



Année Universitaire : 2012-2013

**Master Sciences et Techniques : CMBA
Chimie des Molécules Bio Actives**



MEMOIRE DE FIN D'ETUDES
Pour l'Obtention du Diplôme de Master Sciences et Techniques

**Validation de la méthode de dosage d'Amlodipine
Bésylate par la Spectrophotométrie UV-Visible dans une
forme Pharmaceutique**

Présenté par:

ZOUITEN Mouhcine

Encadré par:

- **Mr BOUAYAD ABDELOUAHED**
- **Mr EZZROUTI Mohamed**

Soutenu Le 18 Juin 2013 devant le jury composé de:

- **Mme O. SQALI**
- **Mr. AW. BOUAYAD**
- **Mr. B. IHSSANE**

Stage effectué à : GENPHARMA (Labo-pharmaceutique/El Jadida)



Mémoire de fin d'études pour l'obtention du Diplôme de Master Sciences et Techniques



Nom et prénom: ZOUTEN Mouhcine

Année Universitaire : 2012/2013

Titre: La Validation de la méthode de dosage du principe actif Amlodipine Bésylate par Spectrophotométrie UV-Visible dans une forme pharmaceutique.

Résumé

Dans le domaine pharmaceutique, son exigence est avant tout une pratique réglementaire. En effet, au Maroc, selon le dernier circulaire du ministère de la santé N°49DMP/00 du 16 juillet 2003, toute méthode analytique décrite dans le dossier d'AMM doit être accompagnée d'une validation complète.

Dans ce cadre, le sujet traité concerne la validation de la méthode de dosage du principe actif Amlodipine bésylate par méthode spectrophotométrie UV selon la norme SFSTP (Société Française des Sciences Techniques et Pharmaceutiques) en se basant sur des techniques statistiques permettant de valider les résultats expérimentaux via le calcul de leurs incertitudes.



REMERCIEMENT

Avant tous, je remercie Dieu tout puissant de m'avoir aidé à porter ce travail à son terme.

Mes remerciements sont particulièrement destinés à Mr le Docteur ADIL ZANFARI, qui nous a donné l'occasion de passer ce stage au sein de son entreprise, mes remerciements vont également à mon encadrant, Mr BOUAYAD ABDELOUAHED qui nous a donné main fort pour réaliser ce travail dans de bonnes conditions également pour ses conseils et ses recommandations, n'oublions pas de remercier mon encadrant au laboratoire GENPHARMA, Mr, EZZROUTI Mohamed pour leurs énorme travail et les précieux conseils et la compréhension qu'il m'a montré, ainsi que pour toutes les informations utiles qu'il n'a cessé de m'a fournir pendant toute la période consacrée à la réalisation de ce modeste travail.

Je tiens à faire parvenir nos sincères expressions de gratitude et de reconnaissance à tout le personnel de GENPHARMA,

Je remercie également tous mes amis et plus particulièrement ceux qui ont contribué de près ou de loin à la réalisation de ce travail.



SOMMAIRE

Introduction générale.....	1
1^{ère} Partie : Présentation du Génpharma.....	2
I/ Les départements de Génpharma.....	3
I.1 Département marketing	
I.2 Département commercial	
I.3 Département logistique	
I.4 Magasin.....	4
I.5 Centrale de pesée	
I.6 Unité de production	
I.7 Le laboratoire de contrôle qualité	
I.8 Département d'enregistrement	
II/ Organigramme de Génpharma.....	5
III/ Organigramme du LCQ	
IV/ Rôle essentiel du laboratoire de contrôle de qualité (LCQ).....	6
IV.1 Contrôles physico-chimiques.....	7
IV.1.1 Contrôle des MP	
IV.1.2 Contrôle des PSF ou semi œuvré (PSO)	
IV.1.3 Contrôle des PF	
IV.1.4 Contrôles microbiologiques	
2^{ème} Partie : Généralité.....	10
I/ Validation d'une méthode d'analyse.....	11
I.1 Introduction	
I.2 Définition de la validation.....	12
I.3 Critères de la validation	
I.4 Etapes de la validation.....	13
I.4.1 Définitions.....	14
I.4.2 Les méthodes statistiques.....	16
I.4.3 Méthodologie de la validation analytique.....	18
I.5 La démarche statistique	
II/ Généralité sur les médicaments	20
II.1 Constituants d'un médicament	
II.1.1 Principe actif	
II.1.2 Excipient	
II.2/ Forme pharmaceutique	
II.3.1 Définition.....	21
II.3.2 Types des formes pharmaceutiques	



II.3.3 Principe phases du développement d'un médicament	
II.3.4 Développement galénique à la production industrielle.....	22
II.3.4.1 La reformulation	
II.3.4.2 La formulation.....	23
II.3.4.3 Définition d'un médicament générique.....	23
II.3.4.4 Intérêt du médicament générique	
III/ Spectroscopie d'absorption dans l'UV visible.....	28
III.1 Domaine spectral.....	28
III.2 Principe	
III.3 Loi d'absorption de la lumière - loi de Bér-Lambert.....	30
3^{ème} Partie : Partie expérimentale.....	33
I/ Détermination de la teneur du principe actif (Paracétamol) par méthode spectrophotométrie UV.....	34
I.1 Objet	
I.2 Principe	
I.3 Mode opératoire	
I.4 Expression des résultats.....	35
II/ Détermination de la teneur du principe actif Amlodipine bésylate par méthode spectrophotométrie UV.....	36
II.1 Objet	
II.2 Principe	
II.3 Mode opératoire	
II.4 Expression des résultats	
II.5 Résultats.....	37
A-Fidélité	
Reproductibilité.....	38
B-Linéarité.....	40
C-L'exactitude.....	44
D-Intervalle de mesure.....	45
Conclusion générale.....	49

Abréviation

Référence bibliographique



INTRODUCTION GÉNÉRALE

Le présent travail a été effectué au sein de la société pharmaceutique GENPHARMA pour une durée de 4 mois au laboratoire de contrôle qualité en collaboration avec la Faculté des Sciences et Techniques de FES.

Dans ce cadre, le sujet traité concerne la validation de la méthode de dosage du principe actif Amlodipine bésylate par la méthode spectrophotométrie UV selon la norme SFSTP (Société Française des Sciences Techniques et Pharmaceutiques) en se basant sur des techniques statistiques permettant de valider les résultats expérimentaux via le calcul de leurs incertitudes.

La première partie de ce travail, sera consacrée à la présentation de la société GENPHARMA plus précisément du laboratoire de contrôle qualité, de ses missions et des différents types d'analyses disponibles.

Dans la deuxième partie des notions essentielles sur la méthode de validation seront présentés, ainsi que des généralités sur les médicaments plus précisément sur (Amcard, Nofébril) et la technique de dosage par spectrophotométrie UV.

La troisième partie sera consacrée sur :

➤ Une étude comparative pour déterminer la teneur du principe actif Paracétamol dans :

- ✘ Panadol
- ✘ Doliprane
- ✘ Cétamyl
- ✘ Nofébril

➤ Les résultats de la validation de la méthode de dosage du principe actif Amlodipine bésylate par spectrophotométrie UV.



CHAPITRE I

PRÉSENTATION DU GENPHARMA



PRÉSENTATION DU GENPHARMA :

GENPHARMA est une entreprise pharmaceutique créée en 2001 et pour objectif la fabrication des médicaments génériques.

Ce site de GENPHARMA abrite plusieurs services :

I/ Départements de Génpharma

I.1 Département marketing

Au sein de la division GENPHARMA, le marketing fait une étude du marché qui consiste

- ☛ Au lancement de nouveaux produits.
- ☛ A la promotion des produits au niveau des corps médicale et pharmaceutique.

I.2 Département commercial

Étant en étroite relation avec le service marketing, le commercial se fixe pour objet de réaliser les ventes prévues.

I.3 Département logistique

Accompli comme fonction :

L'approvisionnement en matière première, article de conditionnement et produit fini conformément aux besoins (grâce au service d'achat) à partir d'un programme de fabrication hebdomadaire et mensuel :

- ☛ Gestion administrative des commandes des fournisseurs étrangers et locaux et des différentes composantes des médicaments,
- ☛ Gestion de transports des marchandises,
- ☛ Saisie des réceptions, des retards, des transferts,...
- ☛ Gestion des stocks de sécurité,
- ☛ Gestion de faisabilité des fabrications.

Et pour réussir ceux-ci un planning annuel de la fabrication est établi, c'est pourquoi une communication entre le département de logistique et le département de marketing est indispensable où le service marketing évalue à l'avance le budget annuel de vente à partir duquel et en fonction de la taille du lot, de vente mensuelle, du délai de fabrication, de la



capacité de l'usine et des états de stocks, on procède à la mise en place du planning de fabrication et de fabrication non définitive en raison des variations de ventes et des disponibilités réelles .



I.4 Magasin

Les matières premières (MP) et les articles de conditionnements (AC) provenant de fournisseurs sont réceptionnés au magasin et enregistrés avec l'étiquette "réception" blanche avec un N° d'analyse, N° de lot, date de réception....

I.5 Centrale de pesée

Le local où s'effectue la pesée répond à certaines exigences à fin de protéger le produit d'une éventuelle contamination.

I.6 Unité de production

Se constitue d'une seule unité de production pour les formes sèches (comprimés, et gélules).

I.7 Le laboratoire de contrôle qualité

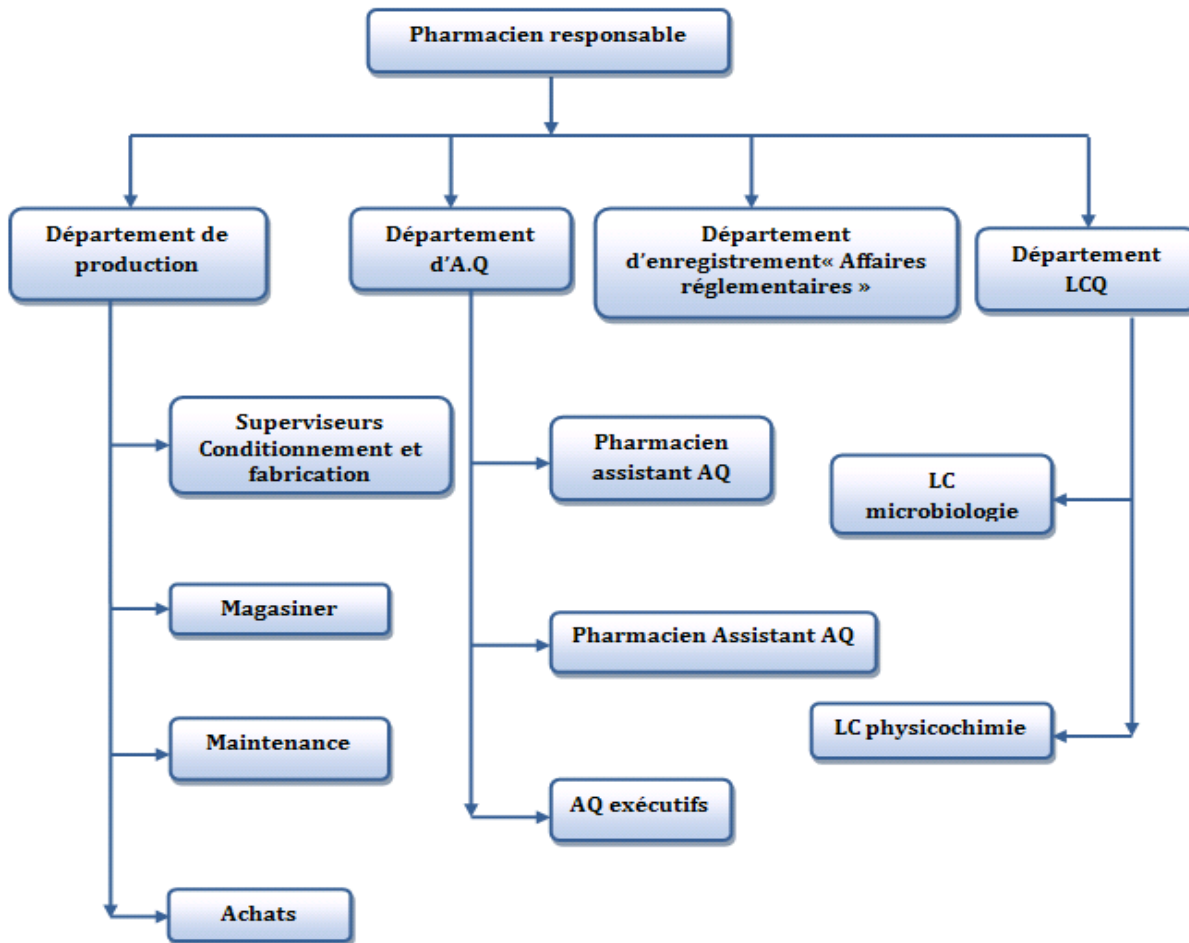
Son rôle de faire tous les contrôles des produits depuis la matière première jusqu'au produit fini, Voir le thème sur le l'organigramme LCQ.

I.8 Département d'enregistrement

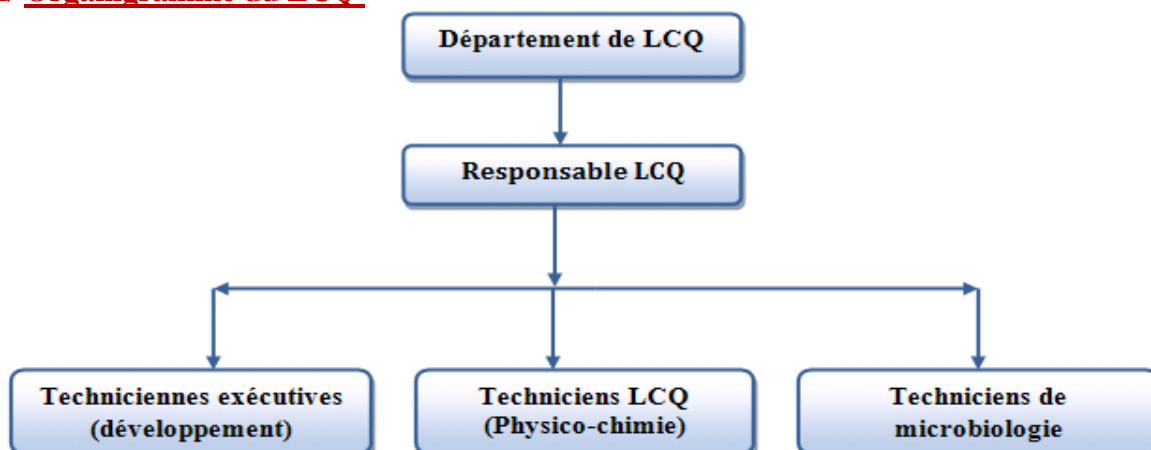
Dite aussi département des affaires réglementaires, son rôle est de faire toutes les enregistrements de toute activité effectués au sein de l'entreprise, ainsi que l'archivage de l'ensemble des documentations de l'entreprise.



II/ Organigramme de Génpharma



III/ Organigramme du LCQ





IV/ Rôle essentiel du laboratoire de contrôle de qualité (LCQ)

Le contrôle de la qualité fait partie des bonnes pratiques de la fabrication. Il concerne l'échantillonnage, les spécifications, le contrôle, ainsi que les procédures d'organisation et de libération qui garantissent que les analyses nécessaires ont été effectuées et que les matières premières (MP), les articles de conditionnement (AC) et les produits ne sont pas libérés pour l'utilisation, la vente ou l'approvisionnement sans que leur qualité n'ait été jugée satisfaisante. Chaque titulaire d'une autorisation de fabrication possède un département de Contrôle de la qualité dirigé par une personne expérimentée et qualifiée.

- ✘ Les fonctions de LCQ
- ✘ Les principales tâches assurées par le LCQ sont :
 - ⇒ Contrôle des MP.
 - ⇒ Contrôle de l'eau.
 - ⇒ Contrôle des AC : (nature chimique, dimension, étanchéité...)
 - ⇒ Contrôle au cours de fabrication (contrôle in process).
 - ⇒ Contrôle des produits semi-finis (PSF) (produit en vrac).
 - ⇒ Contrôle des produits finis (PF).
 - ⇒ Contrôle de la propreté des machines (contrôle microbiologique).
 - ⇒ Contrôle des solutions titrant et suivi de la préparation des réactifs.
 - ⇒ Contrôle de l'environnement : respecter la procédure d'élimination des déchets chimiques issus des analyses par l'ensemble du personnel du LCQ.
- ✘ Réalisation des validations de nettoyage : contrôles réalisés en amont de la production (suivant les prescriptions des BPF).
- ✘ Gestion des substances chimiques de référence.
- ✘ Gestion des réactifs pour la préparation des milieux de culture et les souches microbiennes pures.
- ✘ Réalisation des validations analytiques.



IV.1 Contrôles physico-chimiques

IV.1.1 Contrôle des MP

Caractères organoleptiques : aspect, couleur, solubilité, l'odeur...

Identification : point de fusion, point d'ébullition, méthodes (spectrales : IR, UV, VISIBLE / chromatographiques : HPLC, CCM / réactions colorées).

Essai : (critère de pureté des MP) : CCM /SPECTROPHOTOMETRIE UV perte de masse à la dessiccation / cendre sulfurique / essais limites des métaux lourds / recherche des impuretés particulières.

Dosage : méthodes volumétriques, méthodes physico-chimiques (HPLC, CPG).

IV.1.2 Contrôle des PSF ou semi œuvré (PSO)

On contrôlera l'aspect, l'uniformité de masse pour les solides (l'uniformité de volume pour les liquides), le temps de désagrégation, le pH, la densité

IV.1.3 Contrôle des PF

⇒ Les AC

- ☛ Conformité (n° de lot, date de péremption, PPM,) ceci pour le conditionnement secondaire, pour le primaire on ne vérifie que le n° de lot et date de péremption.
- ☛ Etanchéité des fermetures.
- ☛ Conformité d'étiquetage, couleur.
- ☛ Vérification de notices.

⇒ **Produit médicamenteux**

- ☛ Caractère (aspect).
- ☛ Identification : dosage du PA, et des excipients.
- ☛ Essai de pureté : recherche de substance apparenté, dimension, taux d'humidité...
- ☛ Essais galéniques : dissolution, désagrégation, poids moyen, uniformité de masse...

IV.1.4 Contrôles microbiologiques

Constitue une assurance aux PF d'une qualité, la meilleure, microbiologiquement parlant, conformément aux normes de la pharmacopée.

⇒ **Echantillonnage**



La procédure à suivre pour les prélèvements dépend des analyses à effectuer, l'asepsie doit être respectée d'une façon très stricte afin d'éviter toute contamination du produit prélevé. Les conditionnements recevant les prélèvements doivent être obligatoirement stériles. Le transport de l'échantillon au laboratoire doit s'effectuer dans les plus brefs délais, pour ne pas influencer sa qualité microbiologique.

⇒ **Contrôles effectués normalement**

Dénombrement des germes viables totaux : aérobies et des entérobactéries (Ecoli), dans les produits non obligatoirement stériles (MP et PF).

Dénombrement des germes spécifiques ou pathogènes : (galeries d'identification ou par utilisation de milieu de culture spécifique).

Contrôle de la contamination des locaux de fabrication : (on détermine la charge microbienne).

Analyse microbiologique de l'eau :

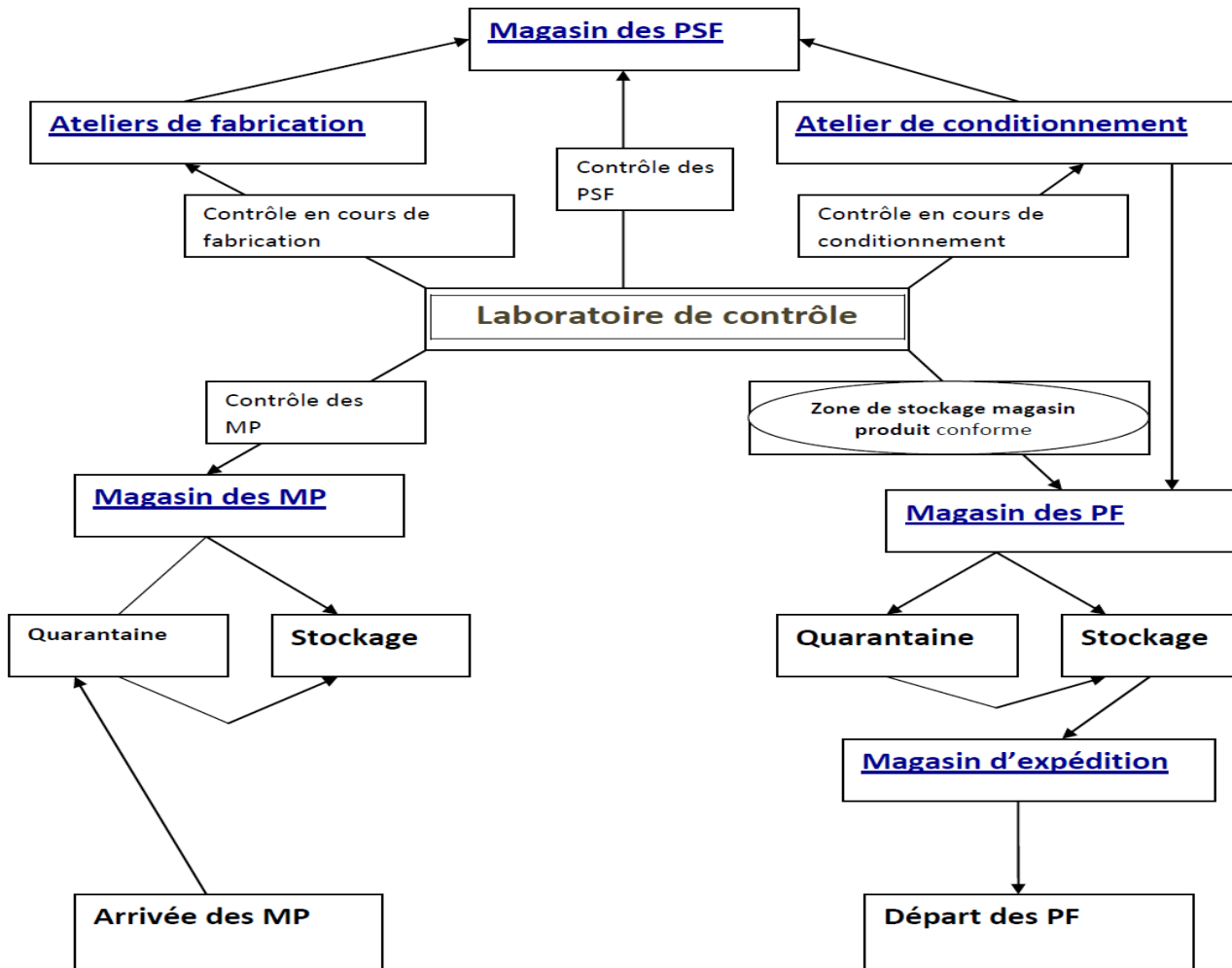
Tous les contrôles en cours de fabrication, y compris ceux qui sont effectués en zone de production par du personnel de production, doivent être réalisés selon des méthodes approuvées par le Contrôle de la Qualité et les résultats vont faire l'objet de comptes rendus. Une attention particulière doit être portée à la qualité des réactifs, de la verrerie graduée, des solutions titrées, des étalons et des milieux de culture.

Leur préparation doit se faire selon des procédures écrites. Les produits ou solutions de réactifs préparés en vue d'un usage prolongé doivent porter la date de leur préparation et la signature de celui qui les prépare. La date de péremption des réactifs instables et des milieux de culture doit être indiquée sur l'étiquette, de même que les conditions particulières de conservation.

De plus, pour les solutions titrées, la dernière date de titrage et le titre en cours doivent être indiqués. Lorsque cela s'avère nécessaire, la date de réception des produits utilisés pour les analyses (par exemple les réactifs et les substances de référence) doit être indiquée sur le récipient. Les instructions pour l'utilisation et la conservation doivent être respectées. Dans certains cas, il peut être nécessaire d'effectuer une identification et/ou d'autres contrôles des réactifs lors de leur réception ou avant leur emploi.



Schéma représentant le rôle central du laboratoire de Contrôle dans l'industrie pharmaceutique





CHAPITRE II

VALIDATION D'UNE MÉTHODE D'ANALYSE



I Validation d'une méthode d'analyse

I.1 Introduction

Le principe de la validation des procédures analytiques quantitatives est, aujourd'hui largement, répandu dans tous les domaines d'activité où des mesures sont réalisées. Le champ d'application de la validation analytique s'étend à toute procédure d'analyse utilisée dans le contrôle de la matière première, le développement galénique, le contrôle en cours de fabrication, le contrôle des produits intermédiaires et finis et les essais de stabilité de tous les produits pharmaceutiques. Dans le domaine pharmaceutique, son exigence est avant tout une pratique réglementaire. En effet, au Maroc, selon la dernière circulaire du ministère de la santé N°49DMP/00 du 16 juillet 2003, toute méthode analytique décrite dans le dossier d'AMM doit être accompagnée par les résultats d'une validation complète.

La validation est fondée sur une analyse statistique basée sur un certain nombre de critères aboutissant à des méthodes analytiques permettant de donner des résultats fiables. Donc, elle a pour but de démontrer qu'elles correspondent à l'utilisation pour laquelle elles sont proposées.

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

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

I.2 Définition de la validation



La norme ISO/CEI 17025 définit la validation comme étant « **la confirmation par examen et fourniture de preuves réelles que les exigences particulières d'un usage projeté donné sont remplies** ».

Une validation n'est pas une opération que l'on effectue une seule fois, plus les conséquences d'un résultat sont importantes, plus la rigueur de la validation doit être poussée.



L'intégration, par un laboratoire d'une méthode validée par un tiers peut, le cas échéant, être réalisée par une validation simplifiée. Cela suppose toutefois que le personnel de laboratoire ait suffisamment d'expérience en la matière.

I.3 Critères de la validation

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

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

⇒ Exactitude

L'exactitude d'une procédure analytique exprime l'étroitesse de l'accord entre la valeur acceptée comme conventionnellement vraie, ou comme valeur de référence, et la valeur trouvée. Elle est parfois appelée justesse.

⇒ Fidélité

La fidélité d'une procédure analytique exprime l'étroitesse de l'accord (mesure de la dispersion) entre une série de mesures obtenues à partir de plusieurs prises d'essais provenant d'un même échantillon homogène, dans les conditions prescrites.

Elle peut être considérée à 3 niveaux :

- ✚ Répétabilité ;
- ✚ Fidélité intermédiaire ;
- ✚ Reproductibilité.



⇒ **Répétabilité**

La répétabilité est la fidélité obtenue dans les conditions opératoires identiques et dans un court intervalle de temps. Elle est également appelée fidélité intra-essai.

⇒ **Fidélité Intermédiaire**

La reproductibilité est l'expression de la variabilité intra-laboratoire (mesures effectuées à des jours différents, par des analystes différents, avec des équipements différents...).

⇒ **Robustesse**

La robustesse d'une procédure analytique est une mesure de sa capacité à ne pas être affectée par des modifications faibles, délibérées, de facteurs associés dans les conditions normales d'application.

⇒ **Linéarité**

La linéarité d'une procédure analytique donnée est sa capacité (à l'intérieur d'un intervalle donné) à fournir des résultats directement proportionnels à la concentration (quantité) de substance présente dans l'échantillon.

⇒ **Intervalle de mesure**

L'intervalle de mesure d'une procédure analytique est l'intervalle (limite inférieure et supérieure comprises) de concentration/quantité de la substance à analyser (dans l'échantillon) sur lequel il a été démontré que la procédure possède une fidélité, une exactitude et une linéarité appropriées

I.4 Étapes de la validation

Une fois la méthode est mise en application, le laboratoire doit employer des moyens de contrôle et de raccordement qui permettent de surveiller la qualité des résultats obtenus. La mise en œuvre de la validation passe par 3 étapes, dans lesquelles figurent des objectifs. Pour remplir ces objectifs, le laboratoire dispose d'outils de validation. Ces outils sont parfois multiples pour un objectif donné, et sont adaptés à différentes situations. Il incombe au laboratoire de faire le choix pertinent des outils, les plus adaptés à la méthode à valider. Le tableau ci-dessous récapitule ces étapes en fonction des objectifs et des outils de validation :

Etapes	Objectifs	Outils de validation
Champs d'application	-Définir les matrices analysables -Définir la gamme analysable	Limite de détection et de quantification
Erreur systématique ou biais	-Réponse linéaire dans l'échelle de valeurs analysables -Spécificité de la méthode -Justesse de la méthode	- Etude de linéarité - Etude de spécificité -Comparaison à une méthode de référence. -Comparaison à des matériaux de référence -Comparaison inter laboratoire
Erreur aléatoire	Fidélité de la méthode	-Etude de répétabilité -Etude de reproductibilité intra laboratoire

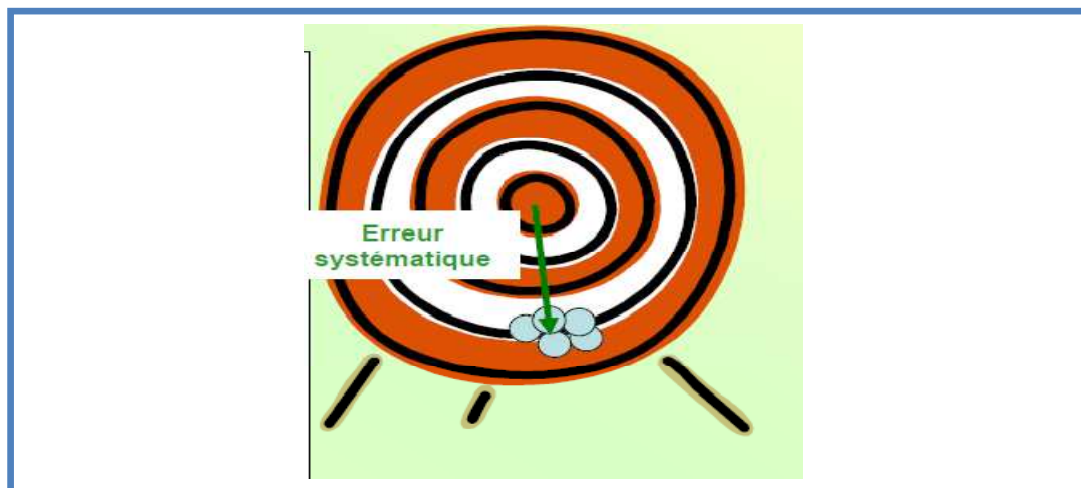
I.4.1/ Définitions

Erreur de mesure: différence entre la valeur mesurée d'une grandeur et une valeur de référence.



Figure 1 : Erreur de mesure

Erreur systématique: composante de l'erreur de mesure qui, dans des mesurages répétés, demeure constante ou varie de façon prévisible



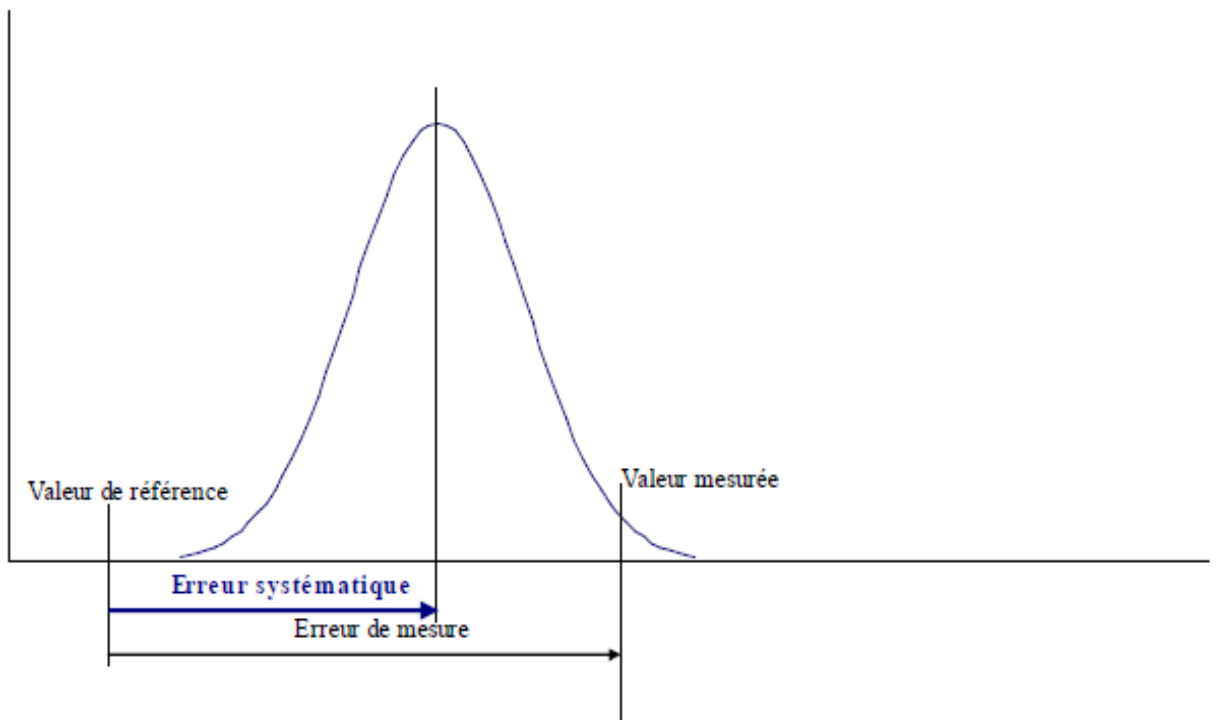
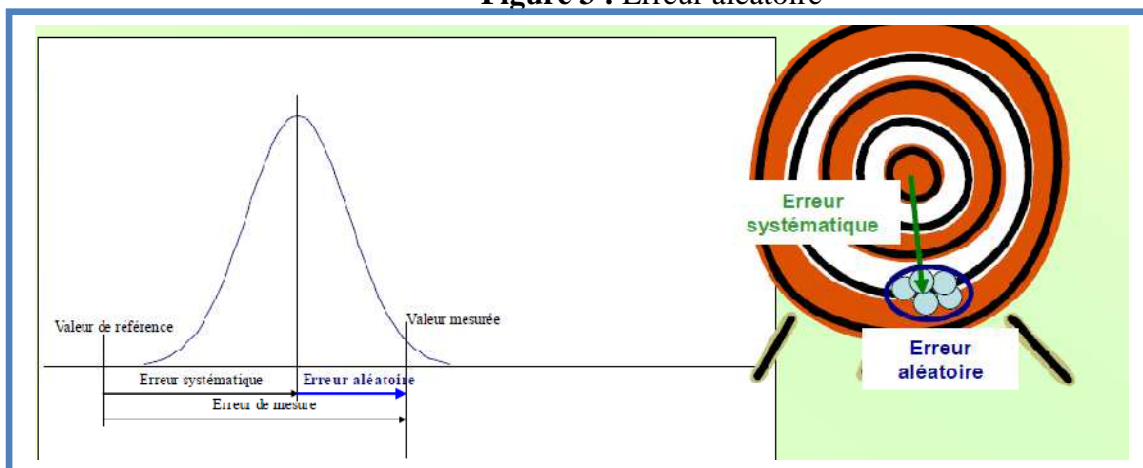


Figure 2 : Erreur systématique

Erreur aléatoire : Composante de l'erreur de mesure qui, dans des mesurages répétés, varie de façon imprévisible.

Figure 3 : Erreur aléatoire



L'objet est de donner un aperçu sur les méthodes statistiques

applicables à l'analyse dans le but d'optimiser soit les erreurs de mesure (aléatoires ou systématiques) pour apprécier au mieux la précision et l'exactitude des résultats trouvés lors d'une analyse, soit pour satisfaire l'étude des critères de validation dans le cas de la mise au point d'une nouvelle méthode d'analyse (quand les normes l'exigent: cas de l'industrie pharmaceutique).



I.4.2 Les méthodes statistiques

Pour estimer les erreurs (systématiques ou aléatoires) affectant des analyses effectuées par des expérimentateurs ou pour définir les critères permettant de valider une méthode d'analyses, il est nécessaire d'effectuer plusieurs analyses afin d'apprécier notamment les effets aléatoires ou imprévisibles.

Chaque effet aléatoire est estimé par un paramètre de dispersion qui est la variance ou son écart-type associé (racine carrée de la variance).

⇒ Variance et écart type

Soit $V(X)$ = variance de la variable aléatoire X

S_X = écart-type estimé de la variable aléatoire X

$$V(x) = S_X^2 = \frac{1}{n-1} \sum_{i=1}^n (X_i - \bar{X})^2 = \frac{1}{n-1} \times \left[\sum_{i=1}^n X_i^2 - \frac{(\sum_{i=1}^n X_i)^2}{n} \right] = \frac{SCE_X}{n-1}$$

Avec \bar{X} : moyenne des X_i soit
$$\bar{X} = \frac{\sum_{i=1}^n X_i}{n}$$

$$CV = 100 \times \frac{S_X}{\bar{X}}$$

n : taille du prélèvement ou nombre de X_i prélevés

SCE_X : Sommes des Carrés des Ecart à la moyenne

CV: Coefficient de variation

⇒ Test de student

La loi de student est notamment utilisée pour: la comparaison d'une variable (ex. moyenne) à une valeur de référence donnée (A) :



$$\frac{|\bar{X} - A|}{S} \leq t_{(p,v)}$$

(Avec $p = 1 - \alpha/2$; avec $\alpha =$ risque de 1^{ère} espèce)

La comparaison de deux variables :

$$\frac{|\bar{X}_1 - \bar{X}_2|}{\sqrt{S_1^2 + S_2^2}} \leq t_{(p,v_1,v_2)}$$

(Avec $p = 1 - \alpha$; avec $\alpha =$ risque de 1^{ère} espèce)

⇒ **Test de Fisher**

En général, la loi de Fisher est utilisée :

- ✗ pour des tests intervenant dans l'analyse de la variance ;
- ✗ pour la détermination de l'intervalle de confiance d'un rapport de deux variances ;
- ✗ pour la comparaison de deux variances à une donnée ...

Dans notre cas, le test de Fisher consiste à valider un résultat statistique à un risque α choisi en comparant deux variances indépendantes S_1^2 et S_2^2

Selon l'inégalité suivante :

$$\frac{S_1^2}{S_2^2} > F_{(\alpha, v_1, v_2)}$$

α : risque de première espèce souvent pris égal à 5%

v_1 : degré de liberté de S_1^2 ; v_2 : degré de liberté de S_2^2

La valeur de $F(\alpha, v_1, v_2)$ est lue sur la table de Fisher Snedecor. Le test de Fisher est significatif lorsque l'inégalité ci-dessus est vérifiée.

⇒ **Test de l'homogénéité des variances**

Le test de Cochran permet de vérifier (à un risque α choisi) l'homogénéité des variances des valeurs individuelles, c'est-à-dire de vérifier que ces variances sont peu différentes entre elles. Le test de Cochran consiste à comparer le critère de Cochran de ces variances avec celui lu sur la table correspondante à un risque α . Soit un ensemble de p variance S_i^2 , toutes calculées à partir du même nombre n de résultats de réplique, le critère de Cochran est :



$$C = \frac{S_{\max}^2}{\sum_{i=1}^p S_i^2}$$

S_i^2 : Variance calculée à partir de n résultats d'un même groupe i

S_{\max}^2 : Variance maximal de l'ensemble des p S_i^2

Le critère de Cochran ne teste que la plus forte valeur d'un ensemble de variances (ou ses écart types associés) et est donc un test unilatéral de valeur aberrante.

Le test de Cochran correspond à vérifier l'inégalité suivante : $C < C(1-\alpha, \kappa, v-1)$ est lu sur la table de Cochran en fonction du risque $\alpha = 5\%$ du nombre de répétitions (n) et du nombre de groupe p.

I.4.3 Méthodologie de la validation analytique

(Appliquée au dosage d'un principe actif dans une spécialité pharmaceutique). Cette méthodologie est basée à la fois sur les critères SFSTP et ICH (Q2B)

- **Protocole SFSTP 92** : Le but du protocole est de minimiser le nombre d'essais pour la validation et maximaliser les chances de succès et diminuer les coûts d'utilisation vérification du non interférence des excipients.
- **En pratique** : Les quantités de substances à tester doivent être pesées individuellement (PA seul) et mélangées à une quantité la plus constante possible du mélange des autres composants (forme pharmaceutique reconstituée) ou produit fini.
- **Spécificité et /ou sélectivité** : Effectuer des essais sur le blanc et montrer qu'ils n'interfèrent pas avec une des solutions standard dans les mêmes conditions expérimentales.
- **Linéarité** : L'intervalle de concentration ($\pm 40\%$ de la concentration cible) à valider est couvert par 5 concentrations minimum; Effectuer au minimum 3 séries indépendantes de ces 5 concentrations (sur le PA seul et la forme pharmaceutique reconstituée) et ce à raison d'une série de chaque jour; Pour les concentrations extrêmes et médianes des pesées supplémentaires sont recommandées.
- **L'exactitude** : de la méthode a été évaluée en utilisant trois niveaux de concentrations Pour chaque concentration trois mesures de la variable dépendante sont effectuées. L'opération est répétée pendant trois jours consécutifs.



- **La fidélité :** (Répétabilité, fidélité intermédiaire) Effectué au minimum 3 séries de 6 pesées de la concentration théorique (100%) sur la forme pharmaceutique reconstituée (ou non) et ce à raison d'un série par jour.

I.5 La démarche statistique

Objet : chiffrer le recouvrement ?

Le recouvrement Ymoy d'une méthode de contrôle n'est pas caractérisée par un chiffre, mais il est encadré par un intervalle de confiance avec des limites (lim: sup et lim: inf) que l'on sait calculer :

$$\text{Recouvrement Y\%} = (\text{Quantité retrouvée} / \text{Quantité introduite}) \times 100$$

La validation d'une méthode de contrôle repose sur ce concept de recouvrement Y % qui est une unité de mesure.

⇒ **Linéarité : K=5 ; n=3**

Avant de commencer l'estimation des critères il faut :

- ☞ S'assurer qu'il n'y a pas un résultat aberrant entre les 5 groupes ; entre les 3 répétitions ;
- ☞ Test de Cochran détecte le double souci ;
- ☞ Test de Dixon précise ;
- ☞ Si contradiction Cochran et Dixon, l'ANOVA (Fisher) pour lever le doute Ensuite;
- ☞ Calcul des coefficients : b ; a ; r avec r : coefficient de corrélation ;
- ☞ Alignement (si nécessaire) des valeurs des Qt introduite → coefficient correcteur → changement de variable ;
- ☞ Cohérence des données alignées → test de Cochran ;
- ☞ Calcul de la variance résiduelle Sr^2 de régression et validité de la pente b → test de Fisher Anova ;
- ☞ Validité de la régression comparaison de la variance d'ajustement $S2L$ et celle expérimentale $S2E$ → test Fisher ;
- ☞ Comparaison du coefficient a avec 0 → t tests t ;

⇒ **Exactitude : K=5 ; n=3**

- ☞ Calcul du recouvrement des 15 résultats ;
- ☞ Homogénéité des 5 variances Test de COCHRON ;
- ☞ Validité des moyennes Test de FISHER ;
- ☞ Comparaison de la variance inter et variance moyenne intra ;



☛ Estimation de recouvrement moyen \bar{Y}_m et de ses limites de confiance au risque de 5%.

⇒ **Répétabilité**

- ☛ Calcul de la variance
- ☛ Calcul du coefficient de variation ($C.Vr\% = (Sr / Y \text{ moy}) \times 100$)

⇒ **Reproductibilité**

- ☛ Calcul de la variance et étude de l'effet du facteur (jour, opérateur ect)
- ☛ Calcul du coefficient de variation : $CVr\% = 100 \times SR / m$



II Généralité sur les médicaments définition

Selon l'Organisation Mondiale de la Santé «OMS», un médicament est toute substance ou mélange de substances fabriqués, ou mise en ventes ou présenté, pouvant être employé dans le diagnostic, le traitement ou la prévention d'une maladie, d'un état physique anormal ou leurs symptômes, chez l'homme ou chez les animaux, en vue de restaurer, corriger ou modifier les fonctions organiques chez l'homme ou chez l'animaux.

Il existe trois types de médicaments :

1. Le médicament spécialisé : préparé à l'avance et conditionné pour la vente en pharmacie. Il est soumis à la procédure d'Autorisation de Mise en Marché
2. Le médicament officinal : désigne certains produits préparé à l'avance mais vendus au détail.
3. Le médicament magistral : préparé extemporanément par le pharmacien selon la formule détaillée par le médecin (essentiellement utilisé en dermatologie).

II.1 Constituants d'un médicament

Un médicament est un ensemble d'éléments actifs et non actifs. Le principe actif ou substance active est le principal constituant. Les différents constituants sont :

II.1.1 Principe actif

C'est tout composant d'un médicament qui est destiné à exercer une action pharmacologique ou un autre effet direct en rapport avec le diagnostic.

Le traitement ou la prévention d'une maladie ou à agir sur la structure ou les fonctions de l'organisme humain ou animal par des moyens pharmacologiques. Un médicament peut contenir plusieurs principes actifs.

II.1.2/ Excipient

Un excipient est un composant non actif d'un médicament, nécessaire à sa mise en forme pharmaceutique. Il constitue souvent la masse du médicament, chaque fois que le principe actif est utilisé de très faibles doses

II.1.3/ Additifs



Substances ajoutée volontairement à un élément ou à un médicament pour en modifier certains propriétés. Exemple : conservateurs, colorants, édulcolorants, éxausteurs et correcteurs de gout.

II.2 Forme pharmaceutique

II.3.1 Définition

On appelle forme pharmaceutique au sens large, toute présentation galénique liquide, solide ou pâteuse nécessaire à l'administration selon une voie définie d'un ou plusieurs principes actifs chez l'homme.

II.3.2 Types des formes pharmaceutiques

Les formes pharmaceutiques sont classées selon la voie d'administration et selon l'aspect physique. A chaque forme physique destinée à une voie donnée, correspondrait une dénomination qui lui serait propre. On distingue :

⇒ **Voie orale** : Ce sont des préparations destinées à être administrée voie orale. Exemple : liquide à usage oral (sirop, potion, suspensions diverse, tisanes...) Comprimées (enrobées ou non enrobées, effervescentes, capsules), poudre Gélules.)

⇒ **Voie parentale** : Ce sont des préparations stériles destinées à être injectées, perfusées ou implantées dans le corps humain ou animal.

⇒ **Voie rectale** : Ce sont des préparations destinées à être administrées par voie rectal en vue d'une action locale ou systémique exemple : suppositoires, capsules.

⇒ **Voie vaginale** : Ce sont des préparations liquides, semi liquides ou solides destinées à être administrées par voie vaginale, généralement en vue d'une action locale.

⇒ **Voie ophtalmique** : Ce sont des préparations liquides, semi liquides ou solides destinées à être appliquées sur le globe oculaire et / ou le conjonctives.

⇒ **Voie aérienne** : Leurs administration se fait par le nez ou par la bouche.

⇒ **Voie percutanée** : Comme sont non l'indique l'administration se fait par la peau, sous forme solides ou semi solide (crème) ou liquides (huiles).

II.3.3 Principe phases du développement d'un médicament

La recherche et le développement sont deux activités clés des entreprises pharmaceutiques. Ces recherches sont généralement couteuses et longues.

Sur 1000 molécules «screnées» en tant que nouveaux médicaments potentiels, seul une quinzaine seront retenues pour les études ultérieurs de préclinique. Après l'évaluation de ces



molécules chez l'animal, quelques unes d'entre-elles seront étudiées en clinique chez l'homme, et seule une ou deux arriverons à l'étape ultime d'Autorisation de Mise en Marché. «AMM».



De ce faite, chronologiquement, le développement d'un médicament peut être divisé en deux étapes :

- Le développement préclinique (3 à 4 ans)
- Le développement clinique (5 à 7 ans)

⇒ Le développement préclinique

A ce stade, les molécules qui ont passé avec succès les étapes de «**screening**» ou sélection subissent des tests pharmacologiques visant à explorer l'efficacité du médicament sur l'animal, et des tests toxicologiques pour apprécier la sécurité du produit.

⇒ Le développement clinique

Ces études cliniques menées sur l'homme comprennent 4 phases :

- Phase1, dont l'objectif est d'évaluer la tolérance à des doses progressives administrées à un groupe de volontaires sains et de déterminer les paramètres pharmacocinétiques chez l'homme.
- Phase2, l'évaluation de l'efficacité thérapeutique du produit par l'étude de la relation dose-effet du produit en administrant à un petit nombre de malades.
- Phase3, réalisée sur un groupe étendu de malades afin de confirmer le rapport efficacité/tolérance du produit et la reproductibilité de l'effet.
- Phase4, débute avec la commercialisation et se poursuit tout au long de la vie du produit.

Ces essais apportent des informations supplémentaires sur son efficacité.

II.3.4 Développement galénique à la production industrielle

Le développement pharmaceutique a pour mission de réaliser une forme pharmaceutique «**administrable**» à l'homme à partir d'une substance pharmacologiquement active. Pour y parvenir plusieurs étapes sont nécessaires :

II.3.4.1 La reformulation

Elle correspond à l'ensemble des études nécessaires pour valider la qualité du ou des principes actifs et le choix des excipients.

Durant cette étape on déterminera les propriétés des principes actifs susceptibles d'affecter la conception et la production du futur produit fini. Il s'agit donc de :

- Définir les caractéristiques physico-chimiques du principe actif.
- Déterminer les excipients compatibles avec la stabilité et/ ou l'amélioration des propriétés du principe actif.



II.3.4.2/ La formulation

C'est l'art de sélectionner qualitativement et quantitativement les principes actifs et les excipients (nature, état physique, caractères organoleptiques....) en fonction de la forme galénique. Elle consiste donc en des choix successifs concernant :

- ∞ Le principe actif.
- ∞ La voie d'administration.
- ∞ La forme galénique.
- ∞ Les substances auxiliaires ou excipient.
- ∞ Les articles de conditionnements.
- ∞ Les procédés de fabrication et de contrôle.

Dans notre rapport on va parler du procédé de fabrication des médicaments génériques

II.3.4.3/ Définition d'un médicament générique

Par spécialité générique d'une autre spécialité, une spécialité qui a la même composition qualitative et quantitative en principes actifs, la même forme pharmaceutique, et dont la bioéquivalence avec la spécialité de référence a été démontrée par des études appropriées de biodisponibilité ».

II.3.4.4/ Intérêt du médicament générique

Les raisons d'exister du médicament générique sont principalement de trois ordres :

- ✘ Le prix de vente est inférieur à celui du princeps ;
- ✘ Les situations de monopoles sont évitées ; cela permet l'autonomie du marché du médicament ;
- ✘ Les ruptures de stocks sont également évitées (substitution d'un produit par un autre).

La place occupée sur le marché par les médicaments génériques est de plus en plus importante, car ils sont aujourd'hui favorisés par les politiques de réduction des coûts de santé, réalisées dans les différents pays développés. Les médicaments génériques coûtent en effet en moyenne de 20 à 30% moins cher que les spécialités de marque.

Malheureusement, cet avantage de prix a des conséquences néfastes. Le générique est très souvent victime de préjugés de type « effet discount » : « Si c'est moins cher c'est que c'est moins bien ». Or la qualité ne peut être jugée uniquement par le seul niveau de son prix. Nous on va s'intéresser de la forme sèche spécialement les comprimés.



Les médicaments fabriqués par le laboratoire Génpharma

Médicament	Principe Actif	Classe thérapeutique
Acepril	Perindopril	Inhibiteur de l'enzyme de conversion
Acidac	Ranitidine	Antihistaminique H1
Adizem	Diltiazem	Inhibiteur calcique
Amcard	Amlodipine	Inhibiteur calcique
Capen	Captopril	Inhibiteur de l'enzyme de conversion
Cinabac	Ciprofloxacine	Antibiotique fluoroquinolone
Devalax	Natéglinide	Antidiabétique oral (glinide)
Diclomax	Diclofénac	Anti-inflammatoire non stéroïdien
Erector	Sildenafil	Médicament d'impuissance
Flucazol	Fluconazol	Antifongique
Fluctine	Fluoxétine	Antidépresseur
Genflu	Oseltamivir	Antiviral
Genpress	Ramipril	Inhibiteur de l'enzyme de conversion
Glitex	Pioglitazone	Antidiabétique oral
Glyset	Glimépiride	Antidiabétique oral sulfamide hypoglycémiant
Levaquin	Levofloxacine	Antibiotique fluoroquinolone
Lofat	Fénofibrate	Hypolipémiant
Lomet	Lanzoprazole	Inhibiteur de pompe à proton
Losacar	Losartan + Hydrchlorothiazide	Inhibiteur de l'angiotensine II + diurétique
Matrix	Ribavirine	Antiviral
Marvil	Olanzapine	Schizophrénie
Nekar	Kétotifène	Antihistaminique H1
Nifegen	Nifédipine	Inhibiteur calcique
Nofebril	Paracétamol	Analgésique, antipyrétique
Normet	Aténolol	Bêtabloquant
Omegen	Oméprazole	Inhibiteur de pompe à proton
Oruvil	Kétoprofène	Anti-inflammatoire non stéroïdien
Rubix	Fluconazole	Antifongique
Sulrid	Sulpiride	Neuroleptique
Supraler	Lévocétirizine	Antihistaminique H1
Talafix	Mésalazine	Médicament de Rectocolite hémorragique
Zifar	Loratadine	Antihistaminique H1

⇒ Amcard (amlodipine bésylate)

∞ Mode d'action et pharmacologie clinique

AMLODIPINE (bésylate d'amlodipine) est un inhibiteur de l'entrée des ions calcium dans la cellule (antagoniste du calcium ou inhibiteur calcique). L'amlodipine est un antagoniste du calcium de la classe des dihydropyridines.

∞ Mode d'action

On croit que l'effet thérapeutique de ce groupe de médicaments est relié à leur action spécifique sur la cellule qui consiste à inhiber de façon sélective le passage transmembranaire des ions



calcium dans le muscle lisse vasculaire et dans le muscle cardiaque. Or, la contractilité de ces tissus dépend de l'entrée des ions calcium extracellulaires dans ces cellules musculaires, par la voie de canaux ioniques spécifiques. L'amlodipine inhibe de façon sélective le passage des ions calcium à travers la membrane cellulaire, plus particulièrement celle du muscle lisse vasculaire plutôt que celle du muscle cardiaque. L'amlodipine n'altère pas la concentration plasmatique du calcium. À pH physiologique, l'amlodipine est un composé ionisé; son interaction cinétique avec les récepteurs des canaux calciques se caractérise par sa fixation graduelle aux récepteurs suivie de sa dissociation de ces derniers. Les données expérimentales nous permettent de croire que l'amlodipine se fixe à la fois aux récepteurs spécifiques des dihydropyridines et aux autres récepteurs.

∞ Hypertension

L'amlodipine abaisse la tension artérielle en entraînant une vasodilatation artérielle périphérique et en réduisant la résistance vasculaire.



∞ Angine de poitrine

On n'a pas entièrement élucidé le mode d'action de l'amlodipine pour soulager l'angine de poitrine. L'amlodipine est un vasodilatateur des artères et des artérioles périphériques. Elle abaisse donc la résistance vasculaire totale, réduisant ainsi le travail du cœur (postcharge). On croit que cette réduction de la postcharge atténue l'ischémie et soulage l'angine d'effort en diminuant les besoins en oxygène du myocarde ainsi que sa consommation d'oxygène.

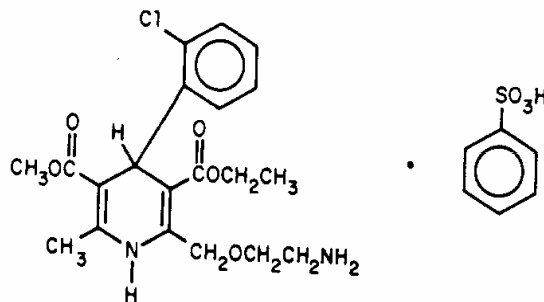
∞ Renseignements pharmaceutiques chimie

Marque déposée : GD-AMLODIPINE

Dénomination commune : bésylate d'amlodipine

Dénomination chimique : benzosulfonate de 3-éthyl-5-méthyl-2-(2-aminoéthoxyméthyl)-4-(2-chlorophényl)-1,4-dihydro-6-méthyl-3,5-pyridinedicarboxylate

Formule développée :



Formule moléculaire : (C₂₀H₂₅ClN₂O₅) ; (C₆H₆O₃S)

Poids moléculaire : 567,1

Description : Le bésylate d'amlodipine est une poudre cristalline blanche, légèrement soluble dans l'eau et peu soluble dans l'éthanol.

Point de fusion (et de décomposition) : 203 °C pKa = 9,02 à 23,5 °C.

Composition: Un comprimé GD-AMLODIPINE renferme une quantité de bésylate d'amlodipine équivalant à 2,5, à 5 ou à 10 mg d'amlodipine.

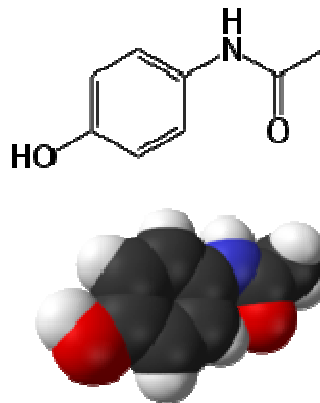
Il renferme également les excipients suivants : cellulose microcristalline, phosphate dicalcique anhydre, glycolate sodique d'amidon et stéarate de magnésium.

⇒ **Nofébril (Paracétamol)**



Le paracétamol, aussi appelé acétaminophène, est la substance active de nombreuses spécialités médicamenteuses de la classe des antalgiques antipyrétiques non salicylés. Il est indiqué dans le traitement symptomatique de la fièvre et des douleurs d'intensité faible à modérée, seul ou en association à d'autres analgésiques. Contrairement aux anti-inflammatoires non stéroïdiens et notamment à l'aspirine, il est dépourvu de propriétés anti-inflammatoires et n'agit pas sur l'agrégation plaquettaire.

Le nom paracétamol vient de la contraction de para-acétyl-amino-phénol. Acétaminophène quant à lui provient de N-acétyl-para-aminophénol.



Représentations plane et 3D du paracétamol

∞ Propriétés chimiques

Formule brute : $C_8H_9NO_2$ [Isomères]

Masse molaire : $151,1626 \pm 0,0078 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$ C 63,56 %, H 6 %, N 9,27 %, O 21,17 %, [pKa](#) 9,5 .

∞ Propriétés physiques

T° fusion : 169 à 170 °C

T° ébullition décomposition : > 500 °C

∞ Indications, posologie et informations pratiques



🦁 Indications





Le paracétamol est utilisé pour: Le traitement symptomatique des douleurs aiguës ou chroniques, d'intensité légère à modérée. Il s'agit d'un antalgique de palier 1 selon la classification de l'OMS. Il peut être utilisé seul ou en association avec d'autres antalgiques (codéine, dextropropoxyphène, tramadol), il rentre alors dans la classification des antalgiques de palier 2 indiqués dans les douleurs d'intensité modérée à intense ou ne répondant pas à l'utilisation d'antalgiques périphériques seuls.

Le traitement symptomatique de la fièvre, en particulier chez l'enfant chez qui il constitue l'antipyrétique de première intention.

Posologie

La dose ou posologie maximale peut varier d'un pays à l'autre selon la recommandation des produits de santé. En France, la recommandation est de:

-  **Adultes :** 500 à 1 000 mg par prise, en espaçant les prises de 4 heures minimum. Il n'est généralement pas nécessaire de dépasser la dose de 3 g par jour mais exceptionnellement (en cas de douleurs intenses non complètement contrôlées par 3 g par jour, et sur avis médical), on peut atteindre un maximum de 4 g par jour (soit $4 \times 1\ 000$ mg ou 8×500 mg).
-  **Enfants :** La dose quotidienne recommandée est de 60 mg/kg/jour, à répartir en 4 ou 6 prises, soit environ 15 mg/kg toutes les 6 heures ou 10 mg/kg toutes les 4 heures. La dose maximale est de 80 mg/kg/jour chez l'enfant de moins de 38 kg selon les recommandations officielles en France.



III/ Spectroscopie d'absorption dans l'UV visible



La

spectroscopie d'absorption dans l'UV et le visible est une méthode très commune dans les laboratoires. Elle est basée sur la propriété des molécules d'absorber des radiations lumineuses de longueur d'onde déterminée.

III.1/ Domaine spectral

Le domaine UV-visible s'étend environ de 800 à 10 nm.

- ✘ Visible: 800 nm (rouge) - 400 nm (indigo)
- ✘ Proche-UV: 400 nm - 200 nm
- ✘ UV-lointain : 200 nm - 10 nm.

III.2/ Principe

Dans une molécule, les transitions électroniques UV-visibles mettent en jeu les énergies les plus importantes de la chimie (environ de 13000 à 50000 cm^{-1} soit 160 à 665 $\text{kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$). L'ordre de grandeur des énergies mises en jeu est celui des énergies de liaison des molécules et ces rayonnements peuvent parfois provoquer des ruptures de liaisons. Plus généralement, ils provoquent des **transitions électroniques** entre les différents niveaux d'énergie des molécules.



Moléculaires engagées dans le processus d'émission. Les principales transitions électroniques sont les suivantes :

- ✘ Transition $\sigma \rightarrow \sigma^*$ (UV lointain)
- ✘ Transition $n \rightarrow \sigma^*$ (UV)
- ✘ Transition $n \rightarrow \pi^*$ (UV)
- ✘ Transition $\pi \rightarrow \pi^*$ (UV proche)
- ✘ Transition $d \rightarrow d$. (Visible)

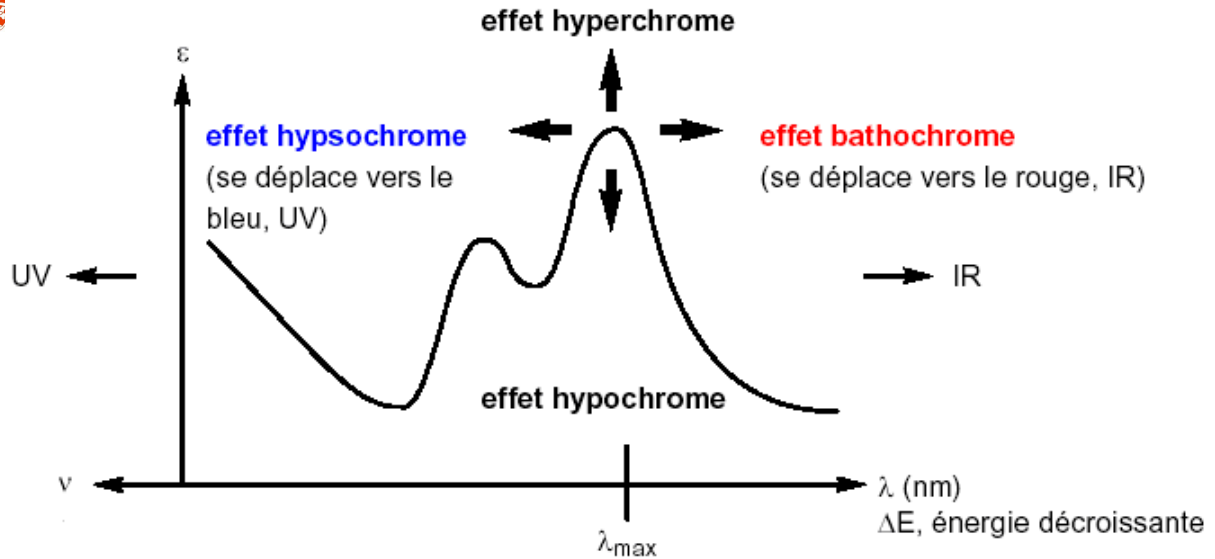
Les transitions d-d sont responsables de la coloration de nombreux complexes. Après l'étape d'absorption, l'énergie captée peut être restituée soit par un processus non radiatif (chaleur), soit par une émission de photons (fluorescence et phosphorescence).

⇒ Définitions

On définit comme groupement chromophore, la fonction chimique ou la partie de la molécule qui est responsable d'une absorption caractéristique. Pour une série de composés possédant le même chromophore, la position et l'intensité des bandes d'absorption restent sensiblement constantes, sauf s'il y a accumulation de plusieurs chromophores à proximité les uns des autres. Lorsque les chromophores sont isolés, c'est-à-dire séparés par au moins deux liaisons simples, on observe uniquement la superposition des effets individuels. La polarité du solvant peut modifier la position, l'intensité et la forme des bandes d'absorption des composés en solution. Ces effets sont définis comme suit :

- ↗ Effet **hypsochrome** : Diminution de la longueur d'onde.
- ↘ Effet **bathochrome** : Augmentation de la longueur d'onde.
- ↗ Effet **hyperchrome** : Augmentation du coefficient d'absorption molaire.

Effet **hypochrome** : Diminution du coefficient d'absorption molaire.

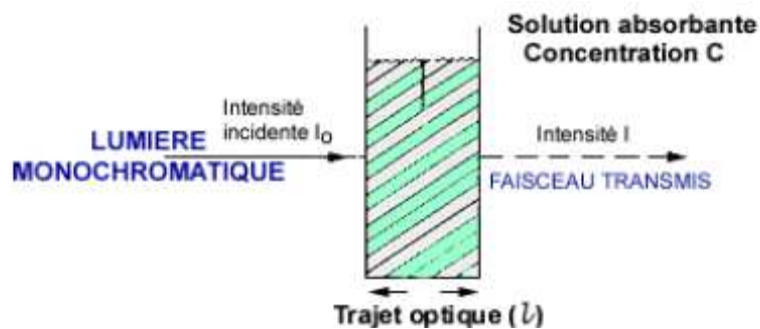


Quelques exemples de bandes d'absorption dans l'UV caractéristiques de chromophores:

Chromophore	λ_{max} (nm)	ϵ_{max}
NH ₂ (amine)	195	3000
NO ₂ (nitro)	210	3000
N=O (nitroso)	300	100
C=O (carbonyle)	275	20

III.3/ Loi d'absorption de la lumière - loi de B er-Lambert

Soit une lumière monochromatique traversant une solution absorbante de concentration contenue dans une cuve d'épaisseur l .



Une partie de ce rayonnement sera absorbée par l'échantillon et une partie sera transmise. Bouguer, Lambert et Beer ont étudié les relations qui existent entre I_0 et I : l'intensité d'une lumière monochromatique traversant un milieu où elle est absorbée décroît de façon exponentielle : $I = I_0 e^{-kCl}$



- ✘ I_0 est l'intensité de la lumière incidente
- ✘ I est l'intensité après passage à travers la cuve contenant la solution (intensité transmise)
- ✘ l est la distance traversée par la lumière (épaisseur de la cuve) (en cm)
- ✘ C est la concentration des espèces absorbantes
- ✘ k est une constante caractéristique de l'échantillon.

Cette équation peut se réécrire $\log(I_0/I) = k l C / 2.3 = \epsilon l C$.

- ✘ $\log(I_0/I)$ est appelé absorbance (A)
- ✘ $I/I_0 = T$ est la transmission
- ✘ % T est la transmittance
- ✘ ϵ est le coefficient d'extinction molaire ; c est une caractéristique de la substance étudiée à une longueur d'onde donnée. Si C est la molarité, ϵ est en $L \cdot mol^{-1} \cdot cm^{-1}$.

On obtient alors la relation connue sous le nom de loi de B er-Lambert :

$$A = - \log T = \epsilon l C$$

Méthode de l'étalon externe : On compare la densité optique (D) d'une solution de concentration connue (c)   la densité optique (D_x) de concentration inconnue (c_x). La loi de Beer-Lambert nous indique que :

$$D = \epsilon c l \text{ et } D_x = \epsilon c_x l$$

$$\text{d'où } \frac{D_x}{D} = \frac{\epsilon c_x l}{\epsilon c l}, \text{ ce qui conduit à } C_x = \frac{D_x c}{D}$$

On pourrait simplement déterminer la concentration par mesure de la densité optique car ;

$$c = \frac{D}{\epsilon l}$$

Mais ceci suppose que la somme est préalablement connu avec précision.

Méthode de l'étalon interne : Le principe consiste à mesurer la densité optique D_x de la solution de concentration c_x inconnue et de volume V_x . Dans un second temps, on ajoute un volume (qui doit être faible par rapport à V_x) d'une solution standard de concentration c_s . La densité optique D_{xs} est alors mesurée.

$$D_x = \epsilon c_x l \text{ (1) et } D_{xs} = \epsilon c_{xs} l \text{ (2)}$$



Le volume résultant ($V_x + \Delta v$), contient les moles de la solution inconnue et celles contenues dans le volume ajouté de la solution standard, soit $V_x \cdot c_x + \Delta v \cdot c_s$.

La concentration c_{xs} vaut donc :

$$C_{xs} = \frac{V_x c_x + \Delta v c_s}{V_x + \Delta v}$$

En reportant cette expression de c_{xs} dans l'équation (2), on obtient :

$$D_{xs} = \epsilon l \frac{V_x c_x + \Delta v c_s}{V_x + \Delta v} \quad (3)$$

Des équations (1) et (3), on tire l'expression de la concentration inconnue c_x :

$$c_x = c_s \frac{\Delta v D_x}{D_{xs} - V_x (D_x - D_{xs})}$$

Les deux méthodes décrites ci-dessus supposent que la loi de Béer-Lambert est rigoureusement respectée, ce qui n'est pas le cas pour de très fortes concentrations.

Méthode de la droite d'étalonnage : Cette méthode consiste à mesurer la densité optique des solutions contenant des quantités connues et croissantes de l'élément à doser M. On trace la droite d'étalonnage $D = f(\text{concentration de } M)$. On détermine ensuite la densité optique de la solution de concentration inconnue. Cette valeur, portée sur le graphique, permet de déterminer la concentration de la substance inconnue.



CHAPITRE III

ETUDE COMPARATIVE ET RÉSULTAT DE LA VALIDATION



I/ Détermination de la teneur du principe actif (Paracétamol) par méthode spectrophotométrie UV

I.1/Objet

La présente méthode a pour objet de faire une étude comparative pour déterminer le pourcentage du principe actif (paracétamol) dans :

- ⊗ Panadol, Doliprane, Cétamyl, Nofébril.

I.2/ Principe

Mesure dans la solution à analyser, l'absorption du principe actif (Paracétamol) par méthode spectrophotométrie UV

■ Appareillage

- ⊗ Matériel courant de laboratoire ;
- ⊗ Spectrophotomètre UV ;
- ⊗ Balance de précision ;
- ⊗ Matériel usuel de laboratoire.

■ Réactifs

- ⊗ L'eau distillée
- ⊗ NaOH (0,1M)

I.3/ Mode opératoire

■ Préparation de l'échantillon :

- ⊗ Mettre 168 mg du paracétamol, 50 ml d'hydroxyde de sodium (0,1M) dans une fiole de 200 ml et compléter avec de l'eau distillée.
- ⊗ Après agitation pendant 15 min, prélever 10 ml dans une fiole de 100 ml et rajouter 10 ml de NaOH (0,1M), compléter avec de l'eau distillée.

■ Préparation du blanc :

Pipeter 10ml d'hydroxyde de sodium (NaOH) dans une fiole de 100ml et compléter avec l'eau distillée.



I.4 formules appliqués d'après (British Pharmacopeia)

$$\text{Soit : \% teneur du PA} = \frac{\text{Abs Ech} \times 1000 \times 200 \times 100 \times 100 \times \text{Masse Moy}}{715 \times 100 \times \text{Masse Ech} \times 10 \times 10 \times \text{LC}} \times 100$$

Avec LC= 500mg

La valeur limite du % (Principe actif) doit appartenir à l'intervalle :

$$95\% < \% \text{ du Principe actif} < 105\%$$

■ Les résultats :

Abs Ech	Masse Ech (mg)	Masse Moy (mg)	% Teneur du Paracétamol (Nofébril)
0,5193	168,1	556	96,09

Abs Ech	Masse Ech (mg)	Masse Moy (mg)	% Teneur du Paracétamol (Doliprane)
0,5172	168,15	613,56	105,57

Abs Ech	Masse Ech (mg)	Masse Moy (mg)	% Teneur du Paracétamol (Cétamyl)
0,5134	168,03	580,8	99,27

Abs Ech	Masse Ech (mg)	Masse Moy (mg)	% Teneur du Paracétamol (Panadol)
0,5189	168,23	596,94	103

Tableau 1 : % Teneur du Paracétamol

■ Conclusion :

D'après ces résultats on constate que les pourcentages du Paracétamol pour les quatre médicaments Nofébril, Doliprane, Cétamyl et Panadol appartient à l'intervalle [95%-105%]

Donc on peut conclure qu'il n'y a pas une grande différence entre les quatre médicaments, c'est-à-dire qu'ils ont le même principe actif paracétamol



II/ validation de méthode de dosage du principe actif Amlodipine bésylate par méthode spectrophotométrie UV

II.1 Objet

La présente méthode a pour objet de faire la validation de méthode d'analyse de dosage le principe actif Amlodipine par méthode spectrophotométrie UV

II.2 Principe

Mesure de la solution à analyser, l'absorption du principe actif (Amlodipine bésylate) par méthode spectrophotométrie UV

■ Appareillage

- ∞ Matériel courant de laboratoire
- ∞ Spectrophotomètre UV
- ∞ Balance de précision

■ Réactifs

- ∞ L'eau purifiée
- ∞ Ethanol

II.3 Mode opératoire

■ Préparation du standard

- ∞ On fait dissoudre 56mg d'Amlodipine bésylate standard dans une fiole de 100ml et compléter au trait jaugée avec de l'éthanol.
- ∞ À partir de cette solution pipetée 2 ml dans une fiole de 100ml et Compléter avec l'éthanol.

■ Préparation de l'échantillon d'Amcard :

- ∞ Mettre 1600 mg dans une fiole de 100 ml et compléter avec de l'éthanol
- ∞ faire la mesure de l'absorbance par spectrophotométrie UV

II.4 Expression des résultats

$$\% \text{teneur PA} = \frac{\text{Abs.Ech} \times \text{Masse.STD} \times \text{Masse.Moy} \times \text{Purité.STD} \times 0,721}{\text{Abs.STD} \times \text{Masse Ech} \times 10}$$



10 : la dose théorique en Amlodipine bésylate = 10 mg

95% < % du Principe actif < 105%

II.5 Résultats :

A. Fidélité :

La répétabilité :

L'étude de la répétabilité sera réalisée à partir des mesures qui sont effectuées sur sept solutions de l'échantillon de même concentration préparées selon la méthode analytique dans les mêmes conditions c'est-à-dire, même opérateur, même jours et même matériels.

On mesure l'absorbance pour chaque solution par spectrophotométrie UV ainsi on détermine le pourcentage de la teneur du principe actif amlodipine par la relation décrit par la méthode analytique. Le coefficient de variance sera calculé (CV).

Pour dire que la méthode est répétable, il faut que $CV < 2\%$, Les résultats sont regroupés dans le tableau suivant :

N° de solution SPL	Qté introd. (mg)	Absorbance SPL	Absorbance STD	% Principe actif
SPL1	1,110	0,3826	0,3769	97,55
SPL2	1,116	0,3845		98,03
SPL3	1,107	0,3818		97,34
SPL4	1,112	0,3835		97,78
SPL5	1,120	0,3863		98,49
SPL6	1,120	0,3865		98,54
SPL7	1,105	0,3814		97,24
			Ecart type	0,52
			Moyenne	97,85
			CV%	0,54%



Tableau 2 : résultats du test de la répétabilité

■ **Conclusion :**

D'après les résultats du tableau, on constate que le coefficient de variance calculé est inférieur à 2%, donc la méthode est répétable.

■ **Reproductibilité :**

Les paramètres de reproductibilité ont été déterminés sur une série de 7 mesures déterminées dans des conditions de reproductibilité. Les résultats obtenus sont donnés dans le tableau suivant :

Date	Essai/j	Qté introd. (mg)	Absorbance SPL	Absorbance STD	%du Principe actif
26/05/2013	A/1	1,113	0,3844	0,3889	96,96
	B/1	1,097	0,3789		95,58
	C/1	1,093	0,3777		95,27
	D/1	1,103	0,3812		96,16
	E/1	1,127	0,3895		98,25
	F/1	1,089	0,3767		95,02
	G/1	1,093	0,3781		95,38
27/05/2013	A/2	1,118	0,3869	0,3758	99,91
	B/2	1,091	0,3778		97,56
	C/2	1,084	0,3756		96,99
	D/2	1,109	0,3845		99,29
	E/2	1,098	0,3807		98,31
	F/2	1,080	0,3745		96,71
	G/2	1,070	0,3712		95,86

Tableau 3 : Reproductibilité

	Série 1	Série 2
--	---------	---------



Moyenne	96,089	97,8050
Ecart type	1,156	1,450
CV	1,2%	1,5%

Tableau 4 : calcul de coefficient de variation

Pour chaque série on a calculé le coefficient de variance, on constate que CV pour les deux séries est inférieur à 2%

Test d'égalité des variances (F-Test)

A partir des échantillons indépendants, il s'agit de mettre en place un test de Fisher qui permettra de vérifier que les variables parents sont de même variance ou pas.

Afin d'éviter toute la partie relative aux calculs du test, nous avons utilisé une «macro» disponible sous EXCEL. Celle-ci nous donne le détail des calculs statistiques et les valeurs qui permettent de prendre une décision.

Test de Fisher		
Test d'égalité des variances	Série 1	Série 2
Moyenne	96,089	97,8050
Ecart type	1,156	1,450
Variance	1,34E+00	2,10E+00
Observations	7	7
Degré de liberté	6	6
F _{Calculée}	6,356E-01	



F (unilatérale)	4,28
-----------------	------

Tableau 5 : test d'égalité des variances



B. La linéarité :

Les tests de linéarité ont été effectués afin :

- D'une part de vérifier la linéarité entre l'absorbance et la concentration.
- D'autre part, de vérifier :
 - ∞ La droite $Y=Ax+B$ passe par l'origine, l'outil de vérification : test de Student
 - ∞ La pente A est elle significative, l'outil de vérification : test de Fisher
 - ∞ L'homogénéité des variances, l'outil de vérification : test de Cochran

Vérification de la linéarité :

On a préparé selon la méthode analytique cinq solutions standard de concentration comprise entre 50% et 150% et on mesure l'absorbance pour les cinq solutions standard. Les résultats obtenus sont donnés dans le tableau suivant :

prise d'essai (mg) X_{ij}	Teneur en PA par rapport à la quantité théorique (%)	Absorbance Y_{ij}
0,560	50	0,197
0,895	80	0,3165
1,120	100	0,3858
1,372	120	0,4808
1,680	150	0,5898

Tableau 6 : la linéarité

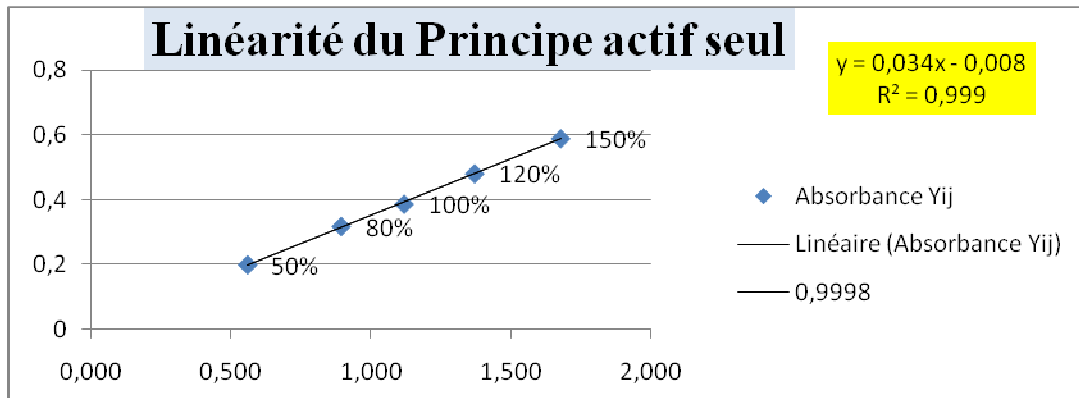


Figure 4: Courbe de la droite d'étalonnage

D'après la valeur du coefficient de détermination, on peut très facilement confirmer qu'il existe une relation linéaire significative entre deux caractères quantitatifs connus : l'absorbance et concentration.

Test de vérification de la linéarité :

On a choisi 5 niveaux de concentration situés dans le domaine de linéarité supposée. Pour chaque niveau de concentration, on a effectué 3 séries sur la solution standard (principe actif seul) et on a mesuré l'absorbance. Les résultats sont reportés dans le tableau suivant :

Niveau	Essai	Teneur en PA par rapport à la qté théorique (%)	Prise d'essai (mg)(X_{ij})	Absorbance (Y_{ij})
1	A1	50,2	0,56	0,1979
	A2	50,4	0,57	0,1988
	A3	49,2	0,55	0,1937
2	B1	79,2	0,89	0,3135
	B2	80,2	0,90	0,3175
	B3	79,9	0,89	0,316
3	C1	99,1	1,11	0,3824
	C2	100,1	1,12	0,386
	C3	99,1	1,11	0,3824



4	D1	120,3	1,38	0,482
	D2	121,7	1,39	0,4875
	D3	120,2	1,37	0,4815
5	E1	149,36	1,67	0,5873
	E2	149,2	1,67	0,5867
	E3	150,1	1,68	0,5902

Tableau 7 : Test de vérification de la linéarité



➤ Vérification que la droite $Y = b_1X + b_0$ passe par l'origine:

On applique le test de Student qui consiste à faire une comparaison de l'ordonnée avec 0 selon cette

relation :

$$t_{test} = \left| \frac{0 - b_0}{s_{b_0}} \right|$$

Pour dire que la droite passe par l'origine il faut que la valeur du t_{TEST} calculée soit inférieure à la valeur critique donnée par le tableau de student. Les résultats sont reportés dans le tableau suivant :

droite : $y = b_1x + b_0$	penste (b1)	ordonnée à l'origine (b0)
coefficients de la droite	0,35053971	-0,00044663
Ecart type sur les coeff	0,08923754	0,10600729

Test de comparaison des ordonnées à l'origine avec 0 (t_{Test})	0,004
t (théorique au risque 5%)	2,16

Tableau 8 : Vérification la droite passe par l'origine

■ **Conclusion :**

On constate que la valeur du t_{TEST} est inférieur à la valeur théorique donnée par le tableau, donc on peut considère que la droite passe par l'origine

➤ Vérification que la pente b1 est significative :

On applique le test de Fisher qui consiste à valider un résultat statistique à un risque α choisi en comparant deux variances indépendantes S_1^2 et S_2^2

Selon l'inégalité suivante :

$$\frac{S_1^2}{S_2^2} > F_{(\alpha, v_1, v_2)}$$



Le test de Fisher est significatif lorsque l'inégalité ci-dessus est vérifiée. Les résultats sont reportés dans le tableau suivant :

Variations	DDL	Somme des carrés	Variances	F calculé	F théorique
Variation totale	14	0,276	-	12159,406	4,67
Variation due à la régression	1	0,276	0,276		
Variation résiduelle	13	0,0003	2,266E-05		

Tableau 9 : Vérification la pente b1 est significative

● **Conclusion :**

D'après les résultats du tableau, la valeur F calculée est supérieur à la valeur F théorique, donc le test de Fisher est vérifié.

La pente de la droite est significative.

➤ **Test d'homogénéité des variances :**

Le test de Cochran permet de vérifier (à un risque α choisi) l'homogénéité des variances des valeurs individuelles, selon cette relation :

$$C = \frac{S_{\max}^2}{\sum_{i=1}^p S_i^2}$$

Le test de Cochran correspond à vérifier l'inégalité suivante : $C < C(n, p)$ est lu sur la table de Cochran en fonction du risque $\alpha = 5\%$ du nombre de répétitions (n) et du nombre de groupe p.

Les résultats sont reportés dans le tableau suivant :



Groupes (j)	1	2	3	4	5
n_i	3	3	3	3	3
S^2_j (Absorbance)	1,81E-06	1,75E-06	3,33E-09	2,33E-06	1,20E-07
Somme des Variance	6,02E-06				
variance max	2,33E-06				
$C_{\text{calculé}} =$	3,88E-01				
$C_{(0,05 ; 5 ; 3)} =$	0,68				

Tableau 10 : Test d'homogénéité des variances

■ **Conclusion :**

On constate que la valeur C calculée est inférieure à la valeur donnée par le tableau, donc le test de Cochran est vérifié.

C. L'exactitude :

L'étude de l'exactitude sera réalisée sur l'analyse des solutions préparées en triple, à 80%, 100% et 120% de la concentration de la solution standard de l'amlodipine bésylate.

La valeur de recouvrement pour chaque point de la gamme doit être entre 95 et 105%, et la moyenne des recouvrements doit être comprise entre 98% et 102%. Les résultats sont reportés dans le tableau suivant :



Teneur en PA par rapport qté théor.	Essai/j	Qté introd. (mg)	Absorbance	Qté retrouvé. (mg)	Recouvrement %	Moy des % de recouvrement
50% (groupe 1)	A/1	0,570	0,1966	0,571	100,12%	100,14%
	A/2	0,573	0,1978	0,574	100,17%	
	A/3	0,567	0,1956	0,568	100,14%	
80% (groupe 2)	B/1	0,893	0,3089	0,897	100,41%	100,40%
	B/2	0,914	0,316	0,917	100,38%	
	B/3	0,915	0,3165	0,919	100,41%	
100 (groupe 3)	C/1	1,139	0,3863	1,121	98,46%	98,45%
	C/2	1,116	0,3787	1,099	98,43%	
	C/3	1,134	0,3846	1,116	98,46%	
120% (groupe 4)	D/1	1,439	0,4931	1,431	99,48%	99,47%
	D/2	1,408	0,4825	1,400	99,45%	
	D/3	1,425	0,4885	1,418	99,48%	
150% (groupe 5)	E/1	1,711	0,5802	1,684	98,43%	98,43%
	E/2	1,730	0,5867	1,703	98,41%	
	E/3	1,730	0,5866	1,703	98,43%	

$Qté\ retrouv\acute{e}. (mg) = Absorbance/b$

$Recouvrement = Qt\acute{e}\ retrouv\acute{e} / Qt\acute{e}\ introduit$

pour chacun des jours $b = Y_{100}/X_{100}$ Y_{100} et X_{100} sont respectivement la pesé et l'absorbance

correspond à l'étalon 100%

Tableau 11: résultats d'exactitude

● Conclusion :

On constate que les valeurs des recouvrements pour chaque point de la gamme appartiennent à l'intervalle 95 et 105%, même chose pour les valeurs des moyennes des recouvrements qui appartiennent à l'intervalle 98%, et 102%.

L'exactitude de la méthode est vérifiée.

D. Range ou (intervalle de mesure) :

Consiste à déterminer aux concentrations extrêmes (de l'intervalle de la linéarité) l'exactitude et la précision.

On a vérifié l'exactitude et la précision à 50% et à 150% de la concentration dosée à 0,0112 mg/ml.

➤ Vérification de précision à 50% et 150% :

L'étude de la précision à 50% et 150% sera réalisée à partir des mesures qui seront effectuées sur sept solutions de l'échantillon. Les résultats sont reportés dans les deux tableau suivant :



Range; résultats du test de précision (50%)

N° de solution SPL	Absorbance SPL	Absorbance STD	% du principe actif
SPL1	0,1979	0,1965	98,47
SPL2	0,1934		96,23
SPL3	0,1944		96,73
SPL4	0,1917		95,39
SPL5	0,1937		96,38
SPL6	0,1923		95,68
SPL7	0,1956		97,33
l'écart type	1,04		
Moyenne	96,60		
CV %	1,08%		



Range; résultats du test de précision (150%)			
N° de solution SPL	Absorbance	Absorbance STD	% du principe actif
SPL1	0,5856	0,5698	99,24
SPL2	0,5785		98,04
SPL3	0,5866		99,41
SPL4	0,5923		100,38
SPL5	0,5834		98,87
SPL6	0,5897		99,94
SPL7	0,5872		99,51
l'écart type	0,75	Tableau 12: Test de précision	Les deu x val eur
Moyenne	99,34		
CV %	0,76%		

s du coefficient de la variance dans les deux tableaux est inférieur à 2%, donc la méthode est précise à 50% et 150%.

➤ **Vérification d'exactitude à 50% et à 150% :**

L'étude d'exactitude est réalisée à partir des mesures effectuées sur des solutions préparées en triple, à 50% et 150% de la concentration de la solution standard de l'amlodipine.

Les résultats exprimés par les pourcentages de recouvrement et la moyenne des pourcentages de recouvrement, seront présentés dans le tableau suivant.



Range; résultats du test d'exactitude à 50% et à 150%						
Teneur en PA par rapport qté théor.	Essai/j	Qté introd. (mg)	Absorbance	Qté retrouvé. (mg)	Recouvrement %	Moy des % de recouvrement
50% (groupe 1)	A/1	0,556	0,1913	0,555	99,87%	100,10%
	A/2	0,557	0,1923	0,558	100,19%	
	A/3	0,547	0,1889	0,548	100,24%	
150% (groupe 5)	E/1	1,720	0,5834	1,693	98,46%	98,46%
	E/2	1,743	0,5913	1,716	98,45%	
	E/3	1,732	0,5876	1,706	98,48%	

Tableau 13: Test d'exactitude à 50% et à 150%

■ **Conclusion :**

Les valeurs des recouvrements appartiennent à l'intervalle 95 et 105%, même chose pour les valeurs des moyennes des recouvrements qui appartiennent à l'intervalle 98%, et 102%.

L'exactitude est vérifiée à 50% et 150%.



CONCLUSION GENERALE

Dans ce cadre, notre travail a consisté en la validation de la méthode de dosage du principe actif amlodipine bésylate par méthode spectrophotométrie UV au sein du laboratoire du contrôle de la qualité de la société Genpharma. Pour démontrer que cette méthode est validée, on a utilisé un ensemble de tests afin d'étudier les différents critères de validation.

Les résultats obtenus après étude de ces critères de validation par utilisation d'Excel, se résument comme suit :

- ❑ La linéarité est vérifiée par les tests suivants:
 - Test de Student, test de comparaison de l'ordonnée à l'origine avec 0;
 - Test de Fisher, test de l'existence d'une pente significative;
 - Test de Cochran, test d'homogénéité des variances.
- ❑ L'exactitude est vérifiée par le calcul de la moyenne des recouvrements;
- ❑ La fidélité est vérifiée par la répétabilité et la reproductibilité.
- ❑ La spécificité est vérifiée

D'après les résultats obtenus, on peut confirmer que la méthode de dosage du principe actif amlodipine bésylate est validée par Spectrophotométrie UV



ABREVIATIONS

- ↵ AC : Articles de Conditionnement
- ↵ AMM : Autorisation de Mise sur le Marché.
- ↵ AQ : Assurance Qualité.
- ↵ BP : British Pharmacopée.
- ↵ BPD : Bonne Pratique de Distribution.
- ↵ BPF : Bonne Pratique de Fabrication.
- ↵ BPL : Bonne pratique de laboratoire
- ↵ CA : Chiffre d’Affaire
- ↵ CQ : Contrôle Qualité.
- ↵ EP : Eau purifiée
- ↵ LCQ : Laboratoire contrôle qualité
- ↵ DCI : Dénomination Commune Internationale.
- ↵ EP : Pharmacopée Européenne.
- ↵ MSP : Ministère de la Santé Publique.
- ↵ MP : Matières Premières.
- ↵ OMS : Organisation Mondiale de la Santé
- ↵ PA : Principe Actif.
- ↵ PF : Produit Fini
- ↵ PPM : Prix Public Marocain
- ↵ PSF : Produit Semi Fini
- ↵ QSE : Qualité-Sécurité-Environnement.
- ↵ ICH International Conférence on Harmonisation
- ↵ SFSTP : Société Française des Sciences Techniques et Pharmaceutiques
- ↵ HPLC : Chromatographie Liquide à Haute Pression
- ↵ UV : Ultra Violet
- ↵ CPG : Chromatographie en Phase Gazeuse
- ↵ CCM : Chromatographie Couche Mince



↪ SPL : Sample (échantillon)

REFERENCE

- ❧ **British Pharmacopeia 2013**
- ❧ **International Conference on Harmonization of Technical Requirements for the registration of pharmaceuticals for humane use: Validation of analytical procedures: Q2A, Q2B.**
- ❧ **Gautier, J. C., Nivet, J.M., Algranti, P., Guilloteau, M., Histe, M., Lallier, M., N’guyen-Huu, J.J. et Russotto, R. 1992. Guide de validation analytique. Rapport d’une commission**
- ❧ **SFSTP. I- Méthodologie. STP Pharma Prat. Vol.2 (4): 205- 226.**
- ❧ **Norme ISO 5725, 1986**
- ❧ **Les plans d’expériences : De l’expérimentation à l’assurance qualité Gilles Sado et Marie Christine Sado AFNOR, Edition 2000**
- ❧ **Guide de validation analytique : Rapport d’une commission de SFSTP I. Méthodologie. J.Caporal-Gautier, J.M. Nivet, P. Algranti, M. Guilloteau, M. Histe, M. Lallier, J.J. N’Guyen-Huu et R. Russotto. STP Pharma Pratiques 2 (4) 205-226 1992.**
- ❧ **Analytical Method Development and Validation M.E. Swartz et Ira S. Krull Marcel Dekker, 1997.**



ANNEXES

Table pour le Test de DIXO

Echantillon ordonnée : $y_1 \leq y_2 \leq \dots \leq y_{n-1} \leq y_n$

N	α						
	0.30	0.20	0.10	0.05	0.02	0.01	0.005
3	0.684	0.781	0.886	0.941	0.976	0.988	0.994
4	0.471	0.560	0.679	0.765	0.846	0.889	0.926
5	0.373	0.451	0.557	0.642	0.729	0.780	0.821
6	0.318	0.386	0.482	0.560	0.644	0.698	0.740
7	0.281	0.344	0.434	0.507	0.596	0.637	0.680
8	0.318	0.385	0.479	0.554	0.631	0.683	0.725
9	0.288	0.352	0.441	0.512	0.587	0.635	0.677
10	0.265	0.325	0.409	0.477	0.551	0.597	0.639
11	0.391	0.442	0.517	0.576	0.638	0.679	0.713
12	0.370	0.419	0.490	0.546	0.605	0.642	0.675
13	0.351	0.399	0.467	0.521	0.578	0.615	0.649
14	0.370	0.421	0.492	0.546	0.602	0.641	0.674
15	0.353	0.402	0.472	0.525	0.579	0.616	0.647
16	0.338	0.386	0.454	0.507	0.559	0.595	0.624
17	0.325	0.373	0.438	0.490	0.542	0.577	0.605
18	0.304	0.350	0.412	0.462	0.514	0.547	0.575
19	0.295	0.340	0.401	0.450	0.502	0.535	0.562
20	0.287	0.331	0.391	0.440	0.491	0.524	0.551
21	0.280	0.323	0.382	0.430	0.481	0.514	0.541
22	0.274	0.316	0.374	0.421	0.472	0.505	0.532
23	0.268	0.310	0.367	0.413	0.464	0.497	0.524
24	0.262	0.304	0.360	0.406	0.457	0.489	0.516
25							

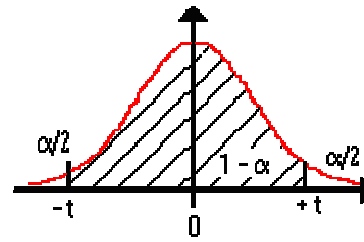
*Avec α :
critique

la valeur
ou le risque.

Table pour le Test de STUDEN



Cette table donne les fractiles de la loi de Student à v degrés de liberté, $v = N - 2$



α bilatéral	$1 - \alpha / 2$ (unilatéral)	v (degré de liberté)
--------------------	-------------------------------	------------------------

	0.9	0.8	0.7	0.6	0.5	0.4	0.3	0.2	0.1	0.05	0.02	0.01	0.005	0.001
	0.55	0.6	0.65	0.7	0.75	0.8	0.85	0.9	0.95	0.975	0.99	0.995	0.9975	0.9995
1	0.1584	0.3249	0.5095	0.7265	1	1.3764	1.9626	3.0777	6.3137	12.706	31.821	63.656	127.32	636.58
2	0.1421	0.2887	0.4447	0.6172	0.8165	1.0607	1.3862	1.8856	2.92	4.3027	6.9645	9.925	14.089	31.6
3	0.1366	0.2767	0.4242	0.5844	0.7649	0.9785	1.2498	1.6377	2.3534	3.1824	4.5407	5.8408	7.4532	12.924
4	0.1338	0.2707	0.4142	0.5686	0.7407	0.941	1.1896	1.5332	2.1318	2.7765	3.7469	4.6041	5.5975	8.6101
5	0.1322	0.2672	0.4082	0.5594	0.7267	0.9195	1.1558	1.4759	2.015	2.5706	3.3649	4.0321	4.7733	6.8685
6	0.1311	0.2648	0.4043	0.5534	0.7176	0.9057	1.1342	1.4398	1.9432	2.4469	3.1427	3.7074	4.3168	5.9587
7	0.1303	0.2632	0.4015	0.5491	0.7111	0.896	1.1192	1.4149	1.8946	2.3646	2.9979	3.4995	4.0294	5.4081
8	0.1297	0.2619	0.3995	0.5459	0.7064	0.8889	1.1081	1.3968	1.8595	2.306	2.8965	3.3554	3.8325	5.0414
9	0.1293	0.261	0.3979	0.5435	0.7027	0.8834	1.0997	1.383	1.8331	2.2622	2.8214	3.2498	3.6896	4.7809
10	0.1289	0.2602	0.3966	0.5415	0.6998	0.8791	1.0931	1.3722	1.8125	2.2281	2.7638	3.1693	3.5814	4.5868
11	0.1286	0.2596	0.3956	0.5399	0.6974	0.8755	1.0877	1.3634	1.7959	2.201	2.7181	3.1058	3.4966	4.4369
12	0.1283	0.259	0.3947	0.5386	0.6955	0.8726	1.0832	1.3562	1.7823	2.1788	2.681	3.0545	3.4284	4.3178
13	0.1281	0.2586	0.394	0.5375	0.6938	0.8702	1.0795	1.3502	1.7709	2.1604	2.6503	3.0123	3.3725	4.2209
14	0.128	0.2582	0.3933	0.5366	0.6924	0.8681	1.0763	1.345	1.7613	2.1448	2.6245	2.9768	3.3257	4.1403
15	0.1278	0.2579	0.3928	0.5357	0.6912	0.8662	1.0735	1.3406	1.7531	2.1315	2.6025	2.9467	3.286	4.0728
16	0.1277	0.2576	0.3923	0.535	0.6901	0.8647	1.0711	1.3368	1.7459	2.1199	2.5835	2.9208	3.252	4.0149
17	0.1276	0.2573	0.3919	0.5344	0.6892	0.8633	1.069	1.3334	1.7396	2.1098	2.5669	2.8982	3.2224	3.9651
18	0.1274	0.2571	0.3915	0.5338	0.6884	0.862	1.0672	1.3304	1.7341	2.1009	2.5524	2.8784	3.1966	3.9217
19	0.1274	0.2569	0.3912	0.5333	0.6876	0.861	1.0655	1.3277	1.7291	2.093	2.5395	2.8609	3.1737	3.8833
20	0.1273	0.2567	0.3909	0.5329	0.687	0.86	1.064	1.3253	1.7247	2.086	2.528	2.8453	3.1534	3.8496
21	0.1272	0.2566	0.3906	0.5325	0.6864	0.8591	1.0627	1.3232	1.7207	2.0796	2.5176	2.8314	3.1352	3.8193
22	0.1271	0.2564	0.3904	0.5321	0.6858	0.8583	1.0614	1.3212	1.7171	2.0739	2.5083	2.8188	3.1188	3.7922
23	0.1271	0.2563	0.3902	0.5317	0.6853	0.8575	1.0603	1.3195	1.7139	2.0687	2.4999	2.8073	3.104	3.7676
24	0.127	0.2562	0.39	0.5314	0.6848	0.8569	1.0593	1.3178	1.7109	2.0639	2.4922	2.797	3.0905	3.7454
25	0.1269	0.2561	0.3898	0.5312	0.6844	0.8562	1.0584	1.3163	1.7081	2.0595	2.4851	2.7874	3.0782	3.7251

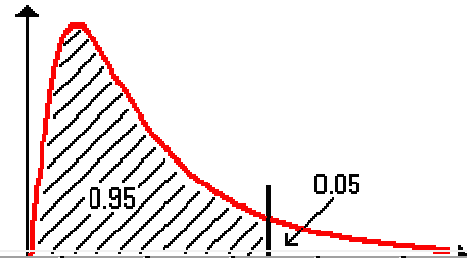


Table pour le test de FISHER

Valeur f de la variable de Fisher $F(v_1 ; v_2)$ ayant la probabilité 0.05 d'être dépassée

V1 : degrés de liberté du numérateur

V2: degrés de liberté du dénominateur



	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	15	16	17	18	19	20
1	161.45	199.50	215.71	224.58	230.16	233.99	236.77	238.88	240.54	241.88	245.95	246.47	246.92	247.32	247.69	248.02
2	18.51	19.00	19.16	19.25	19.30	19.33	19.35	19.37	19.38	19.40	19.43	19.43	19.44	19.44	19.44	19.45
3	10.13	9.55	9.28	9.12	9.01	8.94	8.89	8.85	8.81	8.79	8.70	8.69	8.68	8.67	8.67	8.66
4	7.71	6.94	6.59	6.39	6.26	6.16	6.09	6.04	6.00	5.96	5.86	5.84	5.83	5.82	5.81	5.80
5	6.61	5.79	5.41	5.19	5.05	4.95	4.88	4.82	4.77	4.74	4.62	4.60	4.59	4.58	4.57	4.56
6	5.99	5.14	4.76	4.53	4.39	4.28	4.21	4.15	4.10	4.06	3.94	3.92	3.91	3.90	3.88	3.87
7	5.59	4.74	4.35	4.12	3.97	3.87	3.79	3.73	3.68	3.64	3.51	3.49	3.48	3.47	3.46	3.44
8	5.32	4.46	4.07	3.84	3.69	3.58	3.50	3.44	3.39	3.35	3.22	3.20	3.19	3.17	3.16	3.15
9	5.12	4.26	3.86	3.63	3.48	3.37	3.29	3.23	3.18	3.14	3.01	2.99	2.97	2.96	2.95	2.94
10	4.96	4.10	3.71	3.48	3.33	3.22	3.14	3.07	3.02	2.98	2.85	2.83	2.81	2.80	2.79	2.77
11	4.84	3.98	3.59	3.36	3.20	3.09	3.01	2.95	2.90	2.85	2.72	2.70	2.69	2.67	2.66	2.65
12	4.75	3.89	3.49	3.26	3.11	3.00	2.91	2.85	2.80	2.75	2.62	2.60	2.58	2.57	2.56	2.54
13	4.67	3.81	3.41	3.18	3.03	2.92	2.83	2.77	2.71	2.67	2.53	2.51	2.50	2.48	2.47	2.46
14	4.60	3.74	3.34	3.11	2.96	2.85	2.76	2.70	2.65	2.60	2.46	2.44	2.43	2.41	2.40	2.39
15	4.54	3.68	3.29	3.06	2.90	2.79	2.71	2.64	2.59	2.54	2.40	2.38	2.37	2.35	2.34	2.33
16	4.49	3.63	3.24	3.01	2.85	2.74	2.66	2.59	2.54	2.49	2.35	2.33	2.32	2.30	2.29	2.28
17	4.45	3.59	3.20	2.96	2.81	2.70	2.61	2.55	2.49	2.45	2.31	2.29	2.27	2.26	2.24	2.23
18	4.41	3.55	3.16	2.93	2.77	2.66	2.58	2.51	2.46	2.41	2.27	2.25	2.23	2.22	2.20	2.19
19	4.38	3.52	3.13	2.90	2.74	2.63	2.54	2.48	2.42	2.38	2.23	2.21	2.20	2.18	2.17	2.16
20	4.35	3.49	3.10	2.87	2.71	2.60	2.51	2.45	2.39	2.35	2.20	2.18	2.17	2.15	2.14	2.12
21	4.32	3.47	3.07	2.84	2.68	2.57	2.49	2.42	2.37	2.32	2.18	2.16	2.14	2.12	2.11	2.10
22	4.30	3.44	3.05	2.82	2.66	2.55	2.46	2.40	2.34	2.30	2.15	2.13	2.11	2.10	2.08	2.07
23	4.28	3.42	3.03	2.80	2.64	2.53	2.44	2.37	2.32	2.27	2.13	2.11	2.09	2.08	2.06	2.05
24	4.26	3.40	3.01	2.78	2.62	2.51	2.42	2.36	2.30	2.25	2.11	2.09	2.07	2.05	2.04	2.03
25	4.24	3.39	2.99	2.76	2.60	2.49	2.40	2.34	2.28	2.24	2.09	2.07	2.05	2.04	2.02	2.01



26	4.23	3.37	2.98	2.74	2.59	2.47	2.39	2.32	2.27	2.22	2.07	2.05	2.03	2.02	2.00	1.99
27	4.21	3.35	2.96	2.73	2.57	2.46	2.37	2.31	2.25	2.20	2.06	2.04	2.02	2.00	1.99	1.97
28	4.20	3.34	2.95	2.71	2.56	2.45	2.36	2.29	2.24	2.19	2.04	2.02	2.00	1.99	1.97	1.96
29	4.18	3.33	2.93	2.70	2.55	2.43	2.35	2.28	2.22	2.18	2.03	2.01	1.99	1.97	1.96	1.94
30	4.17	3.32	2.92	2.69	2.53	2.42	2.33	2.27	2.21	2.16	2.01	1.99	1.98	1.96	1.95	1.93