

# DEMARCHE STATISTIQUE DE LA VALIDATION ANALYTIQUE DANS LE DOMAINE PHARMACEUTIQUE (Méthodologie et exemple pratique)

Bouklouze<sup>1</sup> .A, Digua<sup>2</sup> K,

<sup>1</sup> Laboratoire de Pharmacologie et Toxicologie. Faculté de Médecine et de Pharmacie – Rabat

<sup>2</sup> Département de Génie Chimique et Environnement. Faculté des Sciences et Technique Mohammadia

E.mail : a.bouklouze@medramo.ac.ma

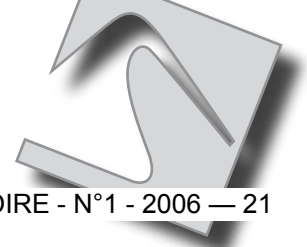
**RESUME :** Cet article a été élaboré dans le but d'aider les industriels du médicament, les organismes de contrôle nationaux à valider leurs procédures d'analyse. Le protocole expérimental appliqué dans ce document est basé sur une méthodologie commune inspirée de la stratégie des guidelines ICH (International Conference on Harmonization ) et celles de la SFSTP (Société Française des Sciences Techniques et Pharmaceutiques pour mieux encore optimiser le nombre d'essais à réaliser et satisfaire à l'étude des critères de validation. La démarche statistique qui sera appliquée aux données brutes est décrite. Et afin de mieux appréhender l'exploitation statistique des données brutes un exemple d'application est traité.

**Mots clés :** validation analytique, fiabilité des méthodes, médicament, contrôle qualité

## INTRODUCTION :

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

de tous les produits pharmaceutiques. Dans le domaine pharmaceutique, son exigence est avant tout une pratique réglementaire. En effet, au Maroc, selon la dernière circulaire du ministère de la santé N°49DMP/00 du 16 juillet 2003, toute méthode analytique décrite dans le dossier d'AMM doit être accompagnée d'une validation complète. La validation est fondée sur une analyse statistique basée sur un certain nombre de critères aboutissant à des méthodes analytiques permettant de donner des



résultats fiables. Donc, elle a pour but de démontrer qu'elles correspondent à l'utilisation pour laquelle elles sont proposées.

Afin d'aider concrètement les spécialistes du médicament à appliquer les recommandations réglementaires concernant la validation. Le présent document présente donc une synthèse des deux guides communément admises et appliquées dans l'industrie pharmaceutique nationale (ICH et SFSTP) et une démarche statistique pour la validation d'une procédure analytique permettant de minimiser les essais effectués et minimiser les deux risques de 1<sup>ère</sup> et 2<sup>ème</sup> espèces c.a.d le risque d'accepter une procédure qui ne serait pas suffisamment exact ou, au contraire, de rejeter une procédure qui serait capable.

Enfin, bien que la démarche présentée dans cet article concerne essentiellement les techniques chromatographiques appliquées au médicament, elle peut facilement s'appliquer à d'autres techniques et s'étendre à d'autres secteurs d'activité comme l'environnement et l'agro-alimentaire.

### LES CRITERES DE LA VALIDATION :

Les critères de validations illustrés dans le tableau ci-dessous, peuvent être requis suivant la nature de l'essai (ex: dosage quantitatif ou essai limite)

Types de test caractéristiques	dosage	Impuretés		identification	Dosage bioanalyse
		quantitatif	Essais limites		
<b>Exactitude</b>	✓	✓			✓
<b>Fidélité répétabilité</b>	✓	✓			✓
<b>Fidélité fidélité intermédiaire</b>	✓	✓			✓
<b>Spécificité Sélectivité</b>	✓	✓	✓	✓	✓
<b>Limite de détection</b>		✓	✓		✓
<b>Limite de quantification</b>		✓			✓
<b>Linéarité</b>	✓	✓			Fonction de réponse
<b>Intervalle de mesure</b>	✓	✓			✓
<b>Robustesse</b>	✓	✓	✓		

NB : en ce qui concerne les définitions de ces critères de validation, le lecteur est invité à consulter les documents cités en références [1-3].

### METHODOLOGIE DE LA VALIDATION ANALYTIQUE

#### (Appliquée au dosage d'un principe actif dans une spécialité pharmaceutique)

Cette méthodologie est basée à la fois sur les critères SFSTP et ICH (Q2B)

#### Protocole SFSTP' 92

Le but du protocole est de minimiser le nombre d'essais pour la validation et maximaliser les chances de succès et diminuer les coûts d'utilisation vérification de la non interférence des excipients.

**En pratique :** Les quantités de substances à tester doivent être pesées individuellement (PA seul) et mélangées à une quantité la plus constante possible du mélange des autres composants (forme pharmaceutique reconstituée) ou produit fini.

#### **Spécificité et /ou sélectivité**

Effectuer des essais sur le blanc et le placebo et montrer qu'ils n'interfèrent pas avec une des solutions standard dans les mêmes conditions expérimentales.

#### **Linéarité (Calibration)**

L'intervalle de concentration ( $\pm 40\%$  de la concentration cible) à valider est couvert par 5 concentrations minimum;

Effectuer au minimum 3 séries indépendantes de ces 5 concentrations (sur le PA seul et la forme pharmaceutique reconstituée) et ce à raison d'1 série de chaque par jour;

Pour les concentrations extrêmes et médianes des pesées supplémentaires sont recommandées.

#### **L'exactitude**

L'exactitude de la méthode a été évaluée en utilisant trois niveaux de concentrations Pour chaque concentration trois mesures de la variable dépendante sont effectuées. L'opération est répétée pendant trois jours consécutifs.

#### **La fidélité (répétabilité, fidélité intermédiaire)**

Effectuer au minimum 3 séries de 6 pesées de la concentration théorique (100%) sur la forme pharmaceutique reconstituée (ou non) et ce à raison d'1 série par jour.

### LA DEMARCHE STATISTIQUE

- Objet : chiffrer le recouvrement  $Y_{moy}$  ?

Le recouvrement  $Y_{moy}$  d'une méthode de contrôle n'est pas caractérisée par un chiffre, mais il est



encadré par un intervalle de confiance avec des limites (lim :sup et lim :inf) que l'on sait calculer

$$\text{RECOUVREMENT } Y\% = \frac{\text{Quantité retrouvée}}{\text{Quantité introduite}} \times 100$$

La validation d'une méthode de contrôle repose sur ce concept de recouvrement Y % qui est une unité de mesure, il est à une méthode de contrôle ce que le « Pascal » est à la pression.

**Linéarité : K=5 ; n=3**

Avant de commencer l'estimation des critères il faut

- S'assurer qu'il n'y a pas un résultat aberrant entre les 5 groupes ; entre les 3 répétitions
- Test de Cochran détecte le double souci
- Test de Dixon précise
- Si contradiction – Cochran et Dixon, l'anvar (Fisher) pour lever le doute
- Ensuite,
- calcul des coefficients : b ; a ; r
- alignement (si nécessaire) des valeurs des Qt introduite → coef correcteur ----> chgt de variable
- cohérence des données alignées → test de Cochran
- calcul de la variance résiduelle Sr<sup>2</sup> de régression et validité de la pente b → test de Fisher Anova
- validité de la régression – comparaison de la variance d'ajustement S<sub>2L</sub> et celle expérimentale S<sub>2E</sub>-----> test Fisher
- comparaison du coef a avec 0 ---> test t

**Exactitude : K=5 ; n=3**

- Calcul du recouvrement des 15 résultats
- Homogénéité des 5 variances Test de COCHRON
- Validité des moyennes Test de FISHER
- Comparaison de la variance inter et variance moyenne intra
- Estimation de recouvrement moyen Y<sub>rm</sub> et de ses limites de confiance au risque de 5%
- $Y_{rm} - (s / \sqrt{n}) * t(1 - \alpha / 2) \leq Y_m \leq Y_{rm} + (s / \sqrt{n}) * t(1 - \alpha / 2)$  Y<sub>m</sub> = la vraie valeur
- avec N=K\*n=15 ; t(0.025 ; N-1=14) = 2.145

**Fidélité**

Deux possibilités :

- 1<sup>er</sup> possibilité : K=1, n=6, N= K\*N =6 (milieu de l'intervalle de mesure)
- 2<sup>ème</sup> possibilité: K=3; n=3; N = 9 (Utilisation

de 3 groupes de valeurs de l'exactitude ( mini; milieu; maxi de l'intervalle de mesure)

- Test d'homogénéité de variance des valeurs brutes de la quantité trouvée (COCHRON)
- Test de recherche de valeurs aberrantes (DIXON)

**-Répétabilité :**

- Calcul de la variance
- Calcul du coefficient de variation (C.Vr%=( Sr / Y moy )x 100)

**- Fidélité Intermédiaire:**

- Calcul de la variance et étude de l'effet du facteur (jour, opérateur ect ) par l'anova
- Calcul du coefficient de variation : CVR = 100 S<sub>R</sub>/ m

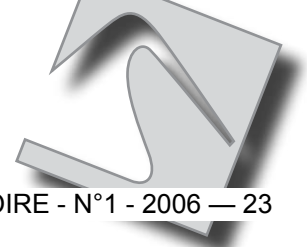
Il est à noter que le protocole expérimental proposé par la SFSTP '92 entre parfaitement dans le cadre défini par les normes ICH.



**Cas d'une validation d'une méthode chromatographique pour le dosage d'un principe actif dans une formulation pharmaceutique**

**1- La linéarité :**

Essai	Pesée [Xij]	m [Xij]	SURF [Yij]	VAR
1	0,329	0,329666667	1,208	0,002263
2	0,3298		1,233	
3	0,3302		1,141	
1	0,3863	0,387566667	1,428	0,001737
2	0,3864		1,422	
3	0,39		1,353	
1	0,4205	0,419733333	1,486	0,001081333
2	0,4195		1,536	
3	0,4192		1,474	
1	0,4595	0,459533333	1,656	0,002532
2	0,4591		1,662	
3	0,46		1,572	
1	0,5002	0,499966667	1,758	0,003404333
2	0,4989		1,827	
3	0,5008		1,711	



\* Test d'homogénéité des variances intragroupe de la variable dépendante **Yij**

Le test de Cochran est appliqué aux variances du groupe Yij pour vérifier l'homogénéité des variances constitutives de l'erreur expérimentale.

$S_{j \max}^2$	$\sum S_j^2$	$C_{\text{calculé}} = S_{j \max}^2 / \sum S_j^2$	$C_{(0,05; k; n-1)}$
0,003404333	0,0110	0,3090	0,6838
$C_{\text{calculé}} < C_{\text{tabulé}} (0,05; 5; 3)$			
C/C: Les variances sont homogènes au risque $\alpha=5\%$			

Conclusion : les variances des différents groupes sont homogènes au risque de 5%.

\* Détermination de l'équation de la droite de régression linéaire :

L'équation de la droite a été calculée par la méthode des moindres carrés.

#### Critères de la droite de régression

Pente de la droite (mV/décade)	b	3,3241
Ordonnée à l'origine (mV)	a	0,104
Coefficient de corrélation	R <sup>2</sup>	0,9580

Equation de la droite de régression  
 $y = 3,3241x + 0,104$

\* Test de l'existence d'une pente significative : Analyse de variance ( Test de Fisher)

Ce test consiste à vérifier l'hypothèse nulle :

**H0 : b = 0 contre H1 : b ≠ 0**

Origine de la variation	ddl	SCE	Variances	$F_{\text{calculé}}$	$F_{(0,05; 1; 13)}$
Variation due à la régression	1	0,5692	0,56922		
Variation résiduelle	13	0,02495	0,001919	296,5238095	<b>4,67</b>
Variation totale	14	0,59418			

$F_{\text{calculé}} > F_{\text{tabulé}} (0,05; 1; 13) ; p < 0,05$

En utilisant le test de Fischer, a partir des résultats brutes,  $F_{\text{calculé}} > F_{\text{tabulé}}$  avec  $p < 0,05$  nous pouvons conclure l'existence d'une pente significative, donc à une dépendance linéaire entre la variable dépendante et la variable indépendante, au seuil de probabilité considérée.

\* Test de validité de la droite de régression :

Ce test permet de comparer les erreurs d'ajustement et les erreurs expérimentales

#### Test de validité de la régression

Origine de la variation	ddl	SCE	Variances	$F_{\text{calculé}}$	$F_{(0,05; 3; 10)}$
Erreur expérimentale	10	0,0220	0,00220		
Erreur de la régression	3	0,0029	0,00097347	0,4418	<b>3,71</b>

$F_{\text{calculé}} < F_{\text{tabulé}} (0,05; 3; 10) ; p > 0,05$

$F_{\text{calculé}} > F_{\text{tabulé}} (0,05; k-2; N-5) ; p > 0,05$

L'ajustement est valide au seuil de probabilité considéré (on accepte l'hypothèse nulle)

\*Test de comparaison de l'ordonnée à l'origine avec 0 : Test de Student

Comparaison de l'ordonnée à l'origine avec zéro :

H0 : a = 0

a	$S_a$	$t_{\text{calculé}} =  a  / S_a$	$t_{\text{tabulé}} (0,05; N-2)$
1345,22	0,100984264	13321,0854	2,1600

$t_{\text{calculé}} < t_{\text{tabulé}} ; p < 0,0000$

L'ordonnée à l'origine n'est pas significativement différente de 0 au seuil de probabilité  $\alpha = 5\%$

## 2- L'exactitude :

Soient les données brutes d'une procédure d'exactitude

essai	Quantité introduite	Surafce (Yij)	Quantité retrouvée	Recouv %
1	0,329	1,208	0,33212996	100,9513568
1	0,3298	1,2330	0,33965102	102,9869687
1	0,3302	1,141	0,31197353	94,48017137
2	0,3863	1,428	0,39831528	103,1103502
2	0,3864	1,422	0,39651023	102,6165188
2	0,39	1,353	0,37575211	96,34669382
3	0,4205	1,486	0,41576414	98,87375496
3	0,4195	1,563	0,438929	104,6314663
3	0,4192	1,474	0,41215403	98,31918685
4	0,4595	1,656	0,46690734	101,6120436
4	0,4591	1,662	0,46871239	102,0937475
4	0,46	1,572	0,44163658	96,0079527
5	0,5002	1,758	0,49759326	99,47886068
5	0,4989	1,827	0,51835138	103,8988543
5	0,5008	1,711	0,48345367	96,53627601

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

\* Evaluer l'homogénéité des variances du Y% comme précédemment par le test de Cochran

\*Test de validité des moyennes : Test de Fischer

Ce test consiste à comparer les erreurs inter et intra groupes.

Exactitude : Test de validité des moyennes

Origine de la variation	ddl	SCE	Variances	F <sub>calculé</sub>	F <sub>(0,05 ; 4 ; 10)</sub>
Variation intragroupe	10	142,6894	14,2689		
Variation intergroupe	4	3,1421	0,7885	0,055	3,42
Variation totale	15	145,84			

$$F_{\text{calculé}} < F_{\text{Tabulé (0,05 ; 2 ; 6)}} ; p > 0,05$$

Au seuil de probabilité de 5 %, le facteur groupe n'a pas d'influence sur les moyennes et il n'y a pas de différence statistiquement significative.

- Estimation de l'intervalle de confiance du recouvrement moyen :

L'intervalle de confiance du recouvrement moyen est calculé à partir des résultats du

$$IC_{R.m} = m \pm t(\text{table}_{(5\%, 8)}) * S/\sqrt{N}$$

$$IC_{R.m} = [99,65-100,36]$$

L'intervalle comprend le 100%, donc la méthode est exacte

### 3- La fidélité :

essai	pesée	rapport	Quantité retrouvée	%
1	0,4212	1,4900	0,416967509	98,9951351
1	0,4223	1,535	0,430505415	101,94303
1	0,4212	1,504	0,421179302	99,995086
1	0,4218	1,547	0,434115523	102,919754
1	0,4206	1,538	0,431407942	102,569649
1	0,4199	1,541	0,432310469	102,955577
2	0,4197	1,491	0,417268351	99,4206222
2	0,4198	1,526	0,427797834	101,905153
2	0,4193	1,492	0,417569194	99,5872153
2	0,4198	1,53	0,429001203	102,191806
2	0,4206	1,516	0,42478941	100,996056
2	0,4194	1,548	0,434416366	103,58044
3	0,4228	1,445	0,403429603	95,4185437
3	0,4238	1,473	0,411853189	97,1810262
3	0,4214	1,457	0,407039711	96,5922428
3	0,4258	1,493	0,417870036	98,1376318
3	0,4236	1,49	0,416967509	98,4342561
3	0,4221	1,483	0,414861613	98,2851487

Test d'homogénéité des variances intra groupe :

Test de Cochran

#### 1- La répétabilité :

Elle est évaluée par le calcul du coefficient de variation. Compte tenu de la valeur du CV = 1.5 % (< 2% valeur fixée par les normes pharmaceutiques), la répétabilité de la méthode est jugée très satisfaisante.

#### IV.3.1.3.2- La fidélité intermédiaire :

Le calcul du CV<sub>FI</sub> = 2.73 % . Cette valeur est supérieure à 2%, la fidélité intermédiaire n'est satisfaite. Le test de la validité des moyennes

à l'aide du test du Fischer a permis de mettre en évidence l'effet du facteur jour, il y a une différence statistiquement significative. Ce facteur jour est à l'origine d'une grande variabilité inter.

Origine de la variation	ddl	SCE	Variances	F <sub>calculé</sub>	F <sub>(0,05 ; 2 ; 15)</sub>
Variation intragroupe	15	33,911	2,26		
Variation intergroupe	2	66,831	33,41	14,78	3,68
Variation totale	17	100,7			

$$F_{\text{calculé}} > F_{\text{tabulé (0,05 ; 2 ; 15)}} ; p < 0,05$$

La série du 3<sup>ème</sup> jour a été soupçonnée d'être à l'origine de cette variabilité, état donné que toutes les valeurs du recouvrement s'écartent du 100%. Cependant, une nouvelle analyse de variance a été appliquée sur les données uniquement sur celles du 1<sup>er</sup> et 2<sup>ème</sup> jour. Le test a montré qu'il n'y a pas de différence statistiquement significative.

Origine de la variation	ddl	SCE	Variances	F <sub>calculé</sub>	p
Variation intragroupe	10	0,24	0,24		
Variation intergroupe	1	26,9	2,691	0,089	0,77
Variation totale	11	27,148			

$$p > 0,05 : \text{moyenne égale}$$

Dans ces conditions les coefficients de variations de répétabilité et de fidélité intermédiaire sont recalculés. Compte tenu de leurs valeurs respectifs du CV et qui sont inférieur à 2%, la fidélité intermédiaire de la méthode est jugée satisfaisante.

### - CONCLUSIONS :

L'acceptation d'une méthode analytique, quant à sa fiabilité, est généralement décidée sur la base du calcul des limites de confiance des mesures d'exactitude et l'estimation de sa fidélité au moyen du calcul des coefficients de variation. Cette approche est, en fait, basée sur l'outil statistique comme un moyen d'analyse et de prise de décision en même temps.

### REFERENCES

- 1- International Conference on Harmonization of Technical Requirements for the registration of pharmaceuticals for humane use: Validation of analytical procedures: Q2A, Q2B.
- 2- Gautier, J. C., Nivet, J.M., Algranti, P., Guilloteau, M., Histe, M., Lallier, M., N'guyen-Huu, J.J. et Russotto, R. 1992. Guide de validation analytique. Rapport d'une commission SFSTP. I- Méthodologie. STP Pharma Prat. Vol.2 (4): 205-226.
- 3- Norme ISO 5725, 1986