

Métrologie et analyse du médicament

M.-F. Dreyfuss^{1,2,*} et P. J.-P. Cardot¹

¹Laboratoire de Chimie Analytique et Bromatologie, Faculté de Pharmacie, 2 rue du Dr Marcland, 87025 Limoges Cedex, France

²Laboratoire de Pharmacologie et Toxicologie, Hôpital Dupuytren, C.H.U., 2 avenue Martin Luther King, 87042 Limoges Cedex, France

To enhance and insure measurements quality, it is necessary to set up metrological rules. Drug analysis is an application field where compromise between a measurement fonction (metrology) of high constraint and necessary but very spreading characteristics, and a result obligation with rentability compatibility as needed by industrial goals must be thought.

Introduction

L'analyse du médicament se décompose en une succession d'étapes que l'on doit parfaitement maîtriser pour assurer la qualité du résultat final. Cette maîtrise passe par une vigilance permanente et la mise en place de points de contrôle pertinents notamment en matière de métrologie.

La métrologie est « la science des mesures » telle que la définit la norme NF X 07-001 (AFNOR). La spécificité de la discipline métrologique n'est pas dans la mesure elle-même (tout le monde peut faire des mesures) mais dans l'évaluation de son incertitude, donc dans la validation du résultat et dans la définition de ses limites.

La variabilité des mesures, qu'elles soient physiques ou chimiques, est un problème commun à tous les expérimentateurs et ce, tout au long d'une analyse. Par définition, une mesure expérimentale est une variable aléatoire et cette variabilité imprévisible rend délicate l'interprétation des mesures. Aussi est-il nécessaire avant toute analyse d'organiser et de planifier les diverses étapes afin d'optimiser la méthodologie et d'aboutir, par du matériel qualifié et des techniques validées, à une valeur aussi vraie que possible [1, 2].

L'analyse du médicament

L'analyse du médicament, en ce qui concerne l'analyse physico-chimique, revêt quelque spécificité vis-à-vis de l'analyse chimique non pharmaceutique. Cette spécificité apparaît à chaque étape de la démarche analytique [3]. En outre, il faut distinguer l'analyse d'une matière première ou d'un produit fini pour en contrôler la pureté ou la teneur, de l'analyse d'une molécule médicamenteuse réalisée dans le cadre d'études pharmacocinétique ou toxicologique, ce qui implique des dosages dans des liquides biologiques (sérum, plasma, urine) et qui nécessite une étape supplémentaire d'extraction à partir de la matrice biologique.

Le processus analytique peut se décomposer en cinq étapes :

- prélèvement, échantillonnage, stockage et conservation d'un échantillon représentatif d'un lot ;
- préparation ou prétraitement de l'échantillon (dilution, extraction) ;
- analyse proprement dite avec calibration, étalonnage ;
- acquisition des données, quantification ;
- interprétation et présentation des résultats.

De la maîtrise de chacune de ces étapes, dépendra la qualité du résultat final.

La métrologie : une nécessité

Pour atteindre la qualité recherchée, l'analyste doit s'impliquer dès le début du processus en faisant le choix des paramètres à analyser et du niveau de précision et d'exactitude à obtenir pour donner une réponse correcte. C'est pourquoi la métrologie, étroitement liée au système d'assurance qualité doit intégrer tous les aspects du problème afin d'obtenir le meilleur résultat possible [4]. La métrologie aura pour rôle d'établir les documents concernant la qualification, l'utilisa-

tion, l'étalonnage et la maintenance de tous les moyens de mesures.

La gestion de ces moyens de mesure est devenue une nécessité et une obligation afin de maîtriser la qualité au sein du laboratoire mais aussi pour assurer la confiance dans la valeur des résultats transmis à l'extérieur du laboratoire. En effet, selon la norme NF X07.010 le rôle de la fonction métrologique consiste à maîtriser l'aptitude à l'emploi de tous les moyens de mesure utilisés dans le laboratoire et à en donner l'assurance, c'est-à-dire à en maîtriser le fonctionnement adéquat [5].

La métrologie : des contraintes

Maîtriser la connaissance exacte des performances des équipements de mesure, leurs limites d'emploi et leur comportement dans le temps pour donner l'assurance de la qualité des opérations de mesurage, implique une démarche méthodologique rigoureuse.

Il faudra, dans un premier temps, analyser les besoins techniques et choisir les moyens de mesure en prenant en considération des critères tels que l'homogénéité du parc d'instruments, les conditions de service après vente, de maintenance, de documentation nécessaire à l'utilisation, les possibilités d'ajustage et bien entendu les exigences particulières relatives à l'étalonnage et à la vérification.

Dès l'arrivée d'un nouveau moyen de mesure dans un laboratoire, la fonction métrologique doit vérifier la conformité de l'équipement aux spécifications du constructeur, identifier le nouvel équipement, le verser à l'inventaire et réaliser la qualification à l'installation.

Ensuite interviennent les opérations d'étalonnage ou de vérification conduites selon le schéma présenté dans la figure 1. L'étalonnage se fait par comparaison des résultats de mesure de l'instrument par rapport à l'étalon. Le résultat d'une vérification permet d'affirmer que le moyen de mesure satisfait aux prescriptions préalablement fixées.

Certaines opérations préliminaires doivent être effectuées avant tout étalonnage ou vérification des moyens de mesure comme le réglage du zéro mécanique, du zéro électrique, du zéro de « mesure » (le réglage de ce dernier, à l'opposé des autres, est rarement négligé), la vérification du bon fonctionnement des commandes mécaniques ou le préchauffage pour les appareils électroniques.

Les référentiels qualité exigent, en outre, un raccordement aux étalons de référence. Les références métrologiques d'un laboratoire sont constituées par l'ensemble des étalons qu'il utilise, qui doivent, eux-mêmes, être raccordés aux étalons nationaux.

Il faut de plus fixer un intervalle d'étalonnage et pour cela, tenir compte de l'incertitude de mesure, du taux et du type d'utilisation du moyen de mesure. Cet intervalle, établi initialement pour chaque instrument de mesure, doit être régulièrement réexaminé et peut être réadapté.

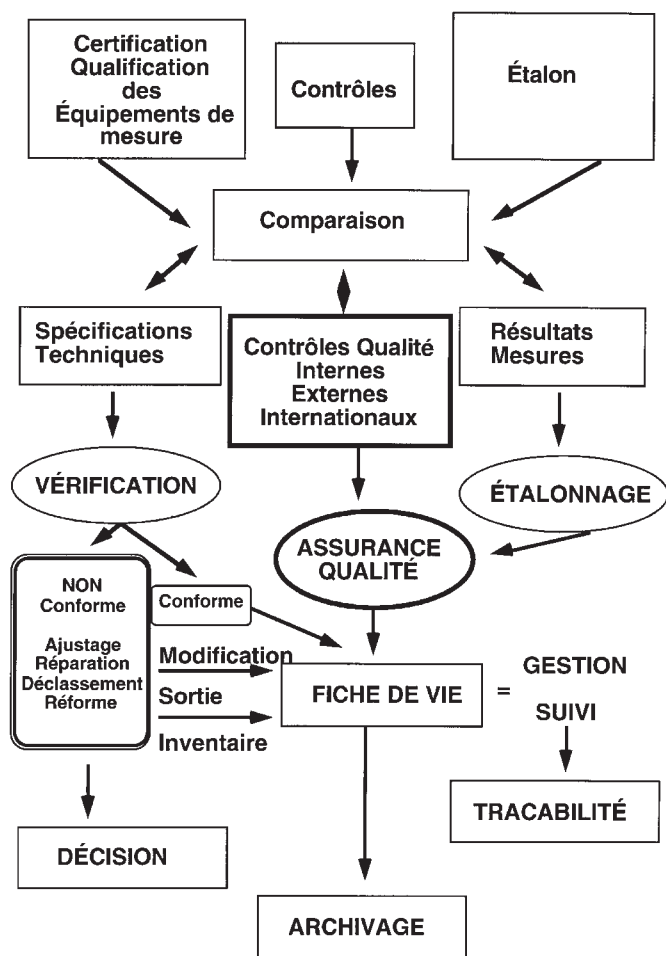


Figure 1. Suivi métrologique des équipements de mesure d'après la norme NF 07-010 (AFNOR).

Tout cet enchaînement d'actions à entreprendre pour mener à bien un étalonnage doit être consigné par écrit, c'est-à-dire sous forme de procédure afin que le manipulateur suive scrupuleusement les opérations jusqu'à la présentation du résultat.

L'exploitation des résultats mène ensuite à deux types de décisions :

- s'il y a conformité, la décision consiste en une mise en service ou une remise en service ;
- s'il y a non conformité, la fonction métrologique doit alerter l'utilisateur afin de prendre les mesures correctives nécessaires qui peuvent aller d'un ajustage, en passant par une réparation jusqu'à un déclassement ou une réforme.

En complément de toutes ces opérations techniques, la gestion des moyens de mesures doit assurer une traçabilité parfaite. Cette traçabilité consiste à identifier, inventorier et repérer (en matière d'étalonnage) chaque instrument.

La métrologie : réalité au laboratoire

La fonction métrologique nécessaire, obligatoire et contraignante doit exister certes, mais aussi être adaptée aux besoins du laboratoire et surtout être compatible avec l'activité et la rentabilité. En effet, il va falloir au sein d'un laboratoire à partir de la théorie métrologique, mettre en place des opérations incontournables de suivi des mesures mais simultanément assurer le rendu de résultats fiables dans un délai donné.

À chaque étape de l'analyse du médicament, il faudra associer à tout système de mesure d'une part une procédure de contrôle de cette mesure, et garder la preuve de ce contrôle, d'autre part une procédure d'action corrective en cas de déviation par rapport à l'incertitude accordée.

Prélèvement - Échantillonnage

Cette première étape de l'analyse est l'acte pharmaceutique par excellence puisque, de la rigueur du prélèvement, dépendra la rigueur du résultat final. Il est impératif de maîtriser parfaitement cette phase pré-analytique en mettant en adéquation le matériel de prélèvement et la matière à prélever. Matériel performant et personnel qualifié contribueront ainsi à la qualité de l'analyse dès le début, en constituant un échantillon représentatif d'un lot de matière première [6].

Ainsi, il sera nécessaire d'établir un plan d'échantillonnage pour définir les points de prélèvements au sein d'un fût de matière première à la réception des produits dans l'industrie pharmaceutique. Dans ce cas, les quantités prélevées sont infiniment petites par rapport à la masse initiale très importante (100 g pour 100 kg, par exemple). La même rigueur doit être apportée lorsque l'on prélève à « l'échelle de la paille » différentes masses d'un même produit pour réaliser des parties aliquotes afin de les distribuer lors de diverses opérations de contrôle (aliquotes de 1 g sur une masse de 100 g, par exemple).

Il faut ensuite prévoir la conservation et le stockage des échantillons dans des enceintes thermostatées et donc parfaitement contrôlées à l'aide de thermomètres étalonnés par rapport à un thermomètre certifié et assurer la traçabilité par des relevés de température, ou mieux des enregistreurs. Une première étape dans le contrôle des températures peut se faire par la mise en place d'indicateurs (pastilles adhésives) à l'intérieur de toutes les enceintes thermostatées.

Préparation ou prétraitement de l'échantillon

Cette deuxième phase débute par la prise d'essai. Que celle-ci soit exprimée en masse ou en volume, le moyen de mesure sera strictement suivi en matière de métrologie. Ensuite, que l'on opère par dilution, par extraction ou évaporation, il faut prendre en considération les matériels dont l'utilisation peut avoir une influence sur le résultat final. Ceux-ci se répartissent en deux catégories :

- équipement de service général ;
- instrument de mesure.

Si ces matériels risquent d'influer sur la fiabilité du résultat, il faudra en assurer leur raccordement. C'est ainsi qu'il faudra prendre en compte, en matière d'équipement de service général, l'étalonnage de la verrerie volumétrique.

Il est certain que chaque matériel ne peut être contrôlé systématiquement mais, mettre en place des prélèvements de spécimens repérés par gravage du verre, par exemple, en vérifier la justesse et contrôler de façon aléatoire certains éléments de verrerie (fioles jaugées, pipettes) à partir de ces spécimens, est réalisable. Par contre, un contrôle systématique des micropipettes doit être régulièrement réalisé, les pipettes se révélant hors normes étant ajustées, réparées ou éliminées. Chaque pipette étant référencée, un contrôle mensuel par gravimétrie peut être facilement mis en place.

En matière d'instruments de mesure, un certain nombre sont raccordables aux grandeurs physiques de base comme les balances (masse), les thermomètres (température), les chronomètres (temps) et les hygromètres (humidité). D'autres instruments peuvent être raccordés à des matériaux de référence, c'est le cas des viscosimètres et des pH-mètres [7]. L'utilisation de matériaux de référence doit alors être en adéquation avec la méthode de mesure choisie. Ces matériaux doivent être certifiés, le certificat d'analyse étant la preuve indispensable jointe à la référence, le Bureau National de Métrologie (BNM) étant l'instance supérieure dans la chaîne d'étalonnage [8].

Utiliser des matériaux de référence est souvent très onéreux, pour en minimiser le coût, on procède souvent en passant par l'intermédiaire d'étalon de travail et éventuellement d'un étalon de transfert intermédiaire selon le schéma de la figure 2. Il faut cependant s'assurer que l'utilisation des étalons successifs soit compatible avec l'incertitude recherchée pour l'instrument de mesure.

Le même principe est adopté pour le suivi métrologique des pesées. Les balances sont contrôlées annuellement par un organisme agréé et des masses de travail sont utilisées au cours de l'année pour des contrôles quotidiens, hebdomadaires ou mensuels, ces masses de travail étant vérifiées annuellement par rapport à des masses étalons certifiées par le BNM.

Analyse proprement dite

La plupart des méthodes utilisées aujourd'hui dans le contrôle du médicament, font appel à l'analyse instrumentale. La qualification du matériel est donc la phase préliminaire de cette analyse et nécessite des tests métrologiques. Si nous prenons l'exemple d'une chaîne de chromatographie en phase liquide haute performance (CLHP), cet ensemble peut comporter classiquement plusieurs modules :

- une pompe ;
- un injecteur (manuel ou automatique) ;
- une enceinte à colonne, thermostatée ;
- un détecteur (spectrophotomètre par exemple) ;

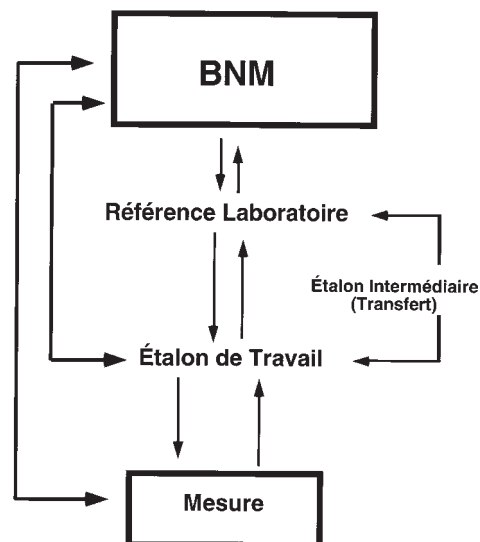


Figure 2. Raccordement des étalons au Bureau National de Métrologie (BNM) d'après la norme NF 07-010 (AFNOR).

- un système d'acquisition et de traitement des données ;
- une imprimante.

En ce qui concerne la pompe, l'exactitude et la régularité du débit moyen seront contrôlés à l'aide d'un débitmètre et d'un chronomètre (instruments de mesure eux-mêmes certifiés). Un test de gradient peut être réalisé, dans un système binaire par exemple, basé sur la différence de transparence spectrale entre deux phases d'élution. La répétabilité d'injection et l'étude de contamination (vérification de l'absence de l'effet mémoire) constitueront les essais menés au niveau de l'injecteur. La vérification de la température de l'enceinte à colonne, thermostatée, sera réalisée à l'aide d'un thermomètre ou d'une sonde de température certifiés. La qualification du détecteur, dans l'exemple choisi, se fera par l'intermédiaire du contrôle des longueurs d'onde, de l'absence de lumière parasite. On s'assurera que le logiciel d'acquisition et de traitement des données est validé et que l'imprimante assure une présentation du chromatogramme en accord avec les coordonnées fixées.

À ce stade, une pondération dans la mise en place des contrôles et dans leur périodicité doit être effectuée. En effet, il ne s'agit pas de ne plus faire que des contrôles au détriment des analyses. Les opérations métrologiques immobilisent les chaînes chromatographiques ou tout instrument de mesure lors de leur qualification. À l'analyste de trouver l'adéquation entre une traçabilité suffisante de l'exactitude de ses mesures et un rendement satisfaisant pour le rendu des résultats d'analyse.

En pratique, il est nécessaire de mettre en place une vérification préliminaire systématique qui a pour objectif de s'assurer que l'instrument est prêt pour l'analyse. Pour cela,

injecter un mélange test permet de vérifier la conformité de la réponse aux spécifications. Ceci peut se faire quotidiennement avant toute analyse, alors que les tests de module se feront annuellement, par exemple. Il est évident que chaque module étant testé de façon aussi indépendante que possible de l'ensemble de l'instrument, ces contrôles ne peuvent être programmés trop souvent au détriment de l'obligation du résultat.

Une fois que la qualification métrologique a démontré la fiabilité du matériel, on peut passer à la partie analytique de la méthodologie.

L'échantillon analysé sera toujours assorti d'échantillons de référence, l'utilisation d'étalon étant indispensable pour vérifier que la mesure est la plus exacte possible. Ces échantillons de références sont délivrés par des organismes officiels nationaux ou internationaux, ils sont certifiés et délivrés avec un certificat d'analyse. La chaîne d'étalonnage pourra suivre le même schéma que celui présenté précédemment (Fig. 2). Nous sommes aussi souvent amenés à utiliser des solutions étalons certifiées pour calibrer l'appareillage avant chaque utilisation. Ces solutions doivent présenter des qualités métrologiques parfaitement définies [9,10].

En ce qui concerne la filiation des solutions étalons, une traçabilité parfaite doit être assurée pour pouvoir attribuer à tout dosage l'étalonnage lui correspondant et ceci, pendant toute la période d'archivage des résultats. Un codage et un enregistrement de toutes les solutions étalons préparés constitue l'assurance de cette traçabilité.

Lorsque le dosage du médicament est réalisé dans un but pharmacocinétique ou toxicologique les problèmes liés aux matrices biologiques doivent être pris en compte. Les critères de qualité auxquels doit répondre toute analyse sont davantage exacerbés, telles la stabilité dans le temps de l'échantillon, l'homogénéité de l'analyte à doser, enfin une concentration et une quantité suffisante pour réaliser plusieurs mesures. L'adhésion à des contrôles de qualité externes comme la participation à des analyses interlaboratoires permet de se situer dans l'échelle d'exactitude et d'apporter des corrections à ces systèmes de mesure, si nécessaire [11]. Quelle que soit la méthode d'évaluation utilisée, ne pas accumuler des résultats de contrôle sans étude systématique des déviations révélées et sans exploiter immédiatement les informations qui en découlent. Il faut, en effet, se servir de ces contrôles pour améliorer les performances

et peut-être redéfinir l'incertitude du résultat c'est-à-dire l'intervalle centré sur celui-ci et qui contient la valeur vraie.

Conclusion

La qualité d'une analyse fournie par un laboratoire se définit non seulement par sa qualité technique, mais aussi par sa qualité métrologique. L'amélioration de cette qualité passe par l'évolution vers une mesure de plus en plus présente et dont les résultats doivent plus que jamais être significatifs et compréhensibles. C'est ainsi que s'est dessinée la nécessité d'une éthique de diffusion des résultats de mesure. Au fur et à mesure des progrès technologiques, le sens de la mesure, l'esprit critique et le bon sens devant un résultat ont disparu. Il faut absolument combattre l'utilisation des chiffres non justifiés, par la formation à l'esprit métrologique en apprenant à évaluer l'incertitude liée à toute mesure, en recourant à chaque fois qu'elles existent à des références (étalons, solutions titrées,...). La confiance ne se mérite que si l'on agit conformément à une pratique normalisée ou certifiée qui assure l'exactitude et la reproductibilité des résultats et cette conformité n'est vérifiable que si l'on a mis en place une parfaite traçabilité.

Références

1. Neuilly, M.; Courtier, J. C. Vocabulaire de l'analyse - Erreurs et incertitudes de mesure, Techniques de l'Ingénieur, traité Analyse et Caractérisation, 1997, p 100.
2. Neuilly, M., Modélisation et calcul de l'incertitude d'un résultat de mesure, Techniques de l'Ingénieur, traité Analyse et Caractérisation, 1997, p 260.
3. Feinberg, M. In: La validation des méthodes d'analyse, Masson, Paris, 1996, p 397.
4. Leroy, M.; Boos, A.; Maier E. A.; Griepink B. Qualité et assurance qualité en chimie analytique, Techniques de l'Ingénieur, traité Analyse et Caractérisation, 1997, p 280.
5. AFNOR, Gérer et assurer la qualité, 6^{ème} édition, Paris 1996, p 703.
6. Gy P. Echantillonnage, Techniques de l'Ingénieur, traité Analyse et Caractérisation, 1998, p 220.
7. Régnault, J. *Ann. Fals. Exp. Chim.* **1995**, 88(930) 35-46.
8. Marschal, A. Matériaux de référence, Techniques de l'Ingénieur, traité Analyse et Caractérisation, 1995, p 240.
9. Mathé, D. *Analisis* **1991**, 19(1), i 30.
10. Revoil, M. *Analisis* **1991**, 19(1), i 28.
11. Feinberg, M. *Analisis* **1991**, 19(1), i 23.