$

- $T = I/I_0$

- I_0 = intensité d rayonnement monochromatique incident

- I = intensité du rayonnement monochromatique transmis

En l'absence d'autres facteurs physico-chimiques, l'absorbance (A) est proportionnelle à l'épaisseur (b) de la couche traversée et à la concentration (c) de la substance dissoute, en accord avec l'équation : $A = \varepsilon c b$

ε = absorbance molaire ou coefficient d'extinction molaire, si b est exprimé en centimètres et c en moles par litre. »

Les mesures ont été effectuées par rapport au même solvant : l'eau, avec un spectrophotomètre UV-visible monofaisceau CARY 50 (Varian). L'absorbance est mesurée dans deux cas :

- Cas des solvants purs : nous traçons le spectre de 200 à 360 nanomètres (nm), en utilisant l'eau R comme liquide de référence. La courbe doit être lisse. Des mesures d'absorbance sont réalisées à des longueurs d'onde précises :
 - 240 nm (absorbance maximale : 0,40),
 - entre 250 et 260 nm (absorbance maximale : 0,30),
 - entre 270 et 340 nm (absorbance maximale : 0,10).
- Cas des mélanges constitués : nous traçons le spectre de 200 à 360 nm, en utilisant l'eau R comme liquide de référence. Les absorbances entre 240 et 340 nm ne doivent pas être supérieures de 0,05 à celle observées sur la même solution à T_0 .

Cette plage de longueur d'onde a été choisie pour détecter les solvants organiques et les aromatiques pouvant être issus de la synthèse de ces solvants. Deux solvants sont utilisés comme phase organique et des maxima d'absorbance sont imposés par la Pharmacopée Européenne (16, 27):

- L'acétonitrile : absorbance maximale de 0,009 entre 255 nm et 420 nm,
- Le méthanol : 0,15 à 230 nm, 0,05 à 250 nm, 0,02 à 270 nm et 0,01 à 290 nm.

1.4.6. Dosage HPLC

Le dosage concerne trois témoins de substance de référence injectés chacun trois fois.

Les paramètres chromatographiques retenus sont les suivants (7, 16, 27):

- **Temps de rétention : t_R** (avec moyenne et coefficient de variation)

Il est défini par la position du maximum du pic dans le chromatogramme.

- **Aire et Hauteur des pics**

Un pic peut être défini par sa *surface* A ou sa *hauteur* h et sa *largeur à mi-hauteur* w_h ou sa *hauteur* h et sa *largeur aux points d'inflexion* w_i ($w_h = 1,18 w_i$).

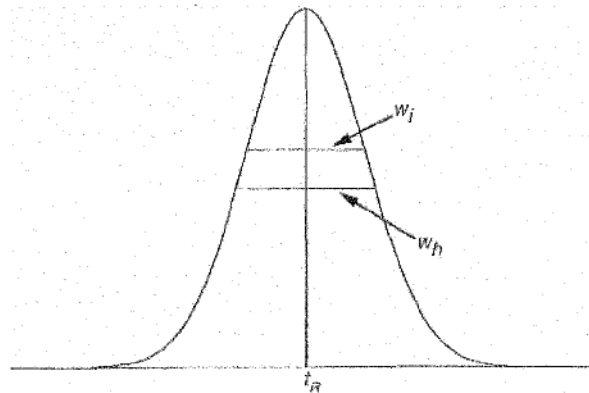


Figure 6 - Pic chromatographique gaussien (w_h : hauteur à mi-hauteur, w_i : largeur aux points d'inflexion, t_R : temps de rétention) ; d'après la Pharmacopée Européenne 5ème Edition, 2.2.46.

- **Facteur de réponse : R_f**

Il est défini par : $R_f = \frac{\text{aire}}{pe}$ dans le logiciel Millennium (pe : prise d'essai). Le facteur

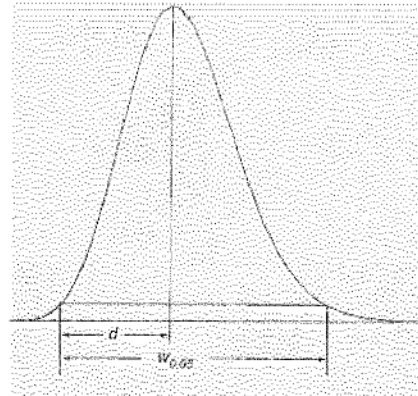
de réponse doit avoir un coefficient de variation inférieur ou égal à 2% (norme interne).

➤ **Facteur de symétrie** ou de traînée A_s d'un pic

Il est donné par l'expression : $A_s = \frac{w_{0,05}}{2d}$

Figure 7 - Facteur de symétrie

- $w_{0,05}$: largeur du pic au vingtième de sa hauteur,
 - d : distance entre la perpendiculaire abaissée du maximum du pic et le bord d'entrée du pic au vingtième de sa hauteur.
- (d'après la Pharmacopée Européenne 5^{ème} édition, 2.2.46)



Une valeur de 1,0 indique une symétrie totale (idéale). Il doit être compris entre 0,8 et 1,5 (16).

➤ **Nombre de plateaux théoriques N**

Il représente la performance d'une colonne (efficacité apparente) : $N = 5,54 \left(\frac{t_R}{w_h} \right)^2$

- t_R : temps (ou volume) de rétention ou distance sur la ligne de base entre le point d'injection et la perpendiculaire abaissée du maximum du pic correspondant au composant considéré,
- w_h : largeur du pic à mi-hauteur.

Les valeurs de t_R et w_h doivent être exprimées dans la même unité (de temps, volume ou distance). Le nombre apparent de plateaux théoriques dépend du composant considéré, ainsi que de la colonne et du temps de rétention. C'est un bon indicateur du vieillissement.

➤ **Coefficient de distribution massique D_m ou Facteur de capacité k' ou facteur de rétention k**

Il représente la capacité de rétention d'une colonne. Il est défini par:

$$D_m = \frac{\text{quantité de soluté dans la phase stationnaire}}{\text{quantité de soluté dans la phase mobile}} = K_c \frac{V_S}{V_M}$$

- K_C : coefficient de distribution à l'équilibre (ou constante de distribution),

- V_S : volume de la phase stationnaire,
- V_M : volume de la phase mobile.

Le coefficient de distribution massique d'un composant peut être déterminé à partir du chromatogramme, à l'aide de l'expression : $D_m = \frac{t_R - t_M}{t_M}$

- t_R : temps (ou volume) de rétention ou distance sur la ligne de base entre le point d'injection et la perpendiculaire abaissée du maximum du pic correspondant au composant considéré,
- t_M : temps (ou volume) de rétention ou distance sur la ligne de base entre le point d'injection et la perpendiculaire abaissée du maximum du pic correspondant à un composant non retenu (« hold-up time »).

NB : la Pharmacopée Européenne ne donne aucune norme sur ces paramètres sauf pour le facteur de symétrie.

1.5. Exigences de la Pharmacopée Européenne par rapport à la composition de la phase mobile (Ph Eur, 2.2.46, 76) :

- « *Pour la proportion du solvant minoritaire*, variation possible de ± 30 pour cent en termes relatifs ou ± 2 pour cent en termes absolus (prendre la valeur la plus élevée des 2).
- *Pour les autres composants*, pas de variation supérieure à 10 pour cent en termes absolus.
- *pH du composant aqueux de la phase mobile* : $\pm 0,2$ pH sauf indication contraire dans la monographie, ou $\pm 1,0$ pH pour l'examen de substances neutres.
- *Concentration des sels* du tampon entrant dans la composition d'une phase mobile : ± 10 pour cent. » (Ph Eur, 2.2.46,76)

Cette définition permet d'avoir une marge d'erreur sur la composition de la phase mobile : en effet, la préparation est faite en volume et non en masse.

2. Validation des durées d'utilisation des réactifs titrés en solution

Le titre d'une solution correspond au rapport de la masse du corps dissous à la masse totale de la solution. Le titre d'un réactif évolue dans le temps. Cela pose quelques problèmes : l'évaluation régulière du titre, un certain gaspillage de réactif lorsque celui-ci se périmé rapidement (par exemple les solutions d'hydroxyde de sodium valables une semaine après ouverture d'un flacon ou préparation).

2.1. Généralités sur les réactifs titrés et leur date de péremption

2.1.1. Définition et préparation des solutions titrés selon la Pharmacopée Européenne

Pour la volumétrie, la Pharmacopée Européenne indique sur les solutions titrées (16):

- Elles sont préparées suivant les normes analytiques classiques et les appareils utilisés doivent être contrôlés,
- Leur concentration est exprimée en terme de molarité (nombre de moles dans un litre : M), elle est déterminée par un nombre approprié de titrages (répétabilité (écart-type relatif) $\leq 0,2$ pour cent),
- Leur facteur de correction est au maximum de ± 10 pour cent.

La vérification des solutions titrées est faite à partir des techniques décrites dans la Pharmacopée Européenne. Normalement, lorsque le dosage d'une substance est effectué par une méthode électrochimique, les solutions titrées sont étalonnées par la même méthode.

2.1.2. Conduite du laboratoire vis-à-vis des réactifs titrés

Un flacon de réactif non ouvert est utilisable jusqu'à la limite indiquée par le fabricant, ou deux ans en l'absence de mention. Après ouverture, le titre d'un réactif est considéré valide

pendant une semaine sauf exception. Avec des re-contrôles successifs, le réactif peut être utilisé pendant un an (à l'exception des solutions d'acide chlorhydrique 0,1 N, d'hydroxyde de sodium et de potassium valables une semaine). Au-delà d'une semaine (validité du titre) ou plus (en cas de recontrôles), le réactif est détruit ou déclassé : il peut servir pour des opérations d'ajustement de pH ou des réactions d'identification.

2.1.3. Avis du fournisseur de réactifs titrés prêts à l'emploi.

Rappelons que les réactifs titrés utilisés au laboratoire sont de marques MERCK et VWR PROLABO. De façon général, les délais de péremption (flacons non ouverts) pour les acides et les bases sont de 3 à 5 ans et plus particulièrement pour les solutions titrées de 1 à 3 ans.

Ainsi après ouverture, le fournisseur suggère, sans engagement de sa part, les délais de péremption suivants :

- Acides et bases : 7,2 à 30 mois
- Solutions étalon, tampon et titres : 2,4 à 18 mois

2.2. Protocole (annexe 2, page 89)

La validation porte sur les réactifs titrés les plus couramment utilisés au laboratoire de contrôle physico-chimique : acide chlorhydrique 0,1M, hydroxyde de sodium 0,1 M, nitrate d'argent 0,1M, acide perchlorique 0,1M, édétate de sodium 0,1M, thiosulfate de sodium 0,1M et nitrate mercurique 0,1M. Le chlorure de benzéthonium 0,004 M est en plus, c'est un réactif peu utilisé mais qu'il serait intéressant de pouvoir conservé un mois. L'étude s'est déroulée sur une période de 4 semaines à J0, J1, J2, J3, J4, J10, J15, J20, J25 et J30, par titrage des solutions.

Les méthodes utilisées sont celles décrites dans la Pharmacopée Européenne 5^{ème} édition ou des méthodes internes au laboratoire (dosage à la burette ou potentiométrique). Les

substances étalons sont identiques à celles utilisées par le laboratoire lors des titrages de routine.

La détermination du titre a été faite à partir de trois titrages indépendants, avec calcul de la valeur moyenne et du coefficient de variation. Ce dernier doit être inférieur ou égal à 0,5 %. La norme de la Pharmacopée Européenne (0,2 %) est difficilement atteinte dans la plupart des titrages. De plus, la limpidité des solutions était surveillée.

2.3. Rappels sur les méthodes de détermination

L'analyse titrimétrique (ou analyse volumétrique) est une analyse chimique quantitative basée sur la détermination du volume d'une solution de concentration connue avec précision (solution étalon ou solution titrante) qui est nécessaire pour réagir quantitativement avec un volume donné d'une solution de substance analysée (solution titrée) (6). Connaissant l'équation chimique correspondante et les masses moléculaires relatives des réactifs, on calcule la masse de substance titrée à partir de la solution étalon utilisée.

En analyse titrimétrique, on trouve quatre classes de réactions : de neutralisation, de formation de complexes, de précipitation et d'oxydo-réduction. Les trois premières reposent sur la combinaison d'ions tandis que la quatrième implique des changements d'état d'oxydation.

Dans une analyse titrimétrique, une réaction doit remplir les conditions suivantes :

- Simple, exprimée par une réaction chimique (réaction complète dans des proportions stoechiométriques),
- Relativement rapide (ajout possible d'un catalyseur),
- Modification d'une propriété physique ou chimique de la solution au point équivalent,
- Disposition d'un indicateur visuel permettant l'obtention précise du point équivalent (couleur ou formation d'un précipité).

Dans le cas où aucun indicateur n'est disponible, ce point peut être détecté d'autres techniques : titrages potentiométrique, coulométrique ou ampérométrique.

2.3.1. Titration à la burette

La solution étalon est habituellement ajoutée à l'aide d'une burette jusqu'à réaction complète (6). Le point d'équivalence théorique ou stoechiométrique est détecté par un changement physique dû à :

- la solution étalon elle-même,
- à l'addition d'un agent auxiliaire (indicateur),
- ou encore par mesure physique (pH par exemple).

Lorsque la réaction est pratiquement complète, l'indicateur doit permettre d'observer visuellement un changement net (couleur, turbidité). Dans un titrage idéal, ce point d'équivalence apparent doit correspondre au point d'équivalence stoechiométrique. L'indicateur et les conditions expérimentales doivent être choisis de sorte que la différence entre le point de fin de titrage et le point d'équivalence stoechiométrique soit la plus petite possible.

Les réactifs titrés à la burette sont :

- L'édétate de sodium 0,1 M (EDTA),
- Le thiosulfate de sodium 0,1 M,
- Le chlorure de benzéthonium 0,004 M.

2.3.2. Titration potentiométrique

Dans un titrage potentiométrique, on mesure le potentiel d'une électrode indicatrice en fonction du volume ajouté d'un réactif titrant(6). Le point d'équivalence de la réaction peut être détecté par un changement brutal des valeurs de la force électromotrice en fonction du

volume de la solution titrante. L'une des deux électrodes doit garder un potentiel fixe ; la seconde, qui indique les changements de concentration ionique, doit répondre rapidement. La solution de l'analyte doit être agitée pendant toute la durée du titrage.

De façon générale, le point de fin de titrage peut être facilement obtenu en examinant la courbe de titrage, ainsi que celles des dérivés primaire et seconde qui en sont déduites. Une courbe de titrage a généralement la même forme qu'une courbe de neutralisation d'un acide : en forme de S. Le point d'équivalence ou point de fin de titrage correspond au point d'inflexion de la courbe.

Les potentiomètres déterminent le point d'équivalence en suivant la variation soit de la dérivée première (dE/dV en fonction de V) soit de la dérivée seconde (d^2E/dV^2 en fonction de V) (15, 28). Si on trace les courbes de ces dérivées, celle de dE/dV présente un maximum au point d'inflexion de la courbe de titrage ; et d^2E/dV^2 est égale à zéro.

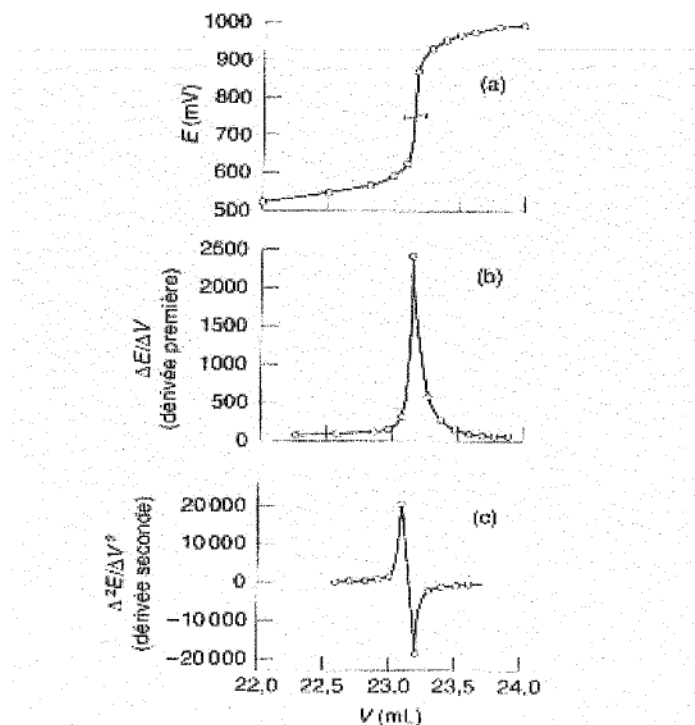


Figure 8 - Titrage potentiométrique – localisation des points de fin de titrage (d'après Analyse Chimique Quantitative de Vogel, 346)

Les réactifs titrés par potentiométrie sont :

- Acide chlorhydrique 0,1 M,
- Hydroxyde de sodium ou soude 0,1 M,
- Nitrate d'argent 0,1 M,
- Nitrate mercurique 0,1 M,
- Acide perchlorique 0,1 M.

Au laboratoire, les titrateurs (titrateurs potentiométriques Titrand (Metrohm)) déterminent automatiquement les volumes à délivrer lors du titrage. Ils fonctionnent en mode dynamique : l'incrément de volume dépend de la pente de la courbe. Des incréments relativement grands sont distribués dans la partie plate de la courbe. Dans la région du point équivalent, ils sont plus petits. L'évaluation du point équivalent est basée sur le passage par zéro de la dérivée seconde.

NB : impossibilité d'utiliser le même appareil durant toute l'étude : indisponibilité ou panne

2.4. Expérimentation

2.4.1. Titrage par dosage à la burette

Les méthodes employées sont celles décrites dans la Pharmacopée Européenne (16, 27) .

❖ **Edétate de sodium 0,1 M ou acide éthylènediaminetétraacétique:**

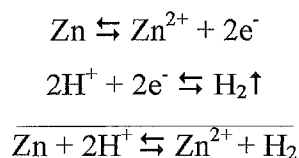
Le dosage est une réaction de formation de complexe (5, 6). Il comporte la préparation de la solution étalon de zinc puis le dosage complexométrique du zinc par l'EDTA 0,1 M permettant de déterminer le titre de ce dernier.

○ **Préparation de la solution étalon :**

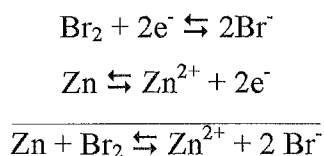
« Dissolvez 0,120 g de *zinc RV* dans 4 ml d'*acide chlorhydrique R1* et ajoutez 0,1 ml d'*eau de brome R*. Éliminez l'excès de brome par ébullition. Ajoutez de la *solution diluée*

d'hydroxyde de sodium R jusqu'à réaction faiblement acide ou neutre et effectuez le dosage du zinc par complexométrie (2.5.11). »

Le zinc est mis en contact avec de l'acide pour passer de la forme métallique Zn à la forme ionique Zn^{2+} :



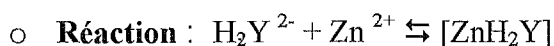
Pour être sûr que le zinc soit sous forme ionique (Zn^{2+}), il est mis en contact avec de l'eau de brome (Br_2). Ainsi, tout le zinc oxydé peut réagir avec l'EDTA :



○ **Dosage complexométrique du zinc :**

« Dans une fiole conique de 500 ml, introduisez la solution prescrite et complétez à 200 ml avec de l'eau R. Ajoutez 50 mg environ de *mélange composé au xylénolorange R* et de *l'hexaméthylènetétramine R* jusqu'à coloration rose-violet. Ajouter 2 g d'*hexaméthylènetétramine R* en excès. Titrez par *l'édédate de sodium 0,1 M* jusqu'à virage du rose-violet au jaune. »

Le mélange composé au méthylorange est composé d'une partie de xylénolorange R avec 99 parties de nitrate de potassium R. Le xylénolorange est violet en présence d'un cation métallique M^{2+} et jaune lorsqu'il est libre à pH voisin de 5. L'hexaméthylènetétramine ou hexamine permet de se positionner à un pH supérieur à 5 afin qu'elle se combine avec les ions Zn^{2+} et ainsi avoir une solution rouge-violet. Lors de l'addition d'EDTA (H_2Y^{2-}), les Zn^{2+} se dissocient du xylénolorange, la solution devient jaune.



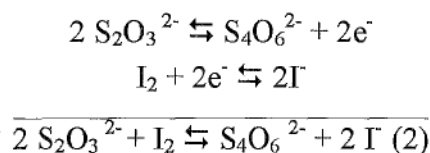
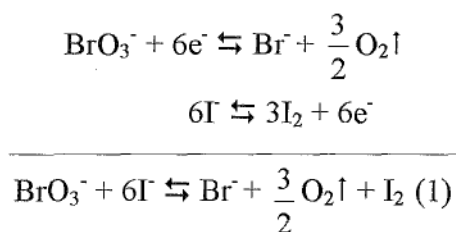
- **Calcul du titre** : la Pharmacopée Européenne indique que 1 ml d'édétate de sodium 0,1 M correspond à 6,54 mg de Zn.

❖ **Thiosulfate de sodium 0,1 M :**

- « Prélevez 10,0 ml de *bromate de potassium 0,033 M* (KBrO₃), ajoutez 40 ml d'eau R, 10 ml de solution d'*iodure de potassium R* (KI) et 5 ml d'*acide chlorhydrique R1*. Titrez par la solution de thiosulfate de sodium en présence de 1 ml de *solution d'amidon R* ajouté en fin de titrage. »

Il s'agit d'une réaction d'oxydo-réduction entre le diiode (I₂) et l'ion thiosulfate (S₂O₄²⁻). Cette réaction comporte deux étapes : d'abord la formation de I₂ (1) puis la réduction des ions S₂O₄²⁻ par I₂ (2).

- **Réaction :**



- **Calcul du titre** : la Pharmacopée Européenne ne donne aucune indication.

Au laboratoire, nous utilisons la démarche suivante :

- 1) Titre exact de la solution de bromate de potassium 0,033M : $t_{\text{Br}} = \frac{\text{pe (g pour 1L)}}{167}$
- 2) Titre de la solution de thiosulfate de sodium 0,1 M : $t = t_{\text{Br}} \times 60 / (V(\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3) \times 0,1)$

❖ Chlorure de benzéthonium 0,004 M

- Le chlorure de benzéthonium a été titré selon la Pharmacopée Européenne le jour de sa fabrication (t_0):

« Calculez la molarité de la solution en tenant compte de la teneur en $C_{27}H_{42}ClNO_2$ du chlorure de benzéthonium desséché, déterminée comme suit : dissolvez 0,350 g de la substance desséchée dans 30 ml d'*acide acétique anhydre R* et ajoutez 6 ml de *solution d'acétate mercurique R*. Titrez par l'*acide perchlorique 0,1 M* en présence de 0,05 ml de *solution de violet cristallisé R*. Effectuez un titrage à blanc. »

Le chlorure de benzéthonium est un tensio-actif sous forme d'ammonium quaternaire. Pour des raisons pratiques, il sera noté $[XN^+]Cl^-$.

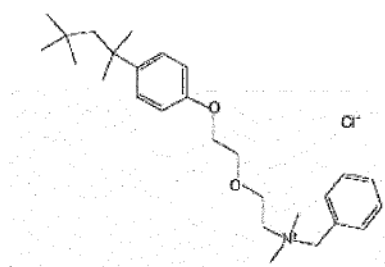
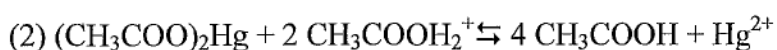
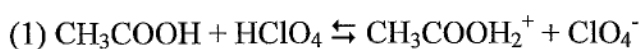
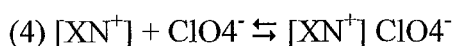
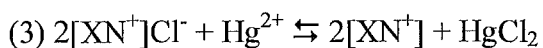


Figure 9 - Formule développée du chlorure de benzéthonium (21)

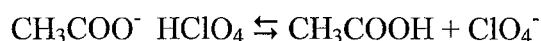
○ Réaction :

C'est une réaction de neutralisation en milieux non aqueux. L'acide acétique est un solvant amphiprotique. Il combine les propriétés protogènes et protophiles. En présence d'acide perchlorique, acide beaucoup plus fort, il accepte un proton (1) qu'il cède facilement à l'acétate mercurique (2). Ainsi les ions mercuriques (Hg^{2+}) sont libérés, et peuvent se combiner avec les ions chlorures (Cl^-) du chlorure de benzéthonium (3). Et l'ion perchlorate se lie au benzéthonium (4).





Le milieu est plus acide, et à l'équivalence, il atteint la zone de virage du cristal violet (0 à 1,6) qui passe du bleu-violet au jaune. Le titrage à blanc permet de connaître le volume d'acide perchlorique nécessaire à la neutralisation de la solution d'acétate mercurique. En effet, cette solution peut amener des ions acétate libres et des ions hydrogènes, et ainsi fausser le dosage. Ainsi, la réaction de neutralisation est la suivante :



- **Calcul du titre à t_0** : la Pharmacopée Européenne indique qu'1 ml d'acide perchlorique 0,1 M correspond à 44,81 mg de $\text{C}_{27}\text{H}_{42}\text{ClNO}_2$.

1. Calcul de la teneur en $\text{C}_{27}\text{H}_{42}\text{ClNO}_2$ du chlorure de benzéthonium desséché :

$$r = \frac{448,1 \times t \times (v - v_0) \times 100}{pe}$$

avec

- r : pureté exprimée en %
- t : titre de l'acide perchlorique (M)
- v : volume d'acide perchlorique utilisé pour le dosage (ml)
- v_0 : volume d'acide perchlorique utilisé pour le titrage du blanc (ml)
- pe : prise d'essai de la substance desséchée pour le dosage (mg)

2. Détermination du titre de la solution :

$$\text{Titre} = \frac{m \times r}{448,1 \times 100}$$

avec

- m : prise d'essai exprimé en g
- r : taux de pureté (%)

Puis, il a été titré à $t_0 + x$ jours en utilisant la méthode de dosage du laurylsulfate de sodium décrite dans la Pharmacopée Européenne (16,27) :

« Dissolvez 1,15 g de *laurilsulfate de sodium* dans de l'eau R, en chauffant si nécessaire, et complétez à 1000,0 ml avec le même solvant. Prélevez 20,0 ml de solution, puis ajoutez 15 ml de *chloroforme R* et 10 ml d'*indicateur mixte au bromure de dimidium-bleu sulfan R*. Titrez par le *chlorure de benzéthonium 0,004 M*, en agitant énergiquement et en laissant les phases se séparer avant chaque addition, jusqu'à disparition de la coloration de la phase chloroformique et apparition d'une coloration bleu-gris. »

○ **Réaction :**


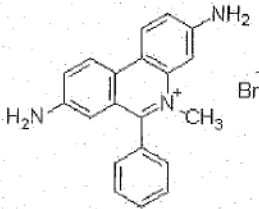
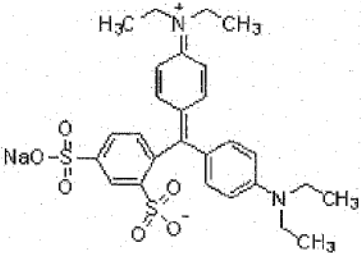
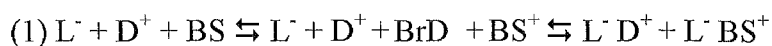
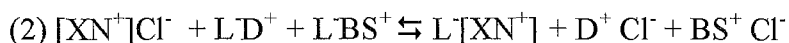
| Noms des réactifs et notation entre parenthèses | Formules développées |
|--|--|
| Laurylsulfate de sodium (LNa) |  |
| Bromure de dimidium (BrD) : rouge en solution |  |
| Bleu Sulfan (BS) : bleu en solution, jaune en milieu acide |  |

Tableau V - Formules développées et notations des réactifs utilisés pour le titrage du chlorure de benzéthonium 0,004 M (22, 23, 24)

NB : L'indicateur mixte au bromure de dimidium-bleu sulfan est jaune-vert (milieu acide) à cause du bleu sulfan.



Une partie du bromure de dimidium passe dans la phase chloroformique ce qui donne sa couleur rose. En effet, il est en excès par rapport au laurylsulfate de sodium et reste en contact avec les ions bromures (Br^-).



Le chlorure de benzéthonium entre en compétition avec le bromure de dimidium et le bleu sulfan. Il se fixe prioritairement et les deux composants de l'indicateur passe dans la phase chloroformique (neutralisation des charges par les ions bromures et chlorures présents dans la phase aqueuse). De plus, l'ajout de chlorure de benzéthonium alcalinise le milieu et le bleu sulfan prend la couleur bleu lors de son passage dans la phase organique.

Calcul du titre à $t_0 + x$ jours : la Pharmacopée Européenne indique qu'1 ml de chlorure de benzéthonium 0,004 M correspond à 1,154 mg d'alkylsulfates de sodium, calculés en $C_{12}H_{25}NaO_4S$.

On utilise la formule d'équivalence :

$$n_1 = n_2 \leftrightarrow C_1 V_1 = C_2 V_2$$

$$\rightarrow C_1 = \frac{C_2 V_2}{V_1} = \frac{m_2}{M_2 V_1}$$

Avec

- C_1 : titre du chlorure de benzéthonium (M)
- V_1 : volume du chlorure de benzéthonium (ml)
- C_2 : titre de la solution de laurylsulfate de sodium (M)
- V_2 : volume de la solution de laurylsulfate de sodium (ml)
- m_2 : masse de la prise d'essai de laurylsulfate de sodium (mg)
- M_2 : masse molaire de laurylsulfate de sodium ($288,4 \text{ g} \cdot \text{mol}^{-1}$)

Il faut tenir compte du taux de pureté du laurylsulfate de sodium ($t(\text{laurylsulfate})$).

$$\text{Titre (Chlorure de benzéthonium 0,004 M)} = \frac{m_2 (\text{mg})}{288,4 \times V_1 (\text{ml})} \times t(\text{laurylsulfate})$$

2.4.2. Titrage potentiométrique

❖ Acide Chlorhydrique 0,1M (HCl) :

- La méthode employée lors de l'étude est la suivante :

« Dissolvez 100 mg de *carbonate de sodium RV* dans 50 ml d'eau. Titrez par l'acide chlorhydrique 0,1 M. » Il s'agit d'une réaction de neutralisation. On parle aussi d'alcalimétrie, car la substance étalon est basique (inversement, si la substance étalon est acide, il s'agit d'acidimétrie). On utilise une électrode aqueuse.

La réaction chimique mise en jeu est : $2 \text{H}_3\text{O}^+ + \text{CO}_3^{2-} \rightleftharpoons \text{H}_2\text{CO}_3 + \text{H}_2\text{O}$

Et la formule utilisée par le titrateur est : $\text{Titre (HCl 0,1 M)} = \frac{pe(mg)}{5,30 \times V(ml)}$

Avec :

- *pe* : prise d'essai de carbonate de sodium en milligramme (mg)
- *V* : volume d'acide chlorhydrique 0,1 M au point d'équivalence en millilitre (mL)

Cette formule a été élaborée à partir de la Pharmacopée Européenne :

« 1 ml d'*acide chlorhydrique 0,1 M* correspond à 5,30 mg de Na_2CO_3 . »

- La technique de la Pharmacopée Européenne (16, 27) est décrite ci-dessous :

« Déterminez le titre d'après les indications correspondantes de la rubrique *Acide chlorhydrique 1 M*, sur 0,100 g de *carbonate de sodium RV*, dissous dans 20 ml d'*eau R*. »

Dans cette rubrique, nous pouvons lire :

« Détermination du titre. Dissolvez 1,000 g de *carbonate de sodium RV* dans 50 ml d'*eau R*. Ajoutez 0,1 ml de *solution de méthylorange R* et titrez par l'acide chlorhydrique jusqu'au début du virage au rouge-jaune. Chauffez alors à ébullition pendant 2 min. La solution devient jaune. Refroidissez et titrez jusqu'à coloration rouge-jaune. »

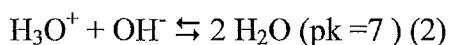
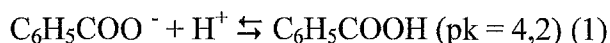
Cette technique n'est pas utilisée. La phase de chauffage est délicate. De plus le titrage potentiométrique est plus simple et plus rapide.

❖ **Hydroxyde de sodium 0,1 M (NaOH)**

○ Technique potentiométrique

« Dissolvez 100 mg d'acide benzoïque dans un mélange de 5 ml d'acide chlorhydrique R1 et de 50 ml d'alcool R. Titrez par l'hydroxyde de sodium.» Ici aussi, il s'agit d'une réaction de neutralisation. Comme la substance étalon est acide, il s'agit d'acidimétrie. On utilise une électrode aqueuse.

○ Réaction :



Il y a donc 2 points équivalents.

Tension (mV)

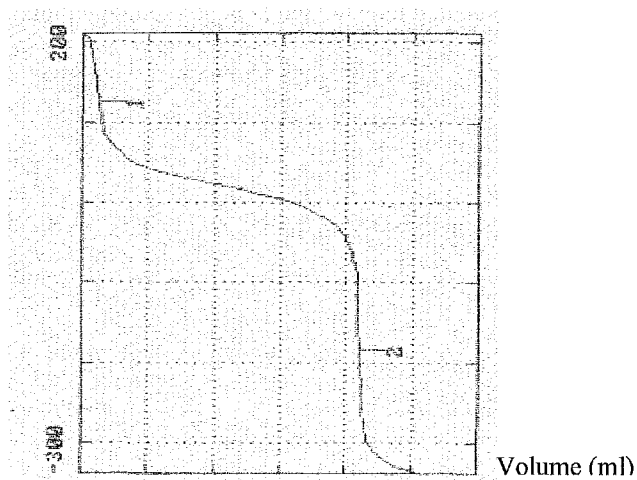


Figure 10 - Courbe potentiométrique du titrage de l'hydroxyde de sodium 0,1 M

○ Calcul du titre :

$$n_1 = n_3 \leftrightarrow C_1(V_1 - V_2) = C_3V_3$$

$$\rightarrow C_1 = \frac{C_3V_3}{(V_1 - V_2)} = \frac{m_3}{M_3(V_1 - V_2)}$$

Avec :

- C_1 : titre de NaOH (mol.L^{-1})
- V_1 : volume de NaOH (L) au premier point d'équivalence
- V_2 : volume de NaOH (L) au deuxième point d'équivalence
- C_3 : titre de la solution d'acide benzoïque (mol.L^{-1})
- V_3 : volume de la solution d'acide benzoïque (L)
- m_3 : masse de la prise d'essai d'acide benzoïque (g)
- M_3 : masse molaire d'acide benzoïque ($122,12 \text{ g.mol}^{-1}$)

○ **Titre (NaOH 0,1 M)** =
$$\frac{pe(mg)}{122,12 \times (V_2 - V_1)(ml)}$$

○ Méthode de la Pharmacopée Européenne:

« Titrez 20,0 ml de la solution d'hydroxyde de sodium par l'acide chlorhydrique 0,1 M. Déterminez le point de fin de titrage par la méthode prescrite dans le dosage où l'hydroxyde de sodium 0,1 M est utilisé. » La potentiométrie permet de s'affranchir des erreurs d'appréciation du virage de l'indicateur par le manipulateur.

❖ **Nitrate d'argent 0,1 M :**

○ La technique employée est une adaptation de celle prescrite dans la Pharmacopée Européenne :

« Dissolvez 100 mg de chlorure de sodium RV dans 80 ml d'eau R. Titrez par la solution de nitrate d'argent 0,1 M. » C'est une réaction de précipitation. On utilise une électrode d'argent.

En effet, dans la Pharmacopée Européenne (16, 27), la technique est la suivante :

« Dissolvez 0,100 g de chlorure de sodium RV dans 30 ml d'eau R. Titrez par la solution de nitrate d'argent et déterminez le point de fin de titrage par potentiométrie (2.2.20).

1 ml de *nitrate d'argent 0,1 M* correspond à 5,844 mg de NaCl. »

- Réaction : $\text{Ag}^+ + \text{Cl}^- \rightleftharpoons \text{AgCl} \downarrow$

La courbe de dosage a l'allure suivante :

Tension (mV)

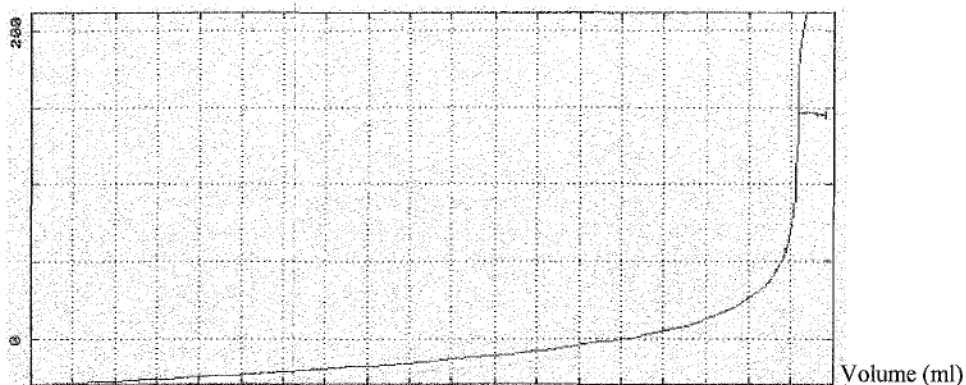


Figure 11 - Courbe potentiométrique du titrage du nitrate d'argent 0,1 M

- Calcul du titre :

On utilise la formule d'équivalence : $n_1 = n_2 \leftrightarrow C_1 V_1 = C_2 V_2$

$$\rightarrow C_1 = \frac{C_2 V_2}{V_1} = \frac{m_2}{M_2 V_1}$$

Avec

- C_1 : titre de AgNO_3 (mol.L^{-1})
- V_1 : volume de AgNO_3 (L)
- C_2 : titre de la solution de NaCl (mol.L^{-1})
- V_2 : volume de la solution de NaCl (L)
- m_2 : masse de la prise d'essai de NaCl (g)
- M_2 : masse molaire de NaCl ($58,44 \text{ g.mol}^{-1}$)

D'où la formule suivante : $\text{Titre } (\text{AgNO}_3 \text{ } 0,1 \text{ M}) = \frac{pe(\text{mg})}{58,44 \times V_1(\text{ml})}$

❖ **Acide perchlorique 0,1 M (HClO₄):**

○ Méthode de la Pharmacopée Européenne :

« Dissolvez 0,350 g de *phtalate acide de potassium RV* dans 50 ml d'*acide acétique anhydre R*, en chauffant légèrement si nécessaire. Laissez refroidir à l'abri de l'air et titrez par la solution d'acide perchlorique en présence de 0,05 ml de *solution de violet cristallisé R*. Notez la température de la solution d'acide perchlorique pendant la détermination du titre. Si la température à laquelle est effectué le dosage diffère de celle à laquelle a été étalonné l'*acide perchlorique 0,1 M*, le volume d'acide utilisé dans le dosage devient :

$$V_c = V[1 + (t_1 - t_2)0,0011]$$

t_1 étant la température lors de l'étalonnage et t_2 la température du dosage ; V_c le volume corrigé et V le volume déterminé au cours du titrage.

1 ml d'*acide perchlorique 0,1 M* correspond à 20,42 mg de C₈H₅KO₄. »

La méthode potentiométrique est plus simple et plus rapide à mettre en œuvre, de plus une hotte et un titrateur sont dédiés à l'utilisation de l'acide perchlorique.

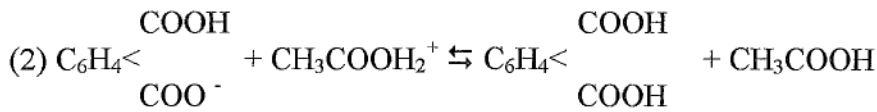
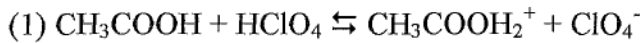
○ Méthode potentiométrique

« Dissolvez 350 mg de phtalate acide de potassium RV (KH(C₈H₄O₄)) dans 50 ml d'acide acétique glacial (CH₃COOH). Titrez par l'acide perchlorique 0,1 M. » On utilise une électrode anhydre.

○ Réaction :

C'est une réaction de neutralisation en milieux non aqueux. L'acide acétique est un solvant amphiprotique. Il combine les propriétés protogènes et protophiles. En présence d'acide perchlorique, acide beaucoup plus fort, il accepte un proton (1) qu'il cède facilement

au phthalate acide de potassium (2). Cette base faible a donc ses propriétés basiques exaltées et peut être dosée par l'acide perchlorique.



- Calcul du titre : nous utilisons la formule d'équivalence : $n_1 = n_2 \Leftrightarrow C_1 V_1 = C_2 V_2$

$$\rightarrow C_1 = \frac{C_2 V_2}{V_1} = \frac{m_2}{M_2 V_1}$$

Avec

- C_1 : titre de HClO_4 (mol.L^{-1})
- V_1 : volume de HClO_4 (L)
- C_2 : titre de la solution de $\text{KH}(\text{C}_8\text{H}_4\text{O}_4)$ (mol.L^{-1})
- V_2 : volume de la solution de $\text{KH}(\text{C}_8\text{H}_4\text{O}_4)$ (L)
- m_2 : masse de la prise d'essai de $\text{KH}(\text{C}_8\text{H}_4\text{O}_4)$ (g)
- M_2 : masse molaire de $\text{KH}(\text{C}_8\text{H}_4\text{O}_4)$ ($204,22 \text{ g.mol}^{-1}$)

D'où la formule suivante : $\text{Titre} (\text{AgNO}_3 \text{ } 0,1 \text{ M}) = \frac{pe(\text{mg})}{204,22 \times V_1(\text{ml})}$

❖ Nitrate mercurique 0,1 M ($\text{Hg}(\text{NO}_3)_2$)

La solution de nitrate mercurique 0,1 M n'est pas répertoriée dans la Pharmacopée Européenne. Le laboratoire utilise une méthode potentiométrique :

« Dissolvez de 100 mg de chlorure de sodium dans 80 ml d'eau. Titrez avec le nitrate mercurique 0,1 M ». On utilise deux électrodes : une électrode de référence et une électrode de platine.

- Réaction : $\text{Hg}^{2+} + 2\text{Cl}^- \rightleftharpoons \text{HgCl}_2$

- o. Calcul du titre : On utilise la formule d'équivalence : $n_1 = \frac{1}{2} n_2 \Leftrightarrow C_1 V_1 = \frac{1}{2} C_2 V_2$

$$\rightarrow C_1 = \frac{C_2 V_2}{2 V_1} = \frac{m_2}{2 M_2 V_1}$$

Avec :

- C_1 : titre de $\text{Hg}(\text{NO}_3)_2$ (mol.L^{-1})
- V_1 : volume de $\text{Hg}(\text{NO}_3)_2$ (L)
- C_2 : titre de la solution de NaCl (mol.L^{-1})
- V_2 : volume de la solution de NaCl (L)
- m_2 : masse de la prise d'essai de NaCl (g)
- M_2 : masse molaire de NaCl ($58,44 \text{ g.mol}^{-1}$)

D'où la formule suivante : Titre ($\text{Hg}(\text{NO}_3)_2$ 0,1 M) = $\frac{pe(mg)}{2 \times 58,44 \times V_1(ml)}$

3. Validation des durées d'utilisation des réactifs non titrés en solution

Les réactifs non titrés sont nombreux et très utilisés dans les différentes monographies de la Pharmacopée Européenne, ainsi que dans les techniques internes au laboratoire. Ce sont les colorants, les indicateurs colorés, les solutions étalons pour essais limites, les révélateurs pour CCM, des acides ou des bases dont il n'est pas nécessaire de connaître le titre exacte et bien d'autres encore. Certains sont dotés d'essai de sensibilités, mais la plupart n'en ont pas.

3.1. Protocole (annexe 3, page 92)

L'étude est réalisée sur les réactifs non titrés en solution utilisés au laboratoire. Les tests de validité sont effectués sur les solutions périmées : étude rétrospective ou sur les solutions en cours d'utilisation : étude prospective sur une durée de trois mois.

Deux cas se présentent :

- Existence de tests de validité dans la Pharmacopée Européenne: « essai de sensibilité »
- Non existence de tests de validité : comparaison des résultats obtenus avec la solution étudiée et une solution nouvellement préparée dans le cadre de la technique, de l'essai où elle est utilisée.

Les solutions sont testées à t_0 , $t_0 + 1$ mois, $t_0 + 2$ mois et $t_0 + 3$ mois. Dans le cas où une solution ne soit pas stable à $t_0 + 1$ mois, une nouvelle solution sera préparée et testée à t_0 , $t_0 + 1$ semaine, $t_0 + 2$ semaines et $t_0 + 3$ semaines.

3.2. Méthodes

Dans un premier temps, l'étude a porté sur les réactifs les plus utilisés et comportant un essai de sensibilité dans la Pharmacopée Européenne (16, 27). Cela correspond à certains colorants et indicateurs colorés :

- Solution de rouge de méthyle (*Zone de virage* : pH 4,4 (rouge) à pH 6,0 (jaune)).
- Solution de rouge de phénol (*Zone de virage* : pH 6,8 (jaune) à pH 8,4 (rouge-violet))

- Solution de vert de bromocrésol et solution de vert de bromocrésol dans l'alcool (*Zone de virage* : pH 3,6 (jaune) à pH 5,2 (bleu))
- Solution de méthylorange (*Zone de virage* : pH 3,0 (rouge) à pH 4,4 (jaune))
- Solution de bleu de bromothymol R1 (*Zone de virage* : pH 5,8 (jaune) à pH 7,4 (bleu))
- Solution de bleu de bromophénol (*Zone de virage* : pH 2,8 (jaune) à pH 4,4 (bleu-violet))
- Solution de phénolphtaléine (*Zone de virage* : pH 8,2 (incolore) à pH 10,0 (rouge))
- Solution de thymolphtaléine (*Zone de virage* : pH 9,3 (incolore) à pH 10,5 (bleu))
- Solution de fuchsine décolorée

Puis, pour augmenter le nombre de réactifs testés, une recherche de produits dont les identifications comportent des réactions colorées a été réalisée :

- Solution de permanganate de potassium (10 g/L)
- Solution diluée d'hydroxyde de sodium R
- Solution de sulfate de cuivre R 10 g/l
- Eau de brome
- Acide sulfurique dilué R
- Solution aqueuse d'hydroxyde de sodium 5% m/v
- Solution de chlorure ferrique 5,2% m/v
- Solution de chlorure de zinc iodée
- Sulfate de cuivre R (125 g/l)
- Nitrate d'argent R2

Les essais de sensibilité et les réactions d'identification utilisés sont précisés en annexe (annexe 4, page 95). Chaque réactif peut être étudié en rétrospectif (réactif périmé mis de côté) ou en prospectif (réactif en cours d'utilisation ou préparé de novo).

RESULTATS

1. Validation des durées d'utilisation des phases mobiles pour HPLC

Je vais développer le cas du dosage de la substance M. C'est un système deux voies.

Voici la composition de la phase mobile associée :

- phase organique (77,5%) : Acétonitrile (PM0001),
- phase aqueuse (22,5%) : tampon pH 7,0 (Eau/Hydrogénophosphate de sodium 12H₂O /Acide phosphorique 5% : PM0002, PM0006 et PM0007).

1.1. Etude analytique

1.1.1. Phase aqueuse : tampon pH 7,0

- **Aspect de la solution**

PM0002, PM0006 et PM0007 sont restées incolores et limpides tout au long de l'étude. Parfois quelques particules ont été observées.

- **pH**

| Jours | PM0002 | PM0006 | PM0007 |
|-----------------------------|--------|--------|--------|
| T ₀ | 7,1 | 7,1 | 7,1 |
| T ₀ + 1 semaine | 7,1 | 7,1 | 7,2 |
| T ₀ + 2 semaines | 7,1 | 7,1 | oubli |
| T ₀ + 3 semaines | 7,1 | 7,1 | 7,1 |
| T _{final} | 7,1 | 7,1 | 7,1 |

Tableau VI - Récapitulatif des mesures de pH pour PM0002, PM0006 et PM0007

Nous n'observons pas de variation supérieure à 0,5 unités pH. Les tampons pH 7 conservent leur pH pendant au moins 4 semaines.

- **Conductivité (σ)**

Afin d'interpréter les mesures de conductivité, nous avons tracé les graphes d'évolution du pH et de la conductivité en fonction du temps car tous deux sont fonction de la concentration en ions du tampon (annexe 5, page 98).

| Jours | PM0002 | | PM0006 | | PM0007 | |
|-----------------------------|----------|----------------|----------|----------------|----------|----------------|
| | σ | $\Delta\sigma$ | σ | $\Delta\sigma$ | σ | $\Delta\sigma$ |
| T ₀ | 0,911 | - | 1,002 | - | 0,926 | - |
| T ₀ + 1 semaine | 0,745 | 0,166 | 0,836 | 0,166 | 0,882 | 0,044 |
| T ₀ + 2 semaines | 0,817 | 0,094 | 0,942 | 0,060 | oubli | - |
| T ₀ + 3 semaines | 0,866 | 0,045 | 0,947 | 0,055 | 0,940 | -0,014 |
| T _{final} | 0,860 | 0,051 | 0,991 | 0,011 | 0,954 | -0,028 |

Tableau VII - Récapitulatif des mesures de conductivité pour PM0002, PM0006 et PM0007

Conductivité et pH peuvent avoir la même allure de courbe (cas de PM0002 et de PM0006). Parfois, leur évolution est inverse (cas de PM0007). Il est donc difficile de conclure sur la conductivité. De plus, la mesure de la conductivité est sujet à caution.

1.1.2. Phase organique : Acétonitrile

- **Aspect de la solution** : PM0001 est restée limpide et incolore.
- **Indice de réfraction (χ)** : La variation de l'indice de réfraction est au maximum de 0,0008 par rapport à la valeur initiale (norme : $\Delta\chi \leq 0,0010$).

| Jours | χ | $\Delta\chi$ |
|-----------------------------|--------|--------------|
| T ₀ | 1,3430 | - |
| T ₀ + 3 jours | 1,3433 | -0,0003 |
| T ₀ + 1 semaine | 1,3425 | 0,0005 |
| T ₀ + 2 semaines | 1,3425 | 0,0005 |
| T ₀ + 3 semaines | 1,3422 | 0,0008 |
| T _{final} | 1,3428 | 0,0002 |

Tableau VIII - Indice de réfraction (χ) et variation ($\Delta\chi$) par rapport à la mesure initiale (T₀)

- **Spectre UV**

Le spectre reste lisse sur toute la durée de l'expérience (annexe 6, page 100), et l'absorbance reste inférieure aux maxima imposés :

| Jours | Absorbance (240 nm) |
|-----------------------------|---------------------|
| T ₀ | 0,0492 |
| T ₀ + 3 jours | 0,0030 |
| T ₀ + 1 semaine | 0,0022 |
| T ₀ + 2 semaines | 0,0049 |
| T ₀ + 3 semaines | 0,0031 |
| T _{final} | 0,0078 |

Tableau IX - Mesures d'absorbance à 240 nm de PM0001

1.2. Dosage HPLC

Il est important de noter qu'il n'a pas été possible d'effectuer les dosages en utilisant un système chromatographique unique (chaîne et colonne). De plus, les standards utilisés comme témoins n'appartiennent pas toujours au même lot pour T_0 et T_{final} . La colonne est de type Spherisorb CN RP, S5, 4.6 x 150 mm.

Ainsi, les conditions de dosage étaient les suivantes :

| Phases | T_0 | | | T_{final} | | |
|-------------------|----------------------|--------|---------|----------------------|--------|---------|
| | Témoin | Chaîne | Colonne | Témoin | Chaîne | Colonne |
| PM0001- PM0002 | D184 Lot 06110528 | 11 | C696 | D184 Lot 07010493 | 13 | C696 |
| PM0001- PM0006 | D184 Lot 07010493 | 11 | C696 | D184 Lot 07010493 | 11 | C716 |
| PM0001- PM0007 | D184 Lot 07010493 | 2 | C696 | D184 Lot 07010493 | 11 | C716 |

Tableau X - Conditions de dosages de M (témoin, chaîne et colonne chromatographique)

Les rapports sur les dosages chromatographiques sont présentés en annexe 7 (page 102). L'évolution des paramètres sélectionnés est résumée ci-dessous :

| Phases | Temps de rétention (minutes) | Aire | Hauteur | Nombre de plateaux théoriques | Facteur de symétrie (N: 0,8-1,5) | Facteur de capacité | R_F | Dosages |
|-------------------|------------------------------|-------------------------|-----------------------|-------------------------------|----------------------------------|---------------------|---------------------|-----------|
| PM0001- PM0002 | 10,3→9,8 ↓ | 364766 → 356468 ↓ | 14470 → 16758 ↑ | 3787 → 6105 ↑ | 1,3→1,5 ↑ | 11,9 →11,3 ↓ | 2717 → 2662 ↓ | conformes |
| PM0001- PM0006 | 12,7→14, 6 ↑ | 368452 → 373643 ↑ | 13926 → 20148 ↑ | 5829 → 14390 ↑ | 1,1→1,2 ≈ | 14,9 → 17,3 ↑ | 2709 → 2812 ↑ | conformes |
| PM0001- PM0007 | 9,3→15,9 ↑ | 355266 → 370967 ↑ | 17819 → 18600 ↑ | 5808 → 14522 ↑ | 1,1→1,2 ≈ | 10,6 → 18,8 ↑ | 2691 → 2768 ↑ | conformes |

Tableau XI - Evolution des paramètres chromatographiques entre T_0 et T_{final}

Avec :

- ↑ : augmentation de la valeur du paramètre
- ↓ : diminution de la valeur du paramètre
- ≈ : équivalent
- les dosages initiaux et terminaux de PM0001-PM0006 et PM0001-PM0007 ont été réalisés avec des colonnes différentes.

Rappelons que la Pharmacopée Européenne ne donne aucune norme sur ces paramètres, sauf pour le facteur de symétrie (0,8-1,5). Les variations des différents paramètres ne peuvent être imputées à l'évolution des phases mobiles. En effet, l'aspect des chromatogrammes à T_0 et T_{final} est semblable. De plus, seules les phases PM0001 et PM0002 ont bénéficié de la même colonne. Dans ce cas, les baisses du facteur de capacité et du temps de rétention montrent plutôt l'usure de la colonne qu'une évolution des phases.

Les facteurs de symétrie sont dans les normes. Les coefficients de variation (CV ou %RSD) des facteurs de réponse (R_f) sont inférieurs à 2%. Donc le recouvrement entre témoins (rapport des R_f) est correct. Les coefficients de variation des R_f de T_0 et T_{final} sont les suivants :

| Phases | CV des R_f (%) |
|---------------|------------------|
| PM0001-PM0002 | 1,3 |
| PM0001-PM0006 | 2,3 |
| PM0001-PM0007 | 1,9 |

Tableau XII - Coefficients de variation des R_f par phase (PM0002, PM0006, PM0007)

Les coefficients de variation des R_f sont calculés à partir des neuf valeurs du dosage initial et des neuf valeurs du dosage final : donc nous utilisons dix-huit valeurs. Ils sont inférieurs ou égaux à 2% (norme interne du laboratoire). Donc les dosages réalisés avec ces phases sont reproductibles.

1.3 Conclusion

Les phases mobiles utilisées dans le dosage HPLC de M peuvent être conservées pendant quatre semaines.

2. Validation des durées d'utilisation des réactifs titrés en solution

Seul le cas du nitrate d'argent 0,1 M est traité. Les résultats numériques sont présentés en annexe (annexe 8, page 106). Ici sont présentées les étapes ayant permis d'aboutir :

- à la non validation de durées d'utilisation,
- et à la réévaluation des titres pour une prolongation de l'utilisation des réactifs titrés selon leur évolution.

2.1 Loi d'évolution du titre

Dans un premier temps, la linéarité de l'évolution des titres est testée. Ainsi, nous traçons les graphes des titres en fonction du temps. Puis nous appliquons une régression linéaire de premier degré en utilisant le logiciel Excel. Cependant, les coefficients de régression sont trop éloignés de 1.

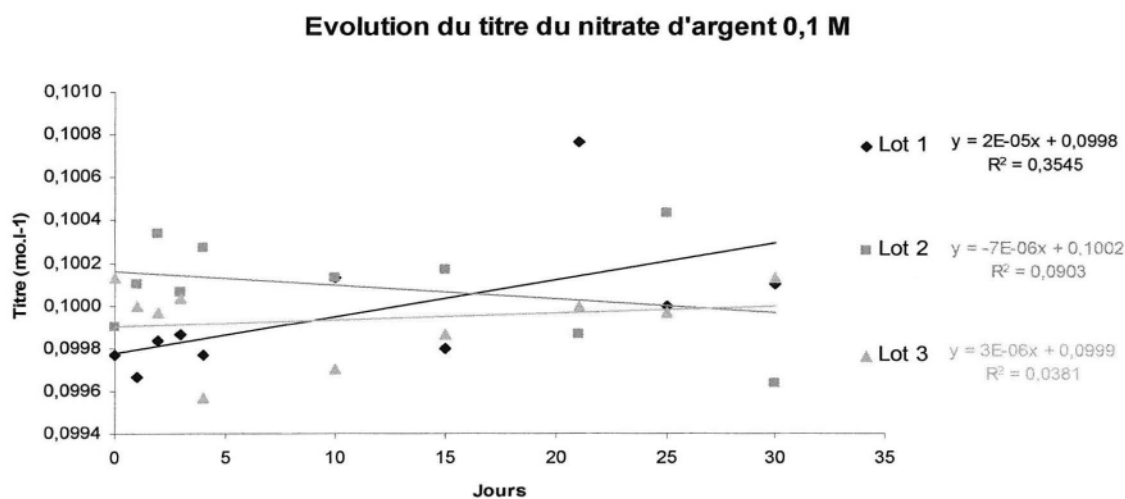


Figure 12 - Graphique de l'évolution du titre du nitrate d'argent 0,1 M

De plus, la recherche de valeur aberrante n'est pas concluante. L'application du test Dixon détecte des valeurs aberrantes ou isolées mais n'a pas permis d'éliminer les valeurs apparaissant visuellement aberrantes. L'application du test de Dixon aux données du Nitrate

d'argent est développée en annexe 9 (page 108) et la table de Dixon se trouve à l'annexe 10 (page 110).

Dans le lot 1, une valeur aberrante a été détectée : 0,1008. Cette valeur est supprimée. Si on refait le test de Dixon, il ne détecte aucune autre valeur aberrante. Voici le nouveau graphique :

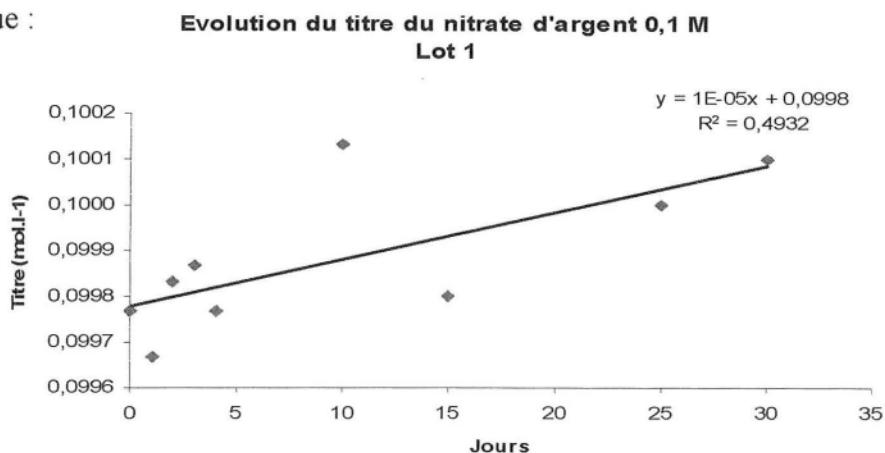


Figure 13 - Graphique de l'évolution du titre du nitrate d'argent 0,1 M sans valeur aberrante

Nous notons une amélioration du coefficient de régression, mais ce n'est toujours pas satisfaisant. De plus, l'allure des graphes des trois lots n'est pas complètement similaire.

L'étude ne permettait pas d'être dans des conditions de répétabilité et de reproductibilité au sens des méthodes de mesure ce qui peut expliquer ces résultats. La détermination du titre moyen sur une journée, par contre, se faisait dans les conditions de répétabilité.

Puis, des régressions polynomiales de degré supérieur (2, 3 et 4) ont été envisagées afin de savoir si l'évolution des titres pouvait être régie par une loi plus complexe. L'exemple du nitrate d'argent 0,1M est décrit en annexe (annexe 11, page 112). Il est apparu qu'un polynôme de quatrième degré était le plus adapté (obtention de coefficient de régression plus proche de 1). Mais ce type d'équation n'est pas aisé à manipuler et l'aspect des courbes peut être complexe.

Dans un deuxième temps, en tenant compte de la procédure spécifique de vérification des réactifs titrés et de l'aspect d'un certain nombre des graphes, les courbes d'évolution des titres sont divisées en deux parties :

- De J0 à J4 (un titre est valable une semaine),
- De J10 à J30.

Après application d'une régression linéaire, des équations plus ou moins satisfaisantes sont obtenues.

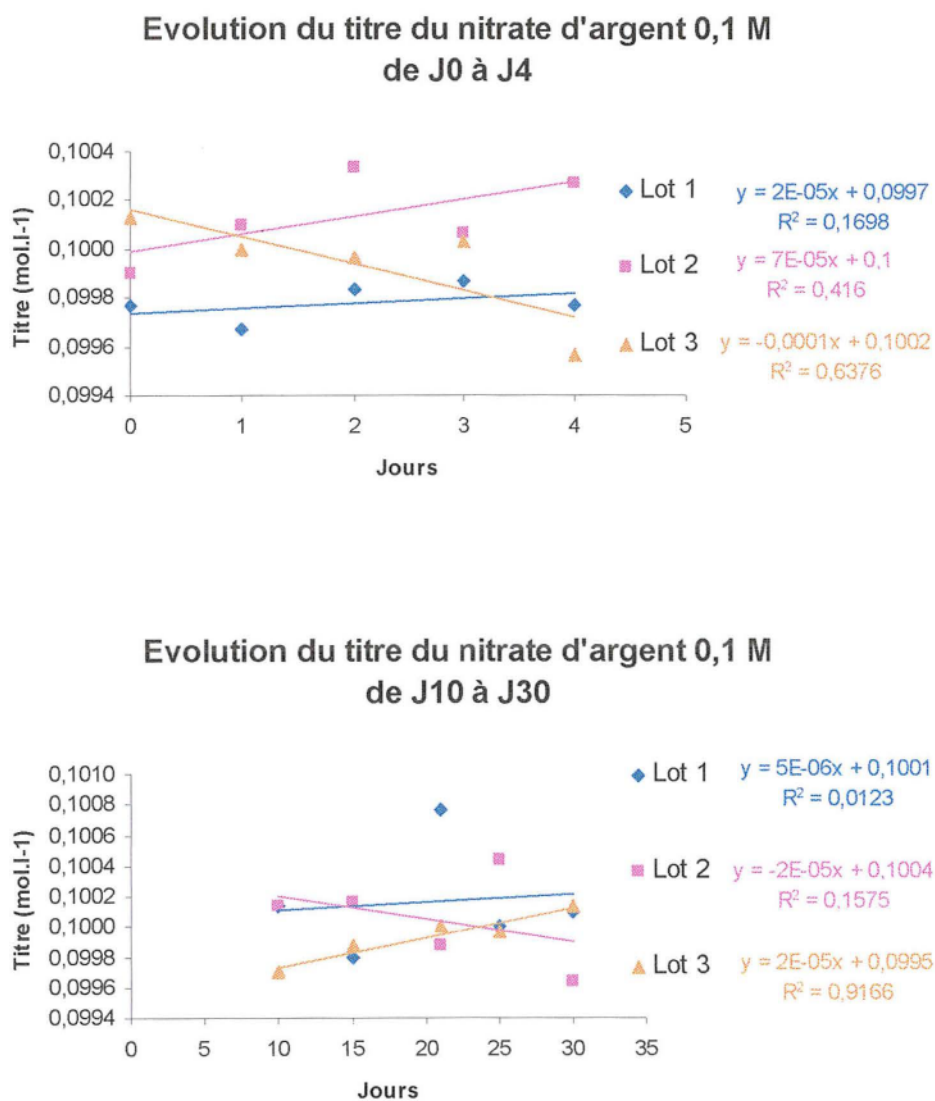


Figure 14 - Evolution du titre du nitrate d'argent 0,1 M de J0 à J4 et de J10 à J30

Cependant, nous n'avons pas obtenu des résultats similaires sur les trois lots de nitrate d'argent. De plus, à partir du dixième jour, l'évolution diverge et les coefficients de régression ne sont plus satisfaisants.

Globalement, pour les autres réactifs titrés, nous avons retrouvé le même type de résultats que ceux du nitrate d'argent. Ainsi, on ne peut pas déterminer des dates de péremption précises. Nous constatons tout de même que les titres sont assez stables la première semaine : les coefficients β des équations obtenues (équation du type : $y = \beta x + \alpha$) sont très faibles (proche de zéro) et les constantes α sont du même ordre (0,1 pour les réactifs de titre 0,1 M).

Cette étude permet de confirmer qu'un titre est stable une semaine ($CV < 2\%$) et qu'il doit être réévalué pour que le réactif soit réutilisé ultérieurement. Il est nécessaire de fixer des limites de variations du titre pour savoir si le réactif considéré est encore valable en tant que réactif titré. Une carte contrôle est le meilleur moyen de suivre l'évolution d'un titre.

2.2. Elaboration d'une carte de contrôle

Une réévaluation du titre à chaque nouvelle semaine d'utilisation est envisagée. Le nouveau titre moyen sera enregistré sur une carte de contrôle. S'il est hors des limites de contrôle, le réactif sera déclassé ou éliminé. Les réactifs rapidement consommés (HCl 0,1M, NaOH 0,1M) ne seront pas concernés.

Cette carte de contrôle doit être simple d'utilisation et les limites de contrôle doivent être déterminées facilement. La carte de SHEWHART (8) est adaptée à la surveillance du titre moyen des réactifs. La détermination des limites de contrôle et le titre moyen correspondant à la ligne centrale se fait à partir :

- de la première estimation du titre pour un réactif préparé,
- du titre indiqué par le fabricant pour les réactifs prêts à l'emploi.

En utilisant les informations fournies par le fabricant (exactitude : 0,2%), j'ai fixé l'estimation s_0 de l'écart-type pour tous les réactifs titrés à 0,0002 M. On considère que lors de la détermination d'un titre par le fabricant ou au laboratoire, la distribution des mesures est normale ou approximativement normale. Les méthodes utilisées ont été validées. De plus, on fixe le nombre de répliques n_0 à 3.

Ainsi, les limites de contrôle sont situées à $\frac{3s_0}{\sqrt{n_0}}$ soit 0,00035 de la ligne centrale.

Pour le nitrate d'argent 0,1 M, le fabricant annonce un titre de 0,1000 M. Les limites de contrôle sont donc :

- Limite de contrôle supérieure : $Lcs = 0,1000 + 0,00035 = 0,10035$
- Limite de contrôle inférieure : $Lci = 0,1000 - 0,00035 = 0,09965$

On obtient la carte suivante :

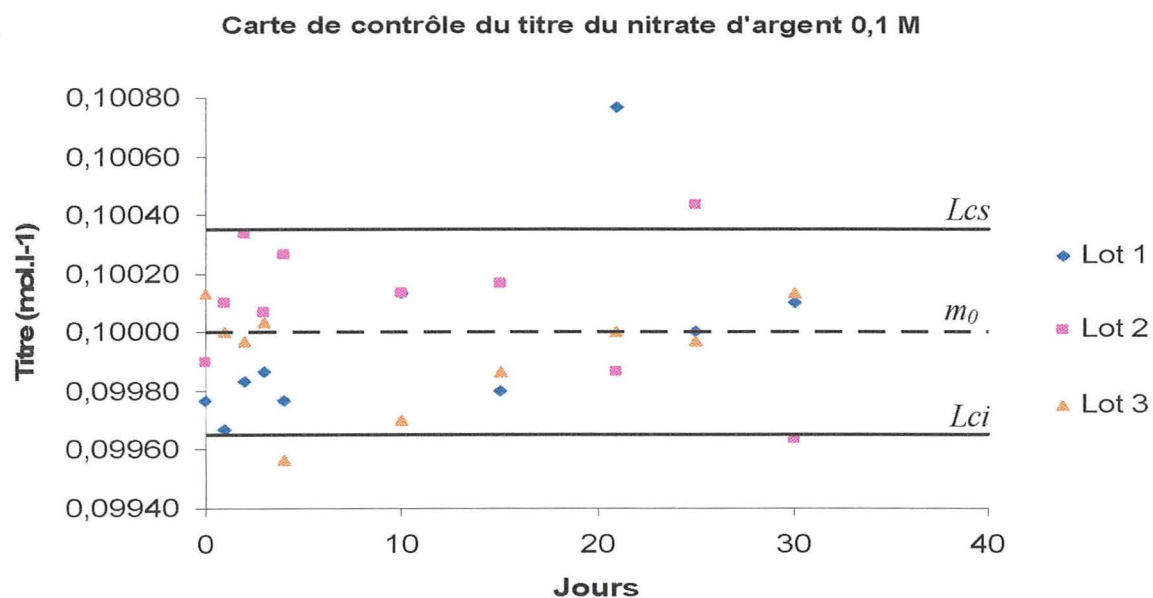


Figure 15 - Carte de contrôle du nitrate d'argent 0,1M : application aux trois lots étudiés.

Nous observons que la plupart des valeurs sont comprises entre les limites de contrôle.

En ne prenant pas compte des mesures de la première semaine, nous constatons que le nitrate

d'argent 0,1 M est utilisable pendant un mois (durée de l'étude), sauf pour le lot 2. Ces résultats confirment les pratiques expérimentales du laboratoire.

2.3. Conclusion

Il n'a pas été réellement possible de déterminer des durées d'utilisation. Nous avons pu confirmer la validité d'un titre pendant une semaine (conformité du coefficient de variation). Un suivi des réactifs titrés est nécessaire à la prolongation de leur utilisation.

3. Validation des durées d'utilisation des réactifs non titrés en solution

Tous les réactifs non titrés testés sont encore valides à trois mois lors de leur contrôle soit par l'intermédiaire des essais de sensibilité, soit par leur utilisation dans des réactions d'identification.

DISCUSSION

Nous constatons que nous ne pouvons pas parler réellement de validation de durée d'utilisation bien que l'étude des réactifs porte sur trois lots. Il s'agit plutôt d'une étude de stabilité mais pas au sens pharmaceutique du terme (durée de l'étude, température, stockage). De plus, il manque un certain nombre de conditions, notamment le contrôle de la température et des conditions de stockage en général.

1. Validation des durées d'utilisation des phases mobiles pour HPLC

On ne peut pas préjuger de la durée d'utilisation d'une phase surtout si c'est une phase aqueuse. Seules les phases organiques ont une stabilité suffisante, et leur validité est bien de quatre semaines. Cette première étude a mis en exergue certains problèmes : l'impossibilité de conserver un même système chromatographique notamment ce qui est préjudiciable au niveau du traitement des résultats.

De plus, elle a permis de sélectionner les paramètres essentiels au suivi des phases mobiles, du point de vue analytique comme du point de vue des dosages HPLC. Quel que soit le type de phases, l'aspect analytique est primordial : c'est lui qui permet de savoir si les phases sont aptes à servir au dosage :

- Pour les phases organiques : ce sont des phases stables dont l'aspect change peu. Elles sont plutôt caractérisées par leur indice de réfraction et par leur spectre UV. La Pharmacopée Européenne insiste sur ces caractères dans leur monographie.
- Pour les phases aqueuses : l'aspect est essentiel, un trouble ou un précipité indique immédiatement que la phase n'est pas utilisable. Le pH varie peu mais il caractérise les tampons et les phases aqueuses dont le pH est précisé dans les techniques. La conductivité est variable selon la température et l'utilisation du conductimètre. Il est

plus important de s'appuyer sur le pH que sur la conductivité. Ce dernier paramètre ne sera pas pris en compte dans les études suivantes.

- Pour les phases constituées : ce sont des mélanges de solutions aqueuses et organiques. Leur aspect peut donc évoluer selon la proportion de chaque solution. Indice de réfraction et spectre UV permettent de suivre les phases organiques. Nogueira et Serôdio (4) se sont attachés à vérifier la composition de la phase.

Lors du dosage HPLC, la qualité de la phase mobile se ressent sur l'aspect du chromatogramme et sur les données quantitatives recueillies. L'influence de la phase se voit surtout au niveau du facteur de symétrie et du facteur de réponse. Les autres paramètres sont essentiellement des indicateurs de l'évolution de la colonne chromatographique utilisée (temps de rétention, nombre de plateaux théoriques, facteur de capacité) et de la durée de vie des détecteurs (aire et hauteur de pics). De plus, certains facteurs dépendent principalement de la prise d'essai (aire et hauteur).

Ainsi, les paramètres à retenir sont :

- **Le facteur de symétrie** qui doit être compris entre 0,8 et 1,5 (Ph. Eur.). C'est un paramètre de rejet. Un pic ayant une traînée trop importante donne un résultat quantitatif surévalué.
- **Le facteur de réponse** qui doit avoir un coefficient de variation (% RSD dans les rapports d'analyse) inférieur ou égal à 2%. Ce facteur s'affranchit de la prise d'essai qui varie d'un témoin à l'autre.

A titre indicatif, il est intéressant de conserver le temps de rétention et le nombre de plateaux théoriques pour suivre l'évolution de la colonne combinée à l'impact de la phase mobile. Il a été difficile de conserver la même colonne.

2. Validation des durées d'utilisation des réactifs titrés en solution

La durée de conservation d'un réactif ouvert est fonction de beaucoup de paramètres dont la plupart ne sont pas contrôlables en laboratoire de routine. Il est difficile dans ce cas d'avoir une répétabilité et une reproductibilité satisfaisante (3,10). Alors, comment déterminer une durée réelle d'utilisation après ouverture et surtout quels outils utilisés alors que nous savons pertinemment que l'évolution d'un produit chimique ou même d'un médicament n'est pas linéaire ? Une solution peut être d'observer à long terme les cartes de contrôle afin de tirer des conclusions plus nettes.

Le protocole employé est similaire à celui de Nogueira et Serôdio (4) : une détermination périodique des titres de chaque solution avec une ouverture des flacons uniquement lors des mesures. La méthode est un peu différente : lors des titrations, trois mesures sont effectuées dans notre cas alors qu'ils réalisent un blanc. La périodicité n'est pas identique : tous les jours la première semaine et tout les cinq jours jusqu'au trentième jour contre une fois par semaine le premier mois et une fois par mois pendant sept mois et demi. La fréquence de détermination des titres est plus proche de la routine dans notre étude.

La règle de décision est moins nette dans notre étude : nous n'avons pas fixé de limite à la déviation du titre : seulement un coefficient de variation maximum de 2 % par rapport à la valeur initiale. Nogueira et Serôdio (4) ont la même règle et suivent l'évolution du coefficient sur une carte de contrôle de Shewart. Dès que la fourchette des $\pm 2\%$ est dépassée, le réactif est considéré non valable. Par contre, Ballerau, Merville, Lafleuriel et Schrive ne se contentent pas de suivre le titre de l'hypochlorite de sodium, ils testent aussi son efficacité (1).

Dans les deux études citées ci-dessus, les conditions de stockage et de température sont strictes. Par contre, ici, nous pouvons évoquer certains biais possibles lors de l'application du protocole ayant rendu plus difficile l'acquisition et le traitement des données :

- Pour certains réactifs (l'acide chlorhydrique en particulier), la substance étalon s'est avérée hygroscopique. Ainsi, une partie des résultats a été surévaluée. Aucune spécification n'est précisée sur cet état de fait dans les techniques du laboratoire. Par contre, les fournisseurs indiquent une phase de séchage avant l'utilisation de ces substances en volumétrie. Notons que la fréquence réelle d'utilisation des substances étalon est moindre que celle de l'étude. Dans la pratique courante, l'hydratation est moins rapide.

- La pesée des prises d'essai était parfois difficile. En effet, les balances mettaient parfois du temps à se stabiliser. Ce problème peut être relié aux problèmes d'humidité à l'intérieur du laboratoire.

- Les conditions de conservation des récipients n'étaient pas strictes, ni contrôlées (conservation des récipients fermés dans un placard sans contrôle de la température, ni de l'humidité).

- Des contaminations peuvent avoir lieu par l'air et la verrerie lors de la détermination des titres.

3. Validation des durées d'utilisation des réactifs non titrés en solution

Le principe de vérification de validité de ce type de réactifs est simple : c'est le principe du tout ou rien. L'essai de sensibilité est positif ou négatif. En cas de négativité, les autres réactifs sont vérifiés à leur tour pour être sûr du résultat.

La difficulté repose sur les réactifs ne possédant pas d'essai de sensibilité à la Pharmacopée Européenne et donc sur le choix de la réaction à mettre en œuvre. Une réaction avec un grand nombre de réactifs et/ou de manipulations est difficilement gérable en cas de négativité du test.

CONCLUSION

THESE SOUTENU PAR : Capucine PLANTE

TITRE : De la difficulté à valider des durées d'utilisation de réactifs en solution

CONCLUSION

Les Laboratoires SOPHARTEX se heurtent à la même difficulté que de nombreux laboratoires pharmaceutiques : démontrer la qualité de leurs contrôles analytiques en prouvant la qualité de leurs réactifs. A la demande de l'AFSSAPS, le laboratoire de contrôle physico-chimique a dû mettre en œuvre des protocoles de validation des réactifs en solution. Trois types de réactifs sont étudiés actuellement : les phases mobiles pour HPLC, les réactifs titrés et les réactifs non titrés.

Nous avons pu définir, si ce n'est une durée d'utilisation, au moins des critères auxquels doivent répondre les réactifs en solution pour être de qualité appropriée :

- Phases aqueuses pour HPLC : aspect et pH,
- Phases organiques et mélanges constitués pour HPLC : aspect, indice de réfraction et spectre UV,
- Réactifs titrés : titre compris dans un intervalle défini,
- Réactifs non titrés : positivité d'un essai de sensibilité ou d'une autre réaction.

Les réactifs non titrés testés ont tous une durée d'utilisation de trois mois. Quant aux phases organiques et mélanges constitués destinés à l'HPLC, ils ont montré une stabilité minimum de quatre semaines. Dans certains cas, nous n'avons pas abouti à la détermination formelle d'une durée d'utilisation :

- Cas des réactifs titrés : leur évolution post ouverture ou post préparation n'est pas linéaire. Nous ne pouvons que surveiller leur titre régulièrement et les déclasser lorsque celui-ci est hors des limites fixées.
- Cas des phases aqueuses pour HPLC : nous avons constaté une instabilité pour certaines phases. De telles phases sont donc à utiliser extemporanément.

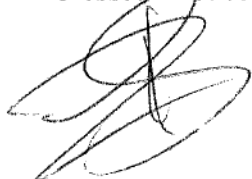
A terme, ces validations seront appliquées à tous les réactifs. Elles mettront en avant l'importance des conditions de stockage et d'utilisation des réactifs en routine pour obtenir des délais d'utilisation compatibles avec les pratiques du laboratoire.

VU ET PERMIS D'IMPRIMER

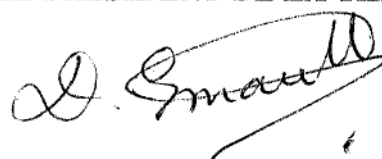
Grenoble, le 23/11/2007

LE DOYEN

Professeur Renée GRILLOT



LE PRESIDENT DE LA THESE



BIBLIOGRAPHIE

Articles

1. Ballereau F., Merville C., Lafleuriel M.T., Schrive I., Stabilité et efficacité antimicrobienne de l'eau de Javel en milieu hospitalier tropical, Bull. Soc. pathol. exot., 1997, **90**, 192-195
2. de Giorgi I., Date de péremption et stabilité des médicaments, Pharma-Flash, 2003, **30**, 21-24
3. Hubert P., Nguyen-Huu JJ, Boulanger B. et al, Validation des procédures analytiques quantitatives, Harmonisation des démarches, STP Pharma Pratiques, 2003, **13**, 101-137
4. Nogueira J. M. F., Serôdio P., Determination of the expiration date of chemical solutions, Accred Qual Assur, 2003, **8**, 231-234

Ouvrages

5. Charlot G., Les méthodes de la chimie analytique, Analyse quantitative minérale, 4^{ème} édition, Masson, 1961
6. Mendham J., Denney R.C., Barnes J.D., Thomas M., Analyse quantitative de Vogel, 6^{ème} édition, De Boeck, Bruxelles, 2006
7. Rosset, Caude, Jardy, Manuel pratique de chromatographie en phase liquide, 2^{ème} édition, Masson, 1990
8. Villemain D., Méthodes statistiques pour le contrôle qualité, 2006, cours de master Contrôle Qualité, Assurance Qualité, Méthodes de Validation de la Faculté de Pharmacie de Grenoble

Anonymes

9. Bulletin Officiel n° 2007/1bis, Bonnes Pratiques de Fabrication, NOR : SANM06250065, 2006
10. CITAC/EURACHEM, Guide to Quality in Analytical Chemistry, 2002
11. Fascicule spécial n° 2000-5 bis, Bonnes Pratiques de Laboratoire, NOR : MESP0020869A, 2000
12. ICH Harmonized Tripartite Guideline, Stability Testing of New Drug Substances and Products Q1A (R2), 2003
13. ICH Harmonized Tripartite Guideline, Evaluation for Stability Data Q1E, 2003
14. ICH Harmonized Tripartite Guideline, Validation of Analytical Procedures Q2 (R1), 2005
15. Pharmacopée Européenne, 5^{ème} Edition, Direction de la Qualité du Médicament du Conseil de l'Europe, Strasbourg, 2004, Tome 1
16. Metrohm, Mode d'emploi Titrimo DMS 716
17. Sciences mathématiques, physiques et chimiques, Tome 2, Editions Groupe Liaisons, 2^{ème} édition, Rueil-Malmaison, 2000

Sites internet consultés entre juin et août 2007 :

18. Waters web site - URL:

<http://www.waters.com/WatersDivision/ContentD.asp?watersit=JDRS-6UXGYA&WT.svl=1>
- août 2007

19. http://perso.orange.fr/physique.chimie/1S_Chimie/1_S_Chimie_5_DETERMINATION_DES_QUANTITES_DE_MATIERE.htm – août 2007
20. Radiometer analytical web site -URL :
http://www.radiometer-analytical.com/fr_meterlab_electrodes.asp - août 2007
21. http://www.educnet.education.fr/rnchimie/bts_c/annales/04/tp2-04.pdf - août 2007
22. <http://www.ac-nancy-metz.fr/enseign/physique/labos/doc/indicateurs/indicateurs.htm> - août 2007
23. <http://www.ilo.org/public/french/protection/safework/cis/products/encyclo/pdf/vol4/4104chnf.pdf> – août 2007
24. http://fr.wikipedia.org/wiki/Laurylsulfate_de_sodium - août 2007
25. http://www.er.uqam.ca/nobel/c2002/Protocoles/Sel/Protocole_Sel.htm - août 2007
26. <http://www.refractometre.com/fr/savoir.htm> - août 2007
27. European Pharmacopia web site – URL :
<http://www.pheur.org> – août 2007
28. Metrohm web site – URL :
<http://www.metrohm.com> – août 2007
29. freephysique.free.fr/cours%206.html – octobre 2007
30. Inorganic Ventures web site – URL :
<http://www.inorganicventures.com/tech/articles/consumer/shelf-exp.asp>
31. Hach web site – URL :
http://www.hach.com/hc/view.knowledge.base.detail.invoker/PackagingCode=GENERAL-REAG_2/NewLinkLabel=Shelf+life+of+reagents – octobre 2007

ANNEXES

LISTE DES ANNEXES

Annexe 1 : Protocole de validation des durées d'utilisation des phases mobiles pour HPLC

Annexe 2 : Protocole de validation des durées d'utilisation des réactifs titrés en solution

Annexe 3 : Protocole de validation des durées d'utilisation des réactifs non titrés en solution

Annexe 4 : Essais de sensibilité et réactions d'identification utilisés pour valider les durées d'utilisation des réactifs non titrés en solution

Annexe 5 : Graphes du pH et de la conductivité de PM0002, PM0006, PM0007 en fonction du temps

Annexe 6 : Spectres UV de la phase PM0001 (acétonitrile) utilisée dans le dosage HPLC de M

Annexe 7 : Rapports des dosages HPLC de M à T_0 et T_{final}

Annexe 8 : Résultats bruts des réactifs titrés en solution

Annexe 9 : Recherche des valeurs aberrantes par le test de Dixon sur les trois lots de nitrate d'argent 0,1 M

Annexe 10 : Table de Dixon

Annexe 11 : Exemple de régressions polynomiales de degré 2, 3 et 4 appliquées au nitrate d'argent 0,1 M.

ANNEXE 1
PROTOCOLE DE VALIDATION DES DUREES
D'UTILISATION DES PHASES MOBILES POUR HPLC

PROCOLE DE VALIDATION DES DATES DE PEREMPTION des PHASES MOBILES pour HPLC

Laboratoire de contrôle

Page : 1 de 3

PROCOLE FVL-001-V1

EDITION N° 1 du 16.10.2006

Rédigé par : C. CLARIC
(Responsable laboratoire)

L. COMBE
(Assistante technique)

Approuvé par : L. LAURIAC
(Adjoint Assurance Qualité)

1. OBJET DE LA VALIDATION :

Valider la durée d'utilisation des phases mobiles pour HPLC.

2. DOMAINE D'APPLICATION DE LA VALIDATION :

Cette validation doit être effectuée à terme sur toutes les phases mobiles utilisées au laboratoire en commençant par celles qui servent aux produits les plus courants.

3. RESPONSABILITES :

Le Responsable du service contrôle confie le suivi de cette validation à une personne du laboratoire qui veille au bon déroulement de la validation et assure l'archivage des résultats et des données brutes. La personne responsable peut déléguer à un ou plusieurs analystes la totalité ou une partie des tests analytiques.

4. PLAN DE VALIDATION :

L'étude doit être effectuée sur une durée maximale de 6 semaines pour les produits courants et de 2 semaines pour les produits occasionnels.

Etude analytique des phases mobiles

0 Tests requis pour la validation :

L'étude doit porter sur l'observation et le suivi des critères définis dans chacun des cas suivants.

1) Cas des systèmes à deux phases :

La phase aqueuse A est distincte de la phase organique B

a) Phase aqueuse :

- Aspect de la solution ; limpidité et coloration
- pH
- Conductivité

La validation portera sur trois préparations distinctes.

b) Phase organique :

- Aspect de la phase : limpidité et coloration
- Indice de réfraction
- Spectre UV (200 à 360 nm)

Dates de péremption des phases mobiles pour HPLC

FVL-001-V1

Rédigé par C. CLARIC

Page 2/3

5. Spectre UV (N° Norm. 2.2.25)

5.1. Cas des milieux colorés

Traiter la solution de 100 à 150 ml de solution filtrée et clarifiée à 0,2 µm et en solution UV (2) comme le mode de référence. La courbe d'absorbance est lue.

- Mesure : 200 nm à 240 nm (pas de 20 nm)
- Méthode : absorbance de 10 à 200 cm (pas de 20)
- Métrage : absorbance de 0,05 à 0,100 (pas de 0,01)

5.2. Cas des milieux incolores

Placer le spectre de 200 à 240 nm en solution filtrée et clarifiée à 0,2 µm et en solution UV (2) comme le mode de référence. Les 2 absorbances mesurées à 200 nm et 240 nm ne doivent pas être supérieures à 0,05 à cette température sur le même volume à TO.

6. Dosage HPLC

Les paramètres chromatographiques (temps de rétention, facteurs de réponse, facteurs de symétrie, purités de référence) seront respectés. Les conditions de mesure de la phase mobile de la phase mobile (viscosité, viscosité, viscosité, viscosité) valent. Les autres sont les paramètres de la phase mobile (viscosité, viscosité, viscosité, viscosité) vus sur les injections.

7.0. Substrat d'absorption

7.1. Cas de la TO

- Cas de la HPLC

- Cas de la TO

Ces courbes ont été effectuées sur les préparations de la phase (ou au plus tard la dernière).

7.2. Cas de la HPLC

- Cas de la TO

- Cas de la HPLC

- Cas de la TO

- Cas de la HPLC

- Cas de la TO

Ces courbes ont été effectuées sur les préparations de la phase (ou au plus tard la dernière).

Lors de la première étude pour chaque sérum étudié, la validation portera sur un seul lot. Pour les études suivantes, il sera fait sur cet même sérum le spectre UV à TO et en solution filtrée.

2. Cas des milieux colorés

- Aspect de la phase : homogénéité en solution
- Indice de réfraction
- Spectre UV (200 à 240 nm)

La validation portera sur trois préparations distinctes.

3. Paramètres des milieux colorés, HPLC, en solution à TO et en solution filtrée

4. Paramètres des milieux incolores

4.1. Aspect de la phase

La homogénéité de la solution ne doit pas évoluer de manière sensible depuis l'observation initiale.

4.2. Coloration (N° Norm. 2.2.21)

La coloration de la solution ne doit pas évoluer de manière sensible depuis l'observation initiale.

4.3. pH (N° Norm. 2.2.21)

La variation observée ne doit pas excéder 0,5 unités de pH par rapport à la valeur mesurée à TO.

4.4. Indice de réfraction (N° Norm. 2.2.21)

L'indice de réfraction est fonction de la température, en raison surtout de la valeur mesurée à 1 °C pour la ramener à sa valeur à 4 °C étant la température de la mesure (réf. 10).

On effectuera pour chaque correction la formule :

$$n_D(T) = n_D(4) + (n_D(4) - n_D(1)) \frac{T - 4}{3}$$

La variation de l'indice ne doit pas excéder ± 0,0005 de la valeur initiale à TO.

4.5. Conductivité (N° Norm. 2.2.21)

Le suivi de la conductivité sera fait à titre indicatif. L'interprétation des résultats se fera en association avec les résultats des autres tests.

12. Aspect documentaire

1) Exécution des numéros de phases
Constituer un tableau comportant les éléments suivants :

- Numéro de la phase : PM400X
- Nom du produit à analyser
- Méthode utilisée au dosage
- Etape de la validation
 - AX : phase expresse
 - BX : phase classique
 - ABX : phase mélange
- Initialité de la phase
- Date de préparation initiale
- N° du cahier
- Nom de la personne qui a effectué la préparation

2) Enregistrement des résultats de phases
Les documents bruts et les résultats obtenus sont enregistrés dans un cahier réservé à la validation.

3) Étiquettes

Les phases mélanges préparées pour la validation ainsi que les sous-phases et les résultats nécessaires à l'étude doivent être étiquetés de manière à être réservés à cet usage.

4) Résultats

Les résultats sont consignés dans un tableau.

ANNEXE 2
PROTOCOLE DE VALIDATION DES DUREES
D'UTILISATION DES REACTIFS TITRES EN SOLUTION

**PROTOCOL DE VALIDATION DES DATES DE PEREMPTIBILITE
DES REACTIFS TITRES**
Laboratoire de contrôle


Page : 1 de 3

PROTOCOL : PVL-003-V1

EDITION N° 1 du 16.02.2007

Rédigé par : C.CLAIRC (Responsable Qualité)

Approuvé par : F. LAFFAY, GOUERIER (Responsable Assurance Qualité)



Mot clé : Réactifs préemptibles réactifs titrés

1. OBJET

Vérifier la durée d'utilisation des réactifs titrés.

2. DOMAINE D'APPLICATION

Cette validation doit être effectuée sur tous les réactifs utilisés dans le laboratoire.

On commencera par les réactifs les plus courants :

- acide chlorhydrique 0,1M
- hydroxyde de sodium 0,1M
- nitrate d'argent 0,1M
- acide perchlorique 0,1M
- édiate de sodium 0,3M
- arséniate de sodium 0,1M
- nitrate mercurique 0,1M

3. RESPONSABILITES

Le responsable du service contrôle veille au suivi de cette validation à l'un(e) analyste du laboratoire qui veille au bon déroulement de cette étude et en assure l'archivage des résultats et des données brutes.

La personne responsable peut déléguer, à un ou plusieurs analystes, la totalité ou une partie des déterminations des titres.

4. PLAN DE VALIDATION

Pour chaque réactif, l'étude sera faite sur une durée de 4 semaines ; on recueillera le maximum d'informations au cours de la 1^{ère} semaine (déterminations quotidiennes).

4.1 Méthodes de détermination

Les réactifs à examiner sont tirés selon les méthodes de la Pharmacopée ou, le cas échéant, selon les méthodes présentées dans des dossiers d'A.M.M. On choisira de préférence la technique (burette ou électrode) en fonction des applications les plus fréquentes du réactif étudié.

4.2 Substances étudiées

Les substances (sels, vitesses) pour la détermination des titres sont de qualité RVV. On utilisera, pour un même réactif, le même lot de substance étant pendant la durée de la validation.

CTM
ex

SYNERLAB

LABORATOIRES SOPHARTEX

4.3. Solutions de colorimétrie

La préparation de la solution de l'auventure du mercure - a 11 s'agit d'un réactif libre du commerce - dans toute à 30, les déterminations seront faites aux jours suivants :

- 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25 et 26 ou aux jours suivants les plus proches de ceux-ci.

4.4. Titration

A chacun des jours J0, effectuer 3 titrations indépendantes. Calculer la valeur moyenne et le coefficient de variation. On observera à chaque échéance les caractères organoleptiques de la solution, en particulier la limpidité et on indiquera toute variation sensible de ce caractère.

5. METHODES DE DETERMINATION

On effectuera la détermination des fibres des réactifs selon les méthodes et avec les agents de titration décrits dans le tableau ci-dessous.

| Réactif titré | Agent de titration | Méthode | Origine |
|---------------------------------|--------------------|---------|---------|
| acide chlorhydrique 0,1M | | | |
| hydroxyde de sodium 0,1M | | | |
| nitrate d'argent 0,1M | | | |
| acide perchlorique 0,1M | | | |
| acétate de sodium 0,1M | | | |
| trinitrofluorure de sodium 0,1M | | | |
| nitrate mercurique 0,1M | | | |

6. RESULTATS

Collecte l'ensemble des résultats dans un tableau. Evaluer CV=0,5% sur 3 mesures. A au cours de la semaine 1 ou 2%

| JOURS | DATE | ESSAI | RESULTAT | MOYENNE | CV |
|-------|------|-------|----------|---------|----|
| M0 | | 1 | | | |
| | | 2 | | | |
| | | 3 | | | |
| J1 | | 1 | | | |
| | | 2 | | | |
| | | 3 | | | |

Dates de péremption des réactifs titrés
 PV1-002-V3
 Révisé par C.CLAIRC

ANNEXE 3
PROTOCOLE DE VALIDATION DES DUREES
D'UTILISATION DES REACTIFS NON TITRES EN SOLUTION

**PROTOCOLE DE VALIDATION DES DATES DE PREEMPTION
des SOLUTIONS DE REACTIFS NON TITRES**

Laboratoire de contrôle

Page : 1 de 4

PROTOCOLE PVL_003-VI

EDITION N° 1 du 21.02.2007

Rédigé par : C. CLAIRIC
(Responsable laboratoire)

Approuvé par : E. LAFAY, GOURNIE
(Responsable Assurance Qualité)




But de la présente procédure : définir les dates

1. **OBJET**
Valider la durée d'utilisation des solutions de réactifs non titrés.
2. **MODE OPERATOIRE**

Cette validation doit être effectuée sur tous les réactifs en solution non titrés utilisés dans le laboratoire.
On validera les durées d'utilisation des solutions disponibles en cours d'utilisation ou des solutions périmées, conservées aux fins de cette étude (validation rétrospective).
On validera enfin les solutions nouvellement préparées (validation prospective) sur une durée de 3 mois maximum.

3. **RESPONSABILITES**

Le responsable du service contrôle assure le suivi de cette validation à l'usage des résultats de l'analyse qui vise à son amélioration et assure l'archivage des résultats et des données brutes.

Le personnel responsable de l'étude peut déléguer, à un ou plusieurs analystes, une ou plusieurs opérations de cette validation. Elle assure la coordination des résultats obtenus par les différents personnels.

4. **PLAN DE VALIDATION**

4.1 Validation rétrospective

- 4.1.1 Solutions concernées
 - les solutions disponibles au laboratoire
 - les solutions périmées conservées pour cette étude

4.1.2 Méthodologie

a) si il existe un rest de validité de la solution, ce test sera pratiqué au temps de l'observation.
b) si il n'existe pas de rest de validité, on comparera les résultats obtenus à partir de la solution étendue aux résultats obtenus avec une solution fraîchement préparée et ceci dans la limite de l'essai où elle est émise utilisée.

4.1.3 Résultats (voir Annexe)

Pour une solution reçue conforme au lot n° 1 :

- si la 3 mois, la durée d'utilisation sera validée à 3 mois.
- si la 1 et 2 mois, on poursuivra l'étude jusqu'à 3 mois minimum.

Pour une solution soumise non-conforme à 1 :

Cette solution sera écartée ou stock utilisable et remplacée par une solution fraîchement préparée sur laquelle on recommencera l'étude pour des temps inférieurs à 1.

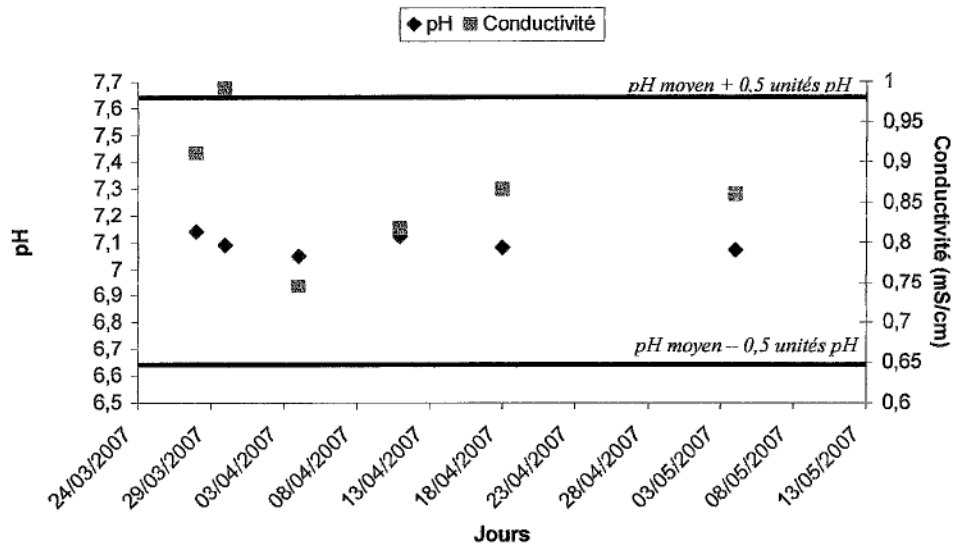
ANNEXE 4
ESSAIS DE SENSIBILITE ET REACTIONS
D'IDENTIFICATION UTILISES POUR VALIDER LES DUREES
D'UTILISATION DES REACTIFS NON TITRES EN SOLUTION

| Réactifs | Essai de sensibilité (Ph Eur 5 ^{ème} édition) |
|--|--|
| Solution de rouge de méthyle | A 0,1 ml de solution de rouge de méthyle, ajoutez 100 ml d' <u>eau exempte de dioxyde de carbone R</u> et 0,05 ml d' <u>acide chlorhydrique 0,02 M</u> . La solution est rouge. Le virage au jaune de l'indicateur ne nécessite pas plus de 0,1 ml d' <u>hydroxyde de sodium 0,02 M</u> . |
| Solution de rouge de phénol | A 0,1 ml de solution de rouge de phénol, ajoutez 100 ml d' <u>eau exempte de dioxyde de carbone R</u> . La solution est jaune. Le virage au rouge-violet de l'indicateur ne nécessite pas plus de 0,1 ml d' <u>hydroxyde de sodium 0,02 M</u> . |
| Solution de vert de bromocrésol et solution de vert de bromocrésol dans l'alcool | A 0,2 ml de solution de vert de bromocrésol, ajoutez 100 ml d' <u>eau exempte de dioxyde de carbone R</u> . La solution est bleue. Le virage au jaune de l'indicateur ne nécessite pas plus de 0,2 ml d' <u>acide chlorhydrique 0,02 M</u> . |
| Solution de méthylorange | Mélangez 0,1 ml de solution de méthylorange et 100 ml d' <u>eau exempte de dioxyde de carbone R</u> . La solution est jaune. Le virage ou rouge de l'indicateur ne nécessite pas plus de 0,1 ml d' <u>acide chlorhydrique 1 M</u> . |
| Solution de bleu de bromothymol R1 | A 0,3 ml de <u>solution de bleu de bromothymol R1</u> , ajoutez 100 ml d' <u>eau exempte de dioxyde de carbone R</u> . La solution est jaune. Le virage au bleu de l'indicateur ne nécessite pas plus de 0,1 ml d' <u>hydroxyde de sodium 0,02 M</u> . |
| Solution de bleu de bromophénol | A 0,05 ml de solution de bleu de bromophénol, ajoutez 20 ml d' <u>eau exempte de dioxyde de carbone R</u> et 0,05 ml d' <u>acide chlorhydrique 0,1 M</u> . La solution est jaune. Le virage au bleu-violet de l'indicateur ne nécessite pas plus de 0,1 ml d' <u>hydroxyde de sodium 0,1 M</u> . |
| Solution de phénolphtaléine | A 0,1 ml de solution de phénolphtaléine, ajoutez 100 ml d' <u>eau exempte de dioxyde de carbone R</u> . La solution est incolore. Le virage au rose de l'indicateur ne nécessite pas plus de 0,2 ml d' <u>hydroxyde de sodium 0,02 M</u> . |
| Solution de thymolphtaléine | A 0,2 ml de solution de thymolphtaléine, ajoutez 100 ml d' <u>eau exempte de dioxyde de carbone R</u> . La solution reste incolore. Le virage au bleu de l'indicateur ne nécessite pas plus de 0,05 ml d' <u>hydroxyde de sodium 0,1 M</u> . |
| Solution de fuchsine décolorée | A 1,0 ml de solution de fuchsine décolorée, ajoutez 1,0 ml d' <u>eau R</u> , 0,1 ml d' <u>alcool exempt d'aldéhyde R</u> , puis 0,2 ml d'une solution contenant 0,1 g/l de formaldéhyde CH ₂ O (M _r 30,0). Il se développe une coloration rose pâle après 5 min. |

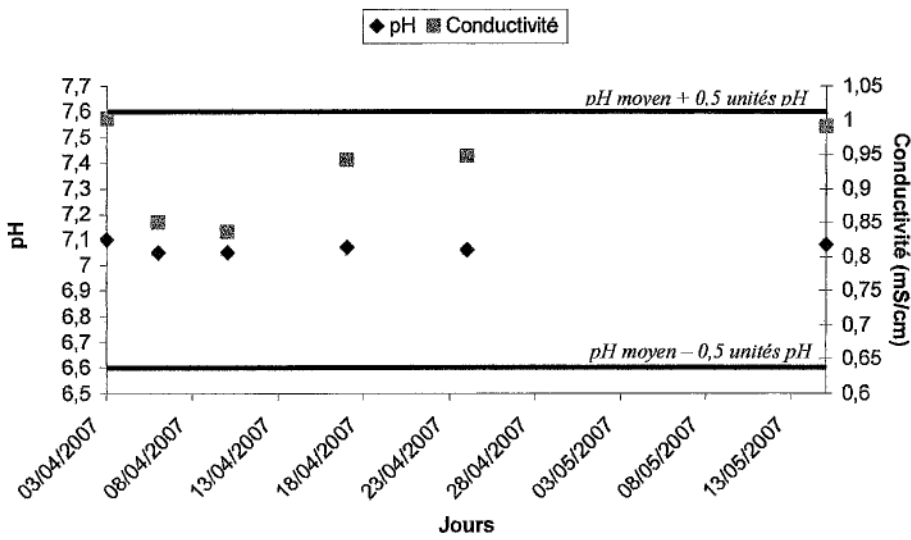
| Réactifs | Réaction utilisé comme essai de sensibilité |
|--|---|
| Solution de permanganate de potassium (10 g/L) | Identification C de l'éthanol à 96% (Ph. Eur 5^{ème} édition) : Dans un tube à essai, mélangez 0,1 ml de substance à examiner et 1 ml d'une solution de permanganate de potassium R à 10 g/L, puis ajoutez 0,2 ml d'acide sulfurique dilué R. Couvrez immédiatement d'un papier filtre humecté d'une solution récemment préparée contenant 0,1 g de nitroprussiate de sodium R et 0,5 g d'hydrate de pipérazine R dans 5 ml d'eau R. Après quelques minutes, il se développe une coloration bleu intense qui pâlit après 10-15 minutes. |
| Solution diluée d'hydroxyde de sodium R | Identification D de l'éthanol à 96% (Ph. Eur 5^{ème} édition) : A 0,5 ml de substance à examiner, ajoutez 5 ml d'eau R, 2 ml de solution diluée d'hydroxyde de sodium R, puis lentement 2 ml d'iode 0,05M. Il se forme un précipité jaune dans les 30 minutes. |
| Solution de sulfate de cuivre R 10 g/l | Identification C du sulfate de polymyxine B (Ph Eur 5^{ème} édition) : Dissolvez environ 2 mg de sulfate de polymyxine B dans 5 ml d'eau R. Ajoutez 5 ml d'une solution d'hydroxyde de sodium R à 100 g/L. Agitez et ajoutez, goutte à goutte, 0,25 ml d'une solution de sulfate de cuivre R à 10 g/L en agitant après chaque addition. Il se développe une coloration rouge-violet. |
| Eau de brome | Identification F de l'alminoprofène : Dissolvez 0,01 g d'alminoprofène dans 5 ml d'éthanol R et ajoutez 4 gouttes d'eau de brome. La solution se décolore immédiatement. |
| Acide sulfurique dilué R | Identification C de l'éthanol à 96% (Ph. Eur 5^{ème} édition) : cf solution de permanganate de potassium R à 10 g/L. |
| Solution aqueuse d'hydroxyde de sodium 5% m/v | Identification A (flavonoïdes) du concentré pour sirop d'orange amère : Prélevez 3 ml de matière première et complétez à 10 ml avec de l'eau. Dans une fraction de 5 ml, ajoutez quelques gouttes d'une solution aqueuse d'hydroxyde de potassium à 5% m/v. Comparez avec l'autre fraction de 5 ml. Une coloration jaune d'or se développe et vire rapidement à l'orange. |
| Solution de chlorure ferrique 5,2% m/v | Identification B (tanins) du concentré pour sirop d'orange amère : Prélevez 3 ml de matière première et complétez à 10 ml avec de l'eau. Ajoutez 1 goutte de solution de chlorure ferrique 5,2% m/v. Il apparaît une coloration brun-noir. |
| Solution de chlorure de zinc iodée | Identification A de la cellulose microcristalline (Ph Eur 5^{ème} édition) : Sur un verre de montre, placez environ 10 mg de cellulose microcristalline et dispersez dans 2 ml de solution de chlorure de zinc iodée R. La substance se colore en bleu-violet. |
| Sulfate de cuivre R (125 g/l) | Identification A du carmellose sodique (Ph Eur 5^{ème} édition) : Identification A : A 10 ml de solution S, ajoutez 1 ml de solution de sulfate de cuivre R. Il se forme un précipité d'aspect cotonneux. Solution S : à 90 ml d'eau exempte de dioxyde de carbone R chauffée à 40-50°C, ajoutez en saupoudrant et sous vive agitation une quantité de carmellose sodique correspondant à 1,0 g de substance desséchée. Continuez à agiter jusqu'à obtention d'une solution colloïdale. Refroidissez puis complétez à 100 ml avec de l'eau R exempte de dioxyde de carbone. |
| Nitrate d'argent R2 | Identification C du gentisate de sodium (Pharmacopée Française X^{ème} édition) : Identification C : Prélevez 1 ml de solution S et complétez à 5 ml avec de l'eau. Ajoutez 1 ml de solution de nitrate d'argent R2. Il se forme un précipité blanc grisâtre virant au gris foncé en même temps que la solution brunit. Solution S : dissolvez 10 g de gentisate de sodium dans de l'eau exempte de dioxyde de carbone R préparée à partir d'eau distille et complétez à 100 ml avec le même solvant. |
| Chlorure ferrique R1 | Identification B du gentisate de sodium (Pharmacopée Française X^{ème} édition) : Prélevez 0,2 ml de solution S et complétez à 10,0 ml avec de l'eau. Ajoutez 0,05 ml de solution de chlorure ferrique R1. Il apparaît une coloration bleu. |

ANNEXE 5
GRAPHES DU PH ET DE LA CONDUCTIVITE DE PM0002,
PM0006, PM0007 EN FONCTION DU TEMPS

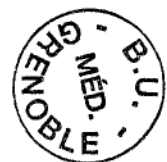
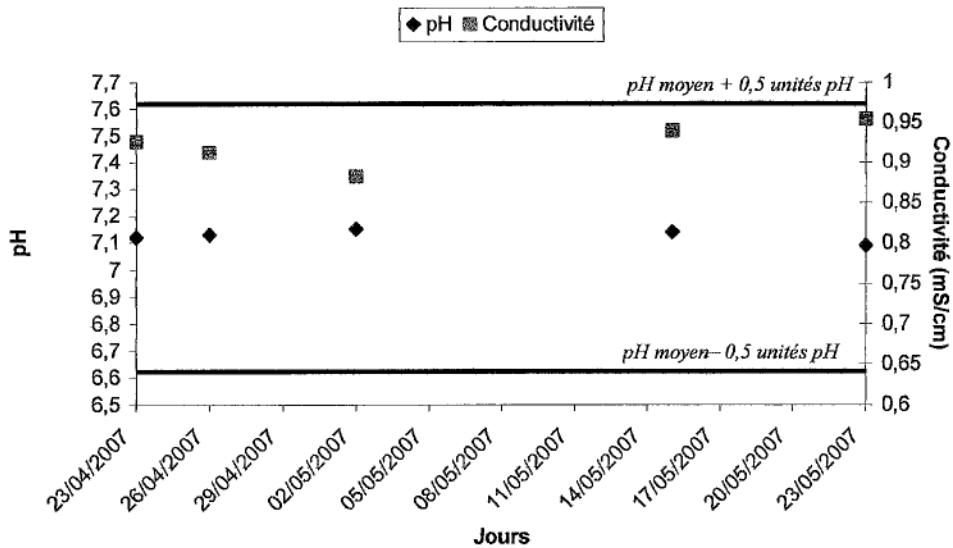
pH et conductivité de PM0002



pH et conductivité de PM0006



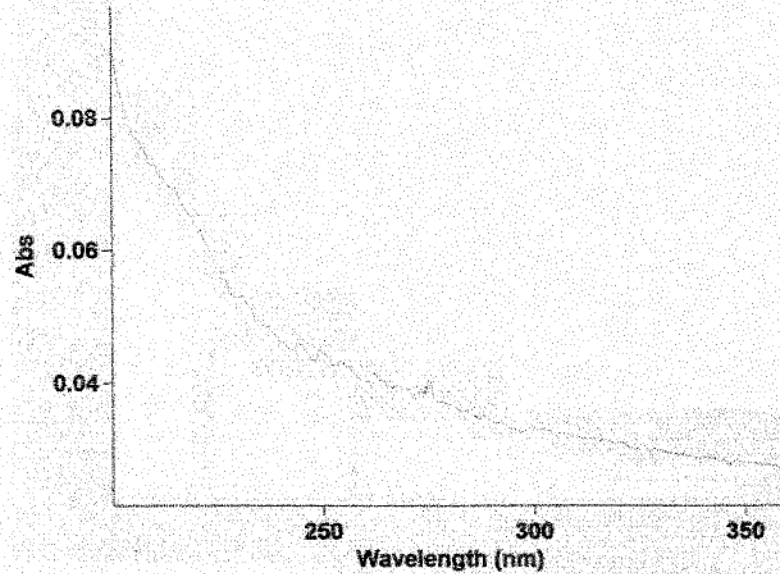
pH et conductivité de PM0007



ANNEXE 6
SPECTRES UV DE LA PHASE PM0001 (ACETONITRILE)
UTILISEE DANS LE DOSAGE HPLC DE M

T₀

SOPHARTEX
Instrument Serial Number EL02085674



Scan Analysis Report

Report Time : Wed 28 Mar 04:58:27 PM 2007
Batch: C:\Varian\Cary Winuv\ADL\PC 28 03 07 PM0001.DSW
Software version: 3.00(182)
Operator: PC28/03/2007

Sample Name: PM0001

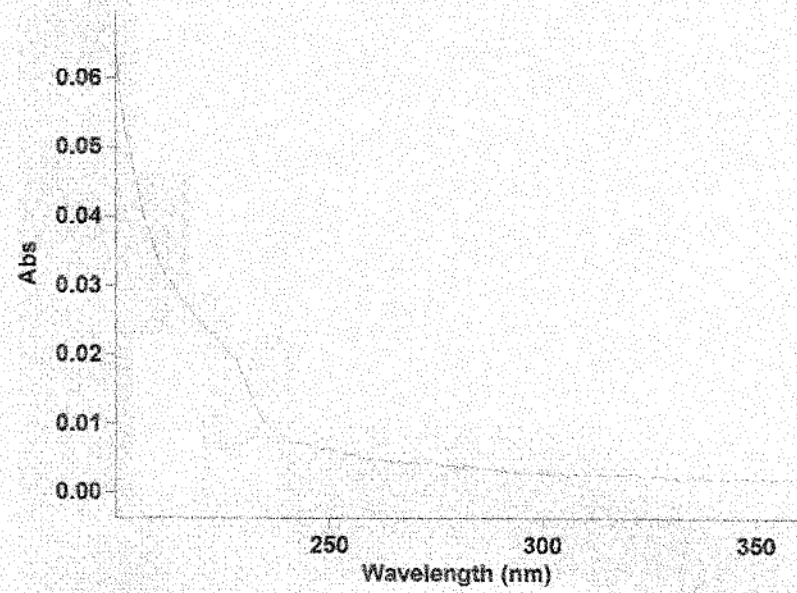
Collection Time 28/03/2007 4:58:36 PM

Peak Table:
Peak Style Peaks
Peak Threshold 0.0100
Range 360.1nm to 200.0nm

No peak found above threshold

T_{final}

SOPHARTEX
Instrument Serial Number EL02085674



Scan Analysis Report

Report Time : Fri 04 May 10:44:19 AM 2007
Batch: C:\Varian\Cary Winuv\ADL\PC 040507 PM0001.DSW
Software version: 3.00(182)
Operator: PC 040507 PM0001

Sample Name: PM0001

Collection Time 4/05/2007 10:44:15 AM

Peak Table:
Peak Style Peaks
Peak Threshold 0.0100
Range 360.1nm to 200.0nm

No peak found above threshold

ANNEXE 7

RAPPORTS DES DOSAGES HPLC DE M A T₀ ET T_{FINAL}



Validation Phases Report

Reported by User: System

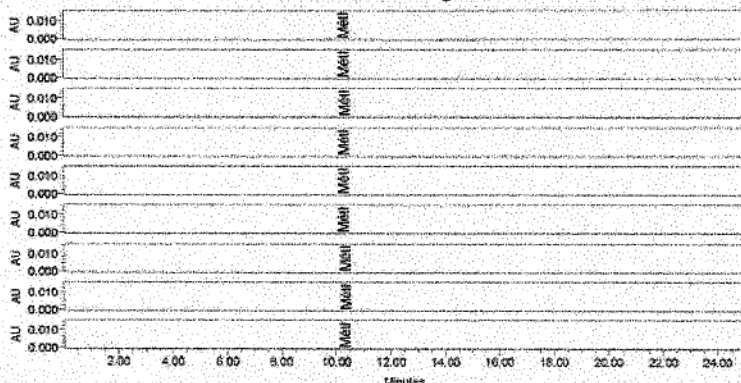
Project Name: M

SAMPLE INFORMATION

Sample Name: Témoin 1, Témoin 2, Témoin 3
 Sample Type: Standard
 Vial: 1, 2, 3
 Injection #: 1, 2, 3
 Injection Volume: 20.00 µl
 Run Time: 25.0 Minutes
 Sample Set Name: M 280307 SR

Acquired By: Labo Contrôle
 Date Acquired: 28/03/2007 14:56:43, 28/03/2007
 Acq. Method Set: Recouvrement T2
 Date Processed: 12/04/2007 16:13:01, 12/04/2007 16:13:02
 Processing Method: m
 Channel Name: 2487Channel 1
 Proc. Chnl. Descr.:

Auto-Scaled Chromatogram



Peak Results

| | Nom du Composé | RT | Aire | Hauteur | PeT | Nombre Plateaux Théoriques | Facteur de Symétrie | K Prime | RF |
|-------|----------------|--------|--------|---------|---------|----------------------------|---------------------|---------|--------|
| 1 | M | 10.280 | 350686 | 14306 | 132.980 | 3746 | 1.3 | 11.3 | 2704.8 |
| 2 | M | 10.236 | 361048 | 14928 | 132.980 | 3735 | 1.3 | 11.3 | 2715.1 |
| 3 | M | 10.300 | 367302 | 14561 | 135.140 | 3782 | 1.3 | 11.3 | 2718.1 |
| 4 | M | 10.301 | 381519 | 14993 | 132.980 | 3788 | 1.3 | 11.3 | 2718.8 |
| 5 | M | 10.303 | 368087 | 14830 | 135.140 | 3841 | 1.3 | 11.3 | 2709.0 |
| 6 | M | 10.330 | 368877 | 14805 | 135.140 | 3783 | 1.3 | 11.3 | 2729.8 |
| 7 | M | 10.345 | 305805 | 14454 | 134.590 | 3782 | 1.3 | 11.3 | 2719.3 |
| 8 | M | 10.353 | 366782 | 14497 | 134.590 | 3824 | 1.3 | 11.3 | 2720.8 |
| 9 | M | 10.391 | 385881 | 14453 | 134.590 | 3820 | 1.3 | 12.0 | 2717.8 |
| % RSD | | 0.3 | | | | | | | 0.3 |
| Mean | | 10.320 | | | | | | | 2717.6 |

Report Method: Validation Phases

Printed 18:28:00 10/05/2007

Page: 1 of 1



Validation Phases Report

Reported by User: System

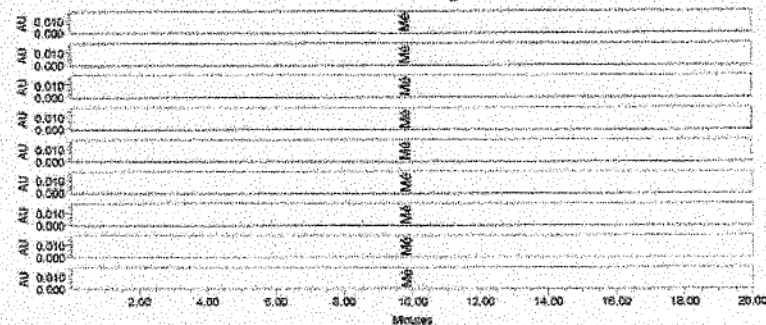
Project Name: M

SAMPLE INFORMATION

Sample Name: Témoin 1, Témoin 2, Témoin 3
 Sample Type: Standard
 Vial: 1, 2, 3
 Injection #: 1, 2, 3
 Injection Volume: 20.00 µl
 Run Time: 20.0 Minutes
 Sample Set Name: M VF 040507

Acquired By: Labo contrôle
 Date Acquired: 04/05/2007 17:29:25, 04/05/2007
 Acq. Method Set: Recouvrement T2
 Date Processed: 09/05/2007 18:09:38, 09/05/2007 18:09:39
 Processing Method: m
 Channel Name: 2487Channel 1
 Proc. Chnl. Descr.:

Auto-Scaled Chromatogram



Peak Results

| | Nom du Composé | RT | Aire | Hauteur | PeT | Nombre Plateaux Théoriques | Facteur de Symétrie | K Prime | RF |
|-------|----------------|-------|--------|---------|---------|----------------------------|---------------------|---------|--------|
| 1 | M | 9.826 | 352949 | 16805 | 133.600 | 6096 | 1.6 | 11.3 | 2641.8 |
| 2 | M | 9.800 | 358289 | 16872 | 133.600 | 6099 | 1.5 | 11.3 | 2686.3 |
| 3 | M | 9.832 | 361812 | 17033 | 133.600 | 6147 | 1.5 | 11.3 | 2708.7 |
| 4 | M | 9.834 | 358098 | 16867 | 133.600 | 6119 | 1.5 | 11.3 | 2687.8 |
| 5 | M | 9.835 | 367711 | 16818 | 134.600 | 6082 | 1.5 | 11.3 | 2677.5 |
| 6 | M | 9.836 | 356306 | 16701 | 134.500 | 6082 | 1.5 | 11.3 | 2640.8 |
| 7 | M | 9.838 | 352204 | 16582 | 133.600 | 6118 | 1.6 | 11.3 | 2636.3 |
| 8 | M | 9.844 | 358033 | 16785 | 134.500 | 6113 | 1.5 | 11.3 | 2647.1 |
| 9 | M | 9.854 | 352323 | 16571 | 134.500 | 6105 | 1.5 | 11.3 | 2624.0 |
| % RSD | | 0.1 | | | | | | | 1.1 |
| Mean | | 9.836 | | | | | | | 2662.2 |

Report Method: Validation Phases

Printed 18:48:27 10/05/2007

Page: 1 of 2



Validation Phases Report

Reported by User: Labo_Controlle

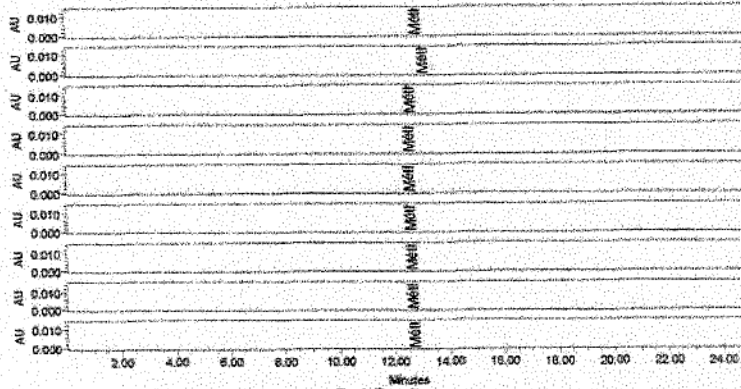
Project Name: M

SAMPLE INFORMATION

Sample Name: Témoin 1, Témoin 2, Témoin 3
 Sample Type: Standard
 Vial: 1, 2, 3
 Injection #: 1, 2, 3
 Injection Volume: 20.00 ul
 Run Time: 25.0 Minutes
 Sample Set Name: 030407CeD 7523_4_5

Acquired By: Labo_Controlle
 Date Acquired: 03/04/2007 16:53:47, 03/04/2007
 Acq. Method Set: Recouvrement T2, conforme T1
 Date Processed: 12/04/2007 15:24:05, 12/04/2007 15:24:05
 Processing Method: m
 Channel Name: 2487Channel 1
 Proc. Chnl. Descr.:

Auto-Scaled Chromatogram



Peak Results

| | Nom du Composé | RT | Aire | Hauteur | PeT | Nombre Plateaux Théoriques | Facteur de Symétrie | K Prime | RF |
|-------|----------------|--------|--------|---------|---------|----------------------------|---------------------|---------|--------|
| 1 | M | 12.966 | 362588 | 15788 | 133.100 | 5765 | 1.1 | 14.7 | 2324.2 |
| 2 | M | 12.892 | 362276 | 15777 | 133.100 | 5778 | 1.1 | 14.7 | 2321.8 |
| 3 | M | 12.610 | 361735 | 15740 | 133.100 | 5777 | 1.1 | 14.8 | 2317.8 |
| 4 | M | 12.631 | 384177 | 14568 | 141.500 | 5768 | 1.1 | 14.8 | 2319.1 |
| 5 | M | 12.851 | 383681 | 14504 | 141.500 | 5803 | 1.1 | 14.8 | 2309.8 |
| 6 | M | 12.873 | 383583 | 14546 | 141.500 | 5803 | 1.1 | 14.8 | 2310.9 |
| 7 | M | 12.721 | 359349 | 13595 | 133.300 | 5837 | 1.1 | 14.9 | 2695.8 |
| 8 | M | 12.842 | 360252 | 13515 | 133.300 | 5907 | 1.1 | 15.1 | 2302.6 |
| 9 | M | 13.103 | 358144 | 13244 | 133.300 | 6005 | 1.1 | 15.4 | 2688.7 |
| % RSD | | 1.3 | | | | | | | 0.5 |
| Mean | | 12.750 | | | | | | | 2308.2 |

Report Method: Validation Phases

Printed 15:55:08 12/04/2007

Page: 1 of 1



Validation Phases Report

Reported by User: Labo_Controlle

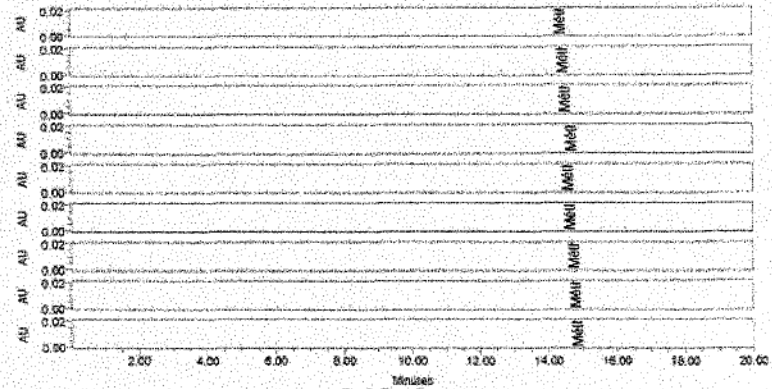
Project Name: M

SAMPLE INFORMATION

Sample Name: Témoin 1, Témoin 2, Témoin 3
 Sample Type: Standard
 Vial: 1, 2, 3
 Injection #: 1, 2, 3
 Injection Volume: 20.00 ul
 Run Time: 20.0 Minutes
 Sample Set Name: TRAMEM NK150507

Acquired By: Labo_Controlle
 Date Acquired: 15/05/2007 22:03:35, 15/05/2007
 Acq. Method Set: Recouvrement T2, conforme T1
 Date Processed: 23/05/2007 09:48:40, 23/05/2007 09:46:41
 Processing Method: m
 Channel Name: LC230507
 Proc. Chnl. Descr.:

Auto-Scaled Chromatogram



Peak Results

| | Nom du Composé | RT | Aire | Hauteur | PeT | Nombre Plateaux Théoriques | Facteur de Symétrie | K Prime | RF |
|-------|----------------|--------|--------|---------|---------|----------------------------|---------------------|---------|--------|
| 1 | M | 14.407 | 374072 | 20307 | 131.300 | 14110 | 1.2 | 17.0 | 2849.0 |
| 2 | M | 14.469 | 372593 | 20234 | 131.300 | 14359 | 1.2 | 17.1 | 2837.7 |
| 3 | M | 14.537 | 372448 | 20180 | 131.300 | 14305 | 1.2 | 17.2 | 2838.8 |
| 4 | M | 14.590 | 373760 | 20218 | 132.200 | 14410 | 1.2 | 17.2 | 2827.5 |
| 5 | M | 14.658 | 374395 | 20185 | 132.200 | 14380 | 1.2 | 17.3 | 2831.8 |
| 6 | M | 14.714 | 373843 | 20121 | 132.200 | 14486 | 1.2 | 17.4 | 2820.3 |
| 7 | M | 14.787 | 373905 | 20080 | 133.200 | 14524 | 1.2 | 17.5 | 2780.2 |
| 8 | M | 14.844 | 374144 | 20027 | 133.200 | 14510 | 1.2 | 17.5 | 2767.5 |
| 9 | M | 14.858 | 373750 | 19979 | 133.200 | 14544 | 1.2 | 17.6 | 2764.4 |
| % RSD | | 1.1 | | | | | | | 1.2 |
| Mean | | 14.647 | | | | | | | 2811.9 |

Report Method: Validation Phases

Printed 09:48:49 23/05/2007

Page: 1 of 1



Validation Phases Report

Reported by User: System

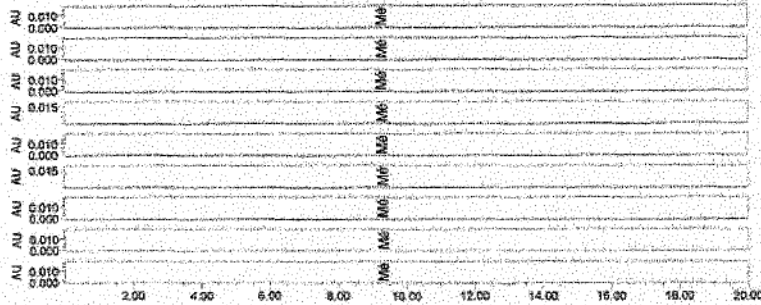
Project Name: Méthadone_impurétés

SAMPLE INFORMATION

Sample Name: Témoin 1, Témoin 2, Témoin 3
 Sample Type: Standard
 Vial: 1, 2, 3
 Injection #: 1, 2, 3
 Injection Volume: 20.00 ul
 Run Time: 20.0 Minutes
 Sample Set Name: M ya 24-04-07

Acquired By: Labo_contrôle
 Date Acquired: 24/04/2007 11:35:13, 24/04/2007
 Acq. Method Set: Recouvrement T2, conformité T1
 Data Processed: 25/04/2007 18:42:07
 Processing Method: m ya 24 04 07
 Channel Name: 2487Channel 1
 Proc. Chnl. Descr.:

Auto-Scaled Chromatogram



Peak Results

| | Nom du Composé | RT | Aire | Hauteur | PeT | Nombre Plateaux Théoriques | Facteur de Symétrie | K Prime | RF |
|-------|----------------|-------|--------|---------|---------|----------------------------|---------------------|---------|--------|
| 1 | M | 9.297 | 347889 | 17426 | 130.700 | 5650 | 1.2 | 10.6 | 2581.7 |
| 2 | M | 9.297 | 347502 | 17410 | 130.700 | 5797 | 1.1 | 10.6 | 2656.8 |
| 3 | M | 9.304 | 360580 | 18130 | 132.700 | 5834 | 1.1 | 10.6 | 2717.3 |
| 4 | M | 9.307 | 347885 | 17485 | 130.700 | 5873 | 1.1 | 10.6 | 2661.8 |
| 5 | M | 9.308 | 351309 | 18118 | 132.700 | 5784 | 1.1 | 10.6 | 2722.8 |
| 6 | M | 9.317 | 358979 | 17913 | 132.600 | 5779 | 1.1 | 10.6 | 2692.1 |
| 7 | M | 9.324 | 351291 | 18191 | 132.700 | 5617 | 1.1 | 10.7 | 2722.8 |
| 8 | M | 9.335 | 356707 | 17953 | 132.600 | 5757 | 1.1 | 10.7 | 2690.1 |
| 9 | M | 9.350 | 357272 | 17871 | 132.600 | 5789 | 1.1 | 10.7 | 2694.4 |
| % RSD | | 0.2 | | | | | | | 1.0 |
| Mean | | 9.315 | | | | | | | 2691.3 |
| None | | | | | | | | | |

Report Method: Validation Phases

Printed 17:22:17 29/05/2007

Page: 1 of 1



Validation Phases Report

Reported by User: System

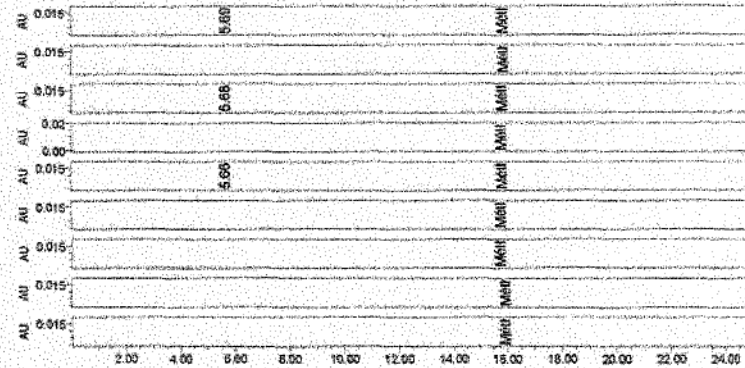
Project Name: Méthadone_impurétés

SAMPLE INFORMATION

Sample Name: Témoin 1, Témoin 2, Témoin 3
 Sample Type: Standard
 Vial: 1, 2, 3
 Injection #: 1, 2, 3
 Injection Volume: 20.00 ul
 Run Time: 25.0 Minutes
 Sample Set Name: M V/F 230507

Acquired By: Labo Contrôle
 Date Acquired: 23/05/2007 16:47:42, 23/05/2007
 Acq. Method Set: Recouvrement T2
 Date Processed: 24/05/2007 16:17:38, 24/05/2007 16:17:39
 Processing Method: m
 Channel Name: 2487Channel 1
 Proc. Chnl. Descr.:

Auto-Scaled Chromatogram



Peak Results

| | Nom du Composé | RT | Aire | Hauteur | PeT | Nombre Plateaux Théoriques | Facteur de Symétrie | K Prime | RF |
|-------|----------------|--------|--------|---------|---------|----------------------------|---------------------|---------|--------|
| 1 | M | 15.758 | 374734 | 18830 | 133.900 | 14370 | 1.2 | 18.7 | 2798.8 |
| 2 | M | 15.774 | 373714 | 18767 | 133.900 | 14412 | 1.2 | 18.7 | 2791.0 |
| 3 | M | 15.805 | 382349 | 19144 | 133.900 | 14402 | 1.3 | 18.8 | 2856.5 |
| 4 | M | 15.836 | 387890 | 19455 | 133.900 | 14451 | 1.2 | 18.8 | 2759.9 |
| 5 | M | 15.854 | 388387 | 19456 | 133.900 | 14493 | 1.2 | 18.8 | 2793.6 |
| 6 | M | 15.888 | 388777 | 19446 | 133.900 | 14528 | 1.2 | 18.8 | 2796.5 |
| 7 | M | 15.922 | 387612 | 19419 | 134.900 | 14921 | 1.2 | 18.9 | 2725.1 |
| 8 | M | 15.936 | 388578 | 19409 | 134.900 | 14993 | 1.2 | 18.9 | 2718.1 |
| 9 | M | 15.946 | 388561 | 19477 | 134.900 | 14650 | 1.2 | 18.9 | 2732.1 |
| % RSD | | 0.4 | | | | | | | 1.6 |
| Mean | | 15.868 | | | | | | | 2787.8 |

Report Method: Validation Phases

Printed 18:28:34 29/05/2007

Page: 1 of 1

ANNEXE 8
RESULTATS BRUTS DES REACTIFS TITRES EN SOLUTION

| Réactif titré : | Nitrate d'argent 0,1 M | | | | | | | | | | | |
|-----------------|------------------------|-------------|----------------|--------|-----------|-------------|----------------|--------|-----------|-------------|----------------|--------|
| Méthode : | Potentiométrie | | | | | | | | | | | |
| Etalon : | Chlorure de sodium | | | | | | | | | | | |
| Jours | LOT 1 | | | | LOT 2 | | | | LOT 3 | | | |
| | Titre (M) | Moyenne (M) | Ecart-type (M) | CV (%) | Titre (M) | Moyenne (M) | Ecart-type (M) | CV (%) | Titre (M) | Moyenne (M) | Ecart-type (M) | CV (%) |
| 0 | 0,0998 | 0,0998 | 0,0003 | 0,3 | 0,0993 | 0,0999 | 0,0006 | 0,6 | 0,0998 | 0,1001 | 0,0003 | 0,3 |
| | 0,1000 | | | | 0,1000 | | | | 0,1002 | | | |
| | 0,0995 | | | | 0,1004 | | | | 0,1004 | | | |
| 1 | 0,0994 | 0,0997 | 0,0003 | 0,3 | 0,0999 | 0,1001 | 0,0002 | 0,2 | 0,0996 | 0,1000 | 0,0003 | 0,3 |
| | 0,0997 | | | | 0,1003 | | | | 0,1002 | | | |
| | 0,0999 | | | | 0,1001 | | | | 0,1002 | | | |
| 2 | 0,0998 | 0,0998 | 0,0005 | 0,5 | 0,1002 | 0,1003 | 0,0002 | 0,2 | 0,0999 | 0,1000 | 0,0001 | 0,1 |
| | 0,0994 | | | | 0,1005 | | | | 0,0999 | | | |
| | 0,1003 | | | | 0,1003 | | | | 0,1001 | | | |
| 3 | 0,1002 | 0,0999 | 0,0004 | 0,4 | 0,1000 | 0,1001 | 0,0001 | 0,1 | 0,0999 | 0,1000 | 0,0002 | 0,2 |
| | 0,0995 | | | | 0,1001 | | | | 0,1000 | | | |
| | 0,0999 | | | | 0,1001 | | | | 0,1002 | | | |
| 4 | 0,0997 | 0,0998 | 0,0001 | 0,1 | 0,1003 | 0,1003 | 0,0002 | 0,2 | 0,0989 | 0,0998 | 0,0006 | 0,6 |
| | 0,0998 | | | | 0,1004 | | | | 0,0999 | | | |
| | 0,0998 | | | | 0,1001 | | | | 0,0989 | | | |
| 10 | 0,1001 | 0,1001 | 0,0002 | 0,2 | 0,1000 | 0,1001 | 0,0002 | 0,2 | 0,0993 | 0,0997 | 0,0004 | 0,4 |
| | 0,1000 | | | | 0,1000 | | | | 0,1000 | | | |
| | 0,1003 | | | | 0,1004 | | | | 0,0998 | | | |
| 15 | 0,0997 | 0,0998 | 0,0002 | 0,2 | 0,1001 | 0,1002 | 0,0001 | 0,1 | 0,0995 | 0,0999 | 0,0003 | 0,3 |
| | 0,0997 | | | | 0,1001 | | | | 0,1001 | | | |
| | 0,1000 | | | | 0,1003 | | | | 0,1000 | | | |
| 21 | 0,1005 | 0,1006 | 0,0003 | 0,2 | 0,1000 | 0,0999 | 0,0003 | 0,3 | 0,0998 | 0,1000 | 0,0002 | 0,2 |
| | 0,1008 | | | | 0,1001 | | | | 0,1002 | | | |
| | 0,1010 | | | | 0,0995 | | | | 0,1000 | | | |
| 25 | 0,0998 | 0,1000 | 0,0002 | 0,2 | 0,1003 | 0,1004 | 0,0004 | 0,4 | 0,0998 | 0,1000 | 0,0002 | 0,2 |
| | 0,1000 | | | | 0,1009 | | | | 0,0999 | | | |
| | 0,1002 | | | | 0,1001 | | | | 0,1002 | | | |
| 30 | 0,1000 | 0,1001 | 0,0001 | 0,1 | 0,0991 | 0,0996 | 0,0005 | 0,5 | 0,0999 | 0,1001 | 0,0003 | 0,3 |
| | 0,1002 | | | | 0,0997 | | | | 0,1005 | | | |
| | 0,1001 | | | | 0,1001 | | | | 0,1000 | | | |

ANNEXE 9
RECHERCHE DES VALEURS ABERRANTES PAR LE TEST
DE DIXON SUR LES TROIS LOTS DE NITRATE D'ARGENT
0,1 M

| | Lot 1 | Lot 2 | Lot 3 |
|-----------------------------------|----------------|----------------|----------------|
| i | x _i | x _i | x _i |
| 1 | 0,0997 | 0,0996 | 0,0996 |
| 2 | 0,0998 | 0,0999 | 0,0997 |
| 3 | 0,0998 | 0,0999 | 0,0999 |
| 4 | 0,0998 | 0,1001 | 0,1000 |
| 5 | 0,0998 | 0,1001 | 0,1000 |
| 6 | 0,0999 | 0,1001 | 0,1000 |
| 7 | 0,1000 | 0,1002 | 0,1000 |
| 8 | 0,1001 | 0,1003 | 0,1000 |
| 9 | 0,1001 | 0,1003 | 0,1001 |
| 10 | 0,1008 | 0,1004 | 0,1001 |
| R=x ₁₀ -x ₁ | 0,0011 | 0,0008 | 0,0006 |
| x ₂ -x ₁ | 0,0001 | 0,0003 | 0,0001 |
| x ₁₀ -x ₉ | 0,0006 | 0,0001 | 0,0000 |
| d _{max} | 0,0006 | 0,0003 | 0,0001 |
| Q _{obs} | 0,5758 | 0,3333 | 0,2353 |
| Q(5%) | 0,412 | | |
| Q(1%) | 0,527 | | |

Les données ont été classées par ordre croissant, puis les valeurs suivantes ont été calculées :

- L'étendue R de chaque lot : $x_{10} - x_1$
- Les différences : $x_2 - x_1$ et $x_{10} - x_9$
- Le maximum des différences calculées ci-dessus : d_{\max}
- Le quotient (statistique du test) : $Q_{\text{obs}} = \frac{d_{\max}}{R}$

Q_{obs} est comparé à la valeur critique au niveau de signification 5% et 1% lu dans la table de Dixon pour un échantillon unique (annexe 10). On applique les règles de décision suivantes :

- Si $Q_{\text{obs}} \leq Q(5\%)$, il n'y a pas de valeurs aberrantes,
- Si $Q(5\%) < Q_{\text{obs}} \leq Q(1\%)$, la valeur incriminée (x_1 ou x_{10} dans ce cas) est une valeur isolée,
- Si $Q_{\text{obs}} > Q(1\%)$, la valeur incriminée (x_1 ou x_{10} dans ce cas) est une valeur aberrante et elle est supprimée des valeurs.

Une valeur aberrante est détectée dans le lot 1 : 0,1008.

ANNEXE 10
TABLE DE DIXON

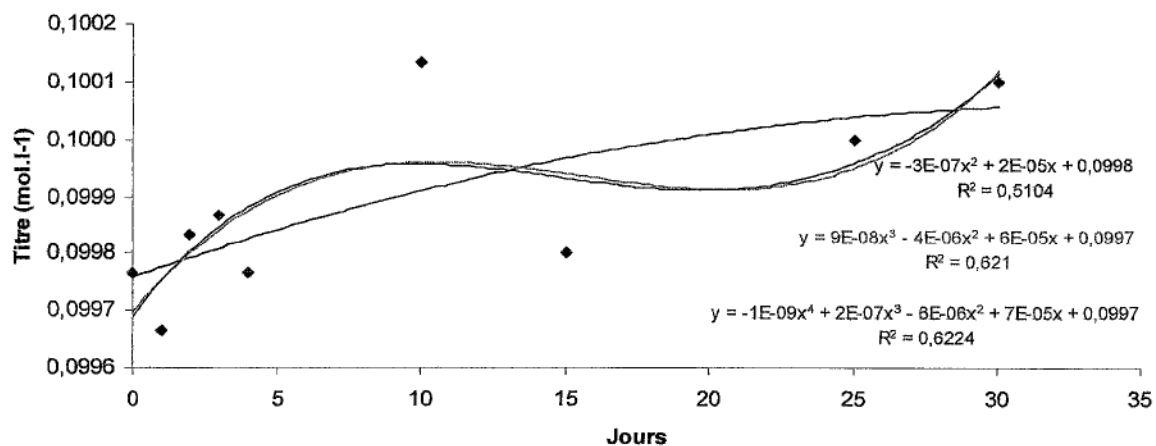
TABLE DE DIXON (d'après Dean et Dixon)**Valeurs critiques de Q pour échantillons uniques**

| n | $\alpha = 5 \%$ | $\alpha = 1 \%$ |
|----------|-----------------------------------|-----------------------------------|
| 3 | 0,941 | 0,988 |
| 4 | 0,765 | 0,889 |
| 5 | 0,642 | 0,780 |
| 6 | 0,560 | 0,698 |
| 7 | 0,507 | 0,637 |
| 8 | 0,468 | 0,590 |
| 9 | 0,437 | 0,555 |
| 10 | 0,412 | 0,527 |
| 11 | 0,397 | 0,505 |
| 12 | 0,380 | 0,485 |
| 13 | 0,368 | 0,468 |
| 14 | 0,358 | 0,454 |
| 15 | 0,349 | 0,442 |
| 16 | 0,341 | 0,432 |
| 17 | 0,334 | 0,424 |
| 18 | 0,328 | 0,417 |
| 19 | 0,323 | 0,411 |
| 20 | 0,318 | 0,406 |
| 21 | 0,314 | 0,402 |
| 22 | 0,310 | 0,398 |
| 23 | 0,306 | 0,394 |
| 24 | 0,303 | 0,391 |
| 25 | 0,300 | 0,388 |
| 26 | 0,297 | 0,385 |
| 27 | 0,294 | 0,383 |
| 28 | 0,292 | 0,381 |
| 29 | 0,290 | 0,379 |
| 30 | 0,288 | 0,377 |

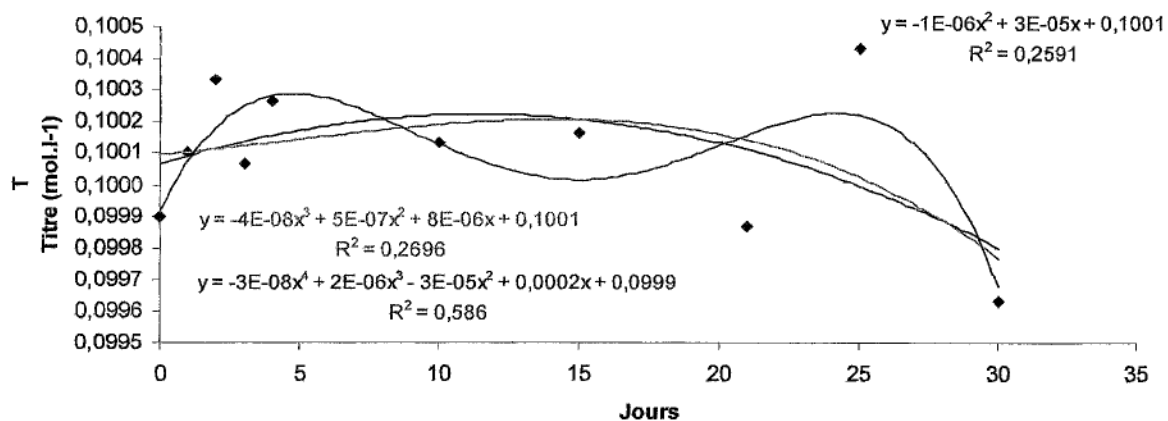
ANNEXE 11
EXEMPLE DE REGRESSIONS POLYNOMIALES DE DEGRE
2, 3 ET 4 APPLIQUEES AU NITRATE D'ARGENT 0,1 M.

Le polynôme de quatrième degré semble le mieux adapté (obtention de coefficient de régression plus proche de 1). Mais ce type d'équation n'est pas aisé à manipuler.

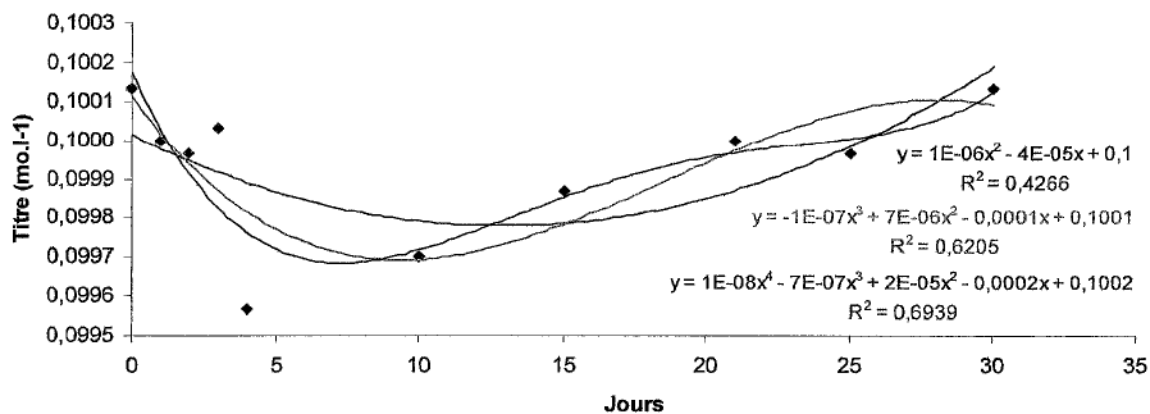
**Evolution du titre du nitrate d'argent 0,1 M
Lot 1**



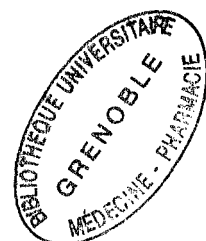
**Evolution du titre du nitrate d'argent 0,1 M
Lot 2**



**Evolution du titre du nitrate d'argent 0,1 M
Lot 3**



LE SERMENT DE GALIEN





Serment des Apothécaires



Je jure, en présence des maîtres de la faculté, des conseillers de l'ordre des pharmaciens et de mes condisciples :

D'honorer ceux qui m'ont instruit dans les préceptes de mon art et de leur témoigner ma reconnaissance en restant fidèle à leur enseignement.

D'exercer, dans l'intérêt de la santé publique, ma profession avec conscience et de respecter non seulement la législation en vigueur, mais aussi les règles de l'honneur, de la probité et du désintéressement.

Je ne jamais oublier ma responsabilité et mes devoirs envers le malade et sa dignité humaine ; en aucun cas je ne consentirai à utiliser mes connaissances et mon état pour corrompre les mœurs et favoriser des actes criminels.

Que les hommes m'accordent leur estime si je suis fidèle à mes promesses. Que je sois couvert d'opprobre et méprisé de mes confrères si j'y manque.



THESE SOUTENU PAR : Capucine PLANTE

TITRE : De la difficulté à valider des durées d'utilisation de réactifs en solution

RESUME

Le contrôle qualité fait partie intégrante de l'assurance qualité. Il permet de vérifier et de confirmer la qualité analytique et microbiologique des médicaments avant leur libération et leur vente aux consommateurs.

La qualité des réactifs chimiques est primordiale pour assurer la justesse des résultats d'analyse fournis par les laboratoires de contrôle physico-chimique. Une erreur peut entraîner des conséquences dramatiques au niveau de la santé et au niveau économique pour les laboratoires pharmaceutiques.

En cherchant à fixer une durée d'utilisation des réactifs en solution (titrés, non titrés, et phases mobiles pour HPLC), nous voulons justifier les règles internes de gestion des réactifs et ainsi satisfaire aux exigences de qualité des autorités et des clients internes et externes.

MOTS CLES : durée d'utilisation, validation, réactifs en solution, contrôle

COMPOSITION DU JURY :

Président du jury : Mme Danielle ESNAULT

Directeur de thèse : Mme Danielle ESNAULT

Membres : Mme Catherine GROSSET

M. Frédéric LAFFAY-GOURIER

Soutenu le : 19 Décembre 2007

[Données à caractère personnel]