

UNIVERSITE DE NANTES
FACULTE DE PHARMACIE

ANNEE 2007

THESE
pour le
DIPLOME D'ETAT
DE DOCTEUR EN PHARMACIE
par

Ségolène GUILLOTIN

Présentée et soutenue publiquement le 16 Janvier 2007

<p>Identification et dosage des monacolines dans la levure de riz rouge</p>
--

Président : - M. Jean-Michel Robert, Professeur de Pharmacochimie

Membres du Jury : - M. Jean-Marie Bard, Professeur de Biochimie
- Mme Corinne Civade, Pharmacien, Docteur d'Université,
Responsable de l'unité physico-chimie II

Sommaire

1 -	<i>Introduction générale</i>	11
2 -	<i>Bibliographie</i>	12
2.1	Apparition de la levure de riz rouge	12
2.2	Historique et utilisations de la levure de riz rouge	12
2.3	Compléments alimentaires à base de levure de riz rouge disponibles sur Internet	14
2.4	Efficacité	16
2.5	Indications	19
2.6	Effets indésirables et toxicité	20
2.7	Intérêt	21
2.8	Production de substances au cours de la fermentation	21
2.9	Analyse qualitative et quantitative de la levure de riz rouge	23
2.10	Méthodes analytiques exploitées pour la séparation et la quantification des monacolines dans la levure de riz rouge	28
2.11	Intérêt de rechercher la composition exacte de la levure de riz rouge	32
3 -	<i>Techniques de séparation chromatographique</i>	33
3.1	Généralités	33
3.2	Définitions	33
3.2.1	Chromatogramme	33
3.3	Données de rétention	34
3.3.1	Temps de rétention et volume de rétention	34
3.3.2	Coefficient de distribution massique	34
3.3.3	Coefficient de partage	35
3.4	Données chromatographiques	35
3.4.1	Pic	35
3.4.2	Facteur de symétrie	36
3.4.3	Performance d'une colonne et nombre apparent de plateaux théoriques	36

3.5	Données de séparation	37
3.5.1	Résolution	37
3.5.2	Rapport pic/vallée	37
3.5.3	Rétention relative	38
3.6	Fidélité de la quantification	39
3.6.1	Rapport signal/bruit	39
3.6.2	Répétabilité	40
3.7	Conformité du système	41
3.8	Ajustement des conditions chromatographiques	42
3.8.1	Composition de la phase mobile	42
3.8.2	pH du composant aqueux de la phase mobile	42
3.8.3	Concentration des sels du tampon entrant dans la composition de la phase mobile	42
3.8.4	Longueur d'onde de détection	42
3.8.5	Phase stationnaire	43
3.8.6	Débit	43
3.8.7	Température	43
3.8.8	Volume injecté	43
3.8.9	Gradient d'élution	43
3.9	Quantification	43
3.9.1	Réponse du détecteur	43
3.9.2	Utilisation d'un étalon externe	43
3.9.3	Utilisation d'un étalon interne	44
3.9.4	Procédé de normalisation	44
3.9.5	Fonction d'étalonnage	44

4 - *Caractéristiques de la lovastatine, molécule principale identifiée dans la levure de riz rouge* **45**

4.1	Spectres de référence de la lovastatine	47
4.1.1	Spectre ultra-violet	47
4.1.2	Spectre infrarouge	47
4.1.3	Spectre de masse	48

5 -	<i>Matériel et méthodes</i>	48
5.1	Principe	48
5.2	Réactifs	48
5.3	Matériels et verrerie	49
5.4	Substances	49
5.5	Equipement	49
6 -	<i>Mise au point de la méthode</i>	50
6.1	Choix de la température d'extraction	50
6.1.1	Principe	50
6.1.2	Résultats	50
6.1.3	Conclusion	54
6.2	Choix du nombre d'extractions	54
6.2.1	Principe	54
6.2.2	Résultats	55
6.2.3	Conclusion	55
6.3	Choix d'une méthode d'extraction spécifique	55
6.3.1	Définition et présentation du système SPE (Solid Phase Extraction)	55
6.3.2	Principe et mise en oeuvre	57
6.3.3	Résultats	59
6.3.3.1	Extraction sur colonne de silice à chaud (60°C)	59
6.3.3.1.1	Analyse solution 1 (extrait)	59
6.3.3.1.2	Analyse solution 2 (éluat)	60
6.3.3.1.3	Conclusion de l'extraction sur colonne de silice à chaud (60°C)	60
7 -	<i>Conditions opératoires retenues</i>	61
7.1	Conditions chromatographiques	61
7.2	Préparations des échantillons et conditions d'extraction	61
8 -	<i>Identification des monacolines présentes dans la levure de riz rouge et dosage de la lovastatine</i>	62
8.1	Principe	62

8.2	Analyse du produit	62
8.2.1	Caractéristiques du produit	62
8.2.2	Composition qualitative et quantitative des monacolines dans la poudre de levure de riz rouge	63
8.2.2.1	Tableau récapitulatif	63
8.2.2.2	Dosage de la lovastatine	66
8.2.3	Analyse chromatographique et des spectres UV	68
8.2.3.1	Introduction	68
8.2.3.2	Analyse chromatographique	68
8.2.3.3	Analyse des spectres UV	69
8.2.3.4	Conclusion	72
9 -	<i>Eléments de validation de la méthode</i>	73
9.1	Introduction	73
9.2	Limite de détection (LoD) et de quantification (LoQ)	73
9.2.1	Définitions	73
9.2.1.1	Limite de détection	73
9.2.1.2	Limite de quantification	74
9.2.2	Méthodes disponibles	74
9.2.2.1	Approche « résultats »	74
9.2.2.1.1	Méthode 1 : Lecture directe de n mesures (réponse ou grandeur de l'analyte) de blancs d'analyse indépendants sur des échantillons contenant l'ensemble des constituants, à l'exception de la substance à rechercher.	74
9.2.2.1.2	Méthode 2 : Utilisation de la droite d'étalonnage : $Y = a + bx$	74
9.2.2.2	Approche graphique	75
9.2.2.2.1	Méthode du h_{max}	75
9.2.2.2.2	Méthode du h_{moyen}	76
9.2.3	Méthodologies testées	78
9.2.3.1	Préparations des solutions	78
9.2.4	Résultats	78
9.2.4.1	Limite de détection	78
9.2.4.1.1	Approche graphique	78
9.2.4.1.2	Approche par utilisation de la droite d'étalonnage	79
9.2.4.2	Limite de quantification	80
9.2.4.2.1	Approche graphique	80
9.2.4.2.2	Approche par utilisation de la droite d'étalonnage	80

9.2.5	Conclusion	81
9.2.5.1	Limite de détection	81
9.2.5.2	Limite de quantification	81
9.2.6	Répétabilité d'injection de la LoQ	81
9.2.6.1	Méthodologie	81
9.2.6.2	Résultats	82
9.3	Linéarité	84
9.3.1	Définition	84
9.3.2	Méthode	84
9.3.3	Résultats	85
9.3.3.1	J1	85
9.3.3.2	J2	85
9.3.3.3	J3	86
9.3.4	Etude statistique de la linéarité	86
9.3.4.1	Introduction	86
9.3.4.2	Comparaison des droites sur 3 jours de validation	86
9.3.4.3	Test de l'homogénéité des variances (test de COCHRAN)	89
9.3.4.4	Test de l'existence d'une pente significative (test de FISHER)	89
9.3.4.5	Test de validité de la droite (test de FISHER)	89
9.3.5	Conclusion	89
9.4	Fidélité	89
9.4.1	Définition	89
9.4.2	Répétabilité de l'injection	90
9.4.2.1	Définition	90
9.4.2.2	Méthode	90
9.4.2.3	Résultats	90
9.4.2.3.1	J1	90
9.4.2.3.2	J2	90
9.4.2.3.3	J3	91
9.4.2.4	Conclusion	91
9.4.3	Répétabilité de la préparation	91
9.4.3.1	Définition	91
9.4.3.2	Méthode	91
9.4.3.3	Résultats	92
9.4.3.3.1	J1	92
9.4.3.3.2	J2	92
9.4.3.3.3	J3	93

9.4.4	Conclusion	93
9.4.5	Fidélité intermédiaire	93
9.4.5.1	Définition	93
9.4.5.2	Méthode	93
9.4.5.3	Résultats	93
9.4.5.4	Conclusion	94
9.4.6	Etude statistique de la fidélité	95
9.4.6.1	Introduction	95
9.4.6.2	Recherche de valeurs aberrantes (test de DIXON)	95
9.4.6.3	Test de l'homogénéité des variances (test de COCHRAN)	95
9.4.6.4	Coefficients de variation de répétabilité et de fidélité intermédiaire	95
9.4.7	Conclusion	95
9.5	Stabilité	96
9.5.1	Définition	96
9.5.2	Méthode	96
9.5.3	Résultats	96
9.5.4	Conclusion	97
9.6	Étude de l'effet matrice, méthode des ajouts dosés	97
9.6.1	Principe	97
9.6.2	Résultats	97
9.6.3	Conclusion	101
10 -	Conclusion	102
11 -	Annexes	106
	Annexe 1 : Recommandation ICH. Validation des procédures analytiques : Q2A	107
	Annexe 2 : Recommandation ICH. Validation des procédures analytiques : Q2B. Méthodologie	114
	Annexe 3 : Calcul de la limite de détection (LoD) et de quantification (LoQ) par mode graphique	125
	Annexe 4 : Calcul de la limite de détection (LoD) et de quantification (LoQ) par extrapolation de la droite d'étalonnage	128
	Annexe 5 : Analyse statistique (logiciel AVA)	131
	Annexe 6 : Chromatogrammes – Etude de stabilité de la lovastatine	152

Table des illustrations

Liste des tableaux

Tableau 1 : Produits à base de levure de riz rouge disponibles sur Internet _____	16
Tableau 2 : Résumé des études cliniques montrant des effets hypocholestérolémiants de la levure de riz rouge _____	18
Tableau 3 : Composition de la levure de riz rouge (Ma et al., 2000) _____	23
Tableau 4 : Monacolines identifiées et produites dans la levure de riz rouge _____	24
Tableau 5 : Composition du complément alimentaire chinois à base de levure de riz rouge : Cholestin® _____	24
Tableau 6 : Composition de la levure de riz rouge (Li et al., 2004) _____	26
Tableau 7 : Quantification de la monacoline K dans la poudre de levure de riz rouge dans différentes régions de Chine (Huang et al, 2006) _____	28
Tableau 8 : Résumé des techniques d'identification et de quantification _____	31
Tableau 9 : Exigences concernant la répétabilité _____	41
Tableau 10 : Réactifs utilisés _____	48
Tableau 11 : Substances employées _____	49
Tableau 12 : Résultats des extractions de la levure de riz rouge à chaud (60°C) et avec refroidissement (< 10°C) _____	53
Tableau 13 : Résultat solution 1 _____	59
Tableau 14 : Résultat solution 2 _____	60
Tableau 15 : Conditions chromatographiques de la LC/PDA utilisée dans cette étude _____	61
Tableau 16 : Composition qualitative et quantitative en monacolines de la poudre de levure de riz rouge. Tableau récapitulatif des 6 extractions. _____	65
Tableau 17 : Masses obtenues de poudre de levure de riz rouge _____	67
Tableau 18 : Résultats des différentes dilutions de lovastatine _____	78
Tableau 19 : Détermination de la dilution de la LoD _____	79
Tableau 20 : Détermination de la dilution de la LoQ _____	80
Tableau 21 : Résultats de la répétabilité d'injection de la LoQ _____	82
Tableau 22 : Table de Dixon _____	83
Tableau 23 : Résultats de la répétabilité de l'injection après élimination de la valeur aberrante par le test de Dixon _____	83
Tableau 24 : Concentrations en lovastatine à J1 (50 %, 75 %, 100 %, 125 % et 150 %) _____	85
Tableau 25 : Concentrations en lovastatine à J2 (50 %, 75 %, 100 %, 125 % et 150 %) _____	85
Tableau 26 : Concentrations en lovastatine à J3 (50 %, 75 %, 100 %, 125 % et 150 %) _____	86

<i>Tableau 27 : Paramètres de la droite de régression</i>	87
<i>Tableau 28 : Répétabilité de l'injection à J1</i>	90
<i>Tableau 29 : Répétabilité de l'injection à J2</i>	90
<i>Tableau 30 : Répétabilité de l'injection à J3</i>	91
<i>Tableau 31 : Répétabilité de la préparation à J1</i>	92
<i>Tableau 32 : Répétabilité de la préparation à J2</i>	92
<i>Tableau 33 : Répétabilité de la préparation à J3</i>	93
<i>Tableau 34 : Fidélité intermédiaire</i>	94
<i>Tableau 35 : Concentrations en levure de riz rouge et en lovastatine</i>	97
<i>Tableau 36 : Résultats obtenus avec la méthode des ajouts dosés</i>	97

Liste des figures

Figure 1 : Structure de l'HMG-CoA Réductase (Les presses de l'Université de Montréal, 2006)	16
Figure 2 : Mode d'action des statines sur la chaîne de formation du cholestérol	17
Figure 3 : Structure de la citrinine	22
Figure 4 : Données structurales des monacolines dans la poudre de levure de riz rouge (Li et al., 2004)	25
Figure 5 : Profil chromatographique et spectres UV des monacolines dans la levure de riz rouge (Li et al., 2004)	26
Figure 6 : Monographie de la lovastatine	46
Figure 7 : Spectre ultraviolet de la lovastatine	47
Figure 8 : Spectre Infrarouge de la lovastatine	47
Figure 9 : Spectre de masse de la lovastatine	48
Figure 10 : Cartouches S.P.E. (Sigma-Aldrich, 2006)	56
Figure 11 : Principe général d'élution (Sigma-Aldrich, 2006)	56
Figure 12 : Système S.P.E. (Solid Phase Extraction, 2006)	57
Figure 13 : Procédé d'extraction	58
Figure 14 : Profil chromatographique de l'extrait après passage sur colonne SPE à base de silice	59
Figure 15 : Profil chromatographique de l'éluat après passage sur colonne SPE à base de silice	60
Figure 16 : Teneur moyenne en lovastatine dans la poudre de levure de riz rouge. Feuille de calcul.	66
Figure 17 : Chromatogramme obtenu avec l'extraction de la poudre de levure de riz rouge (Fidélité J1, extraction 2)	68
Figure 18 : Chromatogramme de référence (Li et al., 2004)	68
Figure 19 : Spectres UV correspondant à l'extraction 2 de la fidélité à J1	70
Figure 20 : Spectre ultraviolet de la lovastatine (Huang et al, 2006)	70
Figure 21 : Spectres UV des 5 monacolines principales	71
Figure 22 : Structure des monacolines K, K acide, M, X et la DMK.	72
Figure 23 : Détermination de la LoD et de la LoQ par la méthode du h_{max}	75
Figure 24 : Détermination de la LoD et de la LoQ par la méthode du h_{moyen}	76
Figure 25 : Validation des calculs de limites. Concentration du composé proche du H_{moyen}	77
Figure 26 : Validation des calculs de limites. Concentration du composé comprise entre le H_{moyen} et le H_{max}	77
Figure 27 : Dilutions de lovastatine	78
Figure 28 : Droite d'étalonnage	79
Figure 29 : Linéarité de la lovastatine à J1	85
Figure 30 : Linéarité de la lovastatine à J2	85
Figure 31 : Linéarité de la lovastatine à J3	86
Figure 32 : Droite de régression	87
Figure 33 : Graphique des résidus de régression	88
Figure 34 : Chromatogramme lovastatine à 100 %	98
Figure 35 : Chromatogramme Gélule de poudre de levure de riz rouge – Dilution au demi	99
Figure 36 : Chromatogramme Gélule + ajout de lovastatine	100

Liste des abréviations

ACN: acétonitrile
Afsaps : Agence Française de sécurité Sanitaire des produits de Santé
C.L.H.P. : Chromatographie Liquide Haute Performance
CT: Cholestérol total
D.L.C. : Direction des laboratoires et des Contrôles
DMK : déhydromonacoline K.
DML: dihydromonacoline L
ESI: electrospray ionization
HDL: High-Density Lipoprotein
HDML: 3 α -hydroxy-3:5-dihydromonacoline L
I.C.H. : International Conference of Harmonization
LC : Liquid Chromatography
LDL: Low-Density Lipoprotein
LoD : Limit of Detection
LoQ: Limit of Quantification
LRR: Levure de Riz Rouge
MJ : monacoline J
MJA : monacoline J forme acide
MK : monacoline K
MKA : monacoline K forme acide
ML : monacoline L
MLA : monacoline L forme acide
MM : monacoline M
MMA : monacoline M forme acide
MS : mass spectrometry
MX : monacoline X
MXA : monacoline X forme acide
P.D.A. : Photo-Diode Array
P1 : compactine
S.P.E. : Solid Phase Extraction
SCR : Substance Chimique de Référence
SIC : Selective Ion Chromatograms
TFA: Trifluoroacetic acid
TIC: Total Ion Current
TR: Temps de rétention
TRR: Temps de Rétention relatif

1 - Introduction générale

Le contrôle des produits de santé tel que les médicaments, les dispositifs médicaux, les produits biologiques d'origine humaine, les produits cosmétiques et les compléments alimentaires, est de la responsabilité de la Direction des Laboratoires et des Contrôles (D.L.C.) qui fait partie intégrante de l'Afssaps (Agence Française de Sécurité Sanitaire des Produits de Santé).

La D.L.C. exerce deux types de missions complémentaires, d'une part l'évaluation et la réglementation relative à l'élaboration de la pharmacopée, d'autre part le contrôle en laboratoire des produits de santé, opéré en urgence ou en situation programmée, dans un contexte européen de libération de lots, dans le cadre de la recherche et développement ou de la surveillance du marché national.

Ainsi, les compléments alimentaires présents sur le marché doivent faire l'objet de contrôles rigoureux afin d'assurer leur entière innocuité vis à vis des consommateurs. Le produit à l'étude est dénommé Red yeast rice (levure de riz rouge). Il s'agit d'un « médicament traditionnel » utilisé pour le bien-être de la santé. Ce complément alimentaire contient 60 gélules dosées à 500 mg en *Monascus purpureus*. La posologie est de 1 à 2 gélules 2 à 3 fois par jour pendant les repas. Ce complément alimentaire à base de levure de riz rouge a fait l'objet d'une attention toute particulière. En effet, il a été démontré que la levure de riz rouge contenait des composés actifs appelés monacolines ou statines. Ces molécules seraient en effet à l'origine d'une activité hypocholestérolémiante. Les monacolines ou statines sont présentes néanmoins à des doses largement plus faibles que celles contenues dans les médicaments à base de statines. Mais, une consommation excessive de ce complément alimentaire peut être à l'origine des mêmes effets que les statines « médicamenteuses ».

L'objectif de cette étude est d'identifier et de quantifier les monacolines présentes dans la levure de riz rouge. Ainsi, la première partie présentera tout d'abord les données bibliographiques recensées sur la levure de riz rouge ainsi que les généralités sur les techniques de séparation chromatographique. Les deuxièmes et troisièmes parties exposeront respectivement le développement ainsi que l'identification des monacolines dans la levure de riz rouge et le dosage de la monacoline principale. Et enfin, la quatrième partie abordera la validation de la méthode.

2 - Bibliographie

2.1 Apparition de la levure de riz rouge

L'hyperlipidémie est un facteur de risque important dans la survenue de pathologies tel que l'athérosclérose, les maladies coronariennes et les pathologies vasculaires et cérébrales. La diminution de l'hyperlipidémie a prouvé qu'elle réduisait la morbi-mortalité associées aux pathologies vasculaires et cérébrales (Wang *et al.*, 1997 ; Li *et al.*, 1998 ; Miao & Metcalfe, 2003 ; Ertürk *et al.*, 2003).

Parmi les actuels agents hypolipémiants, les inhibiteurs de l'HMG-CoA réductase (3-hydroxy-3-méthylglutaryl coenzyme A hépatique) sont efficaces pour diminuer le cholestérol total (CT) et le cholestérol stocké au niveau des LDL (Low-Density Lipoprotein) (Miao & Metcalfe, 2003 ; Ertürk *et al.*, 2003). Néanmoins, le coût très élevé de ces médicaments et leurs disponibilités limitées pour la majorité de la population chinoise ont incité la recherche médicale chinoise à chercher de nouveaux agents hypolipémiants. La médecine traditionnelle chinoise ayant produit une bibliothèque d'herbes actives à travers les siècles, il serait raisonnable d'examiner si un complément alimentaire hypolipémiant pourrait être identifié dans cette bibliothèque. Après une recherche approfondie, le riz fermenté avec *Monascus purpureus* fut découvert en tant qu'herbe efficace pour diminuer le cholestérol et les triglycérides chez les animaux (Li *et al.*, 1998). Ses effets hypolipémiants, confirmés par de nombreuses études cliniques (Heber *et al.*, 1999, Keithley *et al.*, 2002 ; Wang *et al.*, 1997), seraient probablement partiellement dus à la présence d'inhibiteurs de l'HMG-CoA réductase (Ma *et al.*, 2000).

2.2 Historique et utilisations de la levure de riz rouge

La levure de riz rouge est obtenue par fermentation d'une levure communément appelée *Monascus purpureus* sur du riz rouge stérile et humide (Huang *et al.*, 2006). Ce produit solide de fermentation du riz par *Monascus* a une longue tradition dans les pays asiatiques de l'est qui date au moins du premier siècle après JC (Erdogrul & Azirak, 2004). Largement utilisé dans l'alimentation chinoise, la levure de riz rouge est un exemple de l'alimentation traditionnelle consommé à travers l'Asie. Ses propriétés alimentaires, culinaires et médicales datent de plus d'un millier d'années et son usage documenté fut enregistré au 8^{ème} siècle après JC (Ma *et al.*, 2000). Depuis des siècles, les produits de riz fermentés tel que la levure de riz rouge ont été consommés en Asie et Indonésie comme aliments de base et additifs alimentaires.

En chine, la levure de riz rouge est appelée Ang Khak ou Hong Qu. Au Japon, la levure de riz rouge est connue sous le nom de « beni-koji », « Hongqu » (Ma *et al.*, 2000), « Koji, Ang-Khak », « Red-Koji » et son pigment est largement utilisé en tant que colorant alimentaire ; en Europe, elle est dénommée « Rotschimmerreis » et aux USA « the red mold » (Erdogru & Azirak, 2004).

La levure de riz rouge a aussi été utilisée en Chine, à Taiwan, à Okinawa et aux Philippines comme conservateur pour la viande et le poisson, pour accentuer la couleur et le goût des aliments, et même pour le vin brassé et la liqueur. De plus, la levure de riz rouge est aussi citée dans l'ancienne Pharmacopée chinoise des aliments et herbes médicinales, « The Ben Cao Gang Mu-Dan Shi Bu Yi » de Li Shi-zhen publié durant la dynastie Ming (1368-1644), où elle est décrite en tant que remède utile pour améliorer la digestion, revitaliser le sang (Heber *et al.*, 1999 ; Ma *et al.*, 2000 ; Li *et al.*, 2005 ; Huang *et al.*, 2006) et aussi pour stimuler la rate (Li *et al.*, 1998). Un effet bénéfique est traditionnellement attribué à ce produit dans le livre de médecine chinoise publié à Beijing par Li, Shin-Chum (1590). Les premiers comptes-rendus de cette moisissure apparurent il y a plus de 2000 ans dans la monographie par Li-Shin-Chun (1590). Ce livre décrit l'utilisation d'un pigment en tant qu'agent colorant et en tant que médicament dans le traitement de nombreuses maladies.

Aujourd'hui, cette moisissure est encore utilisée pour ses propriétés colorantes et aromatisantes, dans l'industrie alimentaire de beaucoup de pays asiatiques pour la préparation industrielle de produits de volaille, de poisson et de viandes (Ma *et al.*, 2000). Elle est principalement utilisée comme additif alimentaire, en particulier pour la viande comme conservateur et condiment. Son usage dans l'industrie de vin de riz est due à sa haute teneur en alpha-amylase qui favorise la conversion de l'amidon en glucose. L'attractive couleur rouge du vin de riz provient des pigments appartenant à *Monascus*. *Monascus* est devenu connu en Europe en 1884 à travers les travaux d'un scientifique hollandais, Van Tieghem (Ma *et al.*, 2000) qui observa l'usage de la moisissure de riz rouge à travers la population en Java. Ils ont isolé et rangé de nombreuses espèces botaniques du genre *Monascus*. L'espèce isolée du riz rouge fut appelée *Monascus purpureus* Went en 1895 en raison de sa couleur violette /rouge (Went, 1895). C'est donc la levure qui est rouge et non le riz.

Historiquement, dans les années 90, les compagnies de compléments alimentaires ont commercialisé un extrait de levure de riz rouge capable de diminuer le cholestérol de manière aussi efficace que les statines médicamenteuses. Ensuite, l'industrie Merck & Co, de renommée mondiale, a isolé une statine, la monacoline K connue sous le nom de mevinline ou lovastatine produite par un champignon microscopique *Aspergillus terreus* (Merck & Co, 2006) et en a conçu un médicament en 1987 (Pharmaceutiques : Santé, médicament et industrie, 2006) connu sous le nom de Mevacor® (Heber *et al.*, 2001).

Une bataille s'en est suivie entre Merck & Co., industrie pharmaceutique fabricant le Mevacor® (lovastatine), la F.D.A. (Food and Drug administration) et Pharmanex, Inc., le fabricant de la levure de riz rouge sous le nom de Cholestin® qui contient naturellement la présence de lovastatine (le produit chinois s'appelle Xuezhikang). Cette bataille a fait la lumière sur la possibilité que la présence naturelle d'inhibiteurs de l'HMG-CoA réductase tels que la lovastatine, peut avoir une utilité clinique. En conséquence, le 20 mai 1998, la F.D.A. a annoncé que le Cholestin® n'était pas un complément alimentaire, mais plutôt un médicament non agréé selon la F.F.D.C.A. (Federal Food, Drug and Cosmetic Act) (US Department of Health and Human Services, Food and Drug Administration, 2006). Ainsi, les compléments alimentaires de levure de riz rouge ont été retirés du marché aux Etats-Unis. Pharmanex®, Inc., le fabricant du Cholestin®, a récusé cette décision au Tribunal du District Fédéral, qui (selon un communiqué de presse) a fourni une décision préliminaire le 16 juin 1998, déclarant officiellement que le Cholestin® est un complément alimentaire et non un médicament (Havel RJ, 1999). Au printemps 2001, la FDA a interdit la vente de tout complément alimentaire contenant la levure de riz rouge ou Xuezhikang. Le Cholestin® échoua à se conformer à la D.S.H.E.A. (Dietary Supplement and Health Education Act) étant donné qu'il était supposé contenir un composé actif équivalent à la statine commercialisée sous le nom Mevacor® (lovastatine) (Journoud & Jones, 2004).

Actuellement, on peut donc se procurer des compléments alimentaires via internet (Raysahelian, 2006) mais la plupart des compagnies commercialisant des compléments alimentaires à base de levure de riz rouge ont été contraint de la remplacer par d'autres composés tel que les flavones, le géraniol, des acides gras essentiels (EPA et DHA) mais en modifiant quelque peu les revendications de départ c'est-à-dire que ce complément alimentaire aide à maintenir le taux de cholestérol à une valeur normale et supporte les fonctions cardiovasculaires (Pharmanex, 2006) mais il reste toujours possible de se procurer des compléments alimentaires à base de levure de riz rouge par de nombreuses compagnies sur Internet, en parapharmacie ou dans les magasins spécialisés.

2.3 Compléments alimentaires à base de levure de riz rouge disponibles sur Internet

Le tableau ci-dessous présente les différents compléments alimentaires à base de levure de riz rouge disponibles sur Internet (Tableau 1). Il est également possible de se procurer ces compléments alimentaires via les circuits de distribution tels que la pharmacie ou la parapharmacie ; la pharmacie constituant désormais un circuit de distribution privilégié pour les compléments alimentaires (La lettre d'info de l'officine, 2006). La composition, le conditionnement, la marque et le lieu de vente y sont notamment précisés.

Nombre de produits	Dénomination	Composition et dosage	Conditionnement	Marque	Site Internet	Prix
1	LRR	600 mg 1 à 2 gélules/j	60 gélules	Nature's Plus	Bio-forme-online.com	30,84 €
	LRR	600 mg 1 gélule/j Monascus purpureus standardisé à 1,7 %	60 gélules	Nature's Plus	Natural distribution	?? €
2	LRR AP	600 mg 1 cp/j le matin	30 cps	Nature's plus	Bio-forme-online.com	30,84 €
	LRR AP	600 mg 1 cp/j le matin	30 cps	Nature's plus	Nature et Bio	31,70 €
	LRR AP	600 mg 1 cp/j le matin	30 cps	Nature's plus	Para-dstock.com	31,70 €
	LRR AP	600 mg (Monascus purpureus standardisé à 1,7 %) 1 cp/j le matin	30 cps	Nature's plus	Biocenter	32,15 €
	LRR AP	600 mg 1 cp/j le matin	30 cps	Nature's plus	NaturShop	31,18 €
	LRR AP	600 mg 1 cp/j le matin	30 cps	Nature's plus	Natural Forme	37,80 €
	LRR AP	600 mg 1 cp/j le matin	30 cps	Nature's plus	Nature's plus	30,84 €
	LRR AP	600 mg (Monascus purpureus standardisé à 1,7 %) 1 cp/j le matin	30 cps	Nature's Plus	Natural Distribution	??
3	LRR/gugulipide	600 mg 1 gélule le matin	60 gélules	Nature's Plus	Bio-forme-online.com	25,50 €
	LRR		45 gélules	Solaray	L'esprit Chat Para-dstock.com	22,50 €
4	LRR Plus CoQ10		60 gélules	Solaray	L'esprit Chat	58 €
	LRR Plus CoQ10		60 capsules	Solaray	Vitalprix.com	57 €
5	LRR Plus CoQ10		60 gélules	Noria	NaturShop	46,26
6	LRR	250 mg : LRR : 225 mg (0,5 lovastatine) Extrait de LRR : 25 mg (10 % monacoline) *	120 gélules	Boutique Nature	Edden	20,60 €
	LRR	250 mg : LRR : 225 mg (0,5 lovastatine) Extrait de LRR : 25 mg (10 % monacoline)*	120 gélules	Boutique Nature	Natural Forme	20,60 €
	LRR	250 mg : LRR : 225 mg (0,5 lovastatine) Extrait de LRR : 25 mg (10 % monacoline) *	270 gélules	Boutique Nature	Edden	39,90 €
	LRR	250 mg : LRR : 225 mg (0,5 lovastatine) Extrait de LRR : 25 mg (10 % monacoline) *	270 capsules	Boutique Nature	Edden	27,90 €
	LRR	250 mg : LRR : 225 mg (0,5 lovastatine) Extrait de LRR : 25 mg (10 % monacoline) *	270 gélules	Boutique Nature	Natural Forme	39,90 €
	LRR	250 mg : LRR : 225 mg (0,5 lovastatine) Extrait de LRR : 25 mg (10 % monacoline) *	270 gélules	Boutique Nature	Vitalprix.com	32,00 €
	LRR	250 mg : LRR : 225 mg (0,5 lovastatine) Extrait de LRR : 25 mg (10 % monacoline) *	270 gélules	Boutique Nature	monMarchand.com	32,00 €
7	LRR	600 mg 2 à 3 gélules/j au cours des principaux repas	60 gélules	ephyto	Ephyto.com	24,90 €
	LRR	600 mg 2 à 3 gélules/j au cours des principaux repas	180 gélules	ephyto	Ephyto.com	59 €
8	Riz rouge Plus			Dermaforme	Dermaforme	14,37 €
9	LRR	LRR et extrait de LRR 3 gélules/j au cours des repas	60 gélules dosées à 250 mg	Laboratoire Pierre Caron	Pierre-caron.com	10 €
	LRR	LRR et extrait de LRR 3 gélules/j au cours des repas	150 gélules dosées à 250 mg	Laboratoire Pierre Caron	Pierre-caron.com	?? €
10	LRR	600 mg extrait de LRR 1 cp 1 à 3 fois/j de préférence au cours des repas	30 cps	Vit'all +	Vitalplus.com	

Nombre de produits	Dénomination	Composition et dosage	Conditionnement	Marque	Site Internet	Prix
11	LRR	250 mg : LRR : 225 mg (0,5 lovastatine) Extrait de LRR : 25 mg (10 % monacoline) 1 gélule avant chacun des principaux repas avec un grand verre d'eau	120 gélules	Sens Nature	Sens-nature	20,60 €
12	LRR	300 mg par gélule	200 gélules	Dieti Natura	Dieti-natura.com	9 €
	LRR	300 mg par gélule	60 gélules	Dieti Natura	Dieti-natura.com	??? €
13	Moduchol	Policosanol, LRR, guggulipide, stérols, stérolines, inositol hexanicotinate	90 gélules	Laboratoire Vienergie	Medecine-autrement.com	59 €
14	Choledrene	3 capsules /j	90 cps	Hi-Tech Pharmaceuticals	Beauteetdiete.com	

Tableau 1 : Produits à base de levure de riz rouge disponibles sur Internet

Légende :

LRR = Levure de riz rouge

AP : Action prolongée

* 1 gélule avant chacun des 3 principaux repas avec un grand verre d'eau. Une portion journalière apporte 7,5 mg de lovastatine lactone et 2,7 mg de lovastatine hydroxy-acide.

Les revendications citées pour ces produits sont les suivantes:

- Protection du système cardio-vasculaire contre les mauvaises graisses ;
- Favorise le bon état cardio-vasculaire ;
- Régulation du cholestérol.

2.4 Efficacité

Comme exposé précédemment, la levure de riz rouge joue un rôle double: alimentaire et médical. D'une part, elle est largement utilisée en tant que colorant, aromatisant, additif, conservateur, condiment et dans l'industrie du vin de riz. D'autre part, elle contient un certain nombre de substances, appartenant à la famille des monacolines et comprenant entre autre la monacoline K, qui ont mis en exergue une activité hypocholestérolémiant (Li *et al.*, 2004 ; Heber *et al.*, 2001, Huang et al, 2006). Ceci, serait en partie le résultat de l'inhibition de l'HMG-CoA réductase (Li *et al.*, 2005 ; Istvan & Deisenhofer, 2001). La structure de cette enzyme est présentée ci-dessous (Figure 1) (Les presses de l'Université de Montréal, 2006).

HMG-CoA :

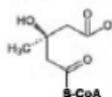


Figure 1 : Structure de l'HMG-CoA Réductase (Les presses de l'Université de Montréal, 2006)

Les monacolines contenues dans la levure de riz rouge sont des statines d'origine naturelle agissant comme des inhibiteurs compétitifs de l'HMG-CoA réductase qui convertit l'HMG-CoA en acide mévalonique, étape préliminaire et déterminante dans la biosynthèse du cholestérol (Heber *et al.*, 2001 ; Istvan & Deisenhofer, 2001). Cette inhibition diminue la biosynthèse intracellulaire du cholestérol, ce qui entraîne une augmentation de la production, par transcription, de l'HMG-CoA réductase et des récepteurs hépatiques LDL (Figure 2) (Les presses de l'Université de Montréal, 2006).

La figure 2 montre la chaîne de formation du cholestérol à partir de l'acétyl-Coenzyme A et le blocage grâce aux statines au niveau de l'intermédiaire mévalonate.

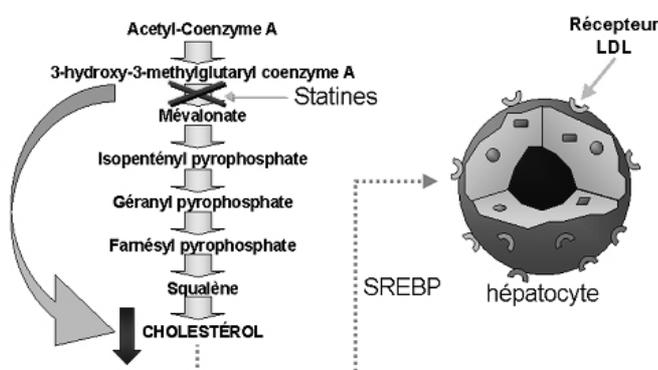


Figure 2 : Mode d'action des statines sur la chaîne de formation du cholestérol
(Les presses de l'Université de Montréal, 2006)

Cette activité inhibitrice a été démontrée par de nombreuses études cliniques.

En effet, des études sur lapins et cailles ont montré une diminution des concentrations en cholestérol de 44% et 59% aux doses de 0.4 et 0.8 mg/kg respectivement. (Li *et al.*, 1998 ; Heber *et al.*, 1999). L'athérosclérose fut significativement réduite chez les lapins et les cailles présentant une hyperlipidémie, induite soit par un régime riche en graisse soit par consommation de caséine, et traités par le riz fermenté avec *Monascus purpureus* (Wang *et al.*, 1997 ; Li *et al.*, 1998). Des études sur souris et rats ont également été réalisées (Li, 1995; Zhu, 1998; Heber *et al.*, 1999).

3 études cliniques menées sur des hommes ont été conduites en Chine parallèlement à celles réalisées sur animaux. Les résultats escomptés de ces études cliniques sont une diminution du cholestérol total (CT), une diminution du LDL-c (Low Density Lipoprotein-cholesterol) qui représente le mauvais cholestérol, une augmentation du HDL-c (High Density Lipoprotein-cholesterol) qui représente le bon cholestérol et une diminution des triglycérides.

La première étude comprenait 446 patients avec une hyperlipidémie ayant reçu le Xuezhikang pendant 8 semaines. Après 8 semaines de traitement, le CT a diminué de 22.7 %, le LDL-c de 30.9% et les TG de 34.1%. Quant aux HDL-c, une augmentation de 19.9 % a été relevée (Wang *et al.*, 1997).

Dans une deuxième étude menée sur 83 patients, les résultats obtenus ont été les suivants : diminution significative du cholestérol total entre la ligne de base et 8 semaines de traitement dans le groupe traité en comparaison avec le groupe placebo (↓ 16.8 %), différence significative pour le LDL-c (↓ 22.3 %) et les triglycérides (↓ 13.3 %) mais pas pour le HDL-c (Heber *et al.*, 1999).

Enfin, dans une récente étude, 12 patients sidéens ont consommé la levure de riz rouge à raison de 2,4 g/j. Les résultats ont été les suivants : une diminution de 13,4 % en CT et une diminution de 25,1 % en LDL-c. Les TG et le HDL-c n'ont subi aucunes variations (Keithley, 2002).

Le tableau 2 ci-après résume les différents résultats obtenus tel que le design de l'étude, les doses utilisées et les modifications lipidiques rencontrées.

Auteurs	Design de l'étude	Dose	CT	LDL-c	TG	HDL-c
Wang et al., 1997 - 1 ^{ère} étude clinique -	Hommes, randomisation en simple aveugle, groupe contrôle positif, n = 446	1.2 g/j	P : ↓ 7 % T : ↓ 22.7 %	P : ↓ 15.3 % T : ↓ 30.9 %	P : ↓ 12.8 % T : ↓ 34.1 %	P : ↑ 8.4 % T : ↑ 19.9 %
Li et al., 1998 - Etude sur animaux -	Animaux, in vivo : 44 lapins et 10 caillies	0.2 g/kg/j 0.4 g/kg/j 0.8 g/kg/j	↓ 45 % ↓ 43 % ↓ 59 %	- ↓ 44 % ↓ 44 %	- ↓ 43.2 % ↓ 43.2 %	↔
Heber et al., 1999 - 2 ^{ème} étude -	Hommes, randomisation en double aveugle, groupe placebo, n = 83	2.4 g/j	P : ↔ T : ↓ 16.8 %	P : ↔ T : ↓ 22.3 %	P : ↔ T : ↓ 13.3 %	↔
Keithley et al., 2002 - 3 ^{ème} étude -	Hommes, étude pilote chez patients sidéens, randomisation en double aveugle, groupe placebo, n = 12	2.4 g/j	P : ↑ 4.1 % T : ↓ 13.4 %	P : ↑ 25.1 % T : ↓ 25.1 %	↔	↔

Tableau 2 : Résumé des études cliniques montrant des effets hypocholestérolémiants de la levure de riz rouge
D'après Journoud & Jones, 2004)

Légende :

P : Groupe placebo

T : Groupe traité

↔ : Pas d'effets significatifs observés

CT: Cholestérol total

LDL-c: Low-Density Lipoprotein – cholesterol

TG: triglycerides

HDL-c: High-Density Lipoprotein – cholesterol

Commentaires sur les principales études cliniques mettant en évidence l'effet de la levure de riz rouge :

En 1997, l'équipe de Wang, a mis en évidence des effets significatifs avec la levure riz rouge à une dose de 1,2 g/j sur les paramètres lipidiques tels que le cholestérol total, le LDL-cholestérol, le HDL-cholestérol et les triglycérides. Cette étude trouve son intérêt dans le nombre de volontaires utilisés (n = 446). En effet, un nombre important de sujets permet d'assurer l'exactitude des résultats constatés. Néanmoins, deux inconvénients sont à mettre en exergue. D'une part, cette étude est menée en simple aveugle c'est-à-dire que le médecin connaît le traitement qu'il donne à ses patients. D'autre part, il n'est pas utilisé de groupe placebo mais un groupe contrôle positif. Dans ce cas, l'investigateur choisi délibérément un groupe de volontaires qui présente une hyperlipidémie. Il aurait peut être été plus judicieux de préférer un groupe placebo sain et ainsi de montrer que la levure de riz rouge peut apporter une amélioration du profil lipidique.

En 1998, l'équipe de Li, a montré une diminution des paramètres lipidiques avec la levure de riz rouge à une dose de 0,2-0,8 g/kg/j chez des animaux (lapins et cailles). Cette étude sur animaux promet d'espérer des résultats probants chez l'homme.

En 1999, l'équipe d'Heber, a conduit son étude sur un nombre suffisant de volontaires (n= 83) et avec des conditions d'études standardisées (double aveugle contre placebo). Les effets observés sont significatifs mais inférieurs à ceux observés avec l'équipe de Wang.

Enfin, en 2002, l'équipe de Keithley, a piloté une étude clinique sur des patients sidéens qui s'est avérée concluante vis-à-vis des paramètres lipidiques mais n'utilise que 12 volontaires ce qui est très faible pour mettre en évidence des effets significatifs sur les paramètres lipidiques .

L'étude clinique de Wang (1997) montre la plus grande diminution des paramètres lipidiques par rapport aux autres.

2.5 Indications

Ainsi, la levure de riz rouge possède un large nombre d'indications. Elle pourra être utilisée dans les maladies cardiovasculaires car il a été démontré qu'elle était efficace notamment dans l'athérosclérose (Wang *et al.*, 1997), chez les diabétiques de type II car elle entraîne une diminution de l'insuline et du glucose, dans le traitement ou la prévention de certains cancers, dans l'ostéoporose, dans les attaques cérébrales, dans la maladie d'Alzheimer ou autres démences ou enfin dans les dégénération maculaires (Erdogru & Azirak, 2004).

2.6 Effets indésirables et toxicité

Aussi bien au niveau des essais cliniques réalisés sur les animaux (Li *et al.*, 1998) que sur l'homme, la toxicité est quasiment nulle.

En effet, dans une étude menée chez des patients sidéens, le traitement par la levure de riz rouge n'a pas entraîné de changement au niveau de l'ARN viral, du nombre de cellules CD4+ et des fonctions hépatiques (Keithley *et al.*, 2002). Un cas d'anaphylaxie due à la sensibilité immédiate de *Monascus purpureus* a néanmoins été noté chez un homme de 26 ans (Wigger *et al.*, 1999 ; Thompson Coon & Ernst, 2003). Les fonctions hépatiques (Wang *et al.*, 1997 ; Keithley *et al.*, 2002) et rénales ne sont pas modifiées. Dans l'étude conduite par Wang, aucun patient quelque soit son traitement (actif ou placebo), n'a vu apparaître une augmentation de plus de 2 fois la valeur normale de l' A.L.A.T. (Alanine AminoTransférase) après 8 semaines d'étude (Wang *et al.*, 1997).

Les effets indésirables existent mais restent néanmoins limités : maux de tête, vertiges, brûlures d'estomac, flatulence, inconfort abdominal, allergie (Wang *et al.*, 1997 ; Keithley *et al.*, 2002 ; Erdogru & Azirak, 2004 ; Journoud & Jones, 2004).

Dans l'étude de Heber en 1999, sur 88 sujets, seulement 3 ont rencontré des effets indésirables incluant un rash, des maux de tête et le développement concomitant d'une pneumonie. Des douleurs musculaires ainsi qu'une fatigue sont généralement observés dans le cas d'une prise de levure de riz rouge élevée. Néanmoins, l'utilisation de la levure de riz rouge reste équivalente à la lovastatine car cette dernière est présente dans l'extrait de riz fermenté (Journoud & Jones, 2004). Les effets indésirables relatifs à la lovastatine « médicamenteuse » peuvent apparaître par la prise de levure de riz rouge. On pourrait observer des effets indésirables supplémentaires tels que dyspepsie, douleurs abdominales, constipation, vision floue et douleurs musculaires (Journoud & Jones, 2004). Le puissant effet des statines et de la lovastatine au niveau de l'intermédiaire mévalonate est malheureusement non spécifique et résulte de l'inhibition en parallèle d'un certain nombre de substances non stéroïdes à structure isoprénoïdes dont le coenzyme Q10. Ceci induit une diminution des teneurs en coenzyme Q10 entraînant des troubles tels que les myopathies. De ce fait, la supplémentation en coenzyme Q10 éviterai ces myopathies induites par la lovastatine et probablement par la prise de levure de riz rouge (Erdogru & Azirak, 2004 ; Journoud & Jones, 2004).

Les interactions alimentaires et médicamenteuses deviennent donc valables pour la levure de riz rouge. La consommation d'alcool ne devra pas dépasser plus de 2 verres par jour. Le jus de pamplemousse, en raison de son effet inhibiteur enzymatique, devra être évité. La conséquence serait un ralentissement du métabolisme (via le cytochrome P 450) de certains médicaments dont les statines (Erdogru & Azirak, 2004). Les fibres, les pectines, le son et l'avoine devront également être évités (Journoud & Jones, 2004).

Enfin, la présence de la lovastatine dans la levure de riz rouge induit les mêmes contre-indications que celles relatives au Mevacor®. Seront contre-indiquées les personnes souffrant de troubles hépatiques, de troubles rénaux, les femmes enceintes, les médicaments hypocholestérolémiants, les femmes allaitant, une infection concomitante, une transplantation d'organe, une récente hospitalisation et un âge inférieur à 20 ans.

2.7 Intérêt

Les compléments alimentaires tels que la levure de riz rouge chinoise fourniraient une alternative aux prescriptions de médicaments. En effet, ces derniers nécessitent de nombreuses années de recherche et d'essais cliniques pour être enfin commercialisés et induisent donc des coûts très élevés alors que les compléments alimentaires peuvent être mis sur le marché beaucoup plus rapidement. Parce qu'ils coûtent moins cher et ne nécessitent pas de prescriptions, ils deviennent plus accessibles et pourraient être utilisés plus largement. La levure de riz rouge pourrait permettre de réduire les coûts de santé et contribuer à l'amélioration de la santé publique (Heber *et al.*, 2001 ; Huang *et al.*, 2006). De plus, il est noté un grand nombre d'indications et un nombre modéré d'effets indésirables ce qui amènerait à trouver un intérêt certain d'utiliser la levure de riz rouge dans le traitement des hyperlipidémies (Bliznakov & Heber, 2000).

2.8 Production de substances au cours de la fermentation

Le genre *Monascus* appartient à la famille des Aspergillacées. La moisissure est à l'origine de la production d'un certain nombre de pigments : les pigments oranges (monascorubine et rubropunctatine), les pigments jaunes (monascine et ankaflavine) et les pigments rouges (monascorubramine et rubropunctamine) (Erdogru & Azirak, 2004 ; Ma *et al.*, 2000) ainsi qu'un certain nombre d'autres substances appartenant aux polycétides tels que la mevinoline i.e. Lovastatine. Les pigments et les polycétides sont en fait des métabolites secondaires de fermentation de *Monascus purpureus* (Ma *et al.*, 2000). Ainsi, ces monacolines seraient en fait des métabolites secondaires de biosynthèse formés durant la fermentation (Heber *et al.*, 2001), elles seraient biogénétiquement reliées entre elles (Li *et al.*, 2004).

Pour la levure de riz rouge, il s'agit de *Monascus purpureus* qui, comme son nom l'indique, est à l'origine de la production de pigments rouges (Erdogrul & Azirak, 2004). Les conditions de fermentation telles que le pH, la présence de carbone, d'azote et de phosphore influencent nettement la production des pigments de *Monascus purpureus* (Erdogrul & Azirak, 2004 ; Li *et al.*, 2004).

Il est connu que si les conditions de fermentation ne sont pas parfaitement maîtrisées, il peut se former une molécule appelée citrinine qui est en fait une mycotoxine produite par de nombreuses espèces de *Penicillium* et d'*Aspergillus* (Heber *et al.*, 2001). La structure de la citrinine figure ci-dessous (Figure 3). La citrinine présente une forte toxicité rénale et hépatique qui entraîne des dommages fonctionnels au niveau du rein ainsi que des altérations du métabolisme hépatique. Cette dernière peut se retrouver à des concentrations qui varient de 0,2 à 122 mg/kg dans la levure de riz rouge (Lee *et al.*, 2006).

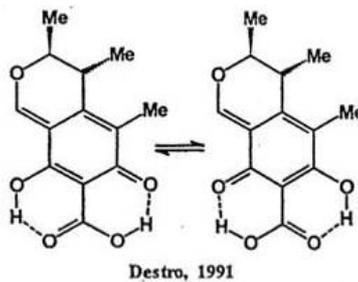


Figure 3 : Structure de la citrinine

La citrinine n'a donné aucune tumeur chez des rats Sprague Dawley à des doses de 0,05% dans la nourriture pendant 48 semaines. Cependant des doses de 0,1% de citrinine dans la nourriture ont induit des tumeurs rénales bénignes chez des rats F344 traités pendant 80 semaines. Chez la souris, des doses de 200 mg de citrinine par kg de nourriture n'induisent pas de tumeurs rénales mais, si elle est administrée simultanément avec de l'ochratoxine A (O.T.A.), elle augmente l'incidence de tumeurs rénales de façon très significative. Récemment, des néoplasmes ont été observés sur des reins de porc âgés de deux ans, qui avaient consommé des nourritures contaminées par de l'OTA et d'autres mycotoxines. La présence simultanée des deux mycotoxines se retrouve assez fréquemment dans les céréales lors du stockage aussi bien dans les pays des Balkans qu'en France. Ces résultats impliquent un accroissement potentiel du risque de développement de cancer lorsque les individus ingèrent des nourritures contaminées par ces deux mycotoxines (Goudey-Perrière *et al.*, 2002).

2.9 Analyse qualitative et quantitative de la levure de riz rouge

Un grand nombre de substances est présente tel que l'amidon de riz, des protéines, des fibres, des stérols (β -sitostérol, campestérol, stigmastérol, sapogénine et saponines), des acides gras saturés et insaturés avec 125 mg/g pour 0.6 g de préparation (Wang *et al.*, 1997) incluant les AGMI (acides gras mono-insaturés) et les acides gras diène-, triène-, tétraène- et pentaène. Bien que la fonction de ces acides gras insaturés reste encore méconnue, ils pourraient néanmoins aider à réduire les lipides (Wang *et al.*, 1997). Sont présents également des protéines, des acides aminés, des saccharides (Wang *et al.*, 1997), des traces de minéraux (magnésium et sodium (les plus abondants), phosphore, calcium, aluminium, fer, manganèse, cuivre, argent, sélénium et zinc) (Ma *et al.*, 2000), des pigments (Erdogru & Azirak, 2004 ; Ma *et al.*, 2000), le complexe vitaminique B (niacine), des isoflavones et glycosides d'isoflavones ainsi que des substances possédant une activité HMG-CoA réductase appelées les monacolines (Erdogru & Azirak, 2004 ; Patrick & Uzick, 2001 ; Heber *et al.*, 1999 ; Journoud & Jones, 2004, Wang *et al.*, 1997).

Le tableau 3 donne les proportions respectives des composants de la levure de riz rouge.

Ingrédients dans la levure de riz rouge	Pourcentage (%)
Sucres	73.4
Fibres	0.8
Protéines	14.7
Humidité	6.0
Pigments	0.3
Cendre	2.45
Phosphore	0.4
Phosphore organique	0.02
Monacolines	0.4
Acides gras	2.87
- acides gras saturés	1.06
Acide palmitique C16.....	0.56
Acide stéarique C18.....	0.50
- acides gras insaturés	1.81
Acide oléique C18 : 1 Ω_9	0.62
Acide linoléique C18 : 2 Ω_6	0.74
Acide arachidonique C20 : 4 Ω_6	0.09
Acide linoléique C18 : 3 Ω_3	0.36
Vitamine C	0.03
Vitamine A	< 70 UI/100g

Tableau 3 : Composition de la levure de riz rouge (Ma *et al.*, 2000)

La composition reste encore assez vague concernant les monacolines. Les données de la littérature en comptent 8, 9 voire 14 (Heber *et al.*, 1999 ; Ma *et al.*, 2000 ; Li *et al.*, 2004).

Les travaux de Ma et al ont permis d'identifier 8 monacolines dans l'extrait méthanolique de la levure de riz rouge (Ma *et al.*, 2000). Le tableau 4 donne les proportions respectives de ces différentes monacolines.

Type de monacolines	Pourcentage (%)
Monacoline K	0.2
Monacoline K (forme hydroxy acide)	0.1
Dihydromonacoline K	Trace
Déhydromonacoline K	0.03
Ester de méthyle de monacoline K (forme hydroxy acide)	0.02
Monacoline IV	0.02
Ester de méthyle de monacoline L (forme hydroxy acide)	0.01
Monacoline L	0.02
Total de monacolines	0.4

Tableau 4 : Monacolines identifiées et produites dans la levure de riz rouge (poids en %/ poids de levure de riz rouge) (Ma *et al.*, 2000).

Les travaux de Heber *et al.* mettent en évidence 9 monacolines. Le tableau 5 donne les proportions respectives de ces différentes monacolines.

Type de monacolines	Pourcentage (%)
Monacoline K	0.2
Monacoline K (forme hydroxy acide)	0.1
Dihydromonacoline K	< 0.01
Monacoline I	0.03
Monacoline II (forme hydroxy acide)	< 0.01
Monacoline III	0.02
Monacoline IV	0.02
Monacoline V	0.02
Monacoline VI	0.01
Total de monacolines	0.4

Tableau 5 : Composition du complément alimentaire chinois à base de levure de riz rouge : Cholestin® (poids en %/ poids de levure de riz rouge) (Heber *et al.*, 1999).

Les travaux de Li et al soulignent la présence de 14 monacolines qui sont la monacoline K, J, L, X, M avec leurs formes hydroxy acides respectives, la compactine et la déhydromonacoline K, la dihydromonacoline L et la 3 α -hydroxy-3,5-dihydromonacoline L. Les 2 dernières monacolines précédemment citées n'ont pas été détectées.

La figure 4 montre les différentes structures chimiques des monacolines identifiées dans la poudre de levure de riz rouge (Li *et al.*, 2004).

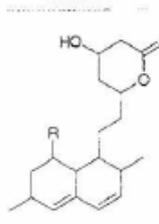
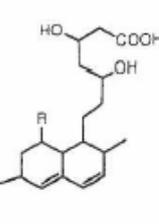
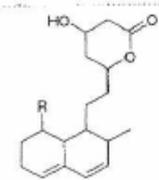
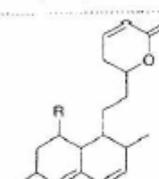
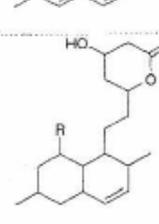
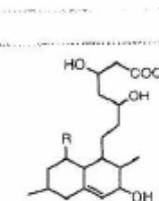
Structure	Name	R	MW	UV (λ_{max})	Ref.
	1. Monacolin K (MK)		404	230, 237, 246	10-12, 20
	2. Monacolin J (MJ)	OH	320	230, 237, 247	13
	3. Monacolin L (ML)	H	304	230, 237, 247	13
	4. Monacolin X (MX)		418	230, 237, 247	14
	5. Monacolin M (MM)		406		15
	1a. MK acid form (MKA)		422		25, 26
	2a. MJ acid form (MJA)	OH	338		
	3a. ML acid form (MLA)	H	322		
	4a. MX acid form (MXA)		436		
	5a. MM acid form (MMA)		424		
	6. Compactin (P1)		390	230, 237, 247	8, 9
		7. Dehydromonacolin K (DMK)		386	
		8. Dihydromonacolin L (DML)	H	306	
		9. 3 α -hydroxy-3,5-dihydromonacolin L (HDML)	H	340	

Figure 4 : Données structurales des monacolines dans la poudre de levure de riz rouge (Li *et al.*, 2004)

La figure 5 présente le profil chromatographique obtenu avec les spectres UV correspondants des monacolines dans la levure de riz rouge.

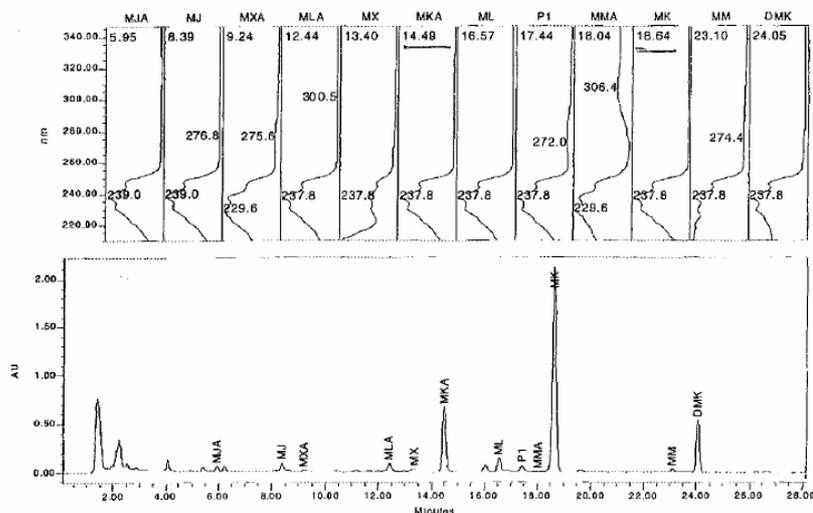


Figure 5 : Profil chromatographique et spectres UV des monacolines dans la levure de riz rouge (Li *et al.*, 2004)

L'allure générale du chromatogramme témoigne de la présence de 3 monacolines majoritaires. Les données sur le plan qualitatif et quantitatif de la poudre de levure de riz rouge sont renseignées dans le tableau ci-dessous (Tableau 6). En d'autres termes, il est précisé le type de monacolines identifié ainsi que leurs teneurs dans la levure de riz rouge. Cette méthode constituera la méthode de référence dans l'interprétation des résultats de l'étude effectuée dans le cadre de l'Afssaps.

Type de monacolines	TR (min)	Maximum d'absorption	Teneurs en monacolines (µg/g)
MJA	5,95	239,0	7,08
MJ	8,39	239,0 et 276,8	12,64
MXA	9,24	229,6 et 275,6	3,64
MLA	12,44	237,8 et 300,5	15,36
MX	13,40	237,8	4,74
MKA	14,49	237,8	103,23
ML	16,57	237,8	23,32
P1	17,44	237,8 et 272,0	12,14
MMA	18,04	229,6 et 306,4	0,72
MK	18,64	237,8	362,37
MM	23,10	237,8 et 274,4	5,19
DMK	24,05	237,8	72,22

Tableau 6 : Composition de la levure de riz rouge (Li *et al.*, 2004)

Légende :

TR, temps de rétention ; MJA, monacoline J forme acide ; MJ, monacoline J ; MXA, monacoline X forme acide ; MLA, monacoline L forme acide ; MX, monacoline X ; MKA, monacoline K forme acide ; ML, monacoline L ; P1, compactine ; MMA, monacoline M forme acide ; MK, monacoline K ; MM, monacoline M ; DMK, déhydromonacoline K.

Le tableau 6 confirme le profil chromatographique obtenu précédemment. En effet, 3 monacolines sont présentes en plus grande quantité dans la levure de riz rouge : la MKA, la MK et la DMK.

L'originalité de cette étude est basée sur le fait que Li et al ont effectué une analyse à la fois sur la poudre de levure de riz rouge et sur un certain nombre de produits retrouvés sur le marché. L'analyse réalisée sur la poudre de levure de riz rouge témoigne d'une variabilité de teneur en monacolines mais d'une conservation du type de monacolines. Au contraire, sur 10 produits étiquetés « levure de riz rouge » et provenant de fabricants différents, 2 seulement ont révélé des profils chromatographiques semblables (les produits 9 et 10). D'une part, les teneurs pour une même monacoline sont très divergentes : pour le produit 1, la teneur en monacoline K est de 98,51% tandis qu'elle n'est que de 55,34% pour le produit 10. D'autre part, le nombre de monacolines diffère selon le produit considéré. Pour le produit 1, on compte seulement 2 types de monacolines tandis que pour les produits 9 et 10, les 12 monacolines sont retrouvées. Ce qui concourt à conclure en la diversité de composition de ces compléments alimentaires (Li *et al.*, 2004) et donc de l'intérêt de les contrôler.

Avant les travaux de Li, en 2001, des conditions standardisées de fabrication avaient été établies concernant la levure de riz rouge vendue en tant que complément alimentaire afin de s'assurer de l'uniformité de teneur en actifs dans les préparations et pour limiter la production de sous-produits de fermentation indésirables tel que la citrinine toxique (Heber *et al.*, 2001). Or, les travaux de Li ont montré clairement que ces pratiques n'ont pas été appliquées vu les grandes variations observées à la fois sur les teneurs des différentes monacolines et sur les types de monacolines identifiés (Li *et al.*, 2004).

A travers les différents travaux effectués, on peut statuer sur le fait que la monacoline K équivalente à 0.2% en poids (Journoud & Jones, 2004) et sa forme hydroxy acide équivalente à 0.1% en poids correspondent à 75% de la fraction totale en monacolines équivalente à 0.4% en poids (Keithley *et al.*, 2002). Les autres composés sont présents uniquement à l'état de trace (< 0.02%) (Ma *et al.*, 2000).

De plus, il s'est avéré qu'un grand nombre de monacolines retrouvées dans la levure de riz rouge seraient en fait des précurseurs de la monacoline K.

C'est pourquoi l'équipe de Huang en 2006 a orienté son travail plus particulièrement sur la monacoline K afin de l'identifier et de la quantifier. Comme précédemment, deux méthodes de développement ont été choisies : la LC/PDA et la LC/PDA/MS. Le but de leur étude était de réaliser une analyse sur le plan qualitatif et quantitatif de la monacoline K dans les aliments et compléments alimentaires. Il a été conclut que sur 9 produits analysés, les teneurs en monacoline K étaient très variables (Huang et al, 2006).

Le Tableau ci-dessous renseigne les teneurs obtenues en monacoline K dans différentes régions de Chine (Tableau 7).

Lots	M + Na	MW	Zone de la Chine	Teneur (mg/g)
P1	427	404	Gutiang	3,1
P2	427	404	Jianou	2,8
P3	427	404	Songqi	2,3
P4	427	404	Zhenhe	2,1
P5	427	404	Pinnan	3,8
P6	427	404	Nanping	3,3
P7	427	404	Produit commercial	0,62
P8	427	404	Produit commercial	0,31
P9	427	404	Produit commercial	0,36

Tableau 7 : Quantification de la monacoline K dans la poudre de levure de riz rouge dans différentes régions de Chine (Huang et al, 2006)

Légende :

MW : Molecular Weight ; M + Na : Molecular ion + sodium (23).

Remarques :

La région de Pinnan est la région où l'on trouve le plus de monacoline K dans la levure de riz rouge. Entre la région Pinnan et un produit vendu sur le marché mais d'origine inconnue, un écart d'un facteur 10 est noté pour la teneur en monacoline K (Huang et al, 2006).

2.10 Méthodes analytiques exploitées pour la séparation et la quantification des monacolines dans la levure de riz rouge

Le tableau 8 rassemble les différentes techniques utilisées relevées dans la bibliographie.

Technique	Monocolines	Tr	Quantif.(%)	Phases mobiles	Vol.d'inj.	Colonne	Spectres	Réf.
LC/MS et LC/PDA	7							
	MK	18.3	0.2	CH ₃ OH/H ₂ O	10 µL	C ₁₈ Zorbax	UV	Ma <i>et al.</i> , 2000
	DMK	21.2	0.03					
	MKA	18.5	0.02					
	MK	ND	0.02					
	ML	17.7	0.02					
	MLA	17.2	0.01					
DML	ND	Trace						
LC-ESI-MS-MS	atorvastatine lovastatine pravastatine simvastatine mevastatine	—		ACN/ H ₂ O + methylammonium acetate (additif)	20 µL	C ₁₈	Lovastatine, pravastatine, simvastatine (ESI)	Miao & Metcalfe, 2003
LC/MS	lovastatine, lovastatine acide			Non précisé		Kromasil C ₁₈	—	Ertürk <i>et al.</i> , 2003
LC-MS-MS	Simvastatine, simvastatine acide			Non précisé		Symmetry C ₁₈	—	Ertürk <i>et al.</i> , 2003
LC/MS	simvastatine			Non précisé		ODS Shimpack	—	Ertürk <i>et al.</i> , 2003
LC-MS-MS	pravastatine			Non précisé		Keystone Betasil ODS	—	Ertürk <i>et al.</i> , 2003
LC/MS	pravastatine			Non précisé		Inertsil ODS-2	—	Ertürk <i>et al.</i> , 2003
LC-MS-MS	pravastatine			Non précisé		Oasis colonne ; Waters Symmetry C ₁₈	—	Ertürk <i>et al.</i> , 2003
LC-MS	pravastatine			Non précisé		Zorbax XDB C ₈	—	Ertürk <i>et al.</i> , 2003
LC-MS-MS	atorvastatine			Non précisé		YMC Basic C ₁₈	—	Ertürk <i>et al.</i> , 2003
LC/PDA Poudre de levure de riz rouge, industrie pharmaceutique, Shanghai, China	12							
	MJA	5.95		ACN/ 0.1 % TFA	20 µL	C ₁₈ phase inverse	UV UV-TIC	Li <i>et al.</i> , 2004
	MJ	8.39						
	MXA	9.24						
	MLA	12.44						
	MX	13.40						
	MKA	14.49	non					
	ML	16.57						
	P1	17.44						
	MMA	18.04						
	MK	18.64						
	MM	23.10						
DMK	24.05							

Technique	Monocolines	Tr	Quantif.(%)	Phases mobiles	Vol.d'inj.	Colonne	Spectres	Réf.	
LC/PDA/MS Poudre de levure de riz rouge, industrie pharmaceutique, Shanghai, China	15								
	MK	16.65							
	MKA	13.15							
	MJ	7.09							
	MJA	5.22							
	ML	14.55							
	ML (i)	6.44							
	MLA	10.99	non		ACN/ 0.2% acide acétique	20 µL	Zorbax C ₁₈ phase inverse	Masse	Li <i>et al.</i> , 2004
	MM	20.08							
	MMA	16.34							
	MX	11.48							
	MXA	8.82							
	DMK	22.19							
	P1	14.83							
DML	16.93								
HDML	10.34								
LC/PDA Poudre de levure de riz rouge n°2	12								
	MJA	5.953	1.08						
	MJ	8.390	1.97						
	MXA	9.239	0.59						
	MLA	12.431	2.42						
	MX	13.403	0.74						
	MKA	14.487	18.25		ACN/ 0.1 % TFA	20 µL	C ₁₈ phase inverse	UV	Li <i>et al.</i> , 2004
	ML	16.565	3.55						
	P1	17.434	1.86						
	MMA	18.037	0.11						
	MK	18.628	56.54						
	MM	23.098	0.82						
DMK	24.057	12.07							
LC/PDA Poudre de levure de riz rouge n°3	12								
	MJA	5.953	1.11						
	MJ	8.390	1.98						
	MXA	9.239	0.62						
	MLA	12.431	2.37						
	MX	13.403	0.79						
	MKA	14.487	16.05		ACN/ 0.1 % TFA	20 µL	C ₁₈ phase inverse	UV	Li <i>et al.</i> , 2004
	ML	16.565	3.68						
	P1	17.434	1.99						
	MMA	18.037	0.14						
	MK	18.628	57.86						
	MM	23.098	0.84						
DMK	24.057	12.57							

Technique	Monacolines	Tr	Quantif.(%)	Phases mobiles	Vol.d'inj.	Colonne	Spectres	Réf.
LC / PDA Produit commercial n° 1	3							
	MKA	14.487	1.16	ACN/ 0.1 % TFA	20 µL	C ₁₈ phase inverse	UV	Li <i>et al.</i> , 2004
	MK	18.628	98.51					
	DMK	24.057	0.33					
LC / PDA Produit commercial n° 9	12			ACN/ 0.1 % TFA	20 µL	C ₁₈ phase inverse	UV	Li <i>et al.</i> , 2004
	MJA	5.953	1.15					
	MJ	8.390	1.92					
	MXA	9.239	0.55					
	MLA	12.431	2.52					
	MX	13.403	0.78					
	MKA	14.487	19.02					
	ML	16.565	3.76					
	P1	17.434	1.81					
	MMA	18.037	0.15					
	MK	18.628	57.75					
	MM	23.098	0.73					
DMK	24.057	9.86						
LC / PDA Produit commercial n° 10	12			ACN/ 0.1 % TFA	20 µL	C ₁₈ phase inverse	UV	Li <i>et al.</i> , 2004
	MJA	5.953	0.78					
	MJ	8.390	2.02					
	MXA	9.239	0.6					
	MLA	12.431	2.37					
	MX	13.403	0.72					
	MKA	14.487	18.33					
	ML	16.565	3.82					
	P1	17.434	1.92					
	MMA	18.037	0.13					
	MK	18.628	55.34					
	MM	23.098	0.72					
DMK	24.057	13.25						
LC/PDA Poudre de levure de riz rouge, industrie pharmaceutique, Shanghai, China	7			ACN/ 0.1 % TFA	20 µL	C ₁₈ phase inverse Waters Symmetry	UV	Li <i>et al.</i> , 2005
	MJA	11.77						
	MJ	14.22						
	MLA	17.11	-					
	MKA	18.33						
	ML	19.77						
	MK	20.77						
DMK	24.11							
LC/PDA	MK	25.671	-	75 % CH ₃ OH	10 µL	C ₁₈ Merck LiChroCART RP-18	UV, chromatogrammes,	Huang et al, 2006
LC/PDA/MS	MK	-	0,31 à 3,8	75 % CH ₃ OH	10 µL	C ₁₈ phase inverse BioBasic-18 pioneer	spectres de masse	Huang et al, 2006

Tableau 8 : Résumé des techniques d'identification et de quantification

Légende :

LC, liquid chromatography ; PDA, photo-diode array detector ; MS, mass spectrometry ; MJA, monacoline J forme acide ; MJ, monacoline J ; MXA, monacoline X forme acide ; MLA, monacoline L forme acide ; MX, monacoline X ; MKA, monacoline K forme acide ; ML, monacoline L ; P1, compactine ; MMA, monacoline M forme acide ; MK, monacoline K ; MM, monacoline M ; DMK, déhydromonacoline K ; DML, dihydromonacoline L ; HDML, 3 α -hydroxy-3,5-dihydromonacoline L ; ACN, acétonitrile ; TFA, trifluoroacetic acid ; ESI, electrospray ionization ; TIC, total ion current ; SIC : selective ion chromatograms.

2.11 Intérêt de rechercher la composition exacte de la levure de riz rouge

Les premières données de la littérature relative à l'action biomoléculaire de la levure de riz rouge furent publiées en 2002. Les résultats indiquent qu'une des actions hypolipémiantes de la levure de riz rouge est une conséquence d'un effet inhibiteur sur la biosynthèse du cholestérol dans les cellules hépatiques. Il n'est pas clair si l'effet hypolipémiant de la levure de riz rouge est dû uniquement à la teneur en monacoline K ou si d'autres monacolines, stérols et isoflavones contribuent à l'effet hypocholestérolémiant (Monographie *Monascus purpureus* (Red yeast rice), 2004).

La teneur en monacolines est très faible dans le Cholestin®. Or, les mêmes effets sont observés quand on utilise le Cholestin® à 5 mg de lovastatine et la lovastatine seule à des concentrations de 20 à 80 mg/j. Ceci traduit donc qu'il y a d'autres substances présentes dans le Cholestin® qui exercent leur efficacité tel que les AGI ou d'autres substances naturelles (Keithley *et al.*, 2002). Il est également possible de noter que la quantité d'inhibiteurs de l'HMG-CoA réductase présent dans une dose de 2,4 g de riz rouge fermenté avec *Monascus purpureus Went* (soit 9,6 mg en monacolines) produit des effets hypolipémiants équivalents à une dose de 10 à 40 mg en lovastatine (Journoud & Jones, 2004).

Il y a 2 avis contradictoires à propos des composants qui joueraient un rôle probable dans l'effet hypolipémiant.

D'un côté, il est suggéré dans la littérature que l'effet hypolipémiant de la levure de riz rouge ne peut pas être expliqué uniquement par les inhibiteurs de l'HMG-CoA réductase ou par la monacoline K seule (lovastatine), mais s'expliqueraient par une synergie d'action de tous les composés (les monacolines et les autres substances) (Li *et al.*, 1998 ; Wang *et al.*, 1997 ; Heber *et al.*, 1999 ; Keithley *et al.*, 2002 ; Bliznakov & Heber, 2000). Ainsi, selon Li en 1998, l'ensemble des composés permet d'inhiber *in vivo* la biosynthèse du cholestérol, d'éviter l'absorption du cholestérol ingéré ou d'augmenter la clairance du cholestérol à partir de la circulation générale. Ces 3 mécanismes d'action sont envisageables. Cependant, des études complémentaires doivent être réalisées afin de comprendre le mécanisme d'action exacte.

D'un autre côté, selon Havel, les composés mentionnés au dessus tels que les stérols, les acides gras et les minéraux jouent un rôle mineur dans l'action de la levure de riz rouge et seuls les inhibiteurs de l'HMG-CoA réductase seraient à l'origine de l'effet hypolipémiant (Havel, 1999 ; Journoud & Jones, 2004).

L'objet de cette étude sera donc d'une part, de rechercher le nombre exact de monacolines dans la levure de riz rouge et d'autre part, de les quantifier afin d'évaluer le pourcentage de chacune d'elle et donc de tenter de justifier leur effet hypolipémiant. Ceci devrait permettre de confirmer ou d'infirmer les études antérieures réalisées.

Etant donné la structure des différentes statines, il est possible d'en déduire que ces molécules absorbent en UV. Il est donc logique de les analyser par chromatographie liquide avec un détecteur UV (LC/UV). Cependant, étant donné qu'il s'agit d'analogues structuraux, l'utilisation d'un détecteur massique s'avèrerait beaucoup plus spécifique et constituerait donc une méthode de choix pour cette analyse.

3 - Techniques de séparation chromatographique

Les données présentées ci-dessous sont issues de la Pharmacopée Européenne V^e édition (2.2.46).

3.1 Généralités

Les techniques de séparation chromatographique sont des méthodes de séparation séquentielle reposant sur la distribution des composants de l'échantillon entre 2 phases, l'une stationnaire et l'autre mobile. La phase stationnaire peut être un solide ou un liquide déposé sur un support solide ou un gel. Elle peut être contenue dans une colonne, étalée en couche, déposée sous forme de film, etc. La phase mobile peut être gazeuse ou liquide ou en phase supercritique.

La séparation peut reposer sur des phénomènes tels que l'adsorption, la distribution de masse (partage), l'échange d'ions, etc., ou sur des différences de propriétés physico-chimiques moléculaires telles que la taille, la masse, le volume, etc.

3.2 Définitions

3.2.1 Chromatogramme

Un chromatogramme est une représentation, graphique ou autre, de la réponse d'un détecteur, de la concentration d'un effluent ou d'une autre grandeur utilisée comme mesure de la concentration d'un effluent en fonction du temps, du volume ou de la distance. Idéalement, un chromatogramme se présente comme une séquence de pics gaussiens au-dessus d'une ligne de base.

3.3 Données de rétention

3.3.1 Temps de rétention et volume de rétention

En chromatographie d'éluion, les mesures de rétention peuvent être exprimées en termes de temps de rétention t_R directement défini par la position du maximum du pic dans le chromatogramme. De ce temps de rétention peut être déduit par le calcul le volume de rétention V_R :

$$V_R = v \times t_R$$

- t_R = temps 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,
- v = débit de la phase mobile.

3.3.2 Coefficient de distribution massique

Le coefficient de distribution massique D_m (ou facteur de capacité k' ou facteur de rétention k) est défini comme :

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

- K_D = 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 »).

3.3.3 Coefficient de partage

En chromatographie d'exclusion, les caractéristiques d'élution d'un composant dans une colonne particulière peuvent être décrites par le coefficient de partage K_0 , calculé à l'aide de l'expression :

$$K_0 = \frac{t_R - t_0}{t_t - t_0}$$

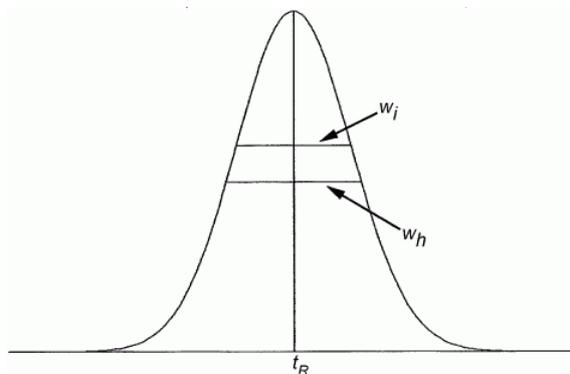
- t_R = temps (ou volume) de rétention ou distance sur la ligne de base entre le point d'injection et la perpendiculaire abaissée du maximum du pic correspondant au composant considéré,
- t_0 = temps (ou volume) de rétention ou distance sur la ligne de base entre le point d'injection et la perpendiculaire abaissée du maximum du pic correspondant à un composant non retenu (« hold-up time »),
- t_t = 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 ayant accès à tous les pores de la phase stationnaire.

3.4 Données chromatographiques

3.4.1 Pic

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 ; dans le cas d'un pic gaussien, il existe une relation de la forme :

$$w_h = 1,18 w_i$$



3.4.2 Facteur de symétrie

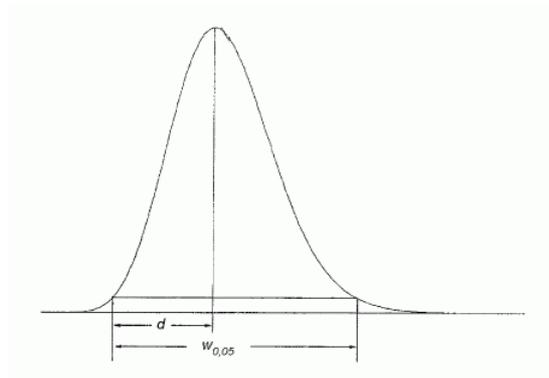
Le facteur de symétrie (ou de traînée) A_s d'un pic est donné par l'expression :

$$A_s = \frac{w_{0,05}}{2d}$$

$w_{0,05}$ = 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.

Une valeur de 1,0 indique une symétrie totale (idéale).



3.4.3 Performance d'une colonne et nombre apparent de plateaux théoriques

La performance d'une colonne (efficacité apparente) peut être calculée, à partir de données obtenues dans des conditions isothermes, isocratiques ou isodenses, selon la technique utilisée, en termes de nombre apparent de plateaux théoriques N , à l'aide de l'expression suivante, où les valeurs de t_R et w_h doivent être exprimées dans la même unité (de temps, volume ou distance) :

$$N = 5,54 \left(\frac{t_R}{w_h} \right)^2$$

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.

Le nombre apparent de plateaux théoriques dépend du composant considéré, ainsi que de la colonne et du temps de rétention.

3.5 Données de séparation

3.5.1 Résolution

La résolution R_s entre 2 pics peut être calculée à l'aide de l'expression :

$$R_s = \frac{1,18(t_{R2} - t_{R1})}{w_{h1} + w_{h2}}$$

$$t_{R2} > t_{R1}$$

t_{R1} et t_{R2} = temps de rétention ou distances sur la ligne de base entre le point d'injection et les perpendiculaires abaissées des maximums de 2 pics adjacents,

w_{h1} et w_{h2} = largeur des pics à mi-hauteur.

Une résolution supérieure à 1,5 correspond à une séparation jusqu'à la ligne de base. L'expression ci-dessus peut ne pas être applicable lorsque les pics ne sont pas séparés jusqu'à la ligne de base.

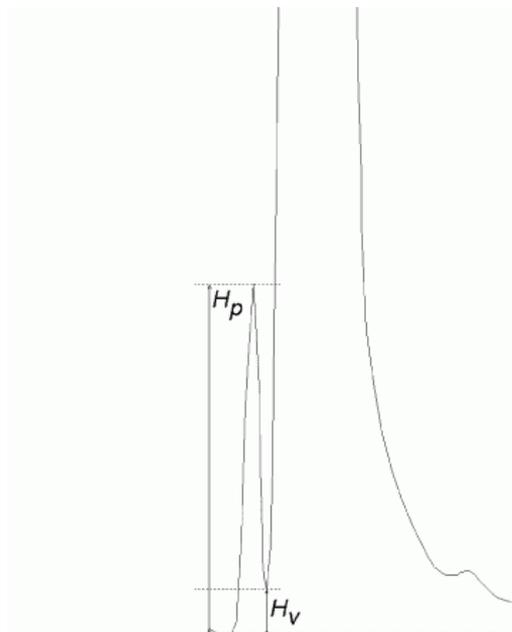
3.5.2 Rapport pic/vallée

Le rapport pic/vallée (p/v) peut être utilisé comme critère de conformité du système dans un essai des substances apparentées lorsqu'il n'y a pas séparation jusqu'à la ligne de base entre 2 pics (figure en dessous).

$$p/v = \frac{H_p}{H_v}$$

H_p = hauteur au-dessus de la ligne de base (extrapolée) du pic mineur,

H_v = hauteur au-dessus de la ligne de base (extrapolée) du point le plus bas du tracé entre les pics mineur et majeur.



3.5.3 Rétention relative

La rétention relative r est une estimation calculée à l'aide de l'expression :

$$r = \frac{t_{R2} - t_M}{t_{R1} - t_M}$$

- t_{R2} = temps de rétention du pic considéré,
- t_{R1} = temps de rétention du pic de référence (généralement celui de la substance à examiner),
- t_M = temps 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 »).

La rétention relative non ajustée r_G est calculée à l'aide de l'expression :

$$r_G = \frac{t_{R2}}{t_{R1}}$$

Sauf indication contraire, les valeurs de rétention relative indiquées dans les monographies correspondent à la rétention relative non ajustée.

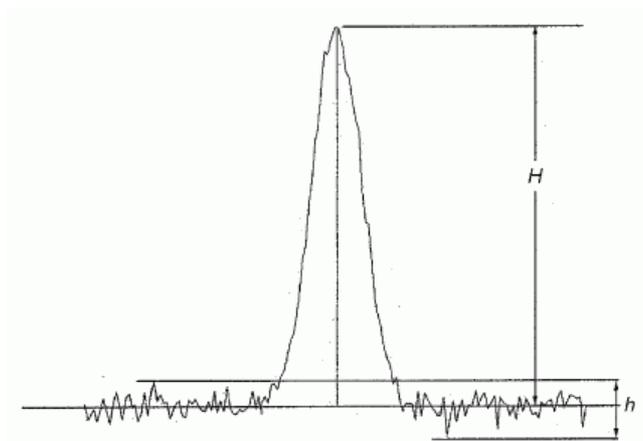
3.6 Fidélité de la quantification

3.6.1 Rapport signal/bruit

Le rapport signal/bruit (S/N) affecte la fidélité de la quantification ; il est calculé à l'aide de l'équation :

$$S/N = \frac{2H}{h}$$

- H = hauteur du pic correspondant au composant considéré dans le chromatogramme obtenu avec la solution témoin indiquée, mesurée entre le sommet du pic et la ligne de base extrapolée du signal observé sur une distance égale à 20 fois la largeur du pic à mi-hauteur,
- h = amplitude du bruit de fond dans un chromatogramme obtenu après injection ou dépôt d'un blanc, observée sur une distance égale à 20 fois la largeur à mi-hauteur du pic du chromatogramme obtenu avec la solution témoin indiquée, et si possible centrée sur l'emplacement où ce pic serait observé.



3.6.2 Répétabilité

La répétabilité de la réponse est exprimée, en pourcentage, par l'écart type relatif ETR% estimé à partir des résultats d'une série de mesures consécutives effectuées par injection d'une solution témoin, et calculée à l'aide de l'expression :

$$ET R_{\%} = \frac{100}{\bar{y}} \sqrt{\frac{\sum (y_i - \bar{y})^2}{n - 1}}$$

- y_i = valeurs individuelles (surfaces ou hauteurs de pic, ou rapports de surfaces pour le procédé de l'étalon interne),
 \bar{y} = moyenne des valeurs individuelles,
 n = nombre des valeurs individuelles.

L'écart type relatif maximum admis ETRmax est calculé à partir d'une série d'injections de la solution témoin, pour des limites de teneur définies, à l'aide de l'expression :

$$ET R_{max} = \frac{K B \sqrt{n}}{t_{90\%, n-1}}$$

- K = constante de valeur 0,349 donnée par l'expression :

$$K = \frac{0,6}{\sqrt{2}} \times \frac{t_{90\%, 5}}{\sqrt{6}} \text{ où } \frac{0,6}{\sqrt{2}} \text{ représente l'ETR requis pour 6 injections et } B = 1,0,$$

- B = limite supérieure de teneur spécifiée dans la rubrique Définition de la monographie moins 100 pour cent,
 n = nombre d'injections de la solution témoin ($3 \leq n \leq 6$),
 $t_{90\%, n-1}$ = variable t de Student au niveau de probabilité 90 pour cent (bilatéral), avec $n - 1$ degrés de liberté.

3.7 Conformité du système

Les essais de conformité du système font partie intégrante de la méthode et visent à vérifier les performances du système chromatographique. Les paramètres généralement utilisés pour évaluer les performances de la colonne sont l'efficacité apparente (N), le coefficient de distribution massique (D_m), la résolution (R_s), la rétention relative (r) et le facteur de symétrie (A_s). Les facteurs pouvant affecter le comportement chromatographique sont notamment la composition, la force ionique, la température et le pH apparent de la phase mobile, le débit, la longueur de la colonne, la température, la pression et certaines caractéristiques de la phase stationnaire comme la porosité, la granulométrie et la nature des particules, la surface spécifique et, dans le cas des supports en phase inversée, le degré de modification chimique (postgreffage, taux de carbone, etc.).

Les différents éléments de l'appareillage doivent être qualifiés et doivent permettre d'atteindre la fidélité requise pour la réalisation de l'essai ou du dosage considéré.

Les exigences suivantes doivent être satisfaites dans tous les cas, sauf indication contraire dans la monographie.

- Le facteur de symétrie du pic principal est compris entre 0,8 et 1,5, sauf indication contraire dans la monographie. Cette exigence est applicable à l'ensemble des essais ou dosages décrits dans les monographies.
- L'écart type relatif maximum admis pour une série d'injections de la solution témoin indiquée n'est pas supérieur aux valeurs spécifiées dans le tableau 8. Cette exigence ne concerne que les déterminations de teneur et ne s'applique pas aux essais des substances apparentées.
- La limite de détection du pic (correspondant à un rapport signal/bruit de 3) est inférieure à la limite d'exclusion de l'essai des substances apparentées.
- La limite de quantification du pic (correspondant à un rapport signal/bruit de 10) est inférieure ou égale à la limite d'exclusion ; de l'essai des substances apparentées.

Les exigences concernant la répétabilité figurent dans le tableau ci-dessous (Tableau 9).

	Nombre d'injections individuelles			
	3	4	5	6
B (pour cent)	Ecart-type relatif maximum admis			
2,0	0,41	0,59	0,73	0,85
2,5	0,52	0,74	0,92	1,06
3,0	0,62	0,89	1,10	1,27

Tableau 9 : Exigences concernant la répétabilité

3.8 Ajustement des conditions chromatographiques

Les limites dans lesquelles il est possible de faire varier les différents paramètres d'un essai chromatographique, pour satisfaire aux critères de conformité du système sans modifier fondamentalement la méthode, sont indiquées ci-dessous pour information. Les conditions chromatographiques décrites sont validées lors de l'élaboration des monographies, et les essais de conformité du système spécifiés ont pour objet de vérifier que la séparation requise pour la réalisation de l'essai ou du dosage est obtenue. Certains ajustements des conditions chromatographiques peuvent toutefois être nécessaires pour que le système réponde aux critères de conformité spécifiés, car les phases stationnaires sont décrites en termes généraux et il en existe dans le commerce une grande diversité pouvant présenter des différences de comportement chromatographique. Dans certains cas, notamment celui des chromatographies liquides en phase inversée, l'ajustement des différents paramètres chromatographiques ne donne pas toujours des résultats satisfaisants. Il peut alors être nécessaire de remplacer la colonne par une autre colonne du même type (par exemple au gel de silice octadécylsilylé) présentant le comportement chromatographique voulu.

Pour les paramètres critiques, les ajustements permettant d'assurer la conformité du système sont clairement définis dans la monographie.

Il faut éviter de procéder à des ajustements multiples pouvant avoir un effet cumulatif sur les performances du système.

3.8.1 Composition de la phase mobile

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.

3.8.2 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.

3.8.3 Concentration des sels du tampon entrant dans la composition de la phase mobile

± 10 pour cent.

3.8.4 Longueur d'onde de détection

Aucun ajustement admis.

3.8.5 Phase stationnaire

- longueur de la colonne : ± 70 pour cent,
- diamètre interne de la colonne : ± 25 pour cent,
- granulométrie : réduction maximale de 50 pour cent, aucune augmentation admise.

3.8.6 Débit

± 50 pour cent. Lorsque le temps de rétention du pic principal est indiqué dans une monographie, le débit est ajusté si le diamètre de la colonne a été modifié. Une réduction du débit n'est pas permise si la monographie utilise un nombre apparent de plateaux théoriques lors de la qualification.

3.8.7 Température

± 10 pour cent, avec un maximum de 60 °C.

3.8.8 Volume injecté

Réduction admise à condition d'obtenir une détection et une répétabilité satisfaisantes du (des) pic(s) à déterminer.

3.8.9 Gradient d'élution

La configuration de l'équipement utilisé peut significativement modifier la résolution, le temps de rétention et les rétentions relatives par rapport aux valeurs décrites dans la méthode. Ce phénomène peut être dû à l'existence d'un trop grand « dwell volume » qui est le volume entre le point de rencontre des 2 éluats et le sommet de la colonne.

3.9 Quantification

3.9.1 Réponse du détecteur

La sensibilité du détecteur est l'intensité du signal délivré par unité de concentration ou de masse d'une substance dans la phase mobile qui entre dans le détecteur. Le facteur de réponse relatif d'un détecteur, communément appelé facteur de réponse, exprime la sensibilité de ce détecteur par rapport à une substance de référence. Le facteur de correction est l'inverse du facteur de réponse.

3.9.2 Utilisation d'un étalon externe

La concentration du (des) composant(s) à analyser est déterminée par comparaison des réponses (pics) respectivement obtenues, pour ce (ces) composant(s), avec la solution à examiner et avec une solution témoin.

3.9.3 Utilisation d'un étalon interne

Un composant bien séparé de la substance à examiner (étalon interne) est introduit en quantités égales dans la solution à examiner et dans une solution témoin. L'étalon interne ne doit pas réagir avec la substance à examiner ; il doit être stable et ne pas contenir des impuretés dont le temps de rétention est similaire à celui de la substance à examiner. La concentration de la substance à examiner est déterminée par comparaison du rapport entre la surface ou hauteur des pics de la substance à examiner et de l'étalon interne obtenu avec la solution à examiner et ce même rapport obtenu avec la solution témoin.

3.9.4 Procédé de normalisation

On détermine la teneur pour cent d'un ou plusieurs composants de la substance à examiner en calculant le pourcentage que représente la surface du (des) pic(s) correspondant(s) par rapport à la surface totale des pics, à l'exclusion de ceux dus aux solvants et aux réactifs éventuellement ajoutés, et de ceux en-dessous de la limite d'exclusion.

3.9.5 Fonction d'étalonnage

On procède à la détermination de la relation entre le signal y mesuré ou estimé et la quantité x (concentration, masse, etc.) de substance, puis au calcul de la fonction d'étalonnage. La fonction réciproque permet alors de calculer les résultats analytiques à partir du signal mesuré ou évalué de la substance à analyser.

Pour les dosages et la détermination quantitative de composants, la méthode décrite dans la monographie peut mettre en œuvre un étalon externe, un étalon interne ou une fonction d'étalonnage, et le procédé de normalisation n'est normalement pas utilisé. Pour les essais des substances apparentées, les procédés généralement appliqués sont soit celui de l'étalon externe avec une solution témoin unique, soit la normalisation ; toutefois, si une dilution de la solution à examiner est utilisée comme base de comparaison dans le cadre de l'un de ces 2 procédés, il faut que la réponse des substances apparentées soit similaire à celle de la substance elle-même (facteur de réponse de 0,8 à 1,2) ; si tel n'est pas le cas, le texte spécifie les facteurs de correction à appliquer. Lorsqu'une sommation des impuretés est prescrite dans un essai des substances apparentées, ou qu'une impureté fait l'objet d'une détermination quantitative, il est important de définir un seuil approprié et des conditions adéquates pour l'intégration de la surface des pics. La limite d'exclusion, c'est à dire la surface seuil au-dessous de laquelle les pics ne sont pas pris en compte dans le calcul, est généralement de 0,05 pour cent. Le seuil d'enregistrement du système est alors réglé sur la moitié au moins de cette limite d'exclusion. L'intégration de la surface des pics dus aux impuretés, lorsqu'ils ne sont pas complètement séparés du pic principal, s'effectue de préférence par extrapolation de vallée à vallée (arasement tangentiel). Les pics dus au(x) solvant(s) utilisé(s) pour dissoudre l'échantillon ne sont pas non plus pris en compte dans le calcul.

4 - Caractéristiques de la lovastatine, molécule principale identifiée dans la levure de riz rouge

Les données présentées ci-dessous sont issues de la Pharmacopée Européenne V^e édition (Figure 6).

PHARMACOPÉE EUROPÉENNE 5.0

Lovastatine

DOSAGE

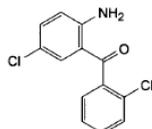
Dissolvez 0,250 g de lorazépam dans 30 ml de diméthylformamide R. Titrerez par l'hydroxyde de tétrabutylammonium 0,1 M et déterminez le point de fin de titrage par potentiométrie (2.2.20). Protégez la solution du dioxyde de carbone de l'air tout au long du titrage.

1 ml d'hydroxyde de tétrabutylammonium 0,1 M correspond à 32,12 mg de C₁₅H₁₀Cl₁N₂O₂.

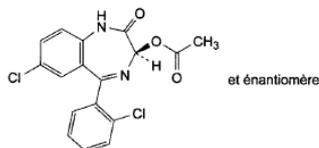
CONSERVATION

En récipient étanche, à l'abri de la lumière.

IMPURETÉS



A. (2-amino-5-chlorophényl)(2-chlorophényl)méthanone,

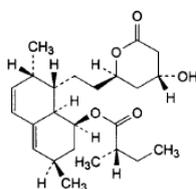


B. acétate de (3RS)-7-chloro-5-(2-chlorophényl)-2-oxo-2,3-dihydro-1H-1,4-benzodiazépín-3-yle.

01/2005:1538

LOVASTATINE

Lovastatinum



C₂₄H₃₆O₅

M_r 404,5

DÉFINITION

La lovastatine contient au minimum 97,0 pour cent et au maximum l'équivalent à 102,0 pour cent de (2S)-2-méthylbutanoate de (1S,3R,7S,8S,8aR)-8-[2-[(2R,4R)-4-hydroxy-6-oxotétrahydro-2H-pyran-2-yl]éthyl]-3,7-diméthyl-1,2,3,7,8,8a-hexahydronaphthalén-1-yle, calculé par rapport à la substance desséchée.

CARACTÈRES

Poudre cristalline, blanche ou sensiblement blanche, pratiquement insoluble dans l'eau, soluble dans l'acétone, assez soluble dans l'éthanol.

IDENTIFICATION

A. La lovastatine satisfait à l'essai du pouvoir rotatoire spécifique (voir Essai).

B. Examinez la lovastatine par spectrophotométrie d'absorption dans l'infrarouge (2.2.24), en comparant avec le spectre obtenu avec la lovastatine SCR. Examinez les substances sous forme de pastilles.

ESSAI

Aspect de la solution. Dissolvez 0,200 g de lovastatine dans de l'acétonitrile R et complétez à 20,0 ml avec le même solvant. La solution est limpide (2.2.1) et n'est pas plus fortement colorée que la solution témoin B₆ ou JB₆ (2.2.2, Procédé II).

Pouvoir rotatoire spécifique (2.2.7). Dissolvez 0,125 g de lovastatine dans de l'acétonitrile R et complétez à 25,0 ml avec le même solvant. Calculé par rapport à la substance desséchée, le pouvoir rotatoire spécifique est de + 325 à + 340.

Substances apparentées. Opérez par chromatographie liquide (2.2.29) selon les indications du dosage.

Injectez 10 µl de solution témoin (b). Ajustez la sensibilité du système de façon que la hauteur du pic principal représente au moins 20 pour cent de l'échelle totale de l'enregistreur. Injectez 10 µl de solution à examiner (a). Lorsque les chromatogrammes sont enregistrés dans les conditions décrites, la rétention relative est de 0,8 environ pour l'impureté A, de 0,6 environ pour l'impureté B, de 1,2 environ pour l'impureté C et de 2,3 environ pour l'impureté D (temps de rétention de la lovastatine : 7 min environ). S'il apparaît d'autres pics que le pic principal dans le chromatogramme obtenu avec la solution à examiner (a), la surface d'aucun d'entre eux n'est supérieure à 0,6 fois la surface du pic principal du chromatogramme obtenu avec la solution témoin (b) (0,3 pour cent) et la somme de leur surface n'est pas supérieure à 2 fois la surface du pic principal du chromatogramme obtenu avec la solution témoin (b) (1 pour cent). Ne tenez pas compte des pics dont la surface est inférieure à 0,1 fois la surface du pic principal du chromatogramme obtenu avec la solution témoin (b) (0,05 pour cent).

Métaux lourds (2.4.8). 1,0 g de lovastatine satisfait à l'essai limite C des métaux lourds (20 ppm). Préparez le témoin avec 2 ml de solution à 10 ppm de plomb (Pb) R.

Perte à la dessiccation (2.2.32). Déterminée dans un dessiccateur sous vide poussé à 60 °C pendant 3 h sur 1,000 g de lovastatine, la perte à la dessiccation n'est pas supérieure à 0,5 pour cent.

Cendres sulfuriques (2.4.14). Déterminé sur 1,0 g de lovastatine, le taux des cendres sulfuriques n'est pas supérieur à 0,2 pour cent.

DOSAGE

Opérez par chromatographie liquide (2.2.29).

Solution à examiner (a). Dissolvez 20,0 mg de lovastatine dans de l'acétonitrile R et complétez à 50,0 ml avec le même solvant.

Solution à examiner (b). Prélevez 10,0 ml de solution à examiner (a) et complétez à 20,0 ml avec de l'acétonitrile R.

Solution témoin (a). Dissolvez 10,0 mg de lovastatine SCR dans de l'acétonitrile R et complétez à 50,0 ml avec le même solvant.

Solution témoin (b). Prélevez 0,5 ml de solution à examiner (a) et complétez à 100,0 ml avec de l'acétonitrile R.

Les Prescriptions Générales (1) s'appliquent à toutes les monographies et autres textes

2077

Solution témoin (c). Prélevez 5,0 ml de solution témoin (a), ajoutez 1 mg de *simvastatine SCR* et complétez à 50,0 ml avec de l'*acétonitrile R*.

La chromatographie peut être réalisée en utilisant :

- une colonne d'acier inoxydable, d'une longueur de 0,25 m et d'un diamètre intérieur de 4,6 mm, remplie de *gel de silice octylsilylé pour chromatographie R* (5 µm),
- comme phase mobile, à un débit de 1,5 ml/min :

Phase mobile A. *Acétonitrile R*,

Phase mobile B. Solution d'*acide phosphorique R* à 0,1 pour cent V/V,

Intervalle (min)	Phase mobile A (pour cent V/V)	Phase mobile B (pour cent V/V)	Commentaire
0 - 5	60	40	isocratique
5 - 7	60 → 65	40 → 35	gradient linéaire
7 - 13	65 → 90	35 → 10	gradient linéaire
13 - 15	90	10	isocratique
15 - 17	90 → 60	10 → 40	gradient linéaire
17 - 20	60	40	rééquilibrage

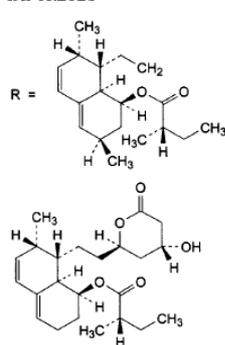
– comme détecteur, un spectrophotomètre réglé à 238 nm. Injectez 10 µl de solution témoin (c). Le dosage n'est valable que si, dans le chromatogramme obtenu, la résolution entre les pics correspondant respectivement à la *simvastatine* et à la *lovastatine* n'est pas inférieure à 5,0. Lorsque les chromatogrammes sont enregistrés dans les conditions décrites, la rétention relative de la *simvastatine* est de 1,1 environ (temps de rétention de la *lovastatine* : 7 min environ). Injectez 10 µl de solution témoin (a). Ajustez la sensibilité du système de façon que la hauteur du pic principal représente 50 pour cent au moins de l'échelle totale de l'enregistreur. Injectez 10 µl de solution à examiner (b).

Calculez la teneur en $C_{24}H_{36}O_5$ à partir de la surface des pics des chromatogrammes obtenus avec la solution à examiner (b) et la solution témoin (a), et de la teneur déclarée en $C_{24}H_{36}O_5$ de la *lovastatine SCR*.

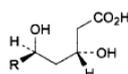
CONSERVATION

Sous azote, à une température de 2 °C à 8 °C.

IMPURETÉS



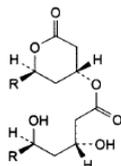
A. (2*S*)-2-méthylbutanoate de (1*S*,7*S*,8*S*,8*aR*)-8-[2-[(2*R*,4*R*)-4-hydroxy-6-oxotétrahydro-2*H*-pyran-2-yl]éthyl]-7-méthyl-1,2,3,7,8,8*a*-hexahydronaphtalén-1-yle (mévastatine),



B. acide (3*R*,5*R*)-7-[(1*S*,2*S*,6*R*,8*S*,8*aR*)-2,6-diméthyl-8-[(2*S*)-2-méthylbutanoyloxy]-1,2,6,7,8,8*a*-hexahydronaphtalén-1-yl]-3,5-dihydroxyheptanoïque (hydroxyacide de *lovastatine*),



C. (2*S*)-2-méthylbutanoate de (1*S*,3*R*,7*S*,8*S*,8*aR*)-3,7-diméthyl-8-[2-[(2*R*)-6-oxo-3,6-dihydro-2*H*-pyran-2-yl]éthyl]-1,2,3,7,8,8*a*-hexahydronaphtalén-1-yle (déshydrolovastatine),

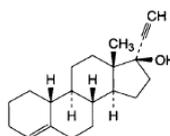


D. (3*R*,5*R*)-7-[(1*S*,2*S*,6*R*,8*S*,8*aR*)-2,6-diméthyl-8-[(2*S*)-2-méthylbutanoyloxy]-1,2,6,7,8,8*a*-hexahydronaphtalén-1-yl]-3,5-dihydroxyheptanoate de (2*R*,4*R*)-2-[2-[(1*S*,2*S*,6*R*,8*S*,8*aR*)-2,6-diméthyl-8-[(2*S*)-2-méthylbutanoyloxy]-1,2,6,7,8,8*a*-hexahydronaphtalén-1-yl]éthyl]-6-oxotétrahydro-2*H*-pyran-4-yle (dimère de *lovastatine*).

01/2005:0558

LYNESTRÉNOL

Lynestrenolum



$C_{20}H_{28}O$

M_r 284,4

DÉFINITION

Le *lynestrénol* contient au minimum 98,0 pour cent et au maximum l'équivalent de 102,0 pour cent de 19-nor-17α-pregn-4-én-20-yn-17-ol, calculé par rapport à la substance desséchée.

CARACTÈRES

Poudre cristalline blanche ou sensiblement blanche, pratiquement insoluble dans l'eau, soluble dans l'acétone et dans l'alcool.

IDENTIFICATION

Première identification : B.
Seconde identification : A, C.

Figure 6 : Monographie de la *lovastatine*

4.1 Spectres de référence de la lovastatine

Les données figurant ci-dessous sont extraites du Clarke's Analysis of Drugs and Poisons, 2006.

4.1.1 Spectre ultra-violet

Ce spectre est réalisé en solution acide (Figure 7).

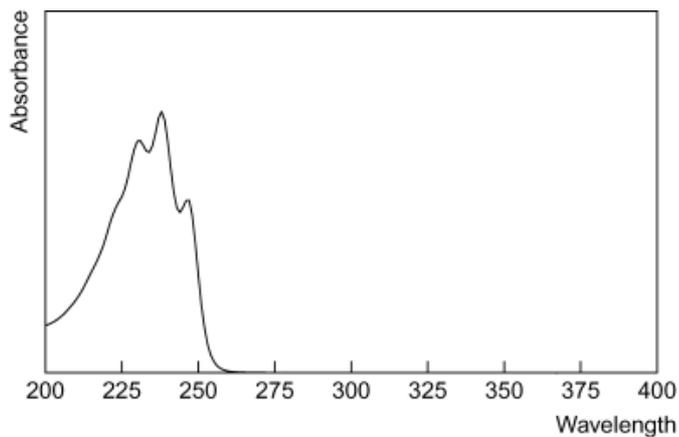


Figure 7 : Spectre ultraviolet de la lovastatine

Ce spectre présente 3 maximum d'absorption : 230, 238,6 et 246 nm (Huang et al, 2006).

4.1.2 Spectre infrarouge

Les principaux pics sont situés aux nombres d'onde : 1725, 1260, 1072 et 1460 cm^{-1} (Figure 8). Ce spectre est effectué avec un disque de Bromure de potassium (KBr).

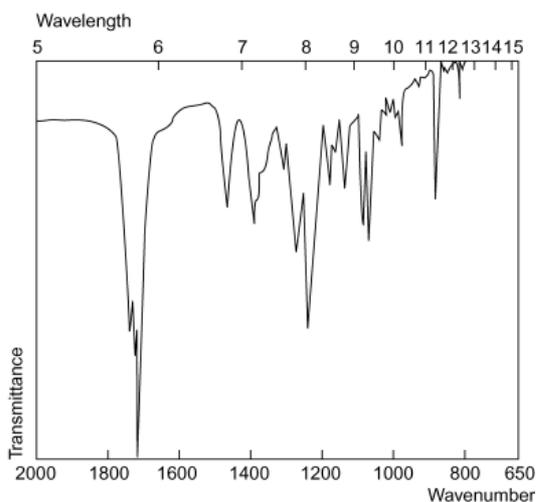


Figure 8 : Spectre Infrarouge de la lovastatine

4.1.3 Spectre de masse

Les principaux ions correspondent au rapport m/z égal à 159, 157, 64, 198, 172, 143, 105 et 73 (Figure 9).

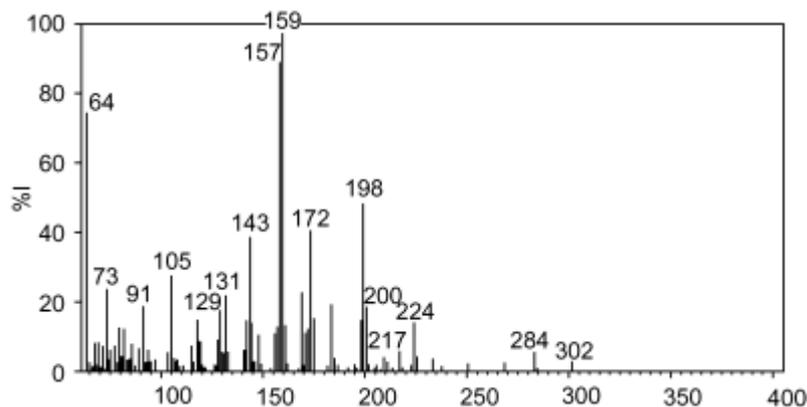


Figure 9 : Spectre de masse de la lovastatine

5 - Matériel et méthodes

5.1 Principe

Afin d'identifier et de quantifier les diverses monacolines présentes dans la levure de riz rouge, une extraction alcoolique associée à une filtration et suivi d'une analyse par C.L.H.P. sont réalisées. Un Vortex, un bain-marie, une centrifugeuse et une C.L.H.P. couplée à l'U.V. sont utilisés.

5.2 Réactifs

Le tableau ci-dessous rassemble les différents réactifs utilisés, leurs caractéristiques (date de péremption, numéro de lot, fabricant) ainsi que l'usage auquel ils sont destinés (Tableau 10).

Produit	Fabricant	N°lot	Date de péremption	Utilisation
Ethanol absolu	VWR	0403047	06/2009	Préparation des échantillons
Acide acétique 100 %	VWR	0400234	01/2009	Phase mobile
Acétonitrile	J.T.Baker	0605308005	02/2009	Phase mobile

Tableau 10 : Réactifs utilisés

5.3 Matériels et verrerie

- Spatule ;
- Tubes de 10 mL à centrifuger munis de bouchons en plastique bleu ;
- Pipette de 10 mL ;
- Vortex ;
- Bains à ultrasons ;
- Centrifugation (Jouan®) ;
- Fioles jaugées de 50 mL ;
- Pipettes Pasteur ;
- Bécher de 10 mL ;
- Vials pour HPLC ;
- Propipettes ;
- Micropipettes ;
- Seringues 5/10 mL ;
- Colonnes SPE (Solid-phase extraction) sur silice ;
- Filtres universels 0,45 µm de type AcroDisk®.

5.4 Substances

Le tableau ci-dessous réunit les différentes substances utilisées et leur numéro d'enregistrement (Tableau 11).

Produit	Fabricant	N° enregistrement Afssaps
MATIERES PREMIERES		
Lovastatine	SCR	-
SPECIALITES		
Red yeast rice	Oriyen	2005/U/XX/21475

Tableau 11 : Substances employées

5.5 Equipement

Les équipements utilisés sont les suivants : chaîne HPLC de la marque Agilent model 1100 composée d'une pompe quaternaire, d'un détecteur UV à barrette de diodes, d'un injecteur automatique réfrigéré, d'un four à colonne et du logiciel Chemstation.

6 - Mise au point de la méthode

6.1 Choix de la température d'extraction

6.1.1 Principe

Les données de la littérature soulignent que les monacolines ou statines contenues dans la levure de riz rouge sont fragiles notamment à l'hydrolyse et à la chaleur (Ma *et al.*, 2000 ; Li *et al.*, 2004 ; Li *et al.*, 2005 ; Lee *et al.*, 2006). Les travaux de Lee évoquent que le procédé d'extraction peut être conduit à 70°C mais que des températures excédant 80°C auraient tendance à diminuer le rendement d'extraction et à conduire à une pyrolyse de la monacoline K. La température optimale serait donc de 60°C. Cette étude vise donc à confirmer les travaux de Lee.

Pour ce faire, dans le premier cas, le bain n'est pas refroidit et donc atteint des températures proches de 60°C. Dans le second cas, le bain à ultrasons est refroidi au moyen de glace pilée régulièrement afin de conserver une température inférieure à 10 °C.

6.1.2 Résultats

Les résultats figurent dans le tableau ci-après (Tableau 12).

Vials	TR (min)	TRR	TRR réf (Li <i>et al.</i> , 2004)	Aire (mAU.s)	Symétrie	Résolution	% d'extraction	Nombre de statines avec certitude	Nombre de statines total
Blanc	–	–	–	–	–	–	–	–	–
Levure de riz rouge	4.729	0.276		344.741	0.4	1.15			
1ère extraction à chaud	5.332	0.312	0.319	103.081	0.4	0.99			
60°C	7.355	0.430	0.450	234.360	2.4	1.55			
	8.415	0.493	0.500	114.644	0.4	1.65			
	9.836	0.575		190.503	0.7	0.97			
	11.917	0.696	0.667	479.489	1.1	1.36			
	12.581	0.735	0.719	261.728	1.0	1.50			
	13.248	0.774		11.837	1.0	1.09			
	14.020	0.819	0.778	13955.600	1.0	1.86	91.788		
	15.164	0.886	0.889	448.813	1.0	1.31		5	19
	15.683	0.916		668.774	1.3	2.04			
	16.214	0.947	0.936	59.904	1.2	2.15			
	17.115	1.000	1	15187.700	0.9	1.32	91.721		
	17.374	1.015		222.393	0.0	1.83			
	18.426	1.077		26.811	0.3	1.84			
	20.276	1.185		55.746	0.8	1.28			
	20.745	1.212	1.24	361.064	0.8	1.96			
	21.827	1.275	1.291	7932.351	0.9	1.33	91.581		
	23.320	1.363		41.910	1.0	6.54			
Levure de riz rouge	11.914	0.696	0.719	40.242	1.0	2.92			
2ème extraction à chaud	14.016	0.819	0.778	1155.887	0.0	1.79	7.602		
60°C	15.157	0.886	0.889	45.448	1.0	1.24		4	6
	15.675	0.916	0.936	57.557	1.0	2.03			
	17.115	1.000	1	1259.285	1.0	1.38	7.605		
	21.827	1.275	1.291	663.249	0.9	1.34	7.657		

Vials	TR (min)	TRR	TRR réf (Li <i>et al.</i> , 2004)	Aire (mAU.s)	Symétrie	Résolution	% d'extraction	Nombre de statines avec certitude	Nombre de statines total	
Levure de riz rouge 3ème extraction à chaud 60°C	14.041	0.819	0.778	92.634	1.0	1.28	0.609	3	3	
	17.141	1.000	1	111.540	1.0	12.66	0.674			
	21.868	1.276	1.291	65.971	0.9	16.75	0.762			
Levure de riz rouge total à chaud 60°C	11.924	0.696	0.719	144.189	0.9	2.93	99,999	5	7	
	14.033	0.819	0.778	2358.316	1.0	1.90				
	15.178	0.886	0.889	85.941	1.1	1.24				
	15.698	0.916	0.936	104.828	1.2	2.00	100			
	17.135	1.000	1	2597.500	1.0	1.36				
	20.768	1.212	1.240	55.526	0.9	1.96				
Levure de riz rouge 1ère extraction après refroidissement <10°C	21.862	1.276	1.291	1318.292	0.9	1.33	100	5	18	
	4.724	0.276		355.012	0.4	1.11	91.343			
	5.340	0.312	0.319	108.630	0.4	0.99				
	7.361	0.430	0.45	223.873	2.2	2.02				
	8.338	0.487	0.50	308.462	0.9	1.49				
	9.832	0.575		194.151	0.7	0.94				
	11.908	0.696	0.667	491.277	1.1	1.35				
	12.569	0.735	0.719	289.867	1.0	1.50				
	13.249	0.774		20.832	0.9	2.06				
	14.015	0.819	0.778	14461.900	1.0	1.67				
	15.165	0.886	0.889	461.180	1.0	1.30				
	15.684	0.917	0.936	687.382	1.3	2.02				
	16.214	0.948	0.968	58.404	1.2	2.14				
	17.109	1.000	1	15700.400	0.7	1.29				91.486
	18.422	1.077		28.866	0.3	1.80				
20.275	1.185		54.921	0.8	1.25					
20.746	1.213	1.24	372.716	0.8	1.93					
21.831	1.276	1.291	7925.470	0.9	1.31	91.349				
23.326	1.363		41.686	1.0	6.44					

Vials	TR (min)	TRR	TRR réf (Li <i>et al.</i> , 2004)	Aire (mAU.s)	Symétrie	Résolution	% d'extraction	Nombre de statines avec certitude	Nombre de statines total
Levure de riz rouge	11.909	0.695	0.719	45.637	1.0	2.87			
2ème extraction après refroidissement <10°C	14.024	0.818	0.778	1250.381	0.0	2.09	7.898		
	15.172	0.885	0.889	47.452	1.0	1.24		4	6
	15.697	0.916	0.936	62.648	1.0	2.01			
	17.138	1.000	1	1330.351	1.0	1.37	7.752		
	21.860	1.276	1.291	683.132	0.9	1.32	7.874		
Levure de riz rouge	14.027	0.818	0.778	120.305	0.9	2.33	0.760		
3ème extraction après refroidissement <10°C	17.152	1.000	1	130.758	1.0	1.39	0.762	3	3
	21.884	1.276	1.291	67.423	0.9	16.99	0.777		
Levure de riz rouge	3.594	0.210		33.647	0.8	0.81			
Total après refroidissement <10°C	11.918	0.695	0.667	89.255	0.9	0.76			
	14.036	0.819	0.778	2593.590	0.0	4.43	100		
	15.187	0.886	0.889	86.080	1.1	1.28		5	8
	15.710	0.916	0.936	101.986	1.1	2.05			
	17.147	1.000	1	2680.866	1.0	1.37	100		
	20.790	1.213	1.24	56.414	0.9	9.73			
	21.886	1.276	1.291	1342.186	0.9	1.32	100		

Tableau 12 : Résultats des extractions de la levure de riz rouge à chaud (60°C) et avec refroidissement (< 10°C)

Légende :

TR, temps de rétention ; TRR, temps de rétention relatif.

Le Tableau 12 permet de montrer que les modifications observées entre la méthode à chaud (60°C) et la méthode avec refroidissement (< 10°C) sont minimales et non significatives. En effet, les paramètres tels que le nombre de statines, les aires, le pourcentage d'extraction sont semblables.

6.1.3 Conclusion

Dans un souci de praticité, la méthode sans refroidissement du bain à ultrasons est choisie, soit une extraction dans l'éthanol (75%) à 60°C.

6.2 Choix du nombre d'extractions

6.2.1 Principe

Les données de la littérature stipulent qu'il est nécessaire de réaliser 3 extractions à l'éthanol afin d'extraire le maximum de statines ou monacolines dans la levure de riz rouge (Li *et al.*, 2004).

Le protocole est le suivant :

- 0,5 g de poudre de riz rouge est transféré dans un tube à centrifuger ;
- Ajout de 10 mL d'éthanol à 75% ;
- Agitation mécanique (vortex) pendant \pm 15 min ;
- Bain à ultrasons pendant 60 min (60°C) ;
- Centrifugation pendant 10 min à 3000 rpm ;
- Cette procédure d'extraction est répétée 3 x ;
- L'ensemble des surnageants est transféré dans une fiole de 50 mL ;
- Ajuster à 50 mL avec l'éthanol à 75% ;
- Prélever 20 mL et transférer dans une fiole jaugée de 50 mL ;
- On complète à 50 mL avec 75% d'éthanol ;
- La solution est conservée 30 min ;
- Filtration sur membrane 0,45 μ m.

Après chaque extraction, on prélève un volume de surnageant (\pm 100 μ L, volume négligeable) que l'on aura au préalable filtré sur une membrane 0,45 μ m. On dispose ainsi de 3 prélèvements analytiques à 3 temps différents. Afin de statuer sur le nombre d'extraction à réaliser, il sera nécessaire de calculer le pourcentage d'extraction à chaque étape.

6.2.2 Résultats

Les résultats de cette étude sont exposés dans le tableau 12.

Les calculs sont effectués uniquement sur les 3 pics principaux aux temps de rétention de 14 min, 17 min et 21 min.

Extraction à chaud

La 1^{ère} extraction à chaud permet d'extraire 91,7 % des statines en moyenne si l'on se base sur les 3 statines majoritaires dans la levure de riz rouge.

La 2^{ème} extraction à chaud permet d'extraire 7,6 % des statines en moyenne si l'on se base sur les 3 statines majoritaires dans la levure de riz rouge.

La 3^{ème} extraction à chaud permet d'extraire 0,7 % des statines en moyenne si l'on se base sur les 3 statines majoritaires dans la levure de riz rouge.

Extraction à froid

La 1^{ère} extraction à froid permet d'extraire 91,4 % des statines en moyenne si l'on se base sur les 3 statines majoritaires dans la levure de riz rouge.

La 2^{ème} extraction à froid permet d'extraire 7,8 % des statines en moyenne si l'on se base sur les 3 statines majoritaires dans la levure de riz rouge.

La 3^{ème} extraction à froid permet d'extraire 0,8 % des statines en moyenne si l'on se base sur les 3 statines majoritaires dans la levure de riz rouge.

6.2.3 Conclusion

La 3^{ème} extraction a peu d'effet sur le rendement d'extraction puisqu'elle permet seulement d'extraire 0,7± 0,1 % de statines ou monacolines. Le choix se porte donc sur une méthode avec deux extractions successives par l'éthanol 75%.

6.3 Choix d'une méthode d'extraction spécifique

6.3.1 Définition et présentation du système SPE (Solid Phase Extraction)

On appelle S.P.E. (Solid Phase extraction) la technique de préparation d'échantillon capable :

- de soustraire les constituants de la matrice (les interférences) tels que les protéines ;
- de quantifier jusqu'au pg/mL grâce à la concentration de l'échantillon.

La figure 10 montre l'aspect général d'une cartouche type.

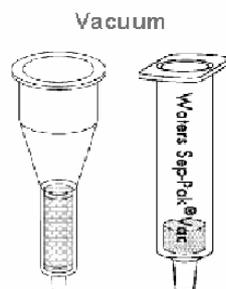


Figure 10 : Cartouches S.P.E. (Sigma-Aldrich, 2006)

2 stratégies peuvent être employées :

- La substance d'intérêt n'est pas retenue tandis que les interférents de la matrice sont adsorbés ;
- La substance d'intérêt est retenue tandis que les interférents de la matrice sont éliminés.

La première stratégie est habituellement choisie quand le composé à extraire est présent en grande quantité. Quand les molécules d'intérêt sont présentes en très faible quantité ou que de nombreux composés avec des polarités différentes doivent être isolés, la seconde stratégie est généralement employée. Cette dernière peut ainsi être utilisée pour enrichir un ensemble de molécules très faiblement concentré. Le principe de l'élution de composés à travers la colonne S.P.E. est présenté en figure 11.

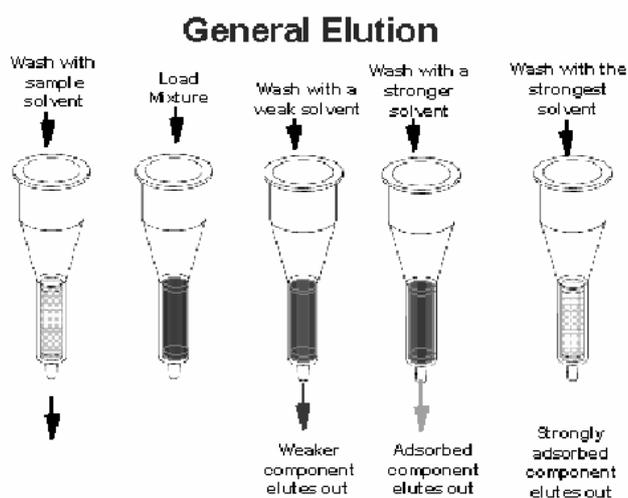


Figure 11 : Principe général d'élution (Sigma-Aldrich, 2006)

Cette technique est typiquement réalisée en chargeant l'échantillon sur une colonne préconditionnée contenant un agent chromatographique adsorbant.

Le système utilisé est représenté ci-dessous (Figure 12).



Figure 12 : Système S.P.E. (Solid Phase Extraction, 2006)

Un système de pompage relié à ce système permet la réalisation d'un vide maîtrisé entraînant l'élution des composés.

Il existe une grande diversité de phases S.P.E. On distingue des colonnes C₁₈, C₈, phényle, cyanyl, diol, NH₂, silice, alumine... Chacune de ces colonnes a une spécificité vis-à-vis de certaines molécules.

6.3.2 Principe et mise en oeuvre

La levure de riz rouge est un ensemble complexe de substances très variées (Heber *et al.*, 1999 ; Ma *et al.*, 2000 ; Li *et al.*, 2004) et de polarités différentes. Cette étude vise à étudier la faisabilité de la mise en place d'une méthode d'extraction spécifique afin de purifier la poudre de levure de riz rouge. Il serait ensuite possible d'isoler plus facilement les statines présentes dans cet extrait.

Les statines étant de polarités très différentes, il est difficile de dire quel type de support choisir.

La Colonne SPE constituée de silice adaptée à l'extraction de composés polaires tels que alcools, aldéhydes, amines, cétones, composés nitrés, acides organiques... est utilisée (Solid Phase Extraction, 2006);

La cartouche sélectionnée est conditionnée avec 3 mL d'acétone puis 3 mL d'éthanol. 5 mL de la solution commerciale de la poudre de levure de riz rouge (obtenu par la technique d'extraction exposée précédemment) sont déposés au sommet de la colonne. Un vide maîtrisé permet l'élution de la solution. L'élution est poursuivie par addition et élution d'1 mL d'acétone (Figure 13). L'éluat est alors recueilli et analysé. Lors de ces différentes étapes, il est essentiel de ne pas laisser s'assécher la colonne.

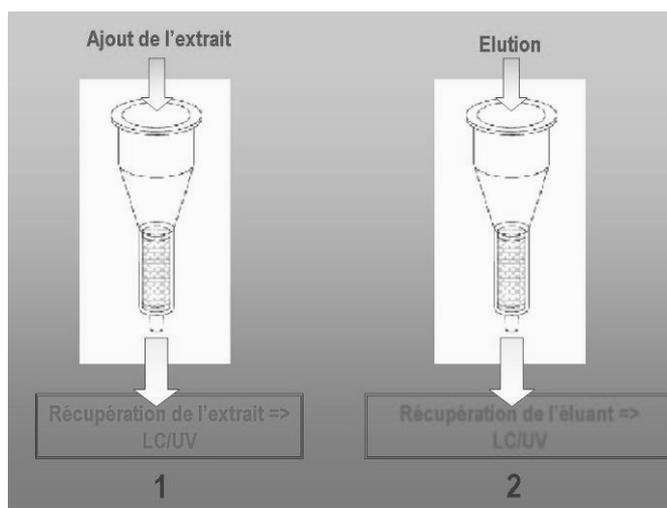


Figure 13 : Procédé d'extraction

1 : Récupération de l'extrait sur silice à chaud (60°C)

2 : Récupération de l'éluat sur silice à chaud (60°C)

Remarque :

Les études précédentes ayant démontré que la température n'influe pas sur le nombre de statines et sur l'efficacité d'extraction, cette étude ne montrera que les résultats des extractions sur colonne SPE à chaud.

Les 2 solvants ont été choisis sur la base de leurs polarités. L'éthanol étant plus polaire que l'acétone, ce dernier n'est donc pas utilisé pour l'élution des composés.

6.3.3 Résultats

6.3.3.1 Extraction sur colonne de silice à chaud (60°C)

La solution commerciale de poudre de levure de riz rouge est appelée extrait. Ce dernier résulte du passage à travers la colonne en absence d'éluion.

L'éluat correspond à la solution commerciale de levure de riz rouge après passage sur la colonne.

6.3.3.1.1 Analyse solution 1(extrait)

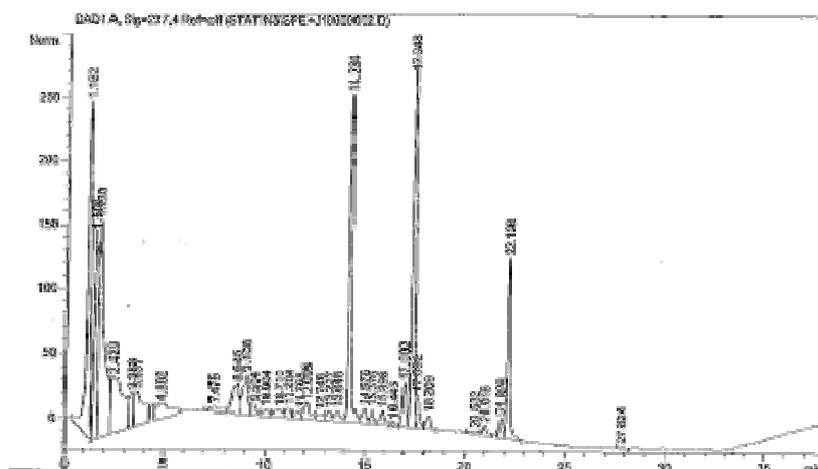


Figure 14 : Profil chromatographique de l'extrait après passage sur colonne SPE à base de silice

33 pics sont identifiables (Figure 14). Selon la correspondance des spectres UV trouvés avec les spectres UV de référence, il est possible de déterminer le nombre éventuel de statines ou monacolines présentes après passage sur colonne S.P.E. à base de silice. 5 monacolines peuvent être identifiées. Les résultats figurant dans le tableau ci-dessous ne reportent que les 5 principaux pics (Tableau 13).

	RT (min)	Aire (mAU*s)	Hauteur (mAU)	%
1	12,095	201,487	12,287	2,83
2	14,234	2555,065	255,121	35,92
3	17,348	2824,820	292,224	39,71
4	21,016	126,217	7,540	1,77
5	22,126	1406,020	139,341	19,77
Total		7113,608	706,514	100,00

Tableau 13 : Résultat solution 1

Remarque :

Les résultats observés dans l'extrait sont identiques à ceux de la solution commerciale de levure de riz rouge avant passage sur colonne SPE (solution de départ) en terme de temps de rétention et d'aires.

6.3.3.1.2 Analyse solution 2 (éluat)

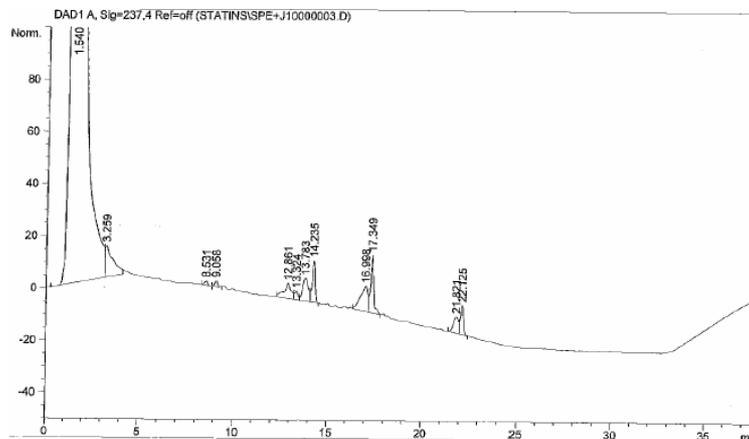


Figure 15 : Profil chromatographique de l'éluat après passage sur colonne SPE à base de silice

Peu de pics sont identifiables (Figure 15). Les monacolines mentionnées dans le tableau ci-dessous (Tableau 14) sont présentes à des quantités très faibles (de l'ordre de 200 mAU*s). En effet, la monacoline K, monacoline principale, au temps de rétention 17,349 min a une aire de seulement 262.656 mAU*s ce qui reste négligeable si l'on considère l'aire retrouvée dans l'extrait (2824,820 mAU*s) ou la solution de départ de poudre de levure de riz rouge.

	RT (min)	Aire (mAU*s)	Hauteur (mAU)	%
1	13,783	188,678	8,783	25,26
2	14,235	170,509	16,089	22,83
3	17,349	262,658	22,136	35,16
4	22,125	125,149	11,236	16,75
Total		746,994	58,244	100,00

Tableau 14 : Résultat solution 2

6.3.3.1.3 Conclusion de l'extraction sur colonne de silice à chaud (60°C)

Les résultats obtenus permettent de mettre en évidence 5 monacolines dans l'extrait et une quantité minimale de monacolines dans l'éluat. On observe donc à la fois une perte qualitative et quantitative en monacolines. En effet, l'aire totale est de 7114 mAU*s dans l'extrait tandis qu'il n'est que 747 mAU*s dans l'éluat. On peut donc présumer qu'aucune molécule ne s'est fixée sur la colonne par manque de spécificité. L'acétone ne permet donc pas l'élution des composés étant donné qu'aucune molécule ne s'est fixée.

Néanmoins, cette méthode pourrait être optimisée en utilisant d'autres solvants afin d'isoler les monacolines majoritaires. Par manque de temps, ce projet n'a pas été poursuivi.

7 - Conditions opératoires retenues

7.1 Conditions chromatographiques

La méthode développée est une LC/UV. Les conditions chromatographiques ont été sélectionnées afin de se rapprocher le plus possible de celles utilisées par Li pour la LC/MS. En effet, l'objectif ultime étant d'affirmer avec précision les monacolines présentes dans la levure de riz rouge, il semble donc plus judicieux de se placer directement dans des conditions compatibles avec une détection massique pour développer la méthode par LC/UV.

Les conditions chromatographiques utilisées dans cette étude sont rassemblées dans le tableau 15.

	LC/PDA
Composition de la phase mobile	0,1% acide acétique (éluant B) + ACN (éluant A)
Caractéristiques de la colonne	X-Terra C18 (150 mm x 2,1 mm, 3,5 µm)
Gradient	Linéaire
Caractéristiques du gradient	De 35% à 75% A en 20 min 75% A de 20 à 28 min
Débit	0,3 mL /min
Durée de l'analyse	35 min
Détection UV	237 nm
Température de la colonne	30°C
Volume d'injection	20µL

Tableau 15 : Conditions chromatographiques de la LC/PDA utilisée dans cette étude

L'intérêt du gradient réside dans sa capacité à séparer les différentes molécules présentes. Ainsi, une absence de gradient aurait pour conséquence une réduction du temps d'analyse avec un seul pic sur le chromatogramme et donc une médiocre séparation. Une colonne courte, de faible diamètre interne, avec un faible diamètre de particules est nécessaire. Un faible débit est indispensable vu la pression générée par la colonne. Concernant la longueur d'onde du détecteur, les spectres UV ayant démontré une absorption maximum à la longueur d'onde de 237 nm, cette longueur d'onde est donc adoptée (Tableau 15).

7.2 Préparations des échantillons et conditions d'extraction

L'analyse menée au paragraphe 6.2. a permis de statuer sur le nombre d'extractions nécessaires : 2 extractions suffisent.

Le protocole suivi est le suivant :

- 0,5 g de poudre de riz rouge est transféré dans un tube à centrifuger ;
- Ajout de 10 mL d'éthanol à 75% ;
- Agitation mécanique (vortex) pendant \pm 15 min ;
- Bain à ultrasons pendant 60 min (60°C) ;
- Centrifugation pendant 10 min à 3000 rpm ;
- Transférer le surnageant dans une fiole de 25 mL
- Cette procédure d'extraction est répétée 2 x ;
- L'ensemble des surnageants est transféré dans la fiole de 25 mL ;
- On complète à 25 mL avec 75% d'éthanol ;
- La solution est conservée 30 min ;
- Filtration sur membrane 0,45 μ m.

8 - Identification des monacolines présentes dans la levure de riz rouge et dosage de la lovastatine

8.1 Principe

L'objectif est d'identifier les monacolines effectivement présentes dans la levure de riz rouge après extraction par la méthode développée au paragraphe 7. Pour ce faire, une analyse approfondie des chromatogrammes et des spectres UV va être entreprise suivie d'une comparaison des temps de rétention relatifs.

Remarque :

Les chromatogrammes ainsi que les spectres UV sont ceux correspondants à la validation de la méthode sur le paramètre de la fidélité ; celui-ci est validé à partir de 6 extractions différentes. La validation sera exposée au paragraphe 9.

8.2 Analyse du produit

8.2.1 Caractéristiques du produit

Toutes les caractéristiques du produit exposées ci-après sont inscrites sur l'emballage du produit : Red yeast rice (levure de riz rouge). Il s'agit d'un « médicament traditionnel » utilisé pour le bien-être de la santé. Ce complément alimentaire contient 60 gélules dosées à 500 mg en *Monascus purpureus*. La posologie est de 1 à 2 gélules 2 à 3 fois par jour pendant les repas. Il doit être stocké à une température n'excédant pas 30°C.

Il est fabriqué par :

Multi Herbs Pharmaceutical
23-25 Alan Kepong entrepreneur's park
Off Jalan Kepong
52100 Kuala Lumpur
Malaysia

Ce produit est exempt des éléments suivants :

- agents de remplissage ;
- agents liants ;
- excipients ;
- sucre ;
- colorants artificiels ;
- additifs d'origine chimiques ;
- stabilisants ;
- conservateurs ;
- substances animales ;
- gélatine.

La date d'expiration du produit est en septembre 2007.

8.2.2 Composition qualitative et quantitative des monacolines dans la poudre de levure de riz rouge

8.2.2.1 Tableau récapitulatif

L'analyse des 6 extractions de la poudre de levure de riz rouge, correspondant aux résultats de la fidélité à J1, est exposée dans le Tableau 16.

Vials	PE (mg)	TR (min)	TRR	TR Réf (Li et al., 2004)	Identification des statines	TRR Réf (Li et al. 2004)	Identification des statines	Aire (mAU.s)	% monacolines	% total de monacolines
<u>Fidélité 1</u>	250,30			5,953		0.319	MJA			
				8,390		0.450	MJ			
				9,239		0.500	MXA			
		12,202	0,699	12,431	MX	0.667	MLA	105,624	1,4	
		14,347	0,822	14,487	MKA	0.719	MX			
		17,444	1,000	17,434	MK	0.778	MKA	2944,256	38,4	100,00
		16,565		0.889	ML					
		18,037		17,434		0.936	P1	3020,740	39,4	
		18,628		23,098	MM	0.968	MMA			
		21,101	1,210	23,098	MM	1	MK	63,121	0,8	
		22,206	1,273	24,057	DMK	1.240	MM	1532,361	20,0	
				1.291	DMK	1.291	DMK			
<u>Fidélité 2</u>	250,01			5,953		0.319	MJA			
				8,390		0.450	MJ			
				9,239		0.500	MXA			
		12,195	0,700	12,431	MX	0.667	MLA	107,019	1,4	
		14,339	0,823	14,487	MKA	0.719	MX			
		17,432	1,000	17,434	MK	0.778	MKA	2950,096	38,5	100,00
		16,565		0.889	ML					
		18,037		17,434		0.936	P1	3012,949	39,3	
		18,628		23,098	MM	0.968	MMA			
		21,099	1,210	23,098	MM	1	MK	63,922	0,8	
		22,207	1,274	24,057	DMK	1.240	MM	1523,449	20,0	
				1.291	DMK	1.291	DMK			
<u>Fidélité 3</u>	250,69			5,953		0.319	MJA			
				8,390		0.450	MJ			
				9,239		0.500	MXA			
		12,190	0,699	12,431	MX	0.667	MLA	108,809	1,4	
		14,337	0,822	14,487	MKA	0.719	MX			
		17,437	1,000	17,434	MK	0.778	MKA	2994,662	38,4	100,00
		16,565		0.889	ML					
		18,037		17,434		0.936	P1	3072,257	39,4	
		18,628		23,098	MM	0.968	MMA			
		21,099	1,210	23,098	MM	1	MK	65,783	0,8	
		22,207	1,274	24,057	DMK	1.240	MM	1562,671	20,0	
				1.291	DMK	1.291	DMK			

Vials	PE (mg)	TR (min)	TRR	TR Réf (Li et al., 2004)	Identification des statines	TRR Réf (Li et al. 2004)	Identification des statines	Aire (mAU.s)	% monacolines	% total de monacolines
<u>Fidélité 4</u>	251,12	12,189	0,700	5,953	MX	0.319	MJA	107,430	1,4	100,000
				8,390		0.450	MJ			
				9,239		0.500	MXA			
				12,431		0.667	MLA			
				13,403		0.719	MX			
				14,487		0.778	MKA			
				16,565		0.889	ML			
17,415	1,000	17,434	P1	3074,837	39,4					
18,037	1,209	18,037	0,968	MMA	64,976	0,8				
18,628		1	MK							
23,098		1.240	MM							
22,165	1,273	24,057	1.291	DMK	1550,867	19,9				
<u>Fidélité 5</u>	250,73	12,181	0,699	5,953	MX	0.319	MJA	101,879	1,4	100,000
				8,390		0.450	MJ			
				9,239		0.500	MXA			
				12,431		0.667	MLA			
				13,403		0.719	MX			
				14,487		0.778	MKA			
				16,565		0.889	ML			
17,424	1,000	17,434	P1	2897,382	39,4					
18,037	1,210	18,037	0,968	MMA	62,273	0,8				
18,628		1	MK							
23,098		1.240	MM							
22,194	1,274	24,057	1.291	DMK	1477,219	20,1				
<u>Fidélité 6</u>	250,36	12,195	0,699	5,953	MX	0.319	MJA	108,369	1,4	100,000
				8,390		0.450	MJ			
				9,239		0.500	MXA			
				12,431		0.667	MLA			
				13,403		0.719	MX			
				14,487		0.778	MKA			
				16,565		0.889	ML			
17,434	1,000	17,434	P1	3044,236	39,3					
18,037	1,210	18,037	0,968	MMA	65,266	0,8				
18,628		1	MK							
23,098		1.240	MM							
22,198	1,273	24,057	1.291	DMK	1543,684	19,9				

Tableau 16 : Composition qualitative et quantitative en monacolines de la poudre de levure de riz rouge. Tableau récapitulatif des 6 extractions.

Légende : PE, prise d'essai ; TR, temps de rétention ; TRR, temps de rétention relatif.

L'homogénéité de teneur en monacolines est démontrée. Les pourcentages obtenus pour les 5 monacolines identifiées sont : 1,4 %, 38,5 %, 39,4 %, 0,8 % et de 20,0% pour les monacolines X, KA, K, M et la DMK avec 6 extractions différentes de poudre de levure de riz rouge.

8.2.2.2 Dosage de la lovastatine

Les résultats du dosage de la lovastatine dans l'échantillon à l'analyse sont présentés dans la feuille de calcul suivante (Figure 16):

PRODUIT:		Levure de riz rouge			
N° enregistrement :		2005/U/XX/21475			
<i>Dosage par HPLC de la lovastatine</i>					
Titre étalon (%) =		100,00%			
Teneur en eau étalon (%) =		0,00%			
Volume de dilution étalon (ml) =		1000,00		pe/50-dilution 1/20	
Volume de dilution dosage (ml) =		25		pe/25	
	Masse (g)	Aire	Teneur (g/100g)	%(m/m)	F.R. %
Etalon	0,01013	2029,809			
Répétition 1	0,2503	3027,123	0,151	0,603	120939784,3%
Répétition 2	0,2503	3040,819	0,152	0,606	121486959,6%
Répétition 3	0,2503	3040,624	0,152	0,606	121479195,8%
Répétition 4	0,2503	3040,026	0,152	0,605	121455298,4%
Répétition 5	0,2503	3046,782	0,152	0,607	121725208,9%
Répétition 6	0,2503	3067,035	0,153	0,611	122534345,6%
Moyenne		2898,888	0,152		
Commentaires					
La teneur moyenne en lovastatine dans la levure de riz rouge est de 0,152 %					

Figure 16 : Teneur moyenne en lovastatine dans la poudre de levure de riz rouge. Feuille de calcul.

Dans l'échantillon considéré, la teneur moyenne en lovastatine dans la poudre de levure de riz rouge est de 0,152%.

Le détail des calculs est exposé ci-dessous :

$$\frac{C_e}{C_t} = \frac{A_e}{A_t}$$

$$C_e = \frac{A_e}{A_t} \times C_t$$

$$C_e = \frac{A_e}{A_t} \times \frac{PE_t}{V_t}$$

$$C_e = \frac{A_e}{A_t} \times \frac{PE_t}{V_t} \times 25 \quad \Rightarrow \text{car la poudre de levure de riz rouge est reprise dans un volume de 25 mL}$$

$$C_e = \frac{A_e}{A_t} \times \frac{PE_t}{V_t} \times 25 \times \frac{1000}{PE_e} \quad \Rightarrow \text{quantité de lovastatine dans 1 g de poudre de levure de riz rouge}$$

$$C_e = \frac{A_e}{A_t} \times \frac{PE_t}{V_t} \times 25 \times \frac{1000}{PE_e} \times 100 \quad \Rightarrow \text{quantité de lovastatine dans 100 g de poudre de levure de riz rouge}$$

Teneur dans une gélule :

Le tableau ci-dessous (Tableau 17) renseigne les masses de poudre obtenues :

Levure de riz rouge	Gélule pleine (mg)	Gélule vide (mg)	Masse de la poudre (mg)
1	634,7	100,1	535
2	631,1	101,7	529
3	604,6	92,24	512
4	598,3	100,8	498
5	618,7	97,55	521
moyenne	617,5	98,46	519

Tableau 17 : Masses obtenues de poudre de levure de riz rouge

La teneur en lovastatine est de 0,152 % soit 0,152 g de lovastatine pour 100 g de poudre. Si l'on considère la moyenne de la masse de poudre égale à 519 mg, il est possible de calculer la teneur de lovastatine dans une gélule.

Dans une gélule de 519 mg en moyenne, on a donc $7,88 \cdot 10^{-4}$ g de lovastatine soit 0,789 mg.

Dans l'échantillon considéré, la teneur moyenne en lovastatine dans la poudre de levure de riz rouge est de 0,789 mg/gélule.

8.2.3 Analyse chromatographique et des spectres UV

8.2.3.1 Introduction

La fidélité ayant été démontrée au travers de nombreux tests statistiques (se référer au paragraphe 9), un seul chromatogramme, associé aux divers spectres UV, correspondant à une seule extraction de la poudre de levure de riz rouge, sera étudié. Le chromatogramme correspondant à la fidélité à J1 (extraction 2) est donc choisi arbitrairement.

8.2.3.2 Analyse chromatographique

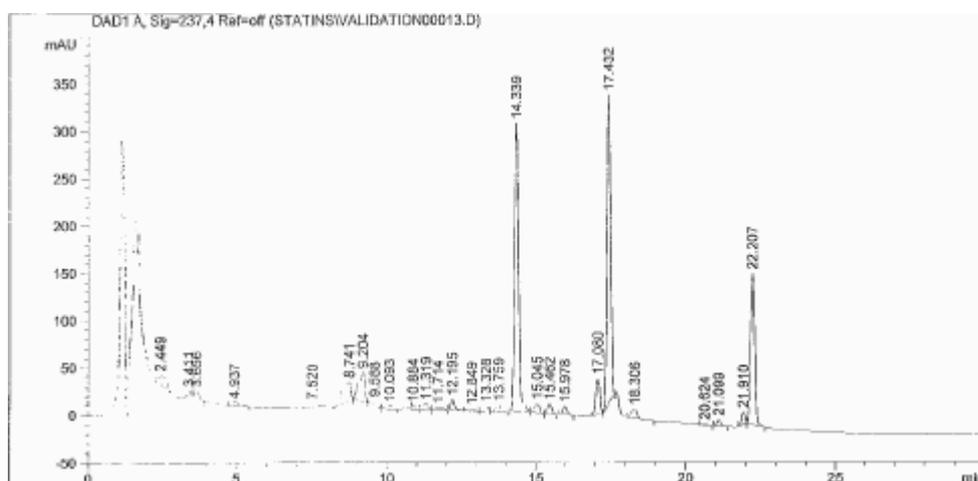


Figure 17 : Chromatogramme obtenu avec l'extraction de la poudre de levure de riz rouge (Fidélité J1, extraction 2)

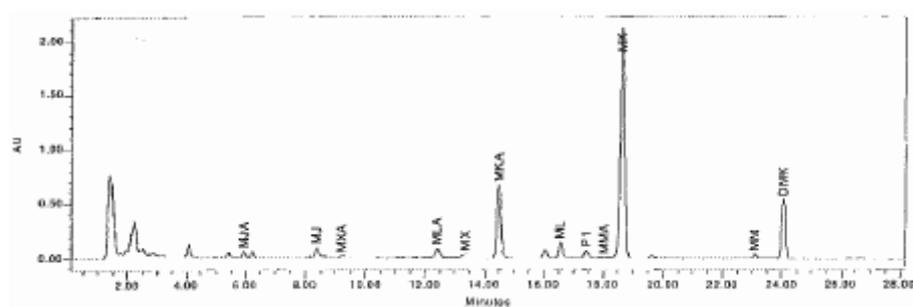


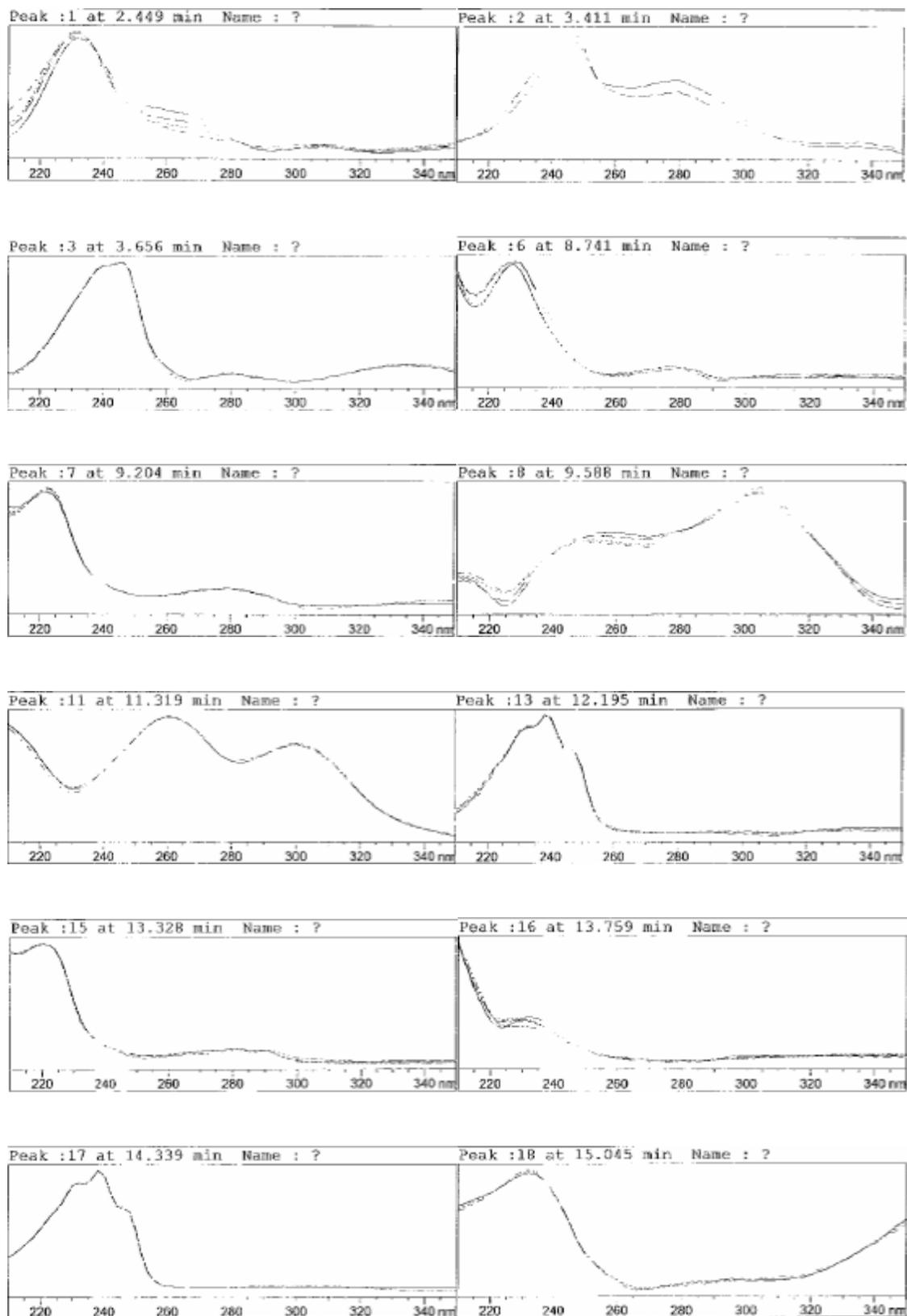
Figure 18 : Chromatogramme de référence (Li *et al.*, 2004)

Le chromatogramme de l'extrait et de référence sont comparables. 3 pics majoritaires sont observables et correspondent à la monacoline K, la monacoline K acide et la DMK (déhydromonacoline K).

A partir des temps de rétention relatifs calculés et des temps de rétention relatifs de référence (Li *et al.*, 2004), il est donc possible d'identifier ces monacolines. Il s'agit des monacolines X, K acide, K, M et la DMK (Figure 17 et 18).

8.2.3.3 Analyse des spectres UV

Les pics sélectionnés, avec un temps de rétention donné, donne des spectres UV (Figure 19).



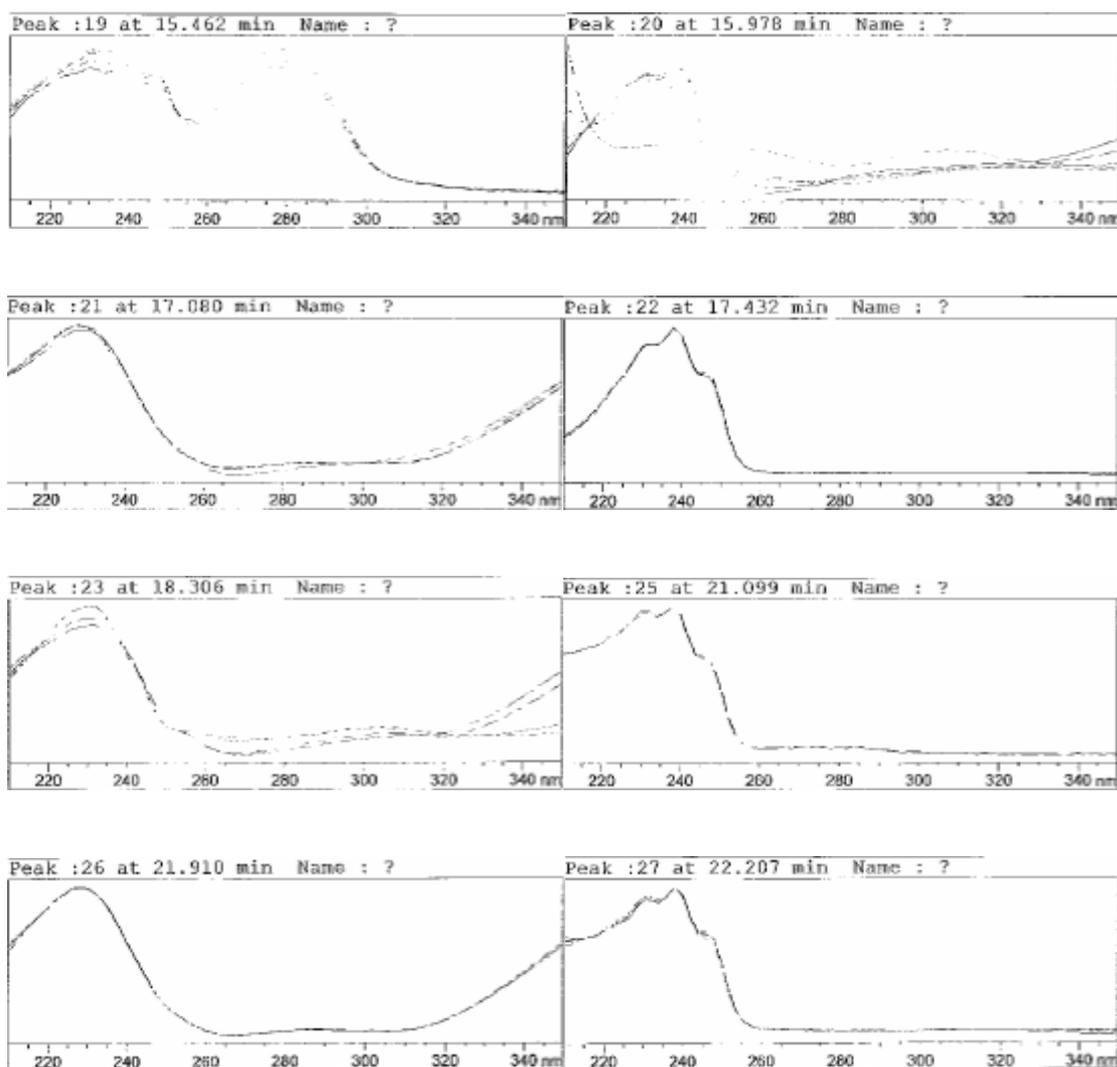


Figure 19 : Spectres UV correspondant à l'extraction 2 de la fidélité à J1

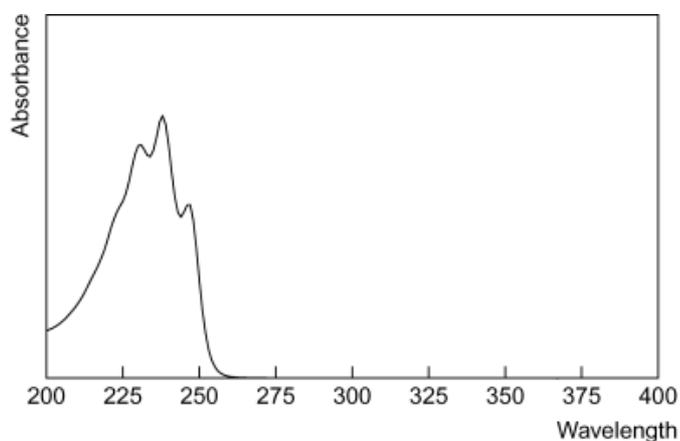
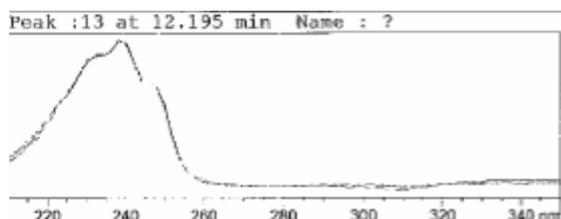
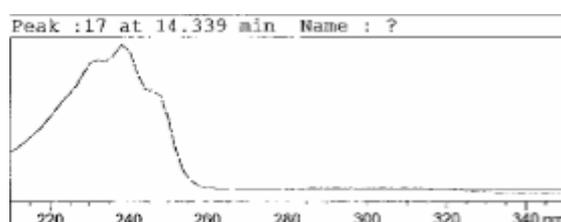


Figure 20 : Spectre ultraviolet de la lovastatine (Huang et al, 2006)

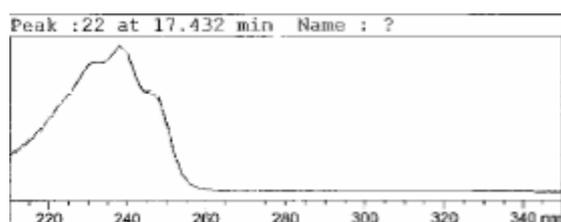
Seules 5 monacolines possèdent un spectre similaire au spectre de référence, avec 3 maximum d'absorption : à 230, 238,6 et 246 nm Il s'agit des monacolines apparaissant aux temps de rétention : 12,195 / 14,339 / 17,432 / 21,99 / 22,207 correspondant aux monacolines X, K acide, K, M et la DMK (Figure 19, 20 et 21).



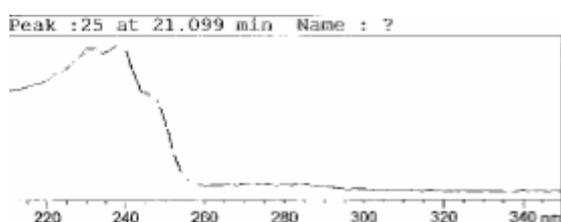
monacoline X



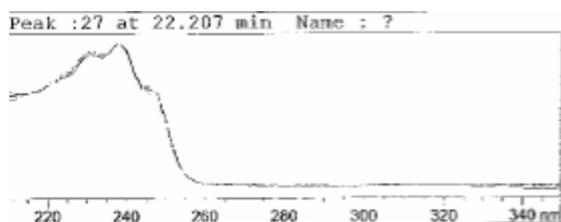
monacoline K acide



monacoline K



monacoline M



déhydromonacoline K

Figure 21 : Spectres UV des 5 monacolines principales

Pour des concentrations faibles en monacolines, les spectres UV peuvent être lissés si bien que les maximum d'absorption ne pourront pas apparaître. Cette hypothèse est plausible dans le sens où la poudre de levure de riz rouge est un mélange complexe de monacolines. Il est donc envisageable de penser que certaines monacolines possédant un spectre UV non caractéristique par cette méthode, ne seront pas identifiées.

8.2.3.4 Conclusion

Les monacolines peuvent être identifiées par comparaison du chromatogramme essai avec le chromatogramme de référence et par le biais des temps de rétention relatifs (TRR).

Leurs spectres UV peuvent également permettre de les identifier. Les 5 monacolines retrouvées dans la poudre de levure de riz rouge présentent une structure chimique semblable : présence d'une fonction lactonique ou acide, de 3 cycles, de fonctions hydroxyles (Figure 22).

Les structures des 5 monacolines majoritaires sont rappelées ci-dessous :

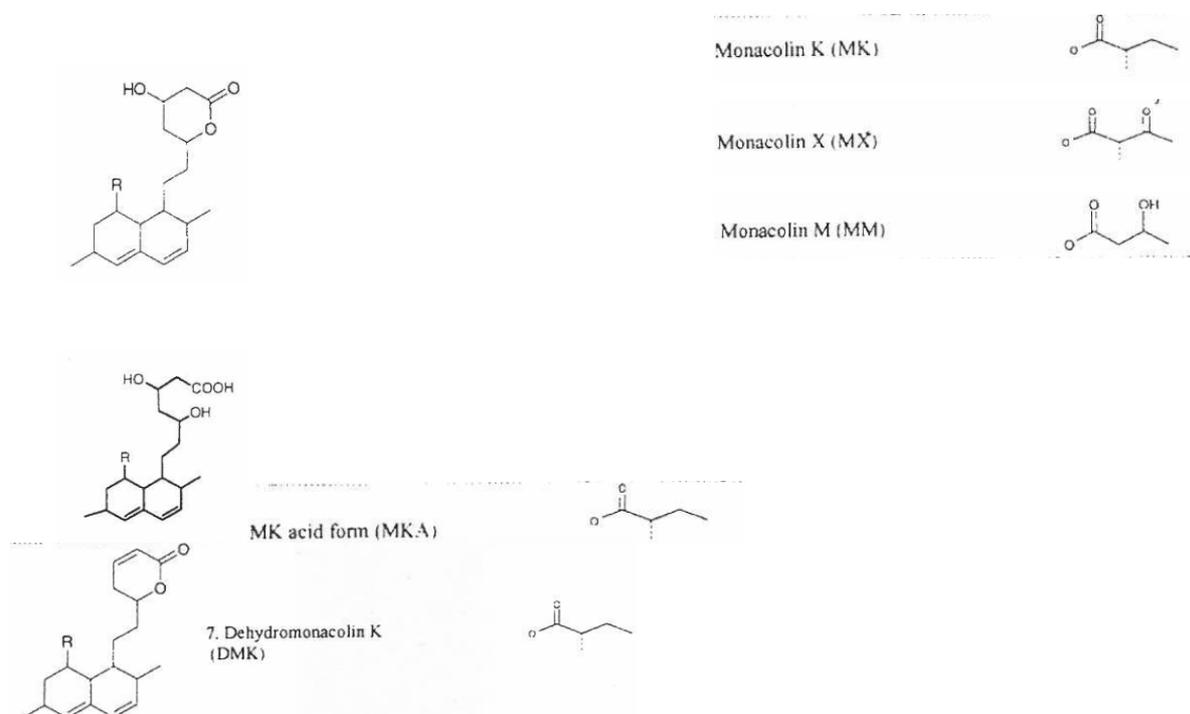


Figure 22 : Structure des monacolines K, K acide, M, X et la DMK.

Si l'on admet cette supposition, leurs spectres devraient être identiques à celui de la lovastatine de référence (SCR). Cette supposition permettrait d'assurer l'exactitude de l'identification des monacolines dans la levure de riz rouge.

Pour confirmer cette hypothèse d'identification, il est donc indispensable soit de passer sur LC/MS soit d'obtenir les monacolines de référence. Les spectres UV des échantillons seraient alors comparés avec les spectres UV des substances de référence. Dans le cas de l'analyse chromatographique, chaque témoin permettrait l'identification et le dosage précis d'une monacoline. Cependant, aujourd'hui, ces monacolines naturelles ne sont pas encore disponibles sur le marché. La LC/MS s'avère donc une méthode de choix pour l'identification des monacolines dans la levure de riz rouge. Le dosage peut être maintenu par chromatographie liquide avec détection UV.

9 - Éléments de validation de la méthode

9.1 Introduction

La validation se définit comme « la confirmation par examen et l'apport de preuves objectives du fait que les prescriptions particulières en vue de l'utilisation prévue déterminée sont remplies » ISO/CEI 17025 § 5.4.5.1. (Désenfant *et al.*, 2006).

Les performances d'une méthode d'analyse peuvent s'exprimer à l'aide de caractéristiques telles que : la sélectivité, la spécificité, la justesse, la linéarité, la répétabilité, la reproductibilité, la robustesse, la limite de détection, la limite de quantification...La validation des méthodes analytiques est développée dans les recommandations ICH (Annexe 1 et 2).

Dans le cadre de ce développement seront exposées les caractéristiques suivantes : la limite de détection et de quantification, la linéarité, la répétabilité de l'injection, la répétabilité de la préparation, la fidélité intermédiaire ainsi que les données de stabilité en cours d'analyse et enfin, l'étude de l'effet matrice par la méthode des ajouts dosés afin d'évaluer la spécificité ou sélectivité de la méthode (Désenfant *et al.*, 2006).

Excepté pour la linéarité et la stabilité, la validation de la méthode d'analyse a été réalisée sur 3 jours, avec la solution commerciale de poudre de levure de riz rouge, par le même opérateur et sur le même appareillage. La linéarité et la stabilité de la lovastatine ont été conduites sur des dilutions de la substance de référence (lovastatine SCR) par le même opérateur, sur le même appareillage, sur 3 jours pour la linéarité et sur 15 jours pour la stabilité de la lovastatine.

9.2 Limite de détection (LoD) et de quantification (LoQ)

9.2.1 Définitions

9.2.1.1 Limite de détection

La limite de détection (LoD) est définie comme étant la plus petite concentration ou teneur de l'analyte pouvant être détectée, avec une incertitude acceptable, mais non quantifiée comme une valeur exacte dans les conditions expérimentales décrites de la méthode. Cette limite sert essentiellement à définir le domaine d'utilisation de la méthode d'analyse.

La limite de détection (LoD) est définie comme la masse ou la concentration d'analyte dans l'échantillon donnant un rapport S/B = 3 (Signal sur Bruit) (Pharmacopée Européenne, V^e édition).

9.2.1.2 Limite de quantification

La limite de quantification (LoQ) est définie comme étant la plus petite concentration ou teneur en analyte pouvant être quantifiée, avec une incertitude acceptable, dans les conditions décrites de la méthode avec une justesse et une reproductibilité définies. Cette limite sert essentiellement à définir le domaine d'utilisation de la méthode d'analyse.

La limite de quantification (LoQ) est la quantité la plus faible d'analyte dans un échantillon qui peut être déterminée quantitativement avec une fidélité et une exactitude satisfaisante. Cette limite est obtenue pour une quantité ou concentration d'analyte tel que le rapport S/B = 10 (Pharmacopée Européenne, V^e édition).

9.2.2 *Méthodes disponibles*

9.2.2.1 Approche « résultats »

9.2.2.1.1 *Méthode 1 : Lecture directe de n mesures (réponse ou grandeur de l'analyte) de blancs d'analyse indépendants sur des échantillons contenant l'ensemble des constituants, à l'exception de la substance à rechercher.*

$$\left| \begin{array}{l} \text{LoD} = m_{\text{blanc}} + 3 S_{\text{blanc}} \\ \text{LoQ} = m_{\text{blanc}} + 10 S_{\text{blanc}} \end{array} \right.$$

Où m_{blanc} et S_{blanc} représentent la moyenne et l'écart-type sur les n mesures de blancs.

Note : Le facteur multiplicatif 3 correspond à un risque de 0,13 % de conclure à la présence de la substance recherchée alors qu'elle est absente ; celui de 10 correspond à un risque de 0,5 %.

9.2.2.1.2 *Méthode 2 : Utilisation de la droite d'étalonnage : $Y = a + bx$*

La limite de détection est la plus petite concentration que l'on peut distinguer du blanc avec un risque de 0,13 % de garder des échantillons ne contenant rien. C'est à dire la valeur à partir de laquelle un test statistique de comparaison de la réponse à la valeur 0 devient significatif avec un risque d'erreur α de 0,13 %.

D'où :

$$\left| \begin{array}{l} Y_{\text{LoD}} = a + 3 S_a \\ X_{\text{LoD}} = (a + 3 S_a) / b \end{array} \right.$$

Avec S_a correspondant à l'écart-type sur l'ordonnée à l'origine de la droite de régression. Le raisonnement est le même pour la LoQ où le facteur de multiplication est 10 (risque de 0,5 %).

9.2.2.2 Approche graphique

Pour la méthode d'analyse qui fournit un enregistrement graphique (Exemple : Chromatographie) ; la limite de détection est estimée à partir du bruit de fond de l'enregistrement du blanc d'analyse sur un échantillon.

$$\left| \begin{array}{l} \text{LoD} = 3 \times h \times R \text{ (le risque associé reste inférieur à 0,13\%)} \\ \text{LoQ} = 10 \times h \times R \text{ (le risque associé reste inférieur à 0,5 \%) } \end{array} \right.$$

Avec :

- h l'amplitude moyenne ou maximum du signal sur une fenêtre correspondant à 10 largeurs du pic à mi-hauteur de part et d'autre du temps de rétention selon la stabilité ;
- R le facteur de réponse quantité/signal, exprimée en quantité matière/hauteur.

A chaque fois, trois séries de 3 injections sont réalisées sur des blancs à plusieurs jours d'intervalle.

9.2.2.2.1 Méthode du h_{max}

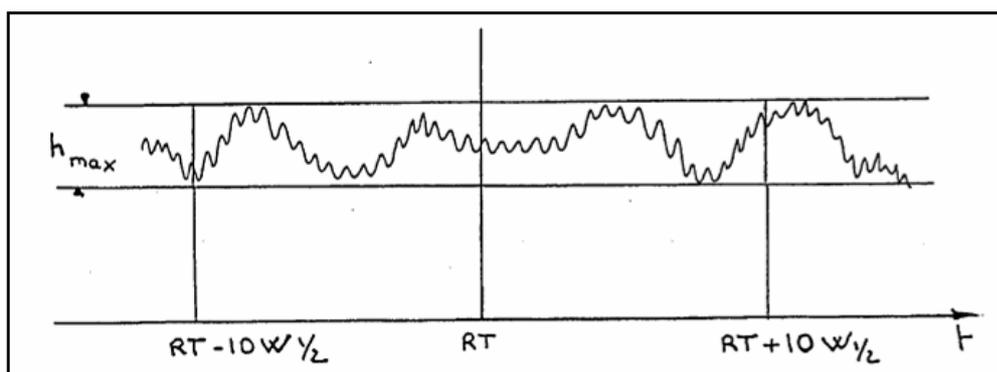


Figure 23 : Détermination de la LoD et de la LoQ par la méthode du h_{max}

- Agrandir au maximum le bruit de fond (Figure 23) ;
- Centrer sur le temps de rétention du produit (RT) ;
- Dessiner une fenêtre de 10 largeurs du pic à mi-hauteur ($W \frac{1}{2}$) de part et d'autre du RT ;
- Tracer deux parallèles passant l'une par le sommet du pic le plus élevé, l'autre par la base de la vallée la plus profonde ;
- Evaluer la hauteur => h_{max} ;
- Calculer le facteur de réponse (Facteur R) ;
- $\text{LoD}_{max} = 3 \times h_{max} \times R$;
- $\text{LoQ}_{max} = 10 \times h_{max} \times R$.

9.2.2.2.2 Méthode du h_{moyen}

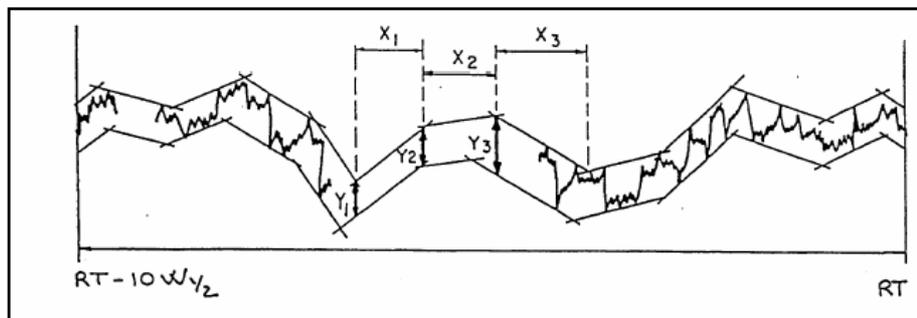


Figure 24 : Détermination de la LoD et de la LoQ par la méthode du h_{moyen}

- Agrandir au maximum le bruit de fond (Figure 24) ;
- Centrer sur le temps de rétention du produit (RT) ;
- Prendre une fenêtre de 10 largeurs du pic à mi-hauteur ($W_{1/2}$) de part et d'autre du RT ;
- Découper en 20 tranches égales (x) ;
- Tracer deux parallèles, dans chaque bloc, l'une passant par le sommet du pic le plus élevé, l'autre par la base de la vallée la plus profonde ;
- Mesurer les hauteurs y ;
- Calculer la moyenne ($y = h_{moyen}$) ;
- Calculer le facteur de réponse (Facteur R) ;
- $LoD_{moyen} = 3 \times h_{moyen} \times R$;
- $LoQ_{moyen} = 10 \times h_{moyen} \times R$.

Ces estimations peuvent elles-mêmes être validées en injectant des quantités de soluté proches des limites calculées (Figure 23 et 24).

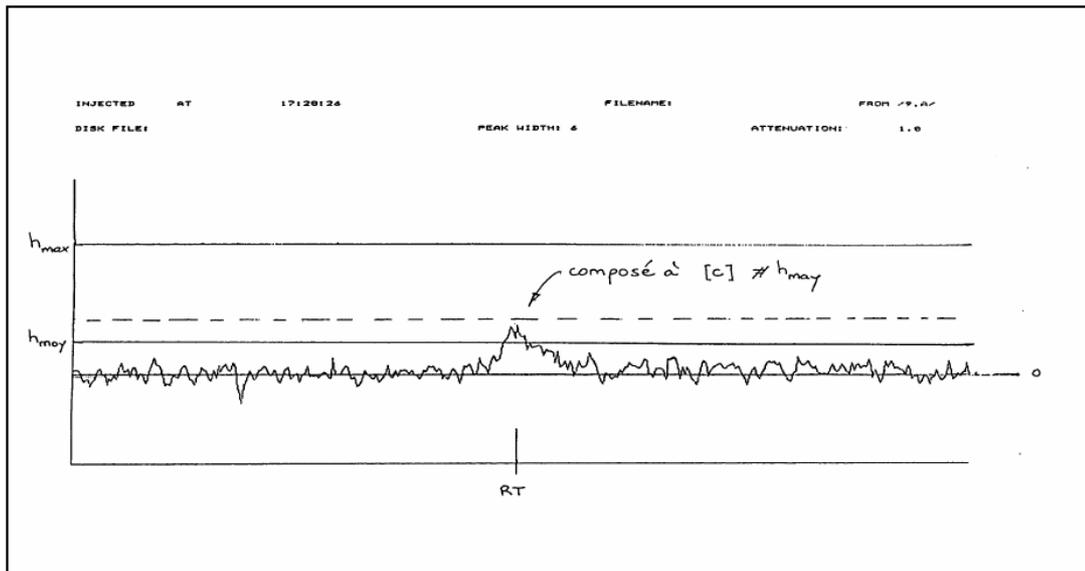


Figure 25 : Validation des calculs de limites. Concentration du composé proche du H_{moyen}

Note : La ligne pointillée correspond à la valeur réelle injectée.

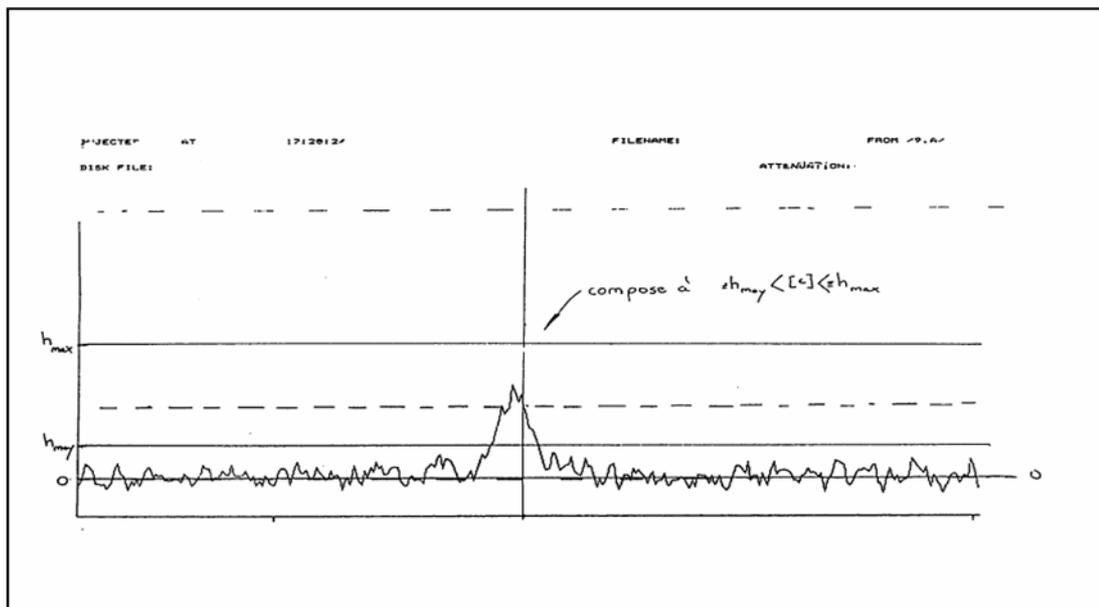


Figure 26 : Validation des calculs de limites. Concentration du composé comprise entre le H_{moyen} et le H_{max}

Remarque :

La ligne pointillée correspond à la valeur réelle injectée.

Les méthodes exposées ci-dessus sont conformes à la Pharmacopée Européenne, V^e édition.

9.2.3 Méthodologies testées

9.2.3.1 Préparations des solutions

A partir de la solution au 1/100^e, on réalise des dilutions successives. La figure ci-dessous résume les dilutions effectuées (Figure 27).

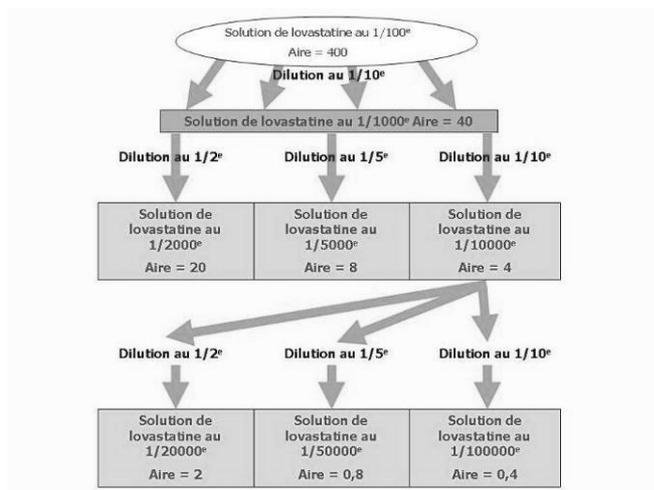


Figure 27 : Dilutions de lovastatine

Des dilutions successives d'une solution de lovastatine SCR à 0,217 mg/ml sont réalisées : 1/1000^e, 1/2000^e, 1/5000^e, 1/10000^e, 1/20000^e, 1/50000^e et 1/100000^e. A partir des chromatogrammes obtenus, il sera ensuite calculé le rapport signal sur bruit (S/B). Si la valeur est proche de 3, on pourra donc en déduire que la concentration choisie correspond bien à la limite de détection (valeur proche de 10 pour la limite de quantification).

9.2.4 Résultats

9.2.4.1 Limite de détection

9.2.4.1.1 Approche graphique

Les tableaux 18 et 19 exposent les résultats obtenus avec les dilutions de lovastatine.

	Lovastatine 1/10	Lovastatine 1/100	Lovastatine 1/1000	Lovastatine 1/2000	Lovastatine 1/5000	Lovastatine 1/10000	Lovastatine 1/20000	Lovastatine 1/50000	Lovastatine 1/100000
Concentration (mg/mL)	0,217	2,17.10 ⁻²	2,17.10 ⁻³	2,17.10 ⁻⁴	1,085.10 ⁻⁴	0,434.10 ⁻⁴	2,17.10 ⁻⁵	1,085.10 ⁻⁵	0,434.10 ⁻⁵
Concentration (ppm)	217	21,7	2,17	0,217	0,1085	0,0434	0,0217	0,01085	0,00434
Tr (min)	17,480	17,472	17,483	17,479	17,476	17,477	17,476	17,481	17,458
Aire du pic (mAU*s)	4342,712	408,655	41,519	21,539	8,151	4,354	2,373	0,860	0,407
Hauteur (mAU)	486,454	47,406	4,667	2,392	9,414.10 ⁻¹	4,897.10 ⁻¹	2,794.10 ⁻¹	1,157.10 ⁻¹	5,175.10 ⁻²

Tableau 18 : Résultats des différentes dilutions de lovastatine

Dilutions de lovastatine	TR (min)	Aire (mAU.s)	Hauteurs (mAU)
1/1000 ^e	17,483	41,519	4,667
1/2000 ^e	17,479	21,539	2,392
1/5000 ^e	17,476	8,151	0,941
1/10000 ^e	17,477	4,354	0,490
1/20000 ^e	17,476	2,373	0,279
1/50000 ^e	17,481	0,860	0,116
1/100000 ^e	17,458	0,407	0,052

Tableau 19 : Détermination de la dilution de la LoD

A partir des chromatogrammes, le rapport signal sur bruit est calculé à partir de la formule suivante :

$$\frac{2xH}{h} \quad \text{où } H \text{ est la hauteur du pic à son maximum et } h \text{ l'amplitude du bruit de fond.}$$

Il est égal à 4,75. Cette valeur est proche de la LoD (S/N = 3) pour la dilution 1/50000^e en lovastatine ce qui correspond à une concentration de 1,09.10⁻⁵ mg/mL (Annexe 3). Il est donc possible de détecter 0,01085 ppm dans la poudre de levure de riz rouge.

9.2.4.1.2 Approche par utilisation de la droite d'étalonnage

La droite d'étalonnage a été réalisée avec les dilutions de 1/1000^e à 1/100000^e. Les données correspondantes à des dilutions plus faibles (1/100^e et 1/10^e) n'ont pas été prises en compte dans la droite d'étalonnage car ces points risquent de fortement dévier la droite et fausser la détermination de la LoD (Figure 28).

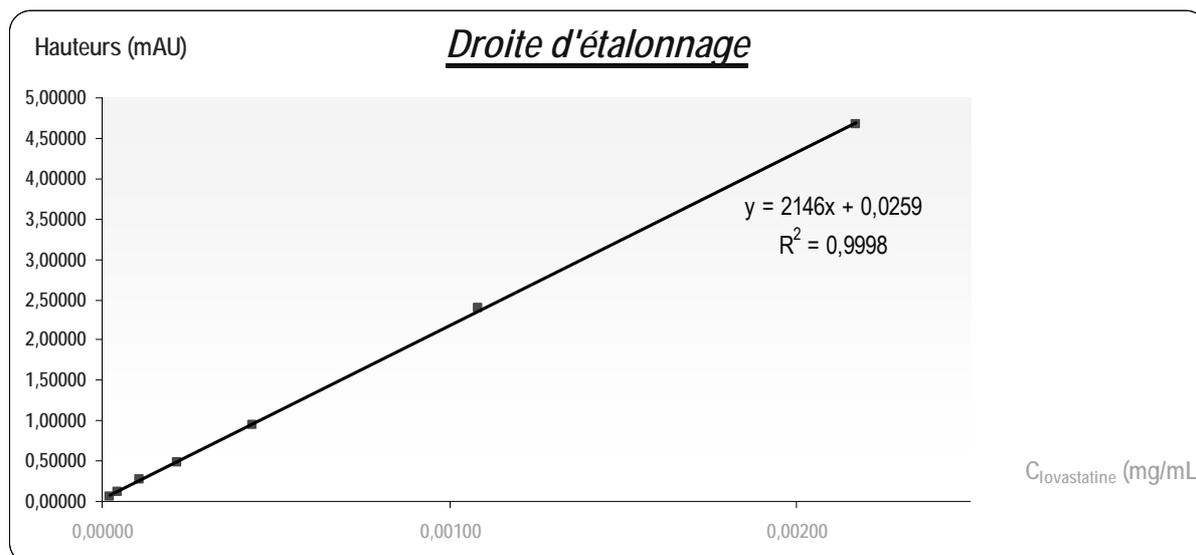


Figure 28 : Droite d'étalonnage

$$Y = a + bx$$

$$Y = 0,0259 + 2146x$$

$$\begin{cases} Y_{LoD} = a + 3 S_a \\ X_{LoD} = (a + 3 S_a) / b \end{cases}$$

$$\begin{cases} Y_{LoD} = 0,0259 + 3 \times 0,01 \\ X_{LoD} = (0,0259 + 3 \times 0,01) / 2146 \end{cases}$$

$$\begin{cases} Y_{LoD} = 0,0559 \\ \underline{X_{LoD} = 2.60.10^{-5}} \end{cases}$$

Cette valeur présente un risque de 0,13 %. Le détail des calculs figurent en Annexe 4.

9.2.4.2 Limite de quantification

9.2.4.2.1 *Approche graphique*

Les tableaux 18 et 20 exposent les résultats obtenus avec les dilutions de lovastatine.

Dilutions de lovastatine	RT (min)	Aire (mAU.s)	Hauteurs (mAU)
1/1000 ^e	17.483	41.519	4,667
1/2000 ^e	17,479	21,539	2,392
1/5000 ^e	17.476	8.151	0,941
1/10000 ^e	17.477	4.354	0,490
1/20000 ^e	17.476	2.373	0,279
1/50000 ^e	17.481	0.860	0,116
1/100000 ^e	17.458	0.407	0,052 ²

Tableau 20 : Détermination de la dilution de la LoQ

A partir des chromatogrammes, le rapport signal sur bruit est calculé selon la formule suivante : $\frac{2xH}{h}$.

Il est égal à 19. Cette valeur est proche de la LoQ (S/N = 10) pour la dilution 1/20000^e en lovastatine ce qui correspond à une concentration de 2,17.10⁻⁵ mg/mL (Annexe 3). Il est donc possible de quantifier 0,0217 ppm dans la poudre de levure de riz rouge.

9.2.4.2.2 *Approche par utilisation de la droite d'étalonnage*

La droite d'étalonnage est présentée Figure 28.

$$Y = a + bx$$

$$Y = 0,0259 + 2146x$$

$$Y_{LoD} = a + 10 S_a$$

$$X_{LoD} = (a + 10 S_a) / b$$

$$Y_{LoD} = 0,0259 + 10 \times 0,01$$

$$X_{LoD} = (0,0259 + 10 \times 0,01) / 2146$$

$$Y_{LoD} = 0.1259$$

$$X_{LoD} = \underline{5.87.10^{-5}}$$

Cette valeur présente un risque de 0,5 %. Le détail des calculs figurent en Annexe 4.

9.2.5 Conclusion

9.2.5.1 Limite de détection

Cette méthode permet de détecter (sans quantifier) une solution contenant 1,09.10⁻⁵ mg/mL de lovastatine selon l'approche graphique et 2,60.10⁻⁵ mg/mL par le biais de la droite d'étalonnage.

Il est préférable de conserver la valeur la plus élevée donc, on peut conclure qu'au minimum, il sera possible de détecter 2,60.10⁻⁵ mg/mL de lovastatine dans la poudre de levure de riz rouge soit 0,01085 ppm.

9.2.5.2 Limite de quantification

Cette méthode permet de détecter et quantifier une solution contenant 2,17.10⁻⁵ mg/mL de lovastatine selon l'approche graphique et 5,87.10⁻⁵ mg/mL par le biais de la droite d'étalonnage.

Il est préférable de conserver la valeur la plus élevée donc, on peut conclure qu'au minimum, il sera possible de quantifier 5,87.10⁻⁵ mg/mL de lovastatine dans la poudre de levure de riz rouge soit 0,0217 ppm.

9.2.6 Répétabilité d'injection de la LoQ

9.2.6.1 Méthodologie

La concentration 1/20000^e est choisie pour effectuer la répétabilité de l'injection. Pour ce faire, cette solution est injectée 6 fois de suite dans la même série analytique.

Remarque :

La répétabilité sur la limite de détection aurait pu également être réalisée. Mais, par manque de temps, cette analyse n'a pas été conduite. La répétabilité aurait dû être réalisée sur 6 solutions différentes de la LoQ.

9.2.6.2 Résultats

Les résultats de la répétabilité de l'injection sont présentés dans le tableau ci-dessous (Tableau 21).

	TR (min)	Aire (mAU*s)	Hauteur (mAU)
1	17,465	3,356	0,319
2	17,463	2,270	0,277
3	17,464	2,046	0,253
4	17,465	2,315	0,274
5	17,485	2,018	0,256
6	17,465	2,168	0,257
Moyenne	17,468	2,362	0,273
Ecart-type	0,008	0,501	0,025
CV (%)	0,0	21,2	9,2

Tableau 21 : Résultats de la répétabilité d'injection de la LoQ

Les coefficients de variation (CV) sont assez élevés sur les aires et sur les hauteurs (21,2 % et 9,2 % respectivement). Cependant, la première injection semble s'écarter notablement des autres. Cette valeur pourrait donc expliquer les CV élevés. Pour le confirmer, un test statistique permettant de justifier l'élimination d'une valeur aberrante avec une probabilité P doit être conduit. Ce test est appelé test de Dixon.

Tout d'abord, il est nécessaire de classer les résultats obtenus par ordre de valeur croissante :

$$x_1 < x_2 < \dots < x_{n-1} < x_n$$

Le test permet alors de vérifier si la première valeur x_1 ou la dernière valeur x_n est aberrante. Le rapport suivant doit être calculé :

$$\underline{3 < n < 7}: r_{10} = \frac{y_n - y_{n-1}}{y_n - y_1} \quad (\text{pour } n > 7, \text{ les formules utilisées seront différentes})$$

La table de Dixon donne les valeurs critiques de ces rapports au niveau du risque 10 %, 5 % et 1 %. La règle à adopter est la suivante : si la valeur du rapport est inférieure à la valeur critique, il n'est pas justifié, au risque considéré, d'éliminer cette valeur.

Dans le cas présenté ici, les valeurs rangées par ordre croissant sont les suivantes :

$$2.018 < 2.046 < 2.168 < 2.270 < 2.315 < 3.356$$

La formule suivante est donc appliquée :

$$r_{10} = \frac{y_6 - y_5}{y_6 - y_1} = \frac{3.356 - 2.315}{3.356 - 2.018} = 0,778$$

La table de Dixon est présentée ci-dessous (Tableau 22) :

n	10 %	5 %	1 %
3	0,886	0,941	0,988
4	0,679	0,765	0,889
5	0,557	0,642	0,780
6	0,482	0,560	0,698
7	0,434	0,507	0,637

Tableau 22 : Table de Dixon

Pour n = 6 observations, la valeur critique lue dans la table est, au risque 5 %, égale à 0,560. La valeur calculée égale à 0,778 est supérieure à la valeur théorique de la table. Il est donc justifié d'éliminer la valeur 3,356. Cette valeur est donc considérée comme aberrante.

Remarque :

Le test de Dixon est également validé pour les risques 10 % et 1 %.

Le calcul du coefficient de variation est réitéré en éliminant la valeur aberrante (Tableau 23).

	TR (min)	Aire (mAU*s)	Hauteur (mAU)
1	17,465	3,356	0,319
2	17,463	2,270	0,277
3	17,464	2,046	0,253
4	17,465	2,315	0,274
5	17,485	2,018	0,256
6	17,465	2,168	0,257
Moyenne	17,468	2,163	0,263
Ecart-type	0,009	0,132	0,011
CV (%)	0,1	6,1	4,3

Tableau 23 : Résultats de la répétabilité de l'injection après élimination de la valeur aberrante par le test de Dixon

Le CV sur les aires est égal à 6.1 % et celui sur les hauteurs à 4.3 %. Ces 2 valeurs sont donc conformes.

La répétabilité de l'injection de la limite de quantification est donc validée.

9.3 Linéarité

9.3.1 Définition

La linéarité est la capacité, à l'intérieur d'un certain intervalle de concentration, d'obtenir des résultats directement proportionnels à la concentration en substance à quantifier dans l'échantillon.

L'intervalle de linéarité pour un composé est déterminé uniquement sur la préparation d'étalons (gamme dans le solvant). Pour ce faire, il est nécessaire de préparer 5 solutions étalons à partir d'une solution étalon mère de pureté définie, située dans le domaine de linéarité, dans le solvant à des concentrations également réparties (à adapter en fonction des dilutions réalisées de l'échantillon). Il est essentiel de réitérer cette opération sur 3 jours.

9.3.2 Méthode

La teneur en lovastatine dans la poudre de levure de riz rouge est de 0,152 % soit 0,152 g de lovastatine pour 100 g de poudre. Donc, dans 250,3 mg de poudre de levure de riz rouge, la quantité de lovastatine est de 0,38 mg. Ainsi, dans un volume total de 25 mL, la concentration en lovastatine est de 0,0152 mg/mL.

La gamme de linéarité doit donc se situer autour de la concentration recherchée en lovastatine dans la poudre donc autour de 75 %. 5 solutions sont ainsi préparées correspondant à 50%, 75%, 100%, 125% et 150 % de la concentration de l'étude en lovastatine.

La lovastatine (SCR) est solubilisée dans la phase mobile (acétonitrile/acide acétique).

9.3.3 Résultats

9.3.3.1 J1

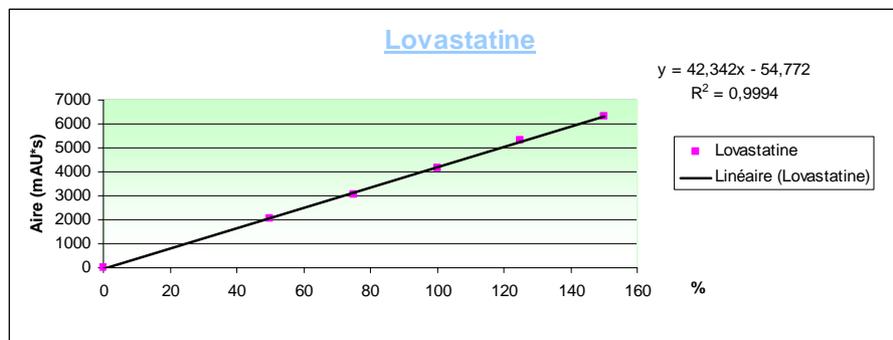


Figure 29 : Linéarité de la lovastatine à J1

	SM	50 %	75 %	100 %	125 %	150 %
SM/C	-	SM/20	-	SM/10	-	-
Concentration (mg/mL)	0,2026	0,01013	0,015195	0,02026	0,025325	0,03039
Concentration (ppm)	202,6	10,13	15,195	20,26	25,325	30,39
Aire (mAU*s)	*	2029,809	3037,395	4172,509	5303,527	6299,009

Tableau 24 : Concentrations en lovastatine à J1 (50 %, 75 %, 100 %, 125 % et 150 %)

Légende : C = concentration ; * : Aucune aire n'est spécifiée pour la solution mère (SM) car elle n'a pas été injectée. Cette dernière a servi uniquement à la préparation des solutions pour l'étude de la linéarité.

9.3.3.2 J2

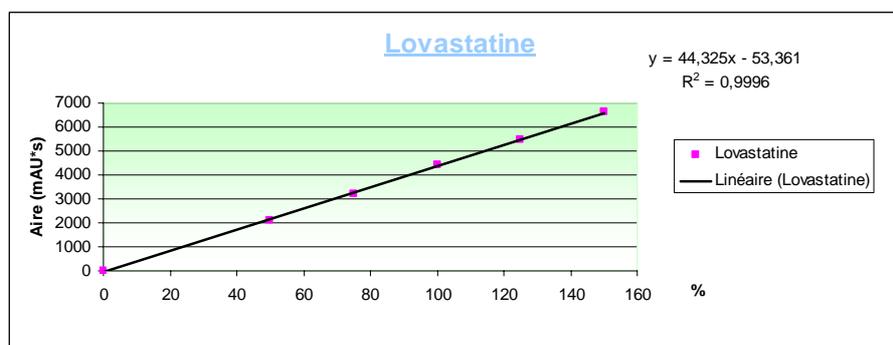


Figure 30 : Linéarité de la lovastatine à J2

	SM	50 %	75 %	100 %	125 %	150 %
SM/C	-	SM/20	-	SM/10	-	-
Concentration (mg/mL)	0,2182	0,01091	0,016365	0,02182	0,027275	0,03273
Concentration (ppm)	218,2	10,91	16,365	21,82	27,275	32,73
Aire (mAU*s)	*	2095,657	3227,124	4425,112	5475,564	6618,752

Tableau 25 : Concentrations en lovastatine à J2 (50 %, 75 %, 100 %, 125 % et 150 %)

* : Aucune aire n'est spécifiée pour la solution mère (SM) car elle n'a pas été injectée. Cette dernière a servi uniquement à la préparation des solutions pour l'étude de la linéarité.

9.3.3.3 J3

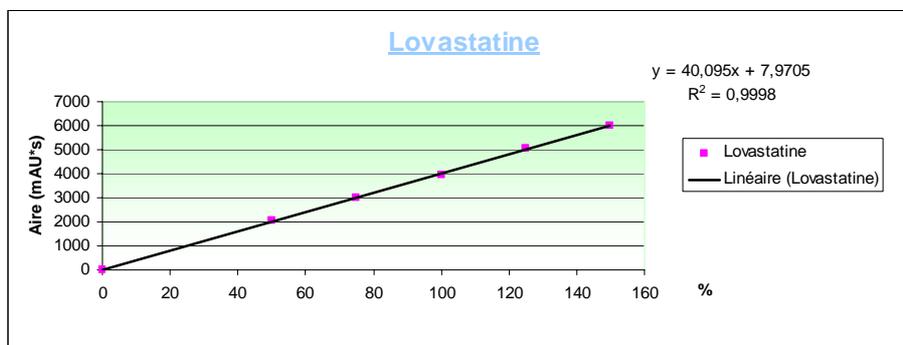


Figure 31 : Linéarité de la lovastatine à J3

	SM	50 %	75 %	100 %	125 %	150 %
SM/C	-	SM/20	-	SM/10	-	-
Concentration (mg/mL)	0,2062	0,01031	0,015465	0,02062	0,025775	0,03093
Concentration (ppm)	206,2	10,31	15,465	20,62	25,775	30,93
Aire (mAU*s)	*	2039,902	3024,078	3959,449	5047,776	6023,944

Tableau 26 : Concentrations en lovastatine à J3 (50 %, 75 %, 100 %, 125 % et 150 %)

* : Aucune aire n'est spécifiée pour la solution mère (SM) car elle n'a pas été injectée. Cette dernière a servi uniquement à la préparation des solutions pour l'étude de la linéarité.

9.3.4 Etude statistique de la linéarité

L'analyse statistique est exposée en Annexe 5. La linéarité de la méthode a été effectuée sur 3 jours. Ces résultats correspondent donc à une moyenne sur les 3 jours de validation.

9.3.4.1 Introduction

Le logiciel AVA a permis l'obtention des données statistiques. Les tests statistiques utilisés pour cette étude sont les suivants :

- Le test t (S = 0,05) ;
- Le test de COCHRAN pour l'homogénéité des variances (S = 0,05 ; HS = 0,01) ;
- Le test de FISHER pour l'existence de la pente (S = 0,01 ; HS = 0,001) et de la validité de la droite (S = 0,05 ; HS = 0,01)

9.3.4.2 Comparaison des droites sur 3 jours de validation

La droite de régression, calculée par la méthode des moindres carrés, est ajustée au plus près des mesures effectuées.

Celle-ci a pour fonction : $Y = a + bx$

Dans laquelle :

- b est la pente de la droite de régression ;
- a représente l'intersection de la droite de régression avec l'axe des ordonnées.

L'équation de la droite de régression est la suivante : $Y = - 87,523194 + 204446,085855 x$

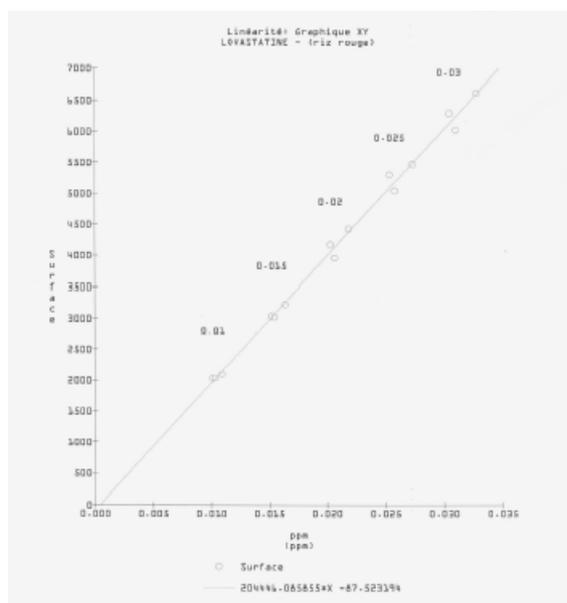


Figure 32 : Droite de régression

L'observation montre que la linéarité est bonne dans la gamme de mesure retenue et que la dispersion des valeurs est limitée (Figure 32).

Le tableau suivant (Tableau 27) renseigne les données de la droite de régression :

	Valeur	Ecart-type	T student calculé	T Student théorique	Niveau de significativité (risque alpha)
Pente	2,044e+05	4238,32			
Ordonnée à l'origine	- 87, 523	94,00			
Coefficient de corrélation	0,997202				
Comparaison de l'ordonnée à l'origine avec 0 (t)			0,93107 (NS)	2,160369 T (0,05 ; 13)	0,368782

Tableau 27 : Paramètres de la droite de régression

Le coefficient de la droite de régression, égal à 0,997202, est proche de 1. La validité de la droite peut être supposée.

Comparaison de l'ordonnée à l'origine avec 0 (t) :

La valeur 0,93107 est inférieure au T Student théorique égal à 2,160369 (t = 0,05 ; 13) au risque alpha 0,368782. Le t calculé est donc non significatif. L'ordonnée à l'origine n'est donc pas significativement différente de 0 au risque considéré.

Représentation des résidus de régression

Une représentation des résidus de régression peut être facilement faite en reportant sur un graphique

les valeurs e_j établies selon la formule :

$$e_j = x_j - \hat{x}_j$$

- Les valeurs x_i correspondent aux surfaces ou aires observées ;
- Les valeurs x_i correspondent aux surfaces ou aires estimées ;

En cas de linéarité, les points obtenus doivent se répartir de façon aléatoire autour de la droite de fonction : $x = 0$. On obtient une représentation des résidus de régression donnée par le graphique suivant (Figure 33).

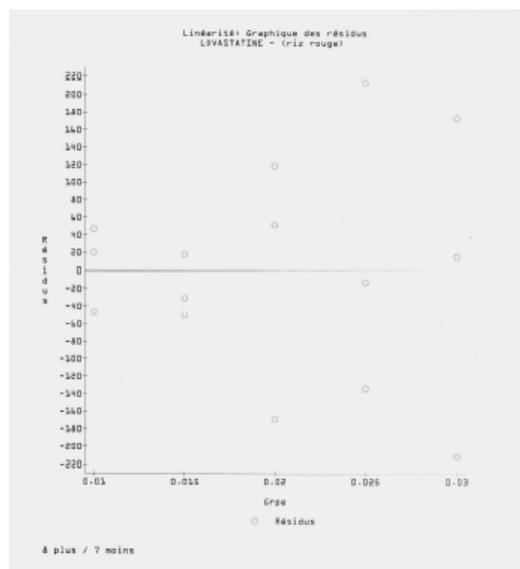


Figure 33 : Graphique des résidus de régression

On peut constater que les valeurs des résidus sont régulièrement réparties autour de la droite $x = 0$. L'observation montre que 8 points sont situés au dessus de la droite $x = 0$ et 7 points en dessous de cette droite. La répartition peut être considérée comme uniforme.

Remarque :

Ces points paraissent éloignés sur le graphique mais si l'on travaille sur les surfaces réelles observées, on constate que ces résidus sont très faibles. En effet, l'écart le plus élevé se situe autour de 200 ce qui est assez faible au vu des aires observées autour de 6000 mAU*s.

9.3.4.3 Test de l'homogénéité des variances (test de COCHRAN)

Le C calculé égal à 0,395299 est inférieur à la valeur C (0,05 ; 5 ; 2) égale à 0,6838. Le C calculé est donc non significatif. Les variances des différents groupes peuvent être considérés comme homogènes au risque considéré. La fidélité intermédiaire, au vu des ces résultats, peut donc être réalisée.

9.3.4.4 Test de l'existence d'une pente significative (test de FISHER)

Le F calculé égal à 2313, 029896 est supérieur au F théorique (0,01 ; 1 ; 13) égal à 9,073806. Le F calculé est donc significativement différent.

Le F calculé égal à 2313, 029896 est supérieur au F théorique (0,001 ; 1 ; 13) égal à 17,81542. Le F calculé est donc hautement significativement différent.

Il est donc possible de conclure à l'existence d'une pente au risque considéré.

9.3.4.5 Test de validité de la droite (test de FISHER)

Le F calculé égal à 0, 054183 au risque alpha de 0, 982435 est inférieur au F théorique (0,05 ; 3 ; 10) égal à 3, 708265. Le F calculé est donc non significatif au risque considéré. L'ajustement peut donc être considéré comme valide à ce risque.

9.3.5 *Conclusion*

Au vu des graphiques observés et de l'analyse statistique complète de la linéarité effectuée, il est donc possible de conclure en la linéarité de la méthode sur les 3 jours de validation.

9.4 Fidélité

9.4.1 *Définition*

La fidélité est l'étroitesse de l'accord entre des résultats d'essais. La répétabilité est la fidélité sous des conditions de répétabilité ; c'est à dire des conditions où des résultats d'essais indépendants sont obtenus par la même méthode sur des individus d'essais identiques dans le même laboratoire (la D.L.C.), par le même opérateur, utilisant le même équipement et pendant un court intervalle de temps (Désenfant et al., 2006). Elle a été réalisée sur la poudre de levure de riz rouge.

La fidélité a été effectuée sur les facteurs de réponse qui correspond au rapport de l'aire sur la prise d'essai. Si l'on considère qu'il peut se produire des variations de la prise d'essai au cours du temps, il est donc justifié d'effectuer la fidélité sur le facteur de réponse et non sur les aires.

9.4.2 Répétabilité de l'injection

9.4.2.1 Définition

Une série d'injection de la même solution traduit la répétabilité de l'injection.

9.4.2.2 Méthode

6 extractions ont été réalisées. La première extraction a été injecté 6 fois de suite (7 fois pour les derniers) afin d'approcher la répétabilité de l'injection de la méthode.

9.4.2.3 Résultats

9.4.2.3.1 J1

	PE (mg)	TR (min)	Aire (mAU.s)	FR
1	250,30	17,459	3027,123	12,094
2	250,30	17,458	3040,819	12,149
3	250,30	17,452	3040,624	12,148
4	250,30	17,445	3040,026	12,146
5	250,30	17,447	3046,782	12,173
6	250,30	17,45	3067,035	12,253
<i>Moyenne</i>	<i>250,30</i>	<i>17,452</i>	<i>3043,735</i>	<i>12,161</i>
<i>Ecart-type</i>		<i>0,006</i>	<i>13,115</i>	<i>0,052</i>
<i>CV (%)</i>		<i>0,0</i>	<i>0,4</i>	<i>0,4</i>

Tableau 28 : Répétabilité de l'injection à J1

Légende : TR, temps de rétention ; PE, prise d'essai ; FR, facteur de réponse.

9.4.2.3.2 J2

	PE (mg)	TR (min)	Aire (mAU.s)	FR
1	250,72	17,438	3011,706	12,012
2	250,72	17,441	3007,699	11,996
3	250,72	17,447	3005,898	11,989
4	250,72	17,447	3011,705	12,012
5	250,72	17,448	2999,947	11,965
6	250,72	17,443	3019,613	12,044
7	250,72	17,449	3026,347	12,070
<i>Moyenne</i>	<i>250,72</i>	<i>17,445</i>	<i>3011,845</i>	<i>12,013</i>
<i>Ecart-type</i>		<i>0,0041</i>	<i>8,802</i>	<i>0,035</i>
<i>CV (%)</i>		<i>0,0</i>	<i>0,3</i>	<i>0,3</i>

Tableau 29 : Répétabilité de l'injection à J2

Légende : TR, temps de rétention ; PE, prise d'essai ; FR, facteur de réponse.

9.4.2.3.3 J3

	PE (mg)	TR (min)	Aire (mAU.s)	FR
1	250,83	17,435	3018,964	12,036
2	250,83	17,421	3028,246	12,073
3	250,83	17,422	3027,351	12,069
4	250,83	17,413	3031,898	12,087
5	250,83	17,427	3026,300	12,065
6	250,83	17,432	3031,742	12,087
7	250,83	17,422	3052,982	12,172
<i>Moyenne</i>	<i>250,83</i>	<i>17,425</i>	<i>3031,069</i>	<i>12,084</i>
<i>Ecart-type</i>		<i>0,007</i>	<i>10,586</i>	<i>0,042</i>
<i>CV (%)</i>		<i>0,0</i>	<i>0,4</i>	<i>0,4</i>

Tableau 30 : Répétabilité de l'injection à J3

Légende : TR, temps de rétention ; PE, prise d'essai ; FR, facteur de réponse.

9.4.2.4 Conclusion

Au vu des résultats exposés ci-dessus notamment le coefficient de variation compris entre 0,3% et 0,4% (Limite \leq à 1,0 % selon la Pharmacopée Européenne, V^e édition 2.2.46.), on peut conclure en la conformité de la répétabilité de l'injection ainsi que de l'étape d'extraction de la poudre de levure de riz rouge sur les 3 jours de validation.

9.4.3 Répétabilité de la préparation

9.4.3.1 Définition

Une série d'injection correspondant à 6 extractions différentes traduit la répétabilité de la préparation. Elle met en évidence l'efficacité de l'extraction.

9.4.3.2 Méthode

6 extractions de poudre de levure de riz rouge ont été réalisées et injectées séparément à J1, J2 et J3.

9.4.3.3 Résultats

9.4.3.3.1 J1

	TR (min)	Aire (mAU.s)	PE (mg)	FR
1	17,444	3020,740	250,30	12,068
2	17,432	3012,949	250,01	12,051
3	17,437	3072,257	250,69	12,255
4	17,415	3074,837	251,12	12,244
5 ^z	17,424	2897,382	250,73	11,556
6	17,434	3044,236	250,36	12,159
<i>Moyenne</i>	<i>17,431</i>	<i>3045,004</i>	<i>250,54</i>	<i>12,155</i>
<i>Ecart-type</i>	<i>0,010</i>	<i>28,503</i>		<i>0,095</i>
<i>CV (%)</i>	<i>0,1</i>	<i>0,9</i>		<i>0,8</i>

* L'injection n°5 a été supprimée car elle correspond à une valeur aberrante selon le test de Dixon (Annexe 5).

Tableau 31 : Répétabilité de la préparation à J1

Légende : TR, temps de rétention ; PE, prise d'essai ; FR, facteur de réponse.

9.4.3.3.2 J2

	TR (min)	Aire (mAU.s)	PE (mg)	FR
1	17,400	2996,374	250,72	11,951
2	17,406	2993,713	250,40	11,956
3	17,433	3004,394	250,59	11,989
4	17,406	3000,907	250,82	11,964
5	17,392	3031,153	250,80	12,086
6	17,434	3044,236	250,41	12,157
<i>Moyenne</i>	<i>17,412</i>	<i>3011,796</i>	<i>250,623</i>	<i>12,017</i>
<i>Ecart-type</i>	<i>0,018</i>	<i>20,810</i>		<i>0,085</i>
<i>CV (%)</i>	<i>0,1</i>	<i>0,7</i>		<i>0,7</i>

Tableau 32 : Répétabilité de la préparation à J2

Légende : TR, temps de rétention ; PE, prise d'essai ; FR, facteur de réponse.

9.4.3.3.3 J3

	TR (min)	Aire (mAU.s)	PE (mg)	FR
1	17,419	3027,732	250,83	12,071
2	17,417	3027,560	251,79	12,024
3	17,413	2970,453	250,59	11,854
4	17,416	2979,855	249,95	11,922
5	17,415	2980,004	250,28	11,907
6	17,406	2968,082	250,53	11,847
<i>Moyenne</i>	<i>17,414</i>	<i>2992,281</i>	<i>250,662</i>	<i>11,938</i>
<i>Ecart-type</i>	<i>0,005</i>	<i>27,816</i>		<i>0,091</i>
<i>CV (%)</i>	<i>0,0</i>	<i>0,9</i>		<i>0,8</i>

Tableau 33 : Répétabilité de la préparation à J3

Légende : TR, temps de rétention ; PE, prise d'essai ; FR, facteur de réponse.

9.4.4 Conclusion

Au vu des résultats exposés ci-dessus notamment le coefficient de variation compris entre 0,7% et 0,8% (Limite \leq à 1,0 % selon la Pharmacopée Européenne, V^e édition 2.2.46.), on peut conclure en la conformité de la répétabilité de la préparation ainsi que de l'étape d'extraction de la poudre de levure de riz rouge sur les 3 jours de validation.

9.4.5 Fidélité intermédiaire

9.4.5.1 Définition

La fidélité intermédiaire est l'aptitude à donner des résultats identiques lorsqu'elle est réalisée plusieurs fois sur le même échantillon par différents opérateurs, avec un équipement différent ou à différents jours de préparation (le facteur jour étant retenu pour la fidélité intermédiaire). Le calcul de la fidélité intermédiaire est effectué à partir de l'ensemble des résultats obtenus.

9.4.5.2 Méthode

6 extractions de poudre de levure de riz rouge ont été réalisées et injectées séparément à J1, J2 et J3.

9.4.5.3 Résultats

Les résultats figurent dans le Tableau 34.

J1	FR
1	12,068
2	12,051
3	12,255
4	12,244
5 *	41,556
6	12,159
Moyenne	12,056
J2	FR
1	11,951
2	11,956
3	11,989
4	11,964
5	12,086
6	12,157
Moyenne	12,017
J3	FR
1	12,071
2	12,024
3	11,854
4	11,922
5	11,907
6	11,847
Moyenne	11,937
<i>Calcul sur 17 valeurs</i>	
Moyenne	12,030
Ecart-type	0,124
CV (%)	1,0

* L'injection n°5 a été supprimée car elle correspond à une valeur aberrante selon le test de Dixon (Annexe 5).

Tableau 34 : Fidélité intermédiaire

Légende :

FR : facteur de réponse ; CV : coefficient de variation.

9.4.5.4 Conclusion

Au vu des résultats exposés ci-dessus notamment le coefficient de variation des 17 préparations de 1,0% (Limite \leq à 1,0 % selon la Pharmacopée Européenne, V^e édition 2.2.46.), on peut conclure en la conformité de la fidélité intermédiaire ainsi que de l'étape d'extraction de la poudre de levure de riz rouge sur les 3 jours de validation.

9.4.6 Etude statistique de la fidélité

L'analyse statistique est exposée en Annexe 5.

9.4.6.1 Introduction

Le logiciel AVA a permis l'obtention des données statistiques. Les tests statistiques utilisés pour cette étude sont les suivants :

- Le test de COCHRAN pour l'homogénéité des variances ($S = 0,05$; $HS = 0,01$) ;
- Le test de DIXON pour la recherche de valeurs aberrantes ($S = 0,05$; $HS = 0,01$)

9.4.6.2 Recherche de valeurs aberrantes (test de DIXON)

Le test de DIXON permet de mettre en évidence une valeur aberrante. Elle correspond à la 5^{ème} extraction de poudre de levure de riz rouge le premier jour de validation. Le E calculé égal à 0,710909 est supérieur à la valeur Q (0,01 ; 6) égale à 0,698. La différence est significative. Il existe donc une valeur aberrante dans les résultats qui peut être exclue des calculs.

9.4.6.3 Test de l'homogénéité des variances (test de COCHRAN)

Le C calculé égal à 0,379124 est inférieur à la valeur C (0,05 ; 3 ; 5) égale à 0,7071. Le C calculé est donc non significatif. Les variances des différents groupes peuvent être considérés comme homogènes au risque considéré. La fidélité intermédiaire, au vu des ces résultats, peut être calculée.

9.4.6.4 Coefficients de variation de répétabilité et de fidélité intermédiaire

Le coefficient de variation, CVr de formule $100 \times Sr/M$ est égal à 0,72848. La limite est fixée à 1 %. Le résultat est donc conforme. Le coefficient de variation de la fidélité intermédiaire, CVR de formule $100 \times SR/M$ est égal à 1,2778. La limite est fixée à 2 %. Le résultat est donc conforme.

9.4.7 Conclusion

Au vu des résultats exposés ci-dessus notamment les coefficients de variation inférieurs à 1,0 % pour la répétabilité de l' injection, la répétabilité de la préparation et la fidélité intermédiaire (Limite \leq à 1,0 % selon la Pharmacopée Européenne, V^e édition 2.2.46.), ainsi que l'analyse statistique complète de la fidélité effectuée, il peut donc être statué que la totalité de l'analyse est répétable ainsi que l'étape d'extraction de la poudre de levure de riz rouge sur les 3 jours de validation.

9.5 Stabilité

9.5.1 Définition

La lovastatine étant caractérisée par une sensibilité prononcée à la lumière, à l'oxydation ainsi qu'à la température (Ma *et al.* 2000 ; Li *et al.*, 2004 ; Li *et al.*, 2005 ; Lee *et al.*, 2006), il est recommandé pour cette molécule de la conserver sous azote à une température de 2°C à 8°C (Pharmacopée Européenne, V^e Edition). On peut donc s'attendre à une dégradation facilitée dans les conditions d'analyse.

Le but de ces essais est d'évaluer la stabilité de la lovastatine mise en solution dans le solvant chromatographique au cours de l'analyse. Ces données permettront de définir le temps pendant lequel il est possible de conserver les solutions essais et témoins sans les refaire et également d'assurer l'exactitude des résultats de l'analyse dans ces mêmes conditions de conservation au cours du temps.

9.5.2 Méthode

Dans le cas présenté ici, l'étude de stabilité a pour but d'évaluer la stabilité de la lovastatine conservée à 4°C pendant 15 jours dans le solvant chromatographique (acétonitrile, acide acétique 0.1%). La température de 4°C a été choisie car la solution de poudre de levure de riz rouge est thermostatée à 4°C dans les analyses de routine. Les 15 jours ont été jugés suffisants pour mener à bien une analyse sur la solution de poudre de levure de riz rouge. A chaque temps (T0, 5j, 10j et 15j), la lovastatine est réinjectée afin de faire apparaître les impuretés éventuelles de la lovastatine.

9.5.3 Résultats

Les chromatogrammes de la lovastatine après 5 jours de stockage témoignent de la présence d'un seul pic. Par contre dès 10 jours, 2 pics apparaissent (Annexe 6):

- Le pic caractéristique de la lovastatine c'est-à-dire la monacolone K avec un temps de rétention égal à 17,338 min et une aire égale à 398,701 mAU.s ;
- Le pic correspondant à l'impureté de la lovastatine c'est-à-dire la monacolone K acide (MKA) avec un temps de rétention égal à 14,218 min et une aire égale à 18,028 mAU.s .

L'aire de l'impureté MKA est au dessus de la LoD et de la LoQ et correspond à une dilution en lovastatine de 1/2000^e. Son pic n'est donc pas négligeable.

Remarque :

Les études antérieures permettent d'affirmer avec une quasi certitude qu'il s'agit bien de la MKA. Une chromatographie liquide avec un détecteur massique permettrait de confirmer cette hypothèse.

9.5.4 Conclusion

Dans ces conditions de conservation (4°C à l'abri de la lumière, dans le solvant chromatographique), la lovastatine est stable 10 jours dans la phase mobile (acétonitrile ; 0.1 % acide acétique). Dépassée cette date, son impureté majoritaire (la monacoline K acide) apparaît. Il sera donc conseillé de refaire les solutions étalons et essais afin d'assurer l'exactitude des résultats d'analyse.

9.6 Étude de l'effet matrice, méthode des ajouts dosés

9.6.1 Principe

Le but de cette étude est d'évaluer la sélectivité ou spécificité de la méthode. Pour ce faire, il est préparé une solution de lovastatine à 100 % qui est diluée au demi. Ensuite, une extraction de poudre de levure de riz rouge est réalisée et également diluée au demi. Enfin, il est ajouté une quantité connue de lovastatine SCR à l'extraction obtenue de levure de riz rouge. L'essai est réalisé avec le premier extrait de levure de riz rouge du 3^{ème} jour de validation avec la solution commerciale de poudre de levure de riz rouge.

9.6.2 Résultats

Le tableau 35 expose les concentrations respectives de levure de riz rouge et de lovastatine SCR utilisées.

	Prise d'essai (mg)	Volume (mL)	Concentration (mg/mL)	Dilution au 1/2		Concentration finale (mg/mL)
				Volume prélevé (mL)	Dans x mL	
Gélule Levure de riz rouge ^{1/2}	250,83	25	10,0332	2,5	5	5,01660
Lovastatine SCR	10,13	50	0,2026 puis dilution au 1/10 ^e pour le 100 %	2,5	5	0,01013

Tableau 35 : Concentrations en levure de riz rouge et en lovastatine

Vu que l'on ajoute à posteriori une quantité de lovastatine dans la levure de riz rouge identique à celle supposée être présente dans l'extrait, la quantité de lovastatine dans le mélange levure de riz rouge et lovastatine sera identique à la quantité initiale dans les 2 produits.

Les résultats obtenus figurent dans le tableau ci-dessous (Tableau 36).

	RT (min)	Aire (mAU*s)	Aire théorique (mAU*s)	Ecart/aire théorique	Ecart
Gélule Levure de riz rouge ^{1/2}	17,431	1487,890	1733,140		
T 100 % ^{1/2}	17,461	1978,390			
Gélule LRR ½ + ajout	17,453	1687,440		45,70	- 2,71 %

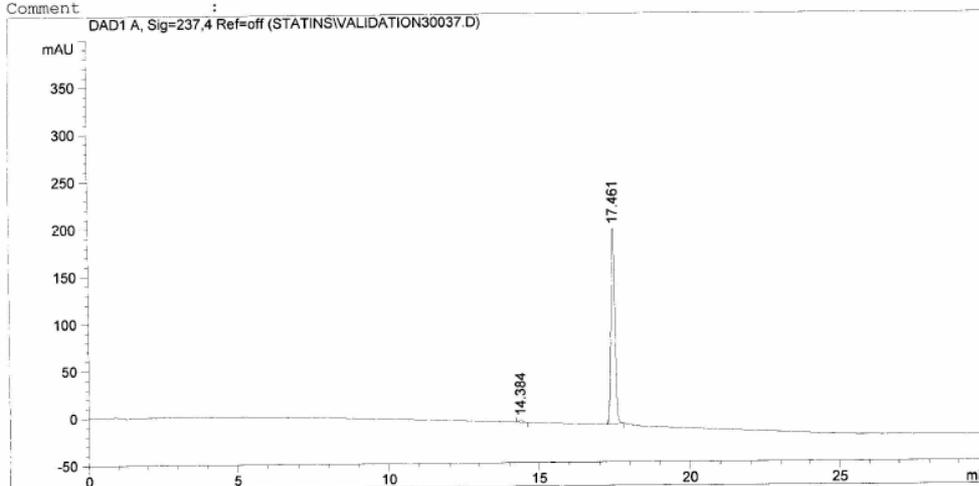
Tableau 36 : Résultats obtenus avec la méthode des ajouts dosés

Les chromatogrammes correspondants figurent ci-dessous (Figure 34, 35 et 36) :

Data File C:\CHEM32\1\DATA\STATINS\VALIDATION30037.D
Sample Name: T100% 1/2

```
=====
Injection Date : 7/27/2006 5:40:58 PM      Seq. Line : 38
Sample Name    : T100% 1/2                 Location  : Vial 38
Acq. Operator : T/SG                       Inj       : 1
Acq. Instrument : LC 26                     Inj Volume: 20 µl
Acq. Method    : C:\CHEM32\1\METHODS\STATINS\MP29062006.M
Last changed   : 7/25/2006 10:31:06 AM by T/SG
Analysis Method : C:\CHEM32\1\METHODS\STATINS\MP29062006.M
Last changed   : 12/12/2006 10:53:22 AM by JV
                (modified after loading)
=====
```

```
Column Description : X Terra
Product#          : colonne n°522          Batch# : 186000408
Serial#          : 0194351501
Diameter         : 2.1 mm                  Length : 150.0 mm
Particle size    : 3.5 µm                 Void volume : 0.0 %
Maximum Pressure : 0 bar                   Maximum pH : 0
Maximum Temperature : 30 °C
Comment         :
```



=====
Area Percent Report with Performance
=====

```
Multiplier      : 1.0000
Dilution        : 1.0000
Use Multiplier & Dilution Factor with ISTDs
```

Signal 1: DAD1 A, Sig=237,4 Ref=off

RetTime [min]	k'	Area [mAU*s]	Height [mAU]	Symm.	Width [min]	Plates	Resol	Select
								ivity
14.384	-	21.99048	2.54886	0.86	0.1333	64473	-	-
17.461	-	1899.15613	207.27480	0.88	0.1417	84166	13.15	1.21

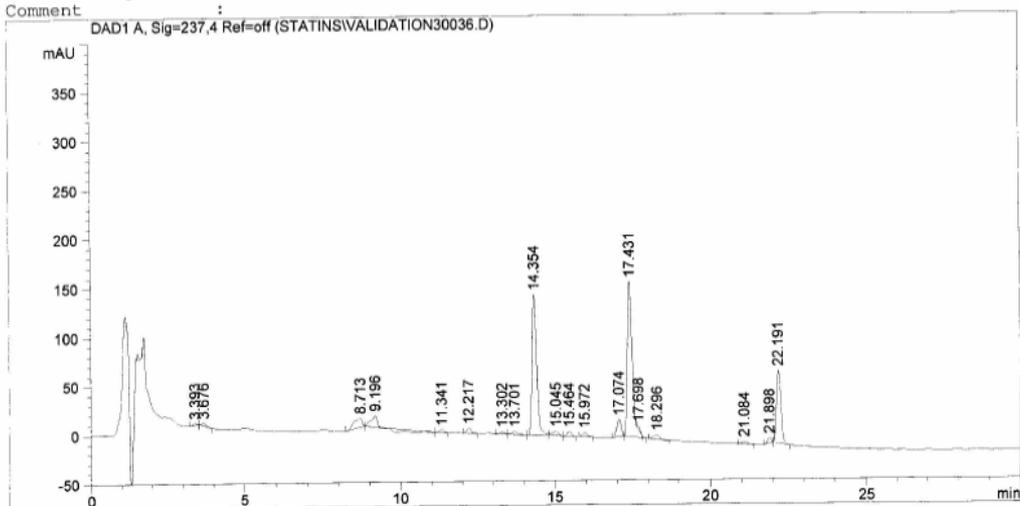
=====
*** End of Report ***

Figure 34 : Chromatogramme lovastatine à 100 %

Data File C:\CHEM32\1\DATA\STATINS\VALIDATION30036.D
 Sample Name: Gélule 1/2

```
=====
Injection Date : 7/27/2006 5:01:25 PM      Seq. Line : 37
Sample Name   : Gélule 1/2                 Location  : Vial 37
Acq. Operator : T/SG                       Inj      : 1
Acq. Instrument : LC 26                     Inj Volume : 20 µl
Acq. Method   : C:\CHEM32\1\METHODS\STATINS\MP29062006.M
Last changed  : 7/25/2006 10:31:06 AM by T/SG
Analysis Method : C:\CHEM32\1\METHODS\STATINS\MP29062006.M
Last changed  : 12/12/2006 10:53:22 AM by JV
              (modified after loading)
=====
```

```
Column Description : X Terra
Product#           : colonne n°522      Batch#: 186000408
Serial#           : 0194351501
Diameter          : 2.1 mm              Length : 150.0 mm
Particle size     : 3.5 µm             Void volume : 0.0 %
Maximum Pressure  : 0 bar              Maximum pH : 0
Maximum Temperature: 30 °C
Comment          :
```



Area Percent Report with Performance

```
Multiplier      : 1.0000
Dilution        : 1.0000
Use Multiplier & Dilution Factor with ISTDs
```

Signal 1: DAD1 A, Sig=237,4 Ref=off

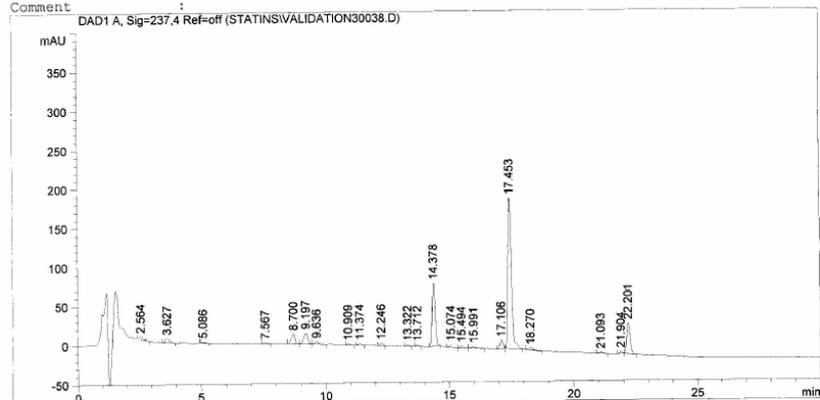
RetTime [min]	k'	Area [mAU*s]	Height [mAU]	Symm.	Width [min]	Plates	Resolution	Selectivity
3.393	-	16.08436	1.89379	1.12	0.1492	2866	-	-
3.676	-	26.63001	2.80792	0.76	0.1844	2201	1.00	1.08
8.713	-	180.90881	9.37354	3.80	0.3067	4472	12.05	2.37
9.196	-	72.74474	11.79446	1.14	0.2833	5836	0.96	1.06
11.341	-	32.98822	2.56004	1.39	0.2233	14285	4.97	1.23
12.217	-	48.71483	4.97901	0.88	0.1483	37578	2.77	1.08
13.302	-	26.87920	2.45356	1.43	0.1856	28471	3.82	1.09
13.701	-	46.60304	3.11429	0.82	0.2167	22152	1.16	1.03
14.354	-	1455.29724	143.41908	0.88	0.1533	48549	2.07	1.05
15.045	-	54.33090	4.22348	1.25	0.2300	23706	2.12	1.05
15.464	-	48.65688	4.96471	0.94	0.1567	53973	1.27	1.03
15.972	-	38.46789	3.83626	0.87	0.1533	60112	1.93	1.03
17.074	-	172.54750	17.30891	1.10	0.1611	62221	4.12	1.07
17.431	-	1700.60339	158.49873	0.78	0.1589	66672	1.31	1.02
17.698	-	19.96956	3.28975	0.56	-	-	-	1.02
18.296	-	54.15018	4.16334	1.86	0.2500	29671	-	1.03
21.084	-	30.96111	3.00594	0.85	0.1617	94231	7.96	1.15
21.898	-	43.35193	5.64053	1.18	0.1275	163410	3.30	1.04
22.191	-	745.97266	74.51421	0.87	0.1567	111147	1.21	1.01

Figure 35 : Chromatogramme Gélule de poudre de levure de riz rouge – Dilution au demi

Data File C:\CHEM32\1\DATA\STATINS\VALIDATION30038.D
Sample Name: Gelule ajout

```
=====
Injection Date : 7/27/2006 6:20:31 PM      Seq. Line : 39
Sample Name   : Gelule ajout                Location  : Vial 39
Acq. Operator : T/SG                       Inj      : 1
Acq. Instrument : LC 26                    Inj Volume : 20 µl
Acq. Method   : C:\CHEM32\1\METHODS\STATINS\MP29062006.M
Last changed  : 7/25/2006 10:31:06 AM by T/SG
Analysis Method : C:\CHEM32\1\METHODS\STATINS\MP29062006.M
Last changed  : 12/12/2006 10:53:22 AM by JV
                (modified after loading)
=====
```

```
Column Description : X Terra
Product#           : colonne n°522      Batch#: 186000408
Serial#           : 0194351501
Diameter          : 2.1 mm              Length : 150.0 mm
Particle size     : 3.5 µm              Void volume : 0.0 %
Maximum Pressure  : 0 bar                Maximum pH : 0
Maximum Temperature: 30 °C
Comment          :
```



=====
Area Percent Report with Performance
=====

Multiplier : 1.0000
Dilution : 1.0000
Use Multiplier & Dilution Factor with ISTDs

Signal 1: DAD1 A, Sig=237,4 Ref=off

RetTime [min]	k'	Area [mAU*s]	Height [mAU]	Symm.	Width [min]	Plates	Resol	Select
							ution	ivity
2.564	-	44.18116	4.10322	0.50	0.1583	1453	-	-
3.627	-	61.71149	5.29229	0.70	0.1833	2168	3.65	1.41
5.086	-	15.02031	1.40715	0.77	0.1717	4863	4.83	1.40
7.567	-	14.22535	1.47400	0.88	0.1550	13202	8.92	1.49
8.700	-	133.62721	12.35932	1.36	0.1667	15097	4.14	1.15
9.197	-	146.39838	14.19764	1.18	0.1578	18825	1.80	1.06
9.636	-	28.92412	3.06400	1.06	0.1550	21409	1.65	1.05
10.909	-	10.87768	1.17273	0.79	0.1533	28039	4.85	1.13
11.374	-	17.57205	2.15379	0.89	0.1311	41690	1.92	1.04
12.246	-	22.24491	2.96170	0.90	0.1211	56638	4.06	1.08
13.322	-	15.38588	1.99188	0.92	0.1244	63489	5.15	1.09
13.712	-	10.17366	1.41773	1.09	0.1200	72339	1.88	1.03
14.378	-	691.44769	80.44947	0.91	0.1350	62839	3.07	1.05
15.074	-	29.85692	3.41678	0.78	0.1333	70813	3.05	1.05
15.494	-	24.48396	2.77638	0.87	0.1389	68945	1.81	1.03
15.991	-	24.65892	2.34698	1.22	0.1633	53102	1.93	1.03
17.106	-	91.07903	10.63943	0.98	0.1367	86789	4.37	1.07
17.453	-	1835.55432	192.88724	0.81	0.1417	84086	1.47	1.02
18.270	-	24.80472	2.27418	0.88	0.2067	43297	2.76	1.05
21.093	-	15.64879	1.58854	0.78	0.1533	104840	9.21	1.15
21.904	-	24.92308	3.19947	1.08	0.1283	161388	3.38	1.04
22.201	-	376.84772	39.29456	0.87	0.1500	121355	1.25	1.01

Figure 36 : Chromatogramme Gélule + ajout de lovastatine

Un écart de dosage égal à 2,71 % de la quantité de lovastatine est relevé par la méthode des ajouts dosés.

La symétrie du pic est de 0.9 pour la lovastatine seule, de 0.8 pour la lovastatine dans la poudre de levure de riz rouge et de 0.8 pour la lovastatine dans le mélange (poudre de levure de riz rouge + lovastatine). Le facteur de symétrie du pic principal doit être compris entre 0.8 et 1.5 (Pharmacopée Européenne, V^e édition, 2.2.46). Les valeurs observées sont donc conformes.

9.6.3 Conclusion

On observe un écart de 2,71 % dans la solution avec ajout suite à l'addition de lovastatine SCR dans la poudre de levure de riz rouge.

La méthode peut être considérée comme spécifique étant donné que la quantité de lovastatine ajoutée s'ajoute bien à la lovastatine présente initialement dans la levure de riz rouge. L'aire du pic de lovastatine se retrouve dans l'aire de lovastatine dans la gélule avec ajout.

10 - Conclusion

Les monacolines ou statines représentent une classe de molécules très diversifiées de par leurs structures et leurs multiples indications. Ces médicaments possèdent une activité hypocholestérolémiantie puissante par inhibition de l'HMG-CoA réductase.

Les compléments alimentaires prennent une place de plus en plus importante sur le marché de la santé. Ainsi, de nos jours, il est possible de trouver des compléments alimentaires qui contiennent des molécules à « action thérapeutique ». C'est le cas des compléments alimentaires à base de levure de riz rouge. Son apparition est relativement récente sur le marché mais depuis des siècles, la levure de riz rouge est utilisée en tant qu'aromatisant, colorant, condiment mais aussi pour diminuer le cholestérol. Cette action non déclarée dans les revendications du produit reste à la frontière du médicament.

L'Afssaps, Agence Française de Sécurité Sanitaire des Produits de Santé, autorité compétente en matière de contrôle de l'ensemble des produits de santé circulant sur le marché, a donc trouvé un intérêt certain de contrôler ces compléments alimentaires ; l'objectif étant de s'assurer que leurs consommations n'entraînent pas de risques notables pour le consommateur.

Une méthode d'analyse par CLHP couplée à l'UV a donc été développée afin d'identifier les diverses monacolines présentes dans la poudre de levure de riz rouge. Cette méthode a fait l'objet d'une validation complète pour la lovastatine sur les paramètres tels que la linéarité, la répétabilité de l'injection, la répétabilité de la préparation, la fidélité intermédiaire, la limite de détection et de quantification. Cinq monacolines ont été identifiées sur la base de leur profil chromatographique, par rapport à un chromatogramme de référence, et de leurs spectres UV. Il s'agit de la monacoline X, K, K acide, M et de la Déhydromonacoline K (DMK). Un détecteur massique pourrait permettre une confirmation de l'identification proposée.

Ce complément alimentaire, contenant des molécules actives, peut donc à plus fortes doses engendrer des effets thérapeutiques, et donc par conséquent des effets indésirables. Il est donc nécessaire pour l'Afssaps de réaliser des analyses afin de déceler les dérives possibles pour ce type de produit.

Articles scientifiques

Heber D, Yip I, Ashley JM, Elashoff DA, Elashoff RM, W Go VL. Cholesterol-lowering effects of a proprietary Chinese red-yeast-rice dietary supplement. Am J Clin Nutr 1999; 69:231-6.

Wigger-Alberti W, Bauer A, Hipler UC, Elsner P. Anaphylaxis due to *Monascus purpureus*-fermented rice (red yeast rice). Allergy 1999;54:1330-1.

Thompson Coon JS, Ernst E. Herbs for serum cholesterol reduction: A systematic review. J Fam Pract 2003;52(6): 468-78.

Erdogru O, Azirak S. Review of the studies on the red yeast rice (*Monascus purpureus*). Turk J Biotech 2004; 2:37-49.

Keithley JK, Swanson B, Sha BE, Zeller JM, Kessler HA, Smith KY. A pilot study of the safety of Cholestin in treating HIV-related dyslipidemia. Nutrition 2002;18:201-204.

Patrick L, Uzick M. Cardiovascular disease: C-Reactive Protein and the Inflammatory disease paradigm: HMG-CoA reductase inhibitors, alpha-tocopherol, red yeast rice, and olive oil polyphenols. A review of the literature. Altern Med Rev 2001;6(3):259-261.

Monascus purpureus (red yeast rice). Altern Med Rev 2004;9(2):208-210.

Havel RJ. Dietary supplement or drug ? The case of Cholestin. Am J Clin Nutr 1999;69(2):175-6.

Istvan ES, Deisenhofer J. Structural mechanism for statin inhibition of HMG-CoA reductase. Science 2001;292:1160-1164.

Bliznakov EG, Heber D. More on the Chinese red-yeast-rice supplement and its cholesterol-lowering effect. Am J Clin Nutr 2000;71(1):152-4.

Journoud M, Jones PJH. Red yeast rice: a new hypolipidemic drug. Life sciences 2004;74:2675-2683.

Wang J, Lu Z, Chi J, Wang W, Su M, Kou W, Yu P, Yu L, Chen L, Zhu JS, Chang J. Multicenter clinical trial of the serum lipid-lowering effects of a *Monascus purpureus* (red yeast) rice preparation from traditional Chinese medicine. Curr Ther Res 1997;58(12):964-977.

Li C, Zhu Y, Wang Y, Zhu JS, Chang J, Kritchevsky D. *Monascus purpureus*-fermented rice (red yeast rice) : a natural food product that lowers blood cholesterol in animal models of hypercholesterolemia. Nutr Res 1998;18(1):71-81.

Li YG, Zhang F, Wang ZT, Hu ZB. Identification and chemical profiling of monacolins in red yeast rice using high-performance liquid chromatography with photodiode array detector and mass spectrometry. *J Pharm Biomed Anal* 2004; 35(5): 1101-1112.

Ma J, Li Y, Ye Q, Li J, Hua Y, Ju D, Zhang D, Cooper R, Chang M. Constituents of red yeast rice, a traditional Chinese food and medicine. *J Agric Food Chem* 2000;48:5220-5225.

Miao XS, Metcalfe CD. Determination of cholesterol-lowering statin drugs in aqueous samples using liquid chromatography-electrospray ionization tandem mass spectrometry. *J Chromatogr A* 2003;998(1-2):133-41.

Ertürk S, Önal A, Müge Çetin S. Analytical methods for the quantitative determination of 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase inhibitors in biological samples. *J Chromatogr* 2003;793(2):193-205.

Li YG, Liu H, Wang ZT. A validated stability-indicating HPLC with photodiode array detector (PDA) method for the stress tests of *Monascus purpureus*-fermented rice, red yeast rice. *J Pharm Biomed Anal* 2005; 39(1-2): 82-90.

Heber D, Lembertas A, Lu QY, Bowerman S, Liang W, Go V. An analysis of nine proprietary Chinese red yeast dietary supplements: Implications of variability in chemical profile and contents. *J Altern Complement Med* 2001; 7(2):133-9.

Lee CL, Wang JJ, Pan TM. Synchronous analysis method for detection of citrinine and the lactone and acid forms of monacolin K in red mold rice. *J AOAC International* 2006;89(3):669-77.

Toxines et recherches biomédicales, collection SFET, Goudey-Perrière, F., Bon Cassian, Puiseux-Dao, S. & Sauviat M-P (eds) Elsevier, 2002, pp 143-152

Huang HN, Hua YY, Bao GR, Xie LH. The quantification of monacolin K in some red yeast rice from Fujian province and the comparison of the other product. *Chem.Pharm.Bull* 2006; 54(5):687-9.

Désenfant M, Priel M, Rivier C. De la validation des méthodes d'analyse à l'évaluation de l'incertitude des résultats de mesure. Laboratoire National d'Essais BNM-LNE, 2006.

Sites Internet

Pharmaceutiques: Santé, médicament et industrie, mai 2006

http://www.pharmaceutiques.com/archive/une/art_204.html

Raysahelian, mai 2006

<http://www.raysahelian.com/redyeastrice.html>

Pharmanex, mai 2006

<http://www.pharmanex.com/corp/index.shtml>

Les Presses de l'Université de Montréal, mai 2006

<http://www.pum.umontreal.ca>

Monographie Mevacor (lovastatin) Merck & Co, Inc, juin 2006

http://www.merck.com/product/usa/pi_circulars/m/mevacor/mevacor_pi.pdf

Monographies de produit Mevacor comprimé de lovastatin 20 et 40 mg, juin 2006

http://www.merckfrosst.ca/ff/products/monographs/MEVACOR_989-a_2_06-F.pdf

Estimation de la limite de détection et de quantification d'une méthode d'analyse, août 2006

http://news.reseau-concept.net/images/oiv/client/Resolution_Oeno_FR_2000_07.pdf

Clarke's analysis of drugs and poisons, monographie de la lovastatine, septembre 2006

<http://localhost:1039/clarke/2004/noframes/CLK0962.htm>

Solid-Phase Extraction, septembre 2006

http://www.forumsci.co.il/HPLC/SPE_site.pdf#search=%22Solid%20Phase%20Extraction%22

Sigma-Aldrich, septembre 2006

<http://www.sigmaaldrich.com/Graphics/Supelco/objects/4600/4538.pdf#search=%22solid%20phase%20extraction%22>

La lettre d'info de l'officine, mercredi 18 octobre 2006, n° 191

Ouvrages

Pharmacopée Européenne 5.6 (V^e édition, 6^{ème} addendum)

- Monographie lovastatine p 2077 et 2078

- 2.2.46 : Techniques de séparation chromatographique p 72

11 - Annexes

Annexe 1 : Recommandation ICH. Validation des procédures analytiques : Q2A

INTERNATIONAL CONFERENCE ON HARMONISATION OF TECHNICAL
REQUIREMENTS FOR REGISTRATION OF PHARMACEUTICALS FOR HUMAN
USE

ICH HARMONISED TRIPARTITE GUIDELINE

TEXT ON VALIDATION OF ANALYTICAL PROCEDURES
Q2A

Recommended for Adoption
at Step 4 of the ICH Process
on 27 October 1994
by the ICH Steering Committee

This Guideline has been developed by the appropriate ICH Expert Working Group and has been subject to consultation by the regulatory parties, in accordance with the ICH Process. At Step 4 of the Process the final draft is recommended for adoption to the regulatory bodies of the European Union, Japan and USA.

TEXT ON VALIDATION OF ANALYTICAL PROCEDURES

ICH Harmonised Tripartite Guideline

Having reached Step 4 of the ICH Process at the ICH Steering Committee meeting on 27 October 1994, this guideline is recommended for adoption to the three regulatory parties to ICH

1. Introduction

This document presents a discussion of the characteristics for consideration during the validation of the analytical procedures included as part of registration applications submitted within the EC, Japan and USA. This document does not necessarily seek to cover the testing that may be required for registration in, or export to, other areas of the world. Furthermore, this text presentation serves as a collection of terms, and their definitions, and is not intended to provide direction on how to accomplish validation. These terms and definitions are meant to bridge the differences that often exist between various compendia and regulators of the EC, Japan and USA.

The objective of validation of an analytical procedure is to demonstrate that it is suitable for its intended purpose. A tabular summation of the characteristics applicable to identification, control of impurities and assay procedures is included. Other analytical procedures may be considered in future additions to this document.

2. Types of Analytical Procedures to be Validated

The discussion of the validation of analytical procedures is directed to the four most common types of analytical procedures:

- Identification tests.
- Quantitative tests for impurities' content.
- Limit tests for the control of impurities.
- Quantitative tests of the active moiety in samples of drug substance or drug product or other selected component(s) in the drug product.

Although there are many other analytical procedures, such as dissolution testing for drug products or particle size determination for drug substance, these have not been addressed in the initial text on validation of analytical procedures. Validation of these additional analytical procedures is equally important to those listed herein and may be addressed in subsequent documents.

A brief description of the types of tests considered in this document is provided below.

- Identification tests are intended to ensure the identity of an analyte in a sample. This is normally achieved by comparison of a property of the sample (e.g., spectrum, chromatographic behavior, chemical reactivity, etc) to that of a reference standard.

- Testing for impurities can be either a quantitative test or a limit test for the impurity in a sample. Either test is intended to accurately reflect the purity characteristics of the sample. Different validation characteristics are required for a quantitative test than for a limit test.
- Assay procedures are intended to measure the analyte present in a given sample. In the context of this document, the assay represents a quantitative measurement of the major component(s) in the drug substance. For the drug product, similar validation characteristics also apply when assaying for the active or other selected component(s). The same validation characteristics may also apply to assays associated with other analytical procedures (e.g., dissolution).

The objective of the analytical procedure should be clearly understood since this will govern the validation characteristics which need to be evaluated. Typical validation characteristics which should be considered are listed below:

Accuracy
Precision
 Repeatability
 Intermediate Precision
Specificity
Detection Limit
Quantitation Limit
Linearity
Range

Each of these validation characteristics is defined in the attached Glossary. The table lists those validation characteristics regarded as the most important for the validation of different types of analytical procedures. This list should be considered typical for the analytical procedures cited but occasional exceptions should be dealt with on a case-by-case basis. It should be noted that robustness is not listed in the table but should be considered at an appropriate stage in the development of the analytical procedure.

Furthermore revalidation may be necessary in the following circumstances:

- changes in the synthesis of the drug substance;
- changes in the composition of the finished product;
- changes in the analytical procedure;

The degree of revalidation required depends on the nature of the changes. Certain other changes may require validation as well.

TABLE

Type of analytical procedure characteristics	IDENTIFICATION	TESTING FOR IMPURITIES quantitat. limit	ASSAY - dissolution (measurement only) - content/potency
Accuracy	-	+ -	+
Precision			
Repeatability	-	+ -	+
Interm.Precision	-	+ (1) -	+ (1)
Specificity (2)	+	+ +	+
Detection Limit	-	- (3) +	-
Quantitation Limit	-	+ -	-
Linearity	-	+ -	+
Range	-	+ -	+

- signifies that this characteristic is not normally evaluated

+ signifies that this characteristic is normally evaluated

(1) in cases where reproducibility (see glossary) has been performed, intermediate precision is not needed

(2) lack of specificity of one analytical procedure could be compensated by other supporting analytical procedure(s)

(3) may be needed in some cases

GLOSSARY

1. ANALYTICAL PROCEDURE

The analytical procedure refers to the way of performing the analysis. It should describe in detail the steps necessary to perform each analytical test. This may include but is not limited to: the sample, the reference standard and the reagents preparations, use of the apparatus, generation of the calibration curve, use of the formulae for the calculation, etc.

2. SPECIFICITY

Specificity is the ability to assess unequivocally the analyte in the presence of components which may be expected to be present. Typically these might include impurities, degradants, matrix, etc.

Lack of specificity of an individual analytical procedure may be compensated by other supporting analytical procedure(s).

This definition has the following implications:

Identification: to ensure the identity of an analyte.

Purity Tests: to ensure that all the analytical procedures performed allow an accurate statement of the content of impurities of an analyte, i.e. related substances test, heavy metals, residual solvents content, etc.

Assay (content or potency):

to provide an exact result which allows an accurate statement on the content or potency of the analyte in a sample.

3. ACCURACY

The accuracy of an analytical procedure expresses the closeness of agreement between the value which is accepted either as a conventional true value or an accepted reference value and the value found.

This is sometimes termed trueness.

4. PRECISION

The precision of an analytical procedure expresses the closeness of agreement (degree of scatter) between a series of measurements obtained from multiple sampling of the same homogeneous sample under the prescribed conditions. Precision may be considered at three levels: repeatability, intermediate precision and reproducibility.

Precision should be investigated using homogeneous, authentic samples. However, if it is not possible to obtain a homogeneous sample it may be investigated using artificially prepared samples or a sample solution.

The precision of an analytical procedure is usually expressed as the variance, standard deviation or coefficient of variation of a series of measurements.

4.1. Repeatability

Repeatability expresses the precision under the same operating conditions over a short interval of time. Repeatability is also termed intra-assay precision .

4.2. Intermediate precision

Intermediate precision expresses within-laboratories variations: different days, different analysts, different equipment, etc.

4.3. Reproducibility

Reproducibility expresses the precision between laboratories (collaborative studies, usually applied to standardization of methodology).

5. DETECTION LIMIT

The detection limit of an individual analytical procedure is the lowest amount of analyte in a sample which can be detected but not necessarily quantitated as an exact value.

6. QUANTITATION LIMIT

The quantitation limit of an individual analytical procedure is the lowest amount of analyte in a sample which can be quantitatively determined with suitable precision and accuracy. The quantitation limit is a parameter of quantitative assays for low levels of compounds in sample matrices, and is used particularly for the determination of impurities and/or degradation products.

7. LINEARITY

The linearity of an analytical procedure is its ability (within a given range) to obtain test results which are directly proportional to the concentration (amount) of analyte in the sample.

8. RANGE

The range of an analytical procedure is the interval between the upper and lower concentration (amounts) of analyte in the sample (including these concentrations) for which it has been demonstrated that the analytical procedure has a suitable level of precision, accuracy and linearity.

9. ROBUSTNESS

The robustness of an analytical procedure is a measure of its capacity to remain unaffected by small, but deliberate variations in method parameters and provides an indication of its reliability during normal usage.

Annexe 2 : Recommandation ICH. Validation des procédures analytiques : Q2B. Méthodologie

INTERNATIONAL CONFERENCE ON HARMONISATION OF TECHNICAL
REQUIREMENTS FOR REGISTRATION OF PHARMACEUTICALS FOR HUMAN
USE

ICH HARMONISED TRIPARTITE GUIDELINE

VALIDATION OF ANALYTICAL PROCEDURES: METHODOLOGY
Q2B

Recommended for Adoption
at Step 4 of the ICH Process
on 6 November 1996
by the ICH Steering Committee

This Guideline has been developed by the appropriate ICH Expert Working Group and has been subject to consultation by the regulatory parties, in accordance with the ICH Process. At Step 4 of the Process the final draft is recommended for adoption to the regulatory bodies of the European Union, Japan and USA.

VALIDATION OF ANALYTICAL PROCEDURES: METHODOLOGY

ICH Harmonised Tripartite Guideline

Having reached Step 4 of the ICH Process at the ICH Steering Committee meeting on 6 November 1996, this guideline is recommended for adoption to the three regulatory parties to ICH

TABLE OF CONTENTS

INTRODUCTION	1
1. SPECIFICITY	2
1.1. Identification.....	2
1.2. Assay and Impurity Test(s).....	2
2. LINEARITY	3
3. RANGE	3
4. ACCURACY	4
4.1. Assay	4
4.2. Impurities (Quantitation).....	5
4.3. Recommended Data	5
5. PRECISION	5
5.1. Repeatability.....	5
5.2. Intermediate Precision	5
5.3. Reproducibility.....	5
5.4. Recommended Data	6
6. DETECTION LIMIT	6
6.1. Based on Visual Evaluation	6
6.2. Based on Signal-to-Noise	6
6.3. Based on the Standard Deviation of the Response and the Slope	6
6.4. Recommended Data	6
7. QUANTITATION LIMIT	7
7.1. Based on Visual Evaluation	7
7.2. Based on Signal-to-Noise Approach.....	7
7.3. Based on the Standard Deviation of the Response and the Slope	7
7.4. Recommended Data	8
8. ROBUSTNESS	8
9. SYSTEM SUITABILITY TESTING	8

VALIDATION OF ANALYTICAL PROCEDURES: METHODOLOGY

INTRODUCTION

This document is complementary to the parent document which presents a discussion of the characteristics that should be considered during the validation of analytical procedures. Its purpose is to provide some guidance and recommendations on how to consider the various validation characteristics for each analytical procedure. In some cases (for example, demonstration of specificity), the overall capabilities of a number of analytical procedures in combination may be investigated in order to ensure the quality of the drug substance or drug product. In addition, the document provides an indication of the data which should be presented in a registration application .

All relevant data collected during validation and formulae used for calculating validation characteristics should be submitted and discussed as appropriate.

Approaches other than those set forth in this guideline may be applicable and acceptable. It is the responsibility of the applicant to choose the validation procedure and protocol most suitable for their product. However it is important to remember that the main objective of validation of an analytical procedure is to demonstrate that the procedure is suitable for its intended purpose. Due to their complex nature, analytical procedures for biological and biotechnological products in some cases may be approached differently than in this document.

Well-characterized reference materials, with documented purity, should be used throughout the validation study. The degree of purity necessary depends on the intended use.

In accordance with the parent document, and for the sake of clarity, this document considers the various validation characteristics in distinct sections. The arrangement of these sections reflects the process by which an analytical procedure may be developed and evaluated.

In practice, it is usually possible to design the experimental work such that the appropriate validation characteristics can be considered simultaneously to provide a sound, overall knowledge of the capabilities of the analytical procedure, for instance: specificity, linearity, range, accuracy and precision.

1. SPECIFICITY

An investigation of specificity should be conducted during the validation of identification tests, the determination of impurities and the assay. The procedures used to demonstrate specificity will depend on the intended objective of the analytical procedure.

It is not always possible to demonstrate that an analytical procedure is specific for a particular analyte (complete discrimination). In this case a combination of two or more analytical procedures is recommended to achieve the necessary level of discrimination.

1.1. Identification

Suitable identification tests should be able to discriminate between compounds of closely related structures which are likely to be present. The discrimination of a procedure may be confirmed by obtaining positive results (perhaps by comparison with a known reference material) from samples containing the analyte, coupled with negative results from samples which do not contain the analyte. In addition, the identification test may be applied to materials structurally similar to or closely related to the analyte to confirm that a positive response is not obtained. The choice of such potentially interfering materials should be based on sound scientific judgement with a consideration of the interferences that could occur.

1.2. Assay and Impurity Test(s)

For chromatographic procedures, representative chromatograms should be used to demonstrate specificity and individual components should be appropriately labelled. Similar considerations should be given to other separation techniques.

Critical separations in chromatography should be investigated at an appropriate level. For critical separations, specificity can be demonstrated by the resolution of the two components which elute closest to each other.

In cases where a non-specific assay is used, other supporting analytical procedures should be used to demonstrate overall specificity. For example, where a titration is adopted to assay the drug substance for release, the combination of the assay and a suitable test for impurities can be used.

The approach is similar for both assay and impurity tests:

1.2.1 Impurities are available

For the assay, this should involve demonstration of the discrimination of the analyte in the presence of impurities and/or excipients; practically, this can be done by spiking pure substances (drug substance or drug product) with appropriate levels of impurities and/or excipients and demonstrating that the assay result is unaffected by the presence of these materials (by comparison with the assay result obtained on unspiked samples).

For the impurity test, the discrimination may be established by spiking drug substance or drug product with appropriate levels of impurities and demonstrating the separation of these impurities individually and/or from other components in the sample matrix.

1.2.2 Impurities are not available

If impurity or degradation product standards are unavailable, specificity may be demonstrated by comparing the test results of samples containing impurities or degradation products to a second well-characterized procedure e.g.: pharmacopoeial method or other validated analytical procedure (independent procedure). As appropriate, this should include samples stored under relevant stress conditions: light, heat, humidity, acid/base hydrolysis and oxidation.

- for the assay, the two results should be compared.
- for the impurity tests, the impurity profiles should be compared.

Peak purity tests may be useful to show that the analyte chromatographic peak is not attributable to more than one component (e.g., diode array, mass spectrometry).

2. LINEARITY

A linear relationship should be evaluated across the range (see section 3) of the analytical procedure. It may be demonstrated directly on the drug substance (by dilution of a standard stock solution) and/or separate weighings of synthetic mixtures of the drug product components, using the proposed procedure. The latter aspect can be studied during investigation of the range.

Linearity should be evaluated by visual inspection of a plot of signals as a function of analyte concentration or content. If there is a linear relationship, test results should be evaluated by appropriate statistical methods, for example, by calculation of a regression line by the method of least squares. In some cases, to obtain linearity between assays and sample concentrations, the test data may need to be subjected to a mathematical transformation prior to the regression analysis. Data from the regression line itself may be helpful to provide mathematical estimates of the degree of linearity.

The correlation coefficient, y-intercept, slope of the regression line and residual sum of squares should be submitted. A plot of the data should be included. In addition, an analysis of the deviation of the actual data points from the regression line may also be helpful for evaluating linearity.

Some analytical procedures, such as immunoassays, do not demonstrate linearity after any transformation. In this case, the analytical response should be described by an appropriate function of the concentration (amount) of an analyte in a sample.

For the establishment of linearity, a minimum of 5 concentrations is recommended. Other approaches should be justified.

3. RANGE

The specified range is normally derived from linearity studies and depends on the intended application of the procedure. It is established by confirming that the analytical procedure provides an acceptable degree of linearity, accuracy and precision when applied to samples containing amounts of analyte within or at the extremes of the specified range of the analytical procedure.

The following minimum specified ranges should be considered:

- for the assay of a drug substance or a finished (drug) product: normally from 80 to 120 percent of the test concentration;
- for content uniformity, covering a minimum of 70 to 130 percent of the test concentration, unless a wider more appropriate range, based on the nature of the dosage form (e.g., metered dose inhalers), is justified;

- for dissolution testing: +/-20 % over the specified range;
e.g., if the specifications for a controlled released product cover a region from 20%, after 1 hour, up to 90%, after 24 hours, the validated range would be 0-110% of the label claim.
- for the determination of an impurity: from the reporting level of an impurity¹ to 120% of the specification;
for impurities known to be unusually potent or to produce toxic or unexpected pharmacological effects, the detection/quantitation limit should be commensurate with the level at which the impurities must be controlled.
Note: for validation of impurity test procedures carried out during development, it may be necessary to consider the range around a suggested (probable) limit;
- if assay and purity are performed together as one test and only a 100% standard is used, linearity should cover the range from the reporting level of the impurities¹ to 120% of the assay specification;

4. ACCURACY

Accuracy should be established across the specified range of the analytical procedure.

4.1. Assay

4.1.1 Drug Substance

Several methods of determining accuracy are available:

- a) application of an analytical procedure to an analyte of known purity (e.g. reference material);
- b) comparison of the results of the proposed analytical procedure with those of a second well-characterized procedure, the accuracy of which is stated and/or defined (independent procedure, see 1.2.);
- c) accuracy may be inferred once precision, linearity and specificity have been established.

4.1.2 Drug Product

Several methods for determining accuracy are available:

- a) application of the analytical procedure to synthetic mixtures of the drug product components to which known quantities of the drug substance to be analysed have been added;
- b) in cases where it is impossible to obtain samples of all drug product components , it may be acceptable either to add known quantities of the analyte to the drug product or to compare the results obtained from a second, well characterized procedure, the accuracy of which is stated and/or defined (independent procedure, see 1.2.).
- c) accuracy may be inferred once precision, linearity and specificity have been established.

¹ see chapters "Reporting Impurity Content of Batches" of the corresponding ICH-Guidelines: "Impurities in New Drug Substances" and "Impurities in New Drug Products"

4.2. Impurities (Quantitation)

Accuracy should be assessed on samples (drug substance/drug product) spiked with known amounts of impurities.

In cases where it is impossible to obtain samples of certain impurities and/or degradation products, it is considered acceptable to compare results obtained by an independent procedure (see 1.2.). The response factor of the drug substance can be used.

It should be clear how the individual or total impurities are to be determined e.g., weight/weight or area percent, in all cases with respect to the major analyte.

4.3. Recommended Data

Accuracy should be assessed using a minimum of 9 determinations over a minimum of 3 concentration levels covering the specified range (e.g. 3 concentrations/3 replicates each of the total analytical procedure).

Accuracy should be reported as percent recovery by the assay of known added amount of analyte in the sample or as the difference between the mean and the accepted true value together with the confidence intervals.

5. PRECISION

Validation of tests for assay and for quantitative determination of impurities includes an investigation of precision.

5.1. Repeatability

Repeatability should be assessed using:

- a) a minimum of 9 determinations covering the specified range for the procedure (e.g. 3 concentrations/3 replicates each)

or

- b) a minimum of 6 determinations at 100% of the test concentration.

5.2. Intermediate Precision

The extent to which intermediate precision should be established depends on the circumstances under which the procedure is intended to be used. The applicant should establish the effects of random events on the precision of the analytical procedure. Typical variations to be studied include days, analysts, equipment, etc. It is not considered necessary to study these effects individually. The use of an experimental design (matrix) is encouraged.

5.3. Reproducibility

Reproducibility is assessed by means of an inter-laboratory trial. Reproducibility should be considered in case of the standardization of an analytical procedure, for instance, for inclusion of procedures in pharmacopoeias. These data are not part of the marketing authorization dossier.

5.4. Recommended Data

The standard deviation, relative standard deviation (coefficient of variation) and confidence interval should be reported for each type of precision investigated.

6. DETECTION LIMIT

Several approaches for determining the detection limit are possible, depending on whether the procedure is a non-instrumental or instrumental. Approaches other than those listed below may be acceptable.

6.1. Based on Visual Evaluation

Visual evaluation may be used for non-instrumental methods but may also be used with instrumental methods.

The detection limit is determined by the analysis of samples with known concentrations of analyte and by establishing the minimum level at which the analyte can be reliably detected .

6.2. Based on Signal-to-Noise

This approach can only be applied to analytical procedures which exhibit baseline noise.

Determination of the signal-to-noise ratio is performed by comparing measured signals from samples with known low concentrations of analyte with those of blank samples and establishing the minimum concentration at which the analyte can be reliably detected. A signal-to-noise ratio between 3 or 2:1 is generally considered acceptable for estimating the detection limit.

6.3 Based on the Standard Deviation of the Response and the Slope

The detection limit (DL) may be expressed as:

$$DL = \frac{3.3 \sigma}{S}$$

where σ = the standard deviation of the response

S = the slope of the calibration curve

The slope S may be estimated from the calibration curve of the analyte. The estimate of s may be carried out in a variety of ways, for example:

6.3.1 Based on the Standard Deviation of the Blank

Measurement of the magnitude of analytical background response is performed by analyzing an appropriate number of blank samples and calculating the standard deviation of these responses.

6.3.2 Based on the Calibration Curve

A specific calibration curve should be studied using samples containing an analyte in the range of DL. The residual standard deviation of a regression line or the standard deviation of y-intercepts of regression lines may be used as the standard deviation.

6.4 Recommended Data

The detection limit and the method used for determining the detection limit should be presented. If DL is determined based on visual evaluation or based on signal to noise

ratio, the presentation of the relevant chromatograms is considered acceptable for justification.

In cases where an estimated value for the detection limit is obtained by calculation or extrapolation, this estimate may subsequently be validated by the independent analysis of a suitable number of samples known to be near or prepared at the detection limit.

7. QUANTITATION LIMIT

Several approaches for determining the quantitation limit are possible, depending on whether the procedure is a non-instrumental or instrumental. Approaches other than those listed below may be acceptable.

7.1. Based on Visual Evaluation

Visual evaluation may be used for non-instrumental methods but may also be used with instrumental methods.

The quantitation limit is generally determined by the analysis of samples with known concentrations of analyte and by establishing the minimum level at which the analyte can be quantified with acceptable accuracy and precision.

7.2. Based on Signal-to-Noise Approach

This approach can only be applied to analytical procedures that exhibit baseline noise.

Determination of the signal-to-noise ratio is performed by comparing measured signals from samples with known low concentrations of analyte with those of blank samples and by establishing the minimum concentration at which the analyte can be reliably quantified. A typical signal-to-noise ratio is 10:1.

7.3. Based on the Standard Deviation of the Response and the Slope

The quantitation limit (QL) may be expressed as:

$$QL = \frac{10 \sigma}{S}$$

where σ = the standard deviation of the response

S = the slope of the calibration curve

The slope S may be estimated from the calibration curve of the analyte. The estimate of s may be carried out in a variety of ways for example:

7.3.1 Based on Standard Deviation of the Blank

Measurement of the magnitude of analytical background response is performed by analyzing an appropriate number of blank samples and calculating the standard deviation of these responses.

7.3.2 Based on the Calibration Curve

A specific calibration curve should be studied using samples, containing an analyte in the range of QL. The residual standard deviation of a regression line or the standard deviation of y-intercepts of regression lines may be used as the standard deviation.

7.4 Recommended Data

The quantitation limit and the method used for determining the quantitation limit should be presented.

The limit should be subsequently validated by the analysis of a suitable number of samples known to be near or prepared at the quantitation limit.

8. ROBUSTNESS

The evaluation of robustness should be considered during the development phase and depends on the type of procedure under study. It should show the reliability of an analysis with respect to deliberate variations in method parameters.

If measurements are susceptible to variations in analytical conditions, the analytical conditions should be suitably controlled or a precautionary statement should be included in the procedure. One consequence of the evaluation of robustness should be that a series of system suitability parameters (e.g., resolution test) is established to ensure that the validity of the analytical procedure is maintained whenever used.

Examples of typical variations are:

- stability of analytical solutions,
- extraction time

In the case of liquid chromatography, examples of typical variations are

- influence of variations of pH in a mobile phase,
- influence of variations in mobile phase composition,
- different columns (different lots and/or suppliers),
- temperature,
- flow rate.

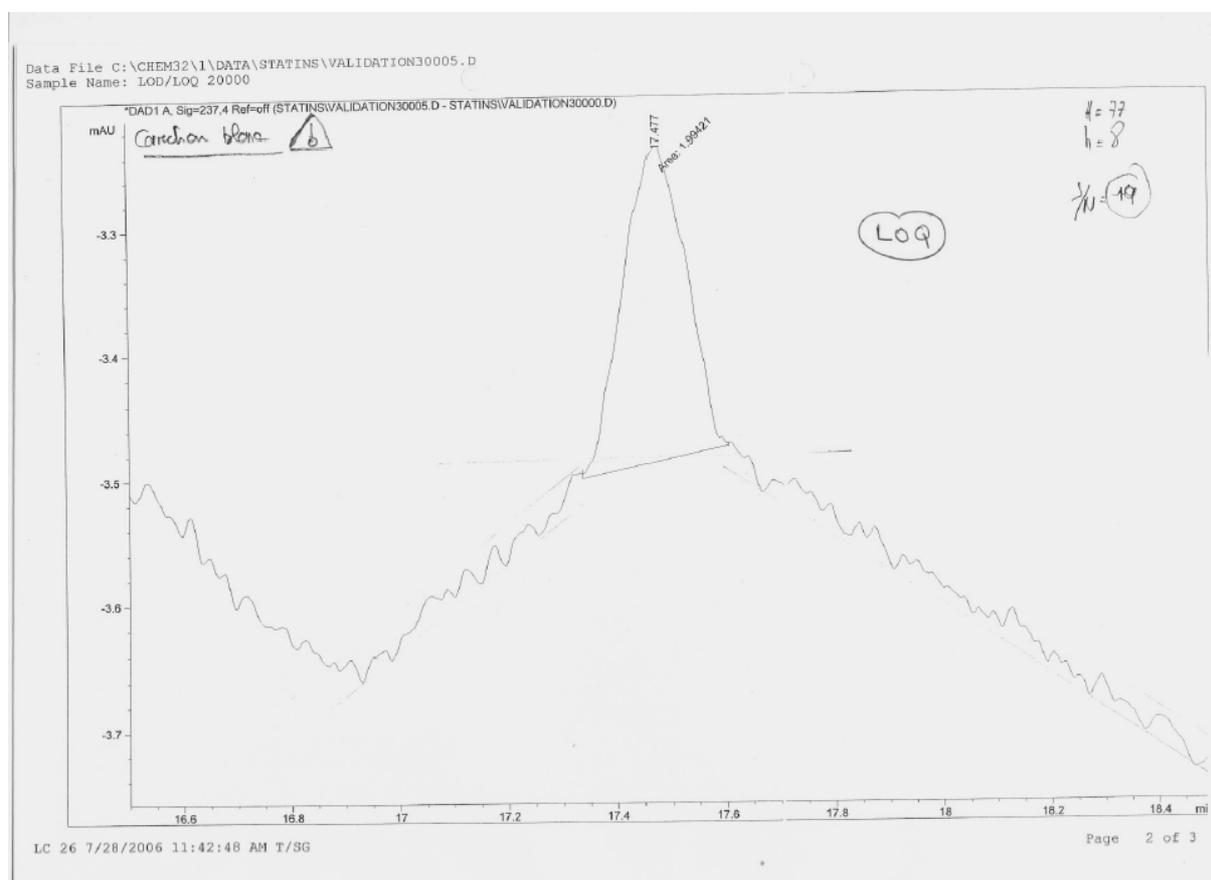
In the case of gas-chromatography, examples of typical variations are

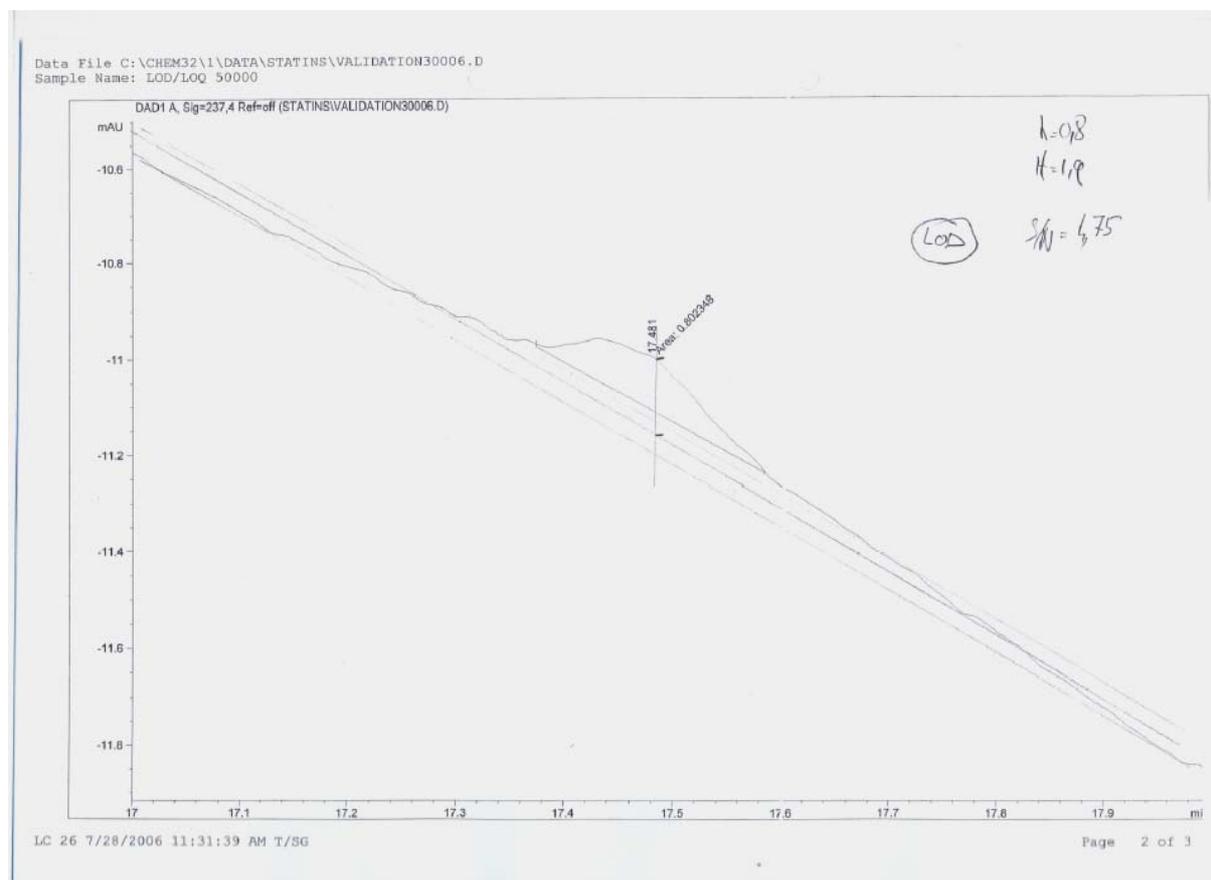
- different columns (different lots and/or suppliers),
- temperature,
- flow rate.

9. SYSTEM SUITABILITY TESTING

System suitability testing is an integral part of many analytical procedures. The tests are based on the concept that the equipment, electronics, analytical operations and samples to be analyzed constitute an integral system that can be evaluated as such. System suitability test parameters to be established for a particular procedure depend on the type of procedure being validated. See Pharmacopoeias for additional information.

Annexe 3 : Calcul de la limite de détection (LoD) et de quantification (LoQ) par mode graphique





Annexe 4 : Calcul de la limite de détection (LoD) et de quantification (LoQ) par extrapolation de la droite d'étalonnage

Etude d'une régression linéaire de première espèce

x(i)	y(i)		
0,00217	4,66675	0,217	4342,71191
0,001085	2,39171	0,0217	
0,000434	0,941382	0,00217	
0,000217	0,489695	0,001085	
0,0001085	0,279439	0,000434	
0,0000434	0,115737	0,000217	
0,0000217	0,051745	0,0001085	
		0,0000434	
		0,0000217	

Calculons la somme des x(i), des x(i)², des y(i), des y(i)² et des x(i).y(i).

x(i)	y(i)	x(i) ²	y(i) ²	x(i).y(i)
0,00217	4,66675	4,7089E-06	21,7785556	0,01012685
0,001085	2,39171	1,1772E-06	5,72027672	0,00259501
0,000434	0,941382	1,8836E-07	0,88620007	0,00040856
0,000217	0,489695	4,7089E-08	0,23980119	0,00010626
0,0001085	0,279439	1,1772E-08	0,07808615	3,0319E-05
0,0000434	0,115737	1,8836E-09	0,01339505	5,023E-06
0,0000217	0,051745	4,7089E-10	0,00267755	1,1229E-06
SOMME =	0,0040796	8,936458	28,7189923	0,01327314

Calculons les estimations ponctuelles de la pente a et de l'ordonnée à l'origine b de la droite de régression de Y par rapport à X ainsi que celle de la variance s²(Y/X) liée de Y par rapport à X.

2.a) Utilisons tout d'abord les formules données.

Pour cela, commençons par poser le nombre d'individus n.

On utilise ici la fonction NB en sélectionnant la série de données des x(i).

n = 7

A présent, nous pouvons calculer a, b et s²(Y/X) grâce aux formules. Pour ce faire, nous allons tout d'abord décomposer le calcul en calculant SCE(x), SCE(y) et SPE(xy).

SCE(x) = 0,0000
SCE(y) = 17,3104
SPE(xy) = 0,0081

D'où :

a = 2146,0209
b = 0,0259
s²(Y/X) = 0,0006

2.b) Une autre méthode consiste à utiliser les fonctions COVARIANCE et SOMME.CARRES.ECARTS, ce qui nous évite d'effectuer certains calculs du a).

Les paramètres de la fonction COVARIANCE sont les séries de données x et y. Cette fonction renvoie la moyenne du produit des écarts à la moyenne de chaque paire de points des deux séries. La multiplication du résultat de cette fonction par le nombre d'individus permet de calculer aisément $SPE(xy)$. Les paramètres de la fonction SOMME.CARRES.ECARTS sont les nombres d'une série de données. Cette fonction renvoie la somme des carrés des écarts entre chacune des données et leur moyenne arithmétique. En appliquant respectivement cette formule à chacune des séries de données x et y, nous obtiendrons $SCE(x)$ et $SCE(y)$.

$$\begin{aligned}SPE(xy) &= 0,0081 \\SCE(x) &= 0,0000 \\SCE(y) &= 17,3104\end{aligned}$$

D'où :

$$\begin{aligned}a &= 2146,0209 \\b &= 0,0259 \\s^2(Y/X) &= 0,0006\end{aligned}$$

2.c) Nous pouvons aussi utiliser la fonction DROITEREG qui nous permet de déterminer la pente et son écart-type, l'ordonnée à l'origine et son écart-type, l'écart-type de Y pour x fixé et le coefficient de détermination r^2 .

Les paramètres de la fonction DROITEREG sont la série de données des y, celle des x, une constante (VRAI si l'ordonnée à l'origine est calculée normalement et FAUX si elle est prise égale à 0) et le dernier est fixé à VRAI si l'on souhaite avoir des statistiques complémentaires telles que les écart-types de la pente et de l'ordonnées à l'origine, l'écart-type lié... et FAUX sinon.

N.B. : il est nécessaire de préparer la place utile pour mettre les résultats donnés par la fonction DROITEREG avec les deux derniers paramètres fixés à VRAI.

2146,0209	0,0259
12,16	0,01
0,9998	0,02

pente ordonnée à l'origine

Ce tableau nous donne (en lisant de gauche à droite les lignes successives) :
a, b, s(a), s(b), r^2 , s(Y/X).

Annexe 5 : Analyse statistique (logiciel AVA)

AVA V 3.1 (MIN) - AVA9510054 27/07/2006 15:14:48 4/11

Utilisateur : admin (Administrator : Manager / NF)
 Mode : LIBRE
 Technique : LOVASTATINE Produit : LEVURE DE RIZ ROUGE
 Nature : linearité
 Matrice : SFSTP
 Composant : LOVASTATINE Statut : P
 Nature : riz rouge
 Rubrique : DOSAGE Procédure : HPLC
 (Rubrique en cours)

Critère de validation : LINEARITE

Linéarité: Données validées et invalidées pour les calculs
 (riz rouge)

Grpe	Série	ppm (ppm)	Teneur en composant/ qté théorique (%)	Surface
0.01	1	0.010130	50.65	2030
0.01	2	0.010910	54.55	2096
0.01	3	0.010310	51.55	2040
0.015	1	0.015195	75.975	3037
0.015	2	0.016365	81.825	3227
0.015	3	0.015465	77.325	3024
0.02	1	0.020260	101.3	4173
0.02	2	0.021820	109.1	4425
0.02	3	0.020620	103.1	3959
0.025	1	0.025325	126.62	5304
0.025	2	0.027275	136.38	5476
0.025	3	0.025775	128.67	5048
0.03	1	0.030390	151.95	6299
0.03	2	0.032730	163.65	6619
0.03	3	0.030930	154.65	6024

Saisie le 27/07/2006 15:10:42 par ADMIN
 qté théorique: 0.02 (ppm)
 (): Données invalidées lors des calculs

AVA V 3.1 (WIN) - AVA9510054 27/07/2006 15:14:48 5/11

Utilisateur : admin (Administrator : Manager / NF)
Mode : LIBRE
Technique : LOVASTATINE Produit : LEVURE DE RIZ ROUGE
Nature : linearité
Matrice : SFSTP
Composant : LOVASTATINE Statut : P
Nature : riz rouge
Rubrique : DOSAGE Procédure : HPLC
(Rubrique en cours)

Critère de validation : LINEARITE

Linéarité: Coefficients de la droite de régression
(riz rouge)

	Valeur	Ecart- type	t stud. calc.	t stud. theor.	Niv. signif. (Risque alpha)
Pente	2.044e+05	4238.32			
Ordonnée à l'origine	-87.523	94.00			
Coef. corr.	0.997202				
Compar. ordonnée orig. avec 0 (t)			0.93107 (NS)	2.160369 t(0.05;13)	0.368762

NS: Valeur Non Significative au risque considéré

Si t calculé n'est pas significatif, l'ordonnée à l'origine n'est pas
significativement différente de 0 au risque considéré.

AVA V 3.1 (WIN) - AVA9510054 27/07/2006 15:14:48 6/11

Utilisateur : admin (Administrator : Manager / NF)
 Mode : LIBRE
 Technique : LOVASTATINE Produit : LEVURE DE RIZ ROUGE
 Nature : linearité
 Matrice : SFSTP
 Composant : LOVASTATINE Statut : P
 Nature : riz rouge
 Rubrique : DOSAGE Procédure : HPLC
 (Rubrique en cours)

Critère de validation : LINEARITE

Linéarité: Données estimées
(riz rouge)

ppm (ppm)	Surface obs.	Surface estim.	Résidus
0.010130	2030	1983.5157	46.4843
0.010910	2096	2142.9836	-46.9836
0.010310	2040	2020.316	19.684
0.015195	3037	3019.0351	17.9649
0.016365	3227	3258.237	-31.237
0.015465	3024	3074.2355	-50.2355
0.020260	4173	4054.5545	118.4455
0.021820	4425	4373.4904	51.5096
0.020620	3959	4128.1551	-169.1551
0.025325	5304	5090.0739	213.9261
0.027275	5476	5488.7438	-12.7438
0.025775	5048	5182.0747	-134.0747
0.030390	6299	6125.5934	173.4066
0.032730	6619	6603.9972	15.0028
0.030930	6024	6235.9942	-211.9942

Linéarité: Changement de variable
(riz rouge)

Grpe	ppm (ppm)	Xmoy du groupe	Surface +	b * (Xmoy-Xij)	= Yij	Variance du groupe
0.01	0.010130	0.010450	2030	65.422747	2095.422747	2316.514784
0.01	0.010910	0.010450	2096	-94.045199	2001.954801	
0.01	0.010310	0.010450	2040	28.622452	2068.622452	
0.015	0.015195	0.015675	3037	98.134121	3135.134121	1238.845549
0.015	0.016365	0.015675	3227	-141.067799	3085.932201	
0.015	0.015465	0.015675	3024	42.933678	3066.933678	
0.02	0.020260	0.020900	4173	130.845495	4303.845495	22647.903713
0.02	0.021820	0.020900	4425	-188.090399	4236.909601	
0.02	0.020620	0.020900	3959	57.244904	4016.244904	
0.025	0.025325	0.026125	5304	163.556869	5467.556869	31200.820533
0.025	0.027275	0.026125	5476	-235.132777	5240.867001	
0.025	0.025775	0.026125	5048	71.556130	5119.556130	
0.03	0.030390	0.031350	6299	196.268242	6495.268242	37525.546445
0.03	0.032730	0.031350	6619	-282.135598	6336.864402	
0.03	0.030930	0.031350	6024	85.867356	6109.867356	

b = 204446.085855

AVA V 3.1 (WIN) - AVA9510054 27/07/2006 15:14:48 7/11

Utilisateur : admin (Administrator : Manager / NF)
 Mode : LIBRE
 Technique : LOVASTATINE Produit : LEVURE DE RIZ ROUGE
 Nature : linearité
 Matrice : SFSTP
 Composant : LOVASTATINE Statut : P
 Nature : riz rouge
 Rubrique : DOSAGE Procédure : HPLC
 (Rubrique en cours)

Critère de validation : LINEARITE

Linéarité: Test d'homogénéité de variances (COCHRAN)
(riz rouge)

Grpe j	0.01	0.015	0.02	0.025	0.03
nj	3	3	3	3	3
S²j	2316.51476	1236.84555	22647.9037	31200.8205	37525.5464
mj	2055.3333	3096	4185.6667	5276	6314
CVj (%)	2.3417	1.1369	3.5954	3.3479	3.068

Somme des variances = 94929.631023

Variance max. = 37525.546445

C calculé = 0.395299

C(0.05;5;2) = 0.6836 (NS)

NS: Valeur Non Significative au risque considéré

Si C calculé n'est pas significatif, les variances des différents groupes peuvent être considérées homogènes au risque considéré.

AVA V 3.1 (WIN) - AVA9510054 27/07/2006 15:14:48 8/11

Utilisateur : admin (Administrator : Manager / NF)
 Mode : LIBRE
 Technique : LOVASTATINE Produit : LEVURE DE RIZ ROUGE
 Nature : linearité
 Matrice : SFSTP
 Composant : LOVASTATINE Statut : P
 Nature : riz rouge
 Rubrique : DOSAGE Procédure : HPLC

(Rubrique en cours)

Critère de validation : LINEARITE

Linéarité: Test de l'existence d'une pente significative
 (riz rouge)

	DDL	Somme des carrés	Variances	F calculé	Niv. signif. (Risque alpha)
Var. tot.	14	34522827.528713			
Var. rég.	1	34329882.133333	34329882.133333	2313.029896	4.44e-16
Var. rés.	13	192945.395380	14841.953491		

F(0.01;1;13) = 9.073806 (S)
 F(0.001;1;13) = 17.81542 (HS)
 S: Valeur Significative au risque considéré
 HS: Valeur Hautement Significative au risque considéré

Si F calculé est significatif, il est possible de conclure à l'existence
 d'une pente au risque considéré.

Linéarité: Test de validité de la droite
 (riz rouge)

	DDL	Somme des carrés	Variances	F calculé	Niv. signif. (Risque alpha)
Err. rég.	3	3086.133333	1028.711111	0.054183	0.982435
Err. exp.	10	189859.262046	18985.926205		

F(0.05;3;10) = 3.708265 (NS)
 NS: Valeur Non Significative au risque considéré

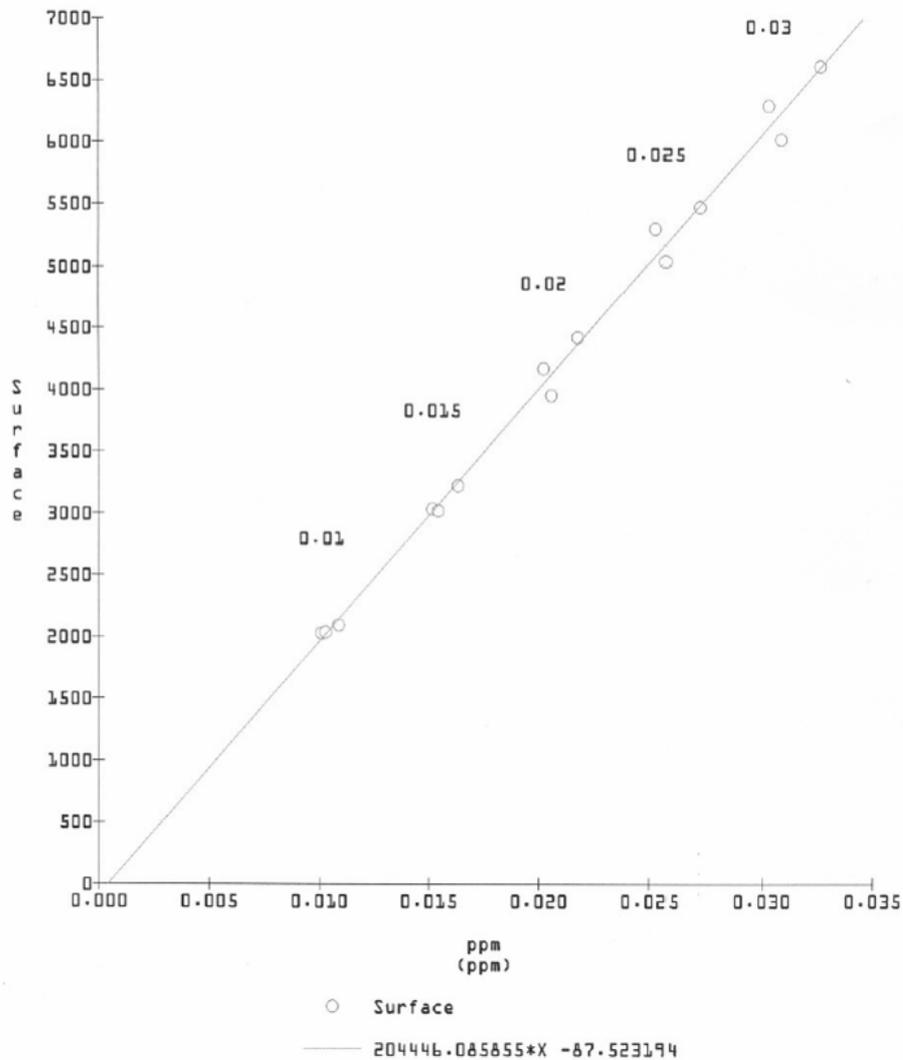
Si F calculé n'est pas significatif, l'ajustement est considéré comme valide
 au risque considéré.

AVA V 3.1 (WIN) - AVA9510054 27/07/2006 15:14:48 9/11

Utilisateur : admin (Administrator : Manager / NF)
 Mode : LIBRE
 Technique : LOVASTATINE Produit : LEVURE DE RIZ ROUGE
 Nature : linéarité
 Matrice : SFSTP
 Composant : LOVASTATINE Statut : P
 Nature : riz rouge
 Rubrique : DOSAGE Procédure : HPLC
 (Rubrique en cours)

Critère de validation : LINEARITE

Linéarité: Graphique XY
 LOVASTATINE - (riz rouge)



AVA V 3.1 (WIN) - AVA9510054 27/07/2006 15:19:52 1/9

Utilisateur : admin (Administrator : Manager / NF)
Mode : LIBRE
Technique : LOVASTATINE Produit : LEVURE DE RIZ ROUGE
Nature : linearité
Matrice : SFSTP
Composant : LOVASTATINE Statut : P
Nature : riz rouge
Rubrique : DOSAGE Procédure : HPLC

(Rubrique en cours)

INFORMATIONS

Procédure analytique:
validation

VERIFIE LE :

PAR :

PARAPHE :

AVA V 3.1 (WIN) - AVA9510054 27/07/2006 15:19:52 2/9

Utilisateur : admin (Administrator : Manager / NF)
Mode : LIBRE
Technique : LOVASTATINE Produit : LEVURE DE RIZ ROUGE
Nature : linearité
Matrice : SFSTP
Composant : LOVASTATINE Statut : P
Nature : riz rouge Procédure : HPLC
Rubrique : DOSAGE (Rubrique en cours)

Critère de validation : FIDELITE

RESULTATS: Fidélité

Transformation : LIN
X

Transformation : LIN
Y

RISQUES SUR LES TESTS :

Homog. variances (COCHRAN) : S=0.05, HS=0.01
Rech. de valeurs aberrantes (DIXON) : S=0.05, HS=0.01
Cohérence Fidélité / Exactitude (FISHER) : S=0.05

EVENEMENTS SURVENUS LORS DES CALCULS :

linearité : ATTENTION !!!
Non homogénéité de variances à 5%
La variance du groupe 1 est SUSPECTE

linearité : Série 1: ATTENTION !!!
La donnée 0.005704 (Essai 5) est aberrante (DIXON)
Données invalidées par test:
S1 E(5 **)

AVA V 3.1 (WIN) - AVA9510054 27/07/2006 15:19:52 7/9

Utilisateur : admin (Administrator : Manager / NF)
 Mode : LIBRE
 Technique : LOVASTATINE Produit : LEVURE DE RIZ ROUGE
 Nature : linearité
 Matrice : SFSTP
 Composant : LOVASTATINE Statut : P
 Nature : riz rouge
 Rubrique : DOSAGE Procédure : HPLC
 (Rubrique en cours)

Critère de validation : FIDELITE

Fidélité: Recouvrements
 Référence: Droite de régression, riz rouge
 (linearité)

Série	Essai	ppm (ppm)	Surface	Qté retrouvée (ppm)	Recouvr. (%) Yij	Variances
3	6	250.53	2968.08179	0.015198	0.006066	

** : valeur aberrante (DIXON)
 S₁ E5: E calc = 0.710909 > d(0.01;6) = 0.698

() : Données invalidées lors des calculs

Qté retrouvée=(Surface-a)/b
 a(1)=-153.4; a(2)=-149.4; a(3)=22.2
 b(1)=213326.752221; b(2)=207057.745188; b(3)=193831.231814

Fidélité: Test d'homogénéité de variances (COCHRAN)
 (linearité)

Grpe j	1	2	3
n _j	5	6	6
S ² _j	1.956403e-09	1.683424e-09	2.222582e-09
m _j	0.005985	0.006092	0.006113
CV _j (%)	0.739	0.67353	0.77122

Somme des variances = 5.862409e-09
 Variance max. = 2.222582e-09
 C.calculé = 0.379124
 C(0.05;3;5) = 0.7071 (NS)
 NS: Valeur Non Significative au risque considéré

Si C calculé n'est pas significatif, les variances des différents groupes peuvent être considérées homogènes au risque considéré.

AVA V 3.1 (WIN) - AVA9510054 27/07/2006 15:19:52 8/9

Utilisateur : admin (Administrator : Manager / NF)
Mode : LIBRE
Technique : LOVASTATINE Produit : LEVURE DE RIZ ROUGE
Nature : linearité
Matrice : SFSTP
Composant : LOVASTATINE Statut : P
Nature : riz rouge
Rubrique : DOSAGE Procédure : HPLC
(Rubrique en cours)

Critère de validation : FIDELITE

Fidélité: Etude statistique
Référence: Droite de régression, riz rouge
(linearité)

Paramètre calculé	Symbole	Formule de calcul	Valeur
Nbre de séries	k		3.000000
Somme des moy.	T1	Somme nj.mj	0.103154
Somme des carrés des moy.	T2	Somme nj.mj ²	0.00626
Nb. tot. de mesures	T3	Somme nj	17.000000
Somme des carrés des effectifs	T4	Somme nj ²	97.000000
Somme des variances	T5	Somme [(nj-1).S ² j]	2.735564e-08
Var. de répétabilité	S ² r	T5/(T3-k)	1.953974e-09
Var. inter-groupes	S ² g	(1)	4.057488e-09
Var. de fidélité intermédiaire	S ² R	S ² r + S ² g	6.011463e-09
Moy. générale	M	T1/T3	0.006068

(1) [(T2.T3)-T1²] / (T3(k-1)) - S²r . [(T3(k-1)) / (T3²-T4)]

Note: Une valeur négative de S²g est remplacée par 0 pour le calcul de S²R

Fidélité: Coefficients de variation
Référence: Droite de régression, riz rouge
(linearité)

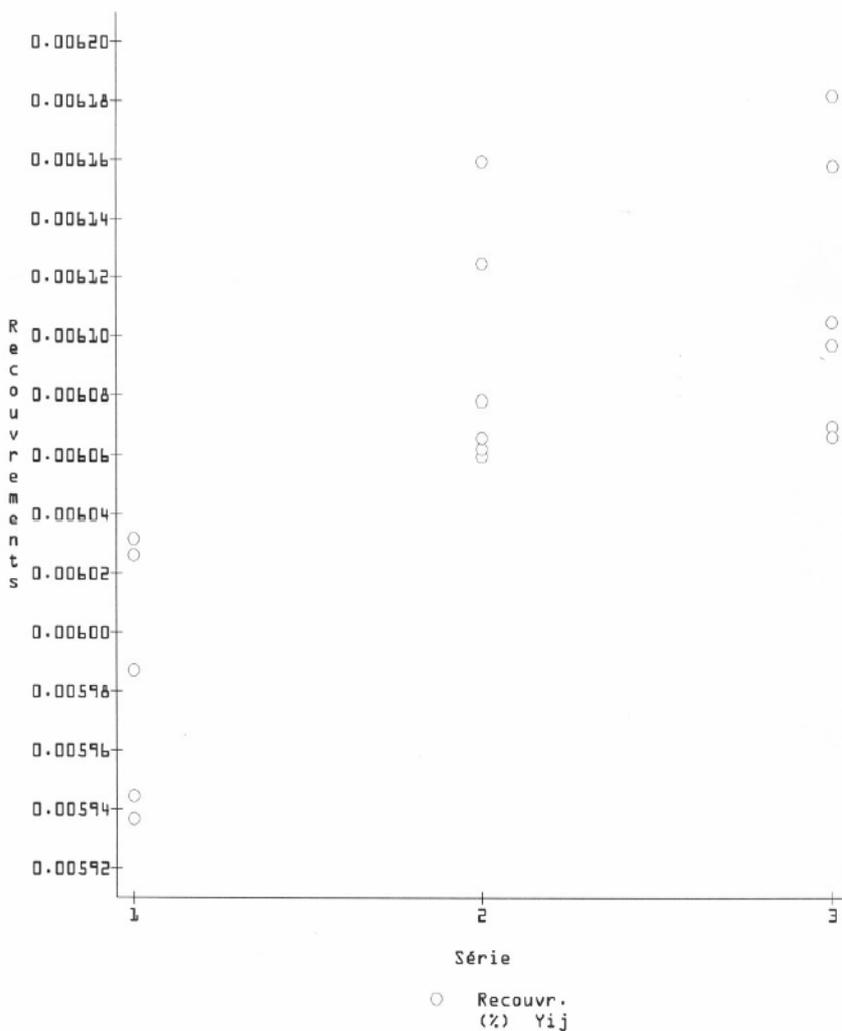
Paramètre calculé	Symbole	Formule de calcul	Valeur (%)
Coef. de variation de répétabilité	CVr	100.Sr/M	0.72848
Coef. de variation de fidélité intermédiaire	CVR	100.SR/M	1.2778

AVA V 3.1 (WIN) - AVA9510054 27/07/2006 15:19:52 9/9

Utilisateur : admin (Administrator : Manager / NF)
 Mode : LIBRE
 Technique : LOVASTATINE Produit : LEVURE DE RIZ ROUGE
 Nature : linearité
 Matrice : SFSTP
 Composant : LOVASTATINE Statut : P
 Nature : riz rouge
 Rubrique : DOSAGE Procédure : HPLC
 (Rubrique en cours)

Critère de validation : FIDELITE

Fidélité: Graphique des recouvrements
 Référence: Droite de régression, riz rouge
 LOVASTATINE - (linearité)



Annexe 6 : Chromatogrammes – Etude de stabilité de la lovastatine

Date File C:\CHEM32\1\DATA\STATINS\30062006000004.D
 Sample Name: Lova 1/100

```

=====
Injection Date : 6/30/2006 6:15:59 PM          Seq. Line : 5
Sample Name   : Lova 1/100                    Location  : Vial 5
Acq. Operator : T/SG                          Inj       : 1
Acq. Instrument : LC 26                       Inj Volume: 20 µl
Acq. Method   : C:\CHEM32\1\METHODS\STATINS\MP29062006.M
Last changed  : 6/29/2006 4:54:19 PM by T/SG
Analysis Method : C:\CHEM32\1\METHODS\STATINS\MP29062006.M
Last changed  : 7/4/2006 10:55:28 AM by T/SG
                (modified after loading)
=====
  
```

```

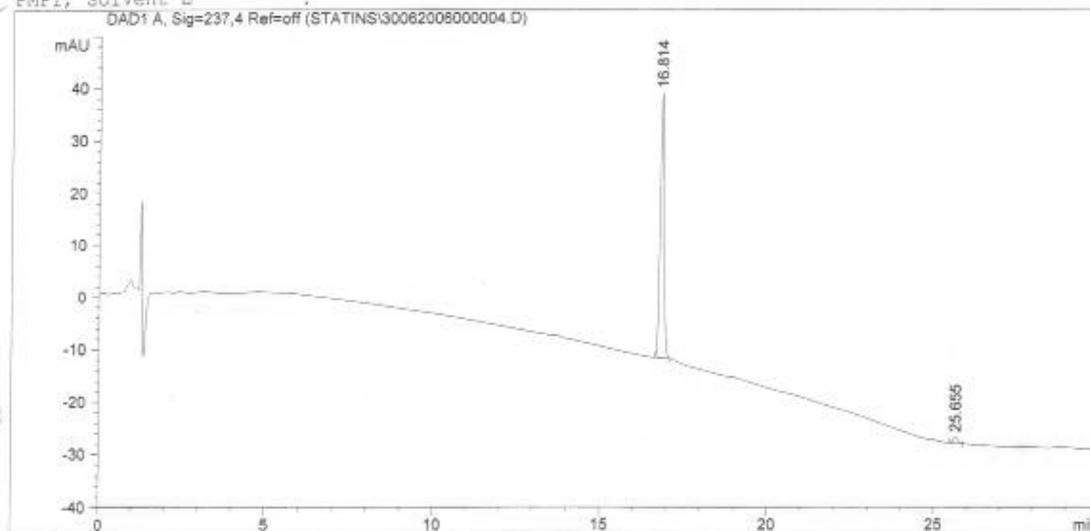
=====
Instrument Conditions : At Start           At Stop
Air Temperature (Tray) : 9.9 °C
Column Temp. (left)   : 30.0             30.0 °C
Column Temp. (right)  : 30.1             30.0 °C
Pressure               : 206.6             200.5 bar
Flow                   : 0.300             0.300 ml/min
=====
  
```

```

Detector Lamp Burn Times: Current On-Time Accumulated On-Time
DAD 1, UV Lamp          : 30.76           2584.3 h
DAD 1, Visible Lamp     : 30.76           5132.4 h
=====
  
```

```

Solvent Description :
PMP1, Solvent A    : H2O
PMP1, Solvent B    : CH3COOH
PMP1, Solvent C    : ACN
PMP1, Solvent D    :
=====
  
```



Area Percent Report

```

=====
Sorted By      : Signal
Multiplier     : 1.0000
Dilution       : 1.0000
Use Multiplier & Dilution Factor with ISTDs
=====
  
```

Signal 1: DAD1 A, Sig=237,4 Ref=off

Peak #	RetTime [min]	Type	Width [min]	Area [mAU*s]	Height [mAU]	Area %
1	16.814	BB	0.1308	418.45776	50.45887	97.4119
2	25.655	BB	0.1522	11.11791	1.13593	2.5881

LC 26 7/4/2006 10:55:44 AM T/SG

Page 1 of 3

Data File C:\CHEM32\1\DATA\STATINS\extraclRR000027.D
 Sample Name: lova 1/100 J5

```

=====
Injection Date   : 7/7/2006 10:27:48 AM           Seq. Line : 28
Sample Name     : lova 1/100 J5                 Location  : Vial 14
Acq. Operator  : T/SG                           Inj       : 1
Acq. Instrument: LC 26                          Inj Volume: 20 µl
Sequence File   : C:\CHEM32\1\SEQUENCE\STATINS\EXTRACTION CHAUD&FROID 06072006.S
Method          : C:\CHEM32\1\METHODS\STATINS\MP29062006 BIS.M
Last changed    : 7/7/2006 10:17:55 AM by T/SG
                  (modified after loading)
=====
  
```

```

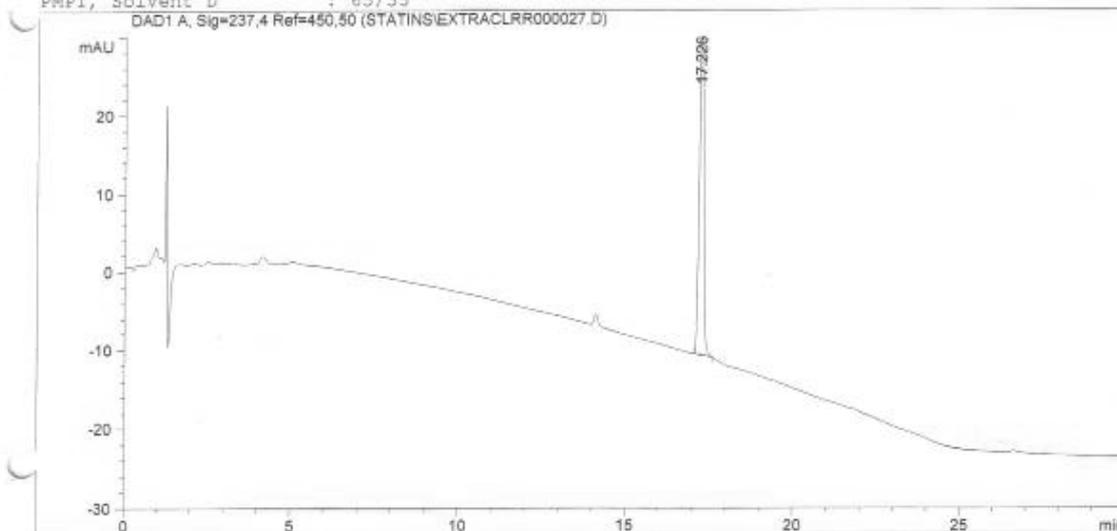
=====
Instrument Conditions : At Start           At Stop
Air Temperature (Tray) : 10.0 °C
Column Temp. (left)   : 30.0           30.1 °C
Column Temp. (right)  : 30.0           30.0 °C
Pressure               : 212.2           208.0 bar
Flow                   : 0.300           0.300 ml/min
=====
  
```

```

Detector Lamp Burn Times: Current On-Time Accumulated On-Time
DAD 1, UV Lamp           : 19.83           2609.4 h
DAD 1, Visible Lamp     : 19.83           5157.5 h
=====
  
```

```

Solvent Description :
PMP1, Solvent A     : H2O
PMP1, Solvent B     : CH3COOH
PMP1, Solvent C     : ACN
PMP1, Solvent D     : 65/35
=====
  
```



Area Percent Report

```

=====
Sorted By       : Signal
Multiplier      : 1.0000
Dilution        : 1.0000
Use Multiplier & Dilution Factor with ISTDs
=====
  
```

Signal 1: DAD1 A, Sig=237,4 Ref=450,50

Peak #	RetTime [min]	Type	Width [min]	Ares [mAU*s]	Height [mAU]	Area %
1	17.226	BB	0.1355	401.83612	47.09661	100.0000

Totals : 401.83612 47.09661

Data File C:\CHEM32\1\DATA\STATINS\SPE+J10000013.D
Sample Name: lova 1/100 J10

```

-----
Injection Date : 7/12/2006 2:12:54 AM          Seq. Line : 14
Sample Name    : lova 1/100 J10                Location  : Vial 14
Acq. Operator  : T/SG                          Inj       : 1
Acq. Instrument: LC 26                          Inj Volume: 20 µl
Acq. Method    : C:\CHEM32\1\METHODS\STATINS\MP29062006.M
Last changed   : 7/11/2006 5:04:03 PM by T/SG
Analysis Method: C:\CHEM32\1\METHODS\STATINS\NUI30062006.M
Last changed   : 7/12/2006 8:51:25 AM by T/SG
                (modified after loading)
-----

```

```

Instrument Conditions :      At Start          At Stop
Air Temperature (Tray) :      10.0 °C
Column Temp. (left)   :      30.0           30.0 °C
Column Temp. (right)  :      30.2           29.9 °C
Pressure              :      213.5          209.6 bar
Flow                  :      0.300          0.300 ml/min

```

```

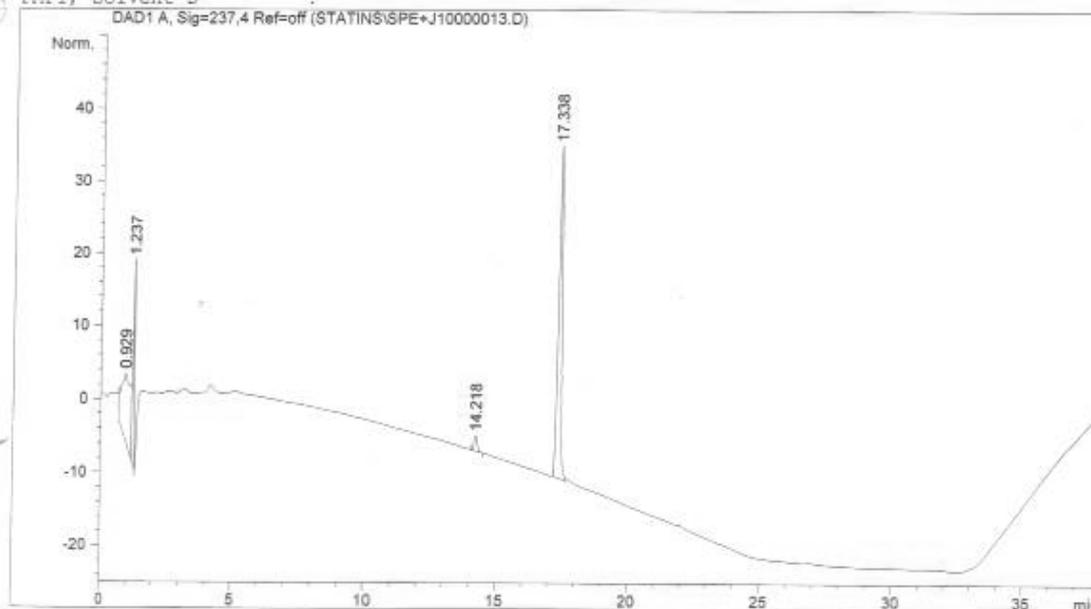
Detector Lamp Burn Times: Current On-Time  Accumulated On-Time
DAD 1, UV Lamp          :      9.10         2619.1 h
DAD 1, Visible Lamp     :      9.10         5167.3 h

```

```

Solvent Description :
PMP1, Solvent A     : H2O
PMP1, Solvent B     : CH3COOH
PMP1, Solvent C     : ACN
PMP1, Solvent D     :

```



Data File C:\CHEM32\1\DATA\STATINS\SPE+J10000013.D
Sample Name: lova 1/100 J10

Signal 1: DAD1 A, Sig=237,4 Ref=off

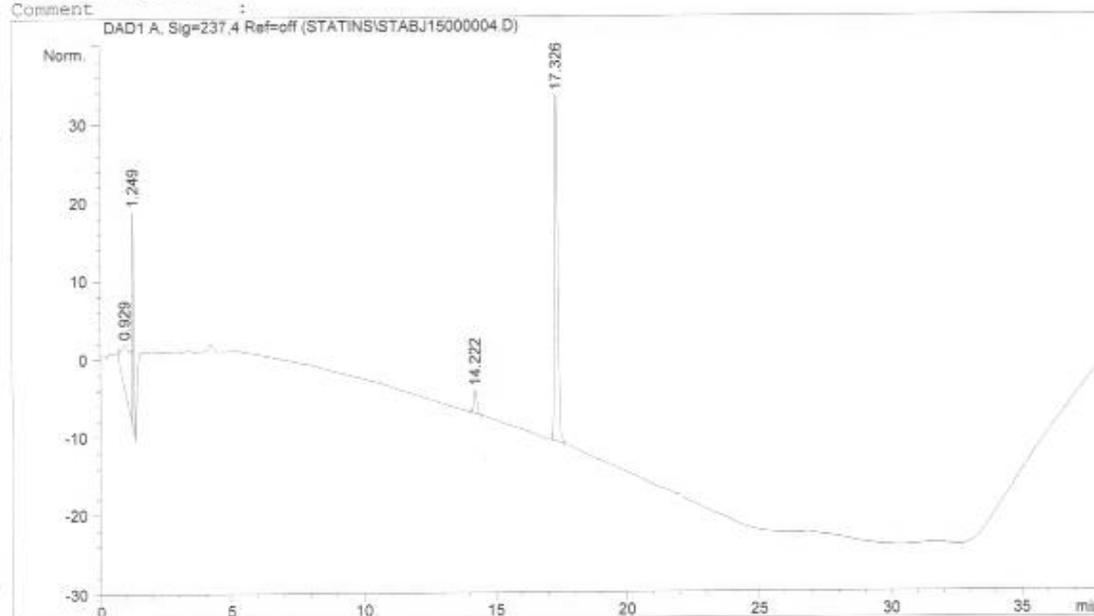
Peak #	RetTime [min]	Type	Width [min]	Area [mAU*s]	Height [mAU]	Area %
1	0.929	BV	0.3060	223.02834	9.09827	29.3029
2	1.237	VV	0.0665	121.35455	28.04915	15.9444
3	14.218	BB	0.1350	18.02808	2.12484	2.3686
4	17.338	BB	0.1381	398.70148	45.56799	52.3840

Totals : 761.11244 84.84026

Data File C:\CHEM32\1\DATA\STATINS\STABJ15000004.D
Sample Name: Iova 1/100 J15

```
=====
Injection Date : 7/17/2006 8:24:46 PM      Seq. Line : 5
Sample Name    : Iova 1/100 J15           Location  : Vial 5
Acq. Operator  : T/SG                     Inj       : 1
Acq. Instrument: LC 26                    Inj Volume: 20 µl
Acq. Method    : C:\CHEM32\1\METHODS\STATINS\MP29062006.M
Last changed   : 7/11/2006 5:04:03 PM by T/SG
Analysis Method: C:\CHEM32\1\METHODS\STATINS\NUIT30062006.M
Last changed   : 7/18/2006 8:37:08 AM by T/SG
                (modified after loading)
=====
```

```
Column Description : X Terra
Product#           : colonne n°522      Batch#: 186000408
Serial#           : 0194351501
Diameter          : 2.1 mm             Length : 150.0 mm
Particle size     : 3.5 µm           Void volume : 0.0 %
Maximum Pressure  : 0 bar              Maximum pH : 0
Maximum Temperature: 30 °C
Comment           :
```



Area Percent Report with Performance

```
Multiplier      : 1.0000
Dilution        : 1.0000
Use Multiplier & Dilution Factor with ISTDs
```

Signal 1: DAD1 A, Sig=237,4 Ref=off

RetTime [min]	k'	Area [mAU*s]	Height [mAU]	Symm.	Width [min]	Plates	Resol	Select
							ution	ivity
0.929	-	159.18758	5.73684	0.44	-	-	-	-
1.249	-	109.37701	27.78204	1.31	0.0628	2194	-	1.34
14.222	-	25.02145	2.93464	0.87	0.1317	64637	78.39	11.38
17.326	-	385.55460	44.27615	0.89	0.1333	93544	13.76	1.22

UNIVERSITE DE NANTES
FACULTE DE PHARMACIE

Année de la soutenance
2007

Nom-Prénoms : Ségolène, Anne, Laure

Titre de la thèse : Identification et dosage des monacolines dans la levure de riz rouge

Résumé de la thèse :

Les monacolines ou statines représentent une classe de molécules très diversifiées de par leurs structures et leurs multiples indications. Ces médicaments possèdent une activité hypocholestérolémiante puissante par inhibition de l'HMG-CoA réductase.

Les compléments alimentaires prennent une place de plus en plus importante sur le marché de la santé. Ainsi, de nos jours, il est possible de trouver des compléments alimentaires qui contiennent des molécules à « action thérapeutique ».

Le contrôle de ce type de produits dans un but de recherche de substances médicamenteuses est une des missions qui incombe à l'Afssaps, Agence Française de Sécurité Sanitaire des Produits de Santé. Le complément alimentaire à base de levure de riz rouge a fait l'objet d'une attention toute particulière car il renferme des monacolines ou statines, molécules actives dont la présence a été largement démontrée. Cette action non déclarée dans les revendications du produit reste à la frontière du médicament. Les monacolines ou statines sont présentes néanmoins à des doses largement plus faibles que celles contenues dans les médicaments à base de statines. Cependant, une consommation excessive de ce complément alimentaire peut être à l'origine des mêmes effets que les statines « médicamenteuses ». La levure de riz rouge, conditionnée en gélules dosées à 500 mg de *Monascus purpureus*, a fait l'objet de contrôles approfondis afin d'identifier et de quantifier ces substances. Il est donc nécessaire pour l'Afssaps de réaliser des analyses afin de déceler les dérives possibles pour ce type de produit.

Une méthode d'analyse par Chromatographie Liquide Haute Performance (CLHP) couplée à un détecteur ultraviolet (UV) a été développée et validée à partir des paramètres tels que la linéarité, la répétabilité de l'injection, la répétabilité de la préparation, la fidélité intermédiaire, la limite de détection et de quantification. Ces analyses ont mis en exergue la présence de 5 monacolines : la monacoline X, monacoline K, la monacoline K acide, la monacoline M et la déhydromonacoline K. Un détecteur massique permettrait une identification plus précise des monacolines présentes dans la levure de riz rouge.

MOTS CLES :

STATINES, MONACOLINES, LEVURE DE RIZ ROUGE, COMPLEMENT ALIMENTAIRE, CLHP, VALIDATION

Adresse de l'auteur :

13 rue nolivier 85330 NOIRMOUTIER EN L'ÎLE

(A laquelle peuvent être adressées les demandes d'exemplaires ou de renseignements).