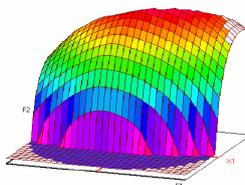




Année Universitaire : 2013-2014



Master Sciences et Techniques CAC Agiq
Chimométrie et Analyse Chimique : Application à la gestion industrielle
de la qualité

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

Titre : validation analytique du test de dissolution de la
Paroxétine par UV-Visible

Présenté par:

Nom et prénom : MAHOU Achraf

Encadré par:

- Nom et prénom : Mr. Driss OUSSIDHOUM (ZENITH Pharma)
- Nom et prénom : Pr. Hicham CHTIOUI (FST Fès)

Soutenu Le 17/06/2014 Juin 2014 devant le jury composé de:

- Pr. H. CHTIOUI (Encadrant)
- Pr. E.M.ELHADRAMI (Examineur)
- Pr. H.BALI (Examineur)

Stage effectué à : ZENTITH Pharma (Agadir)



DEDICACES



A mes parents

Nulle dédicace ne pourrait exprimer mon profond amour, mon immense respect et ma grande gratitude pour tous les sacrifices que vous avez consentis pour mon éducation et toute la patience dont vous avez fait preuve. Papa, maman je vous aime profondément.

A ma famille

Aucune expression ne pourrait traduire tout l'amour que je porte à votre égard. Je vous adore tout simplement.

A mes professeurs

Tous les mots du monde ne sauraient exprimer l'estime que je porte à votre égard. Trouvez dans ce travail ma reconnaissance pour tout votre savoir faire qui m'a guidé dans mon travail, votre soutien et vos encouragements.

A mes ami(e)s

En reconnaissance des liens fraternels et de solidarité qui nous réunissent, tous les mots ne sauraient exprimer mon affection et gratitude pour vos encouragements et votre sympathie.

Que Dieu vous prête tous, une longue vie, de bonheur, de santé et de prospérité.



REMERCIEMENTS



Sans l'aide de plusieurs personnes, ce rapport n'aurait pas vu le jour, Je tiens donc, à travers ces mots, à exprimer toute ma gratitude à toutes les personnes qui y ont concouru de près ou de loin.

A l'occasion de la réalisation et de l'aboutissement de ce travail, je tiens à remercier après ALLAH tout d'abords à M. Mohamed EL BOUHMADI PDG, M. Hamid OUAHBI, Directeur Général et Mlle Wafaa SADIK, responsable du laboratoire de Contrôle Qualité au sein de ZENITH Pharma, pour m'avoir fait confiance et permis d'effectuer ce stage au sein de son établissement dans les meilleures conditions.

Mes vifs remerciements s'adressent à mon encadrant M. Driss OUSIDHOUM Responsable du laboratoire de développement et validation, pour le soutien, l'accueil, l'écoute, la confiance et leur aide tout au long de ce projet. Je tiens également à remercier, Mr.Hicham CHTIOUI, pour avoir accepté de m'encadrer, pour sa gentillesse, et pour ses conseils judicieux. Qu'ils veuillent trouver ici l'expression de mon profond respect et ma haute considération.

Mes remerciements les plus chaleureux vont aux membres du jury, pour m'avoir honoré de leur présence et d'avoir accepté de juger ce travail. Je vous exprime tout mon respect et ma gratitude.

Mes sincères

remerciements s'adressent également à tout le personnel de ZENITH Pharma et spécialement, le personnel du laboratoire de Contrôle Qualité : Nadia, Nessrine, Amina, Imane, Zineb, Rahma, Khadija, , Abdelmalek, Youssef, Omar, Aziz et Abdelhafid, pour leur accueil, amitié, gentillesse, soutien et leur précieuse assistance. Grace à vous une agréable ambiance de travail règne au laboratoire.

Merci à tous ceux qui

m'ont aidé.



Sommaire

Introduction général.....	1
Partie 1 : Présentation de ZENITH PHARMA	
I. Présentation.....	3
II. Activités.....	4
III. Fiche signalétique de ZENITHPHARMA.....	4
IV. Organigramme.....	5
V. Présentation du laboratoire de contrôle	6
Partie 2 : l'enjeu qualité dans le domaine pharmaceutique	
Le contrôle et assurance qualité dans l'industrie pharmaceutique.....	7
I- Quelques notions sur le système qualité des produits pharmaceutique.....	7
1-Notion d'assurance et contrôle qualité	7
Partie 3 : Validation analytique	
I – Définition.....	10
II – Historique de validation analytique.....	11
III – Texte de référence pour la validation analytique.....	12
IV -Objectif de la validation analytique.....	12
V- Les règles d'or de la validation analytique.....	12
VI- Champs d'application.....	13
VII- Les critères de la validation.....	13
1-Spécificité/Sélectivité.....	14
2- La linéarité.....	14
3- Exactitude.....	14
4- La fidélité.....	15
5- Limite de détection.....	15
6- Limite de quantification.....	16
7- Robustesse.....	16
VIII- Démarche de la validation analytique.....	16
IX- Système documentaire.....	16
X- La revalidation analytique.....	17
Partie 4 : Matériels et méthode	
I – la Paroxétine.....	19



II- L'essai de dissolution.....	20
1-Généralités.....	20
2-Principe.....	20
3-Appareillage utilisé dans la dissolution de la Paroxétine.....	21
III- La spectrophotométrie UV-Visible.....	23
1-Définition.....	23
2-Principe.....	23
IV-Matériels et appareillage.....	25
V-Réactifs.....	25
VI-Méthodologie de validation.....	25
1-Spécificité.....	25
2-Linéarité.....	26
3-L'exactitude.....	27
4-Fidélité.....	28
Partie 5 : Résultats et discussion	
I-Résultats.....	29
1-Spécificité.....	29
2-Linéarité.....	29
3-Exactitude.....	36
4-Fidélité.....	38



II- Discussion.....	40
Conclusion générale.....	41
Références Bibliographiques.....	42

Liste des tableaux et figures

Liste des figures

Figure 1: Présentation du groupe ZENITH Pharma

Figure 2 : Organigramme de ZENITH Pharma

Figure 3 : Le rôle du laboratoire de contrôle qualité dans la fabrication du médicament

Figure 4 : Formule développée de la Paroxétine

Figure 5 : Le dissolutest à palettes

Figure 6 : les dimensions des palettes et les vases utilisés

Figure 7 : Schéma de principe du spectrophotomètre UV-visible monofaisceau

Figure 8 : le principe de la loi de Beer-Lambert

Figure 9: droite de régression de la linéarité pour le PA seul

Figure 10 : droite de régression de la linéarité pour FPR

Liste des tableaux

Tableau 1: Fiche signalétique de la société ZENITH Pharma

Tableau 2 : Tableau des critères de validation analytique

Tableau 3 : Conditions opératoires



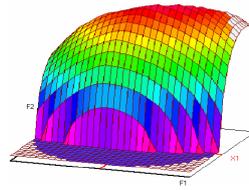
Tableau 4 : Préparation de la gamme avec PA seul
Tableau 5 : Préparation de la gamme avec FPR
Tableau 6 : Résultats d'étude de linéarité pour le PA seul
Tableau 7 : Test d'existence d'une pente significative pour le PA seul
Tableau 8 : Test de la validité de droite de régression pour le PA seul
Tableau 9 : Résultats d'étude de linéarité pour le FPR
Tableau 10 : Test d'existence d'une pente significative pour FPR
Tableau 11 : Test de la validité de droite de régression pour FPR
Tableau 12 : Tableau des résultats de l'étude de l'exactitude
Tableau 13 : Test de la validité des moyennes
Tableau 14 : Coefficient de variation de l'étude de la répétabilité (jour 1)
Tableau 15 : Coefficient de variation de l'étude de la fidélité intermédiaire jour 2
Tableau 15 : Coefficient de variation de l'étude de la fidélité intermédiaire jour 3
Tableau 17 : Les résultats de l'étude de fidélité
Tableau 18 : Test de validité des moyennes

Liste des abréviations et acronymes

AC : Articles de Conditionnement
AOAC : Association of official Analytical chemists
AMC : Analytical methode comite
AMM : Autorisation de Mise sur le Marché
AQ : Assurance Qualité
BPF : Bonnes Pratiques de Fabrication
DMP : Direction du Médicament et de la pharmacie



DP : Division de la Pharmacie
EP : European Pharmacopia
FDA : Food and Drug Administration
FPR : Forme pharmaceutique reconstituée
HPLC : High Performance Liquid chromatography
ICH : International Conference on Harmonisation
IPC : In Process Control
IUPAC : International Union of Pure and Applied Chemistry
LCQ : Laboratoire de contrôle de qualité
MP : Matières Premières
OMS : Organisation Mondial de la Santé
PA : Principe Actif
PF : Produit fini
PSF : Produit semi fini
SFSTP : Société Française des Sciences et Techniques Pharmaceutique
T : Température
USP : United State Pharmacopia
UV : Ultra-Violet



Master ST CAC Agiq

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

Nom et prénom: MAHOU Achraf

Année Universitaire : 2013/2014

Titre: validation analytique du test de dissolution de la Paroxétine par UV-Visible

Résumé

Les médicaments représentent un enjeu à la fois réglementaire, économique et de santé publique, leur qualité est donc plus que pour tout autre bien de consommation-impérative

Afin de garantir cette qualité, le recours à la validation analytique, étape ultime de tout cycle de vie d'une méthode d'analyse, et garant universel de la fiabilité des résultats est nécessaire, d'autant plus qu'à la base de ces derniers des décisions critiques, mettant en jeu la santé publique, sont prises.

La validation analytique est donc d'une importance incontestable au sein d'un laboratoire pharmaceutique. Elle repose sur un certain nombre de critères et requiert une certaine méthodologie afin de prouver que la méthode analytique en question convient pour l'usage auquel elle est destinée. Ce rapport passera donc en revue tous ces critères tout en illustrant ce concept par exemple pratique.

Mots clés: Médicament, Qualité, Méthode analytique, Validation analytique

INTRODUCTION



La question qui se pose : existe –t-il un bien plus précieux que la santé ? La réponse à cette question que l'on a depuis toujours posée est à l'évidence négative. La santé est un bien supérieur, et un droit inaliénable pour tout un chacun, que l'on se doit de préserver. Cette préservation ne serait possible que par le biais de soins efficaces et exempts de dangers, en d'autres termes, des soins de qualité.

La qualité des soins dépend de la qualité des médicaments. Pour assurer cette dernière, toute entreprise pharmaceutique doit mettre une politique de management de la qualité.

Dans le cadre de cette politique et afin de maîtriser la qualité , l'entreprise pharmaceutique doit concevoir et mettre en application un système d'assurance qualité , point cardinal de la pratique de la pharmacie dont le principal objectif est la satisfaction des exigences de Qualité-Sécurité-Efficacité du médicament dans l'intérêt de la santé publique ainsi que dans le but de l'octroi de l'Autorisation de Mise sur le Marché (AMM).

Pour pouvoir contrôler la qualité des médicaments, pendant les différentes étapes de fabrication, l'utilisation de méthodes analytiques, s'avère nécessaire. Ainsi, la fiabilité des résultats issus de ces méthodes d'analyse, qui doivent entre autre être en accord avec les besoins des utilisateurs, est fondamentale voire impérative, d'où l'importance de la validation des méthodes analytiques.

En effet cet élément capital du cycle de vie de n'importe quelle méthode analytique permet de garantir la crédibilité et donne la confiance en tout résultat fourni lors des analyses. De plus , la validation des méthodes d'analyses est une exigence des bonnes pratique de fabrication (B.P.F.) ainsi qu'un impératif en vue de la conformité avec les réglementations et législations aussi bien nationales qu'internationales .

La validation analytique est donc indispensable à la gestion de cet équilibre difficile crée par l'enjeu à la fois réglementaire, économique et de santé publique que représente les médicaments.

C'est dans ce contexte que se situe ce projet de stage de fin d'étude intitulé « la validation analytique et l'enjeu qualité dans le domaine pharmaceutique»

Le présent rapport se décline en deux grands axes :

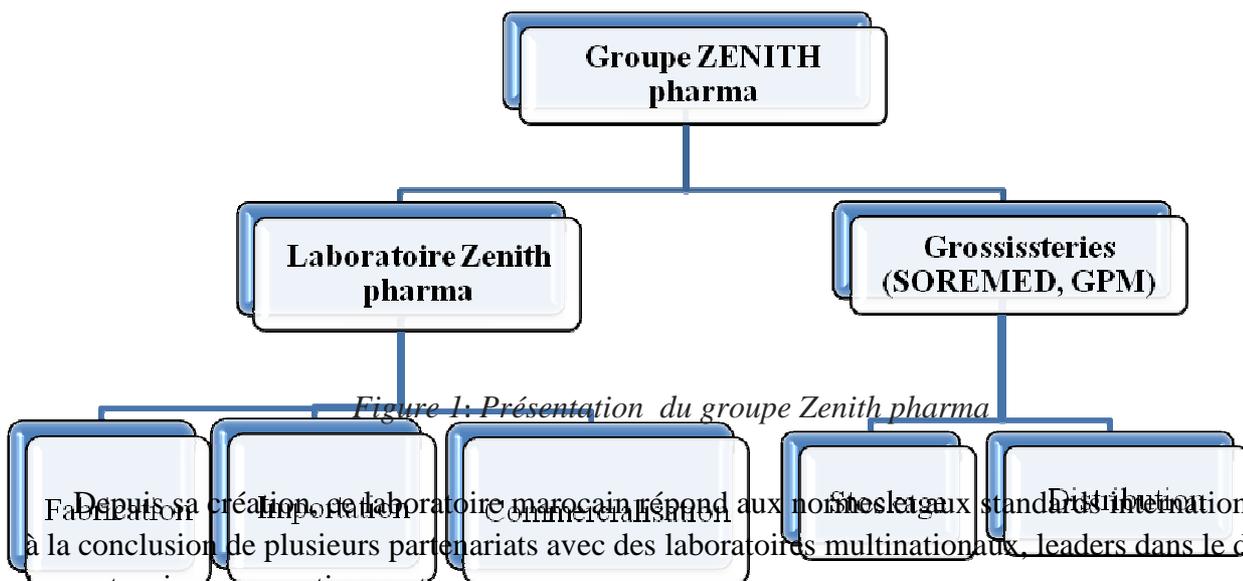
- Dans un premier temps, une revue de littérature portant sur l'industrie pharmaceutique et l'enjeu qualité, ainsi que la validation analytique sera présentée.
- Dans un deuxième temps, une partie expérimentale dans laquelle une description détaillée de ma mission de stage, ainsi que des résultats obtenus sera exposée.

La mission de stage en question consiste à mettre en place un protocole de validation analytique de la technique de dissolution de la Paroxétine utilisant la spectrophotométrie UV-Visible.



I-Présentation de l'entreprise d'accueil:

ZENITH Pharma est le premier laboratoire pharmaceutique dans toute la région du sud, crée en 2002, cette jeune firme innovante et audacieuse a commencé comme une entreprise commerciale (importation des médicaments dans le but de les revendre), jusqu'en 2009 où elle a démarré ses activités techniques (production des médicaments) tout en continuant ses activités d'importation, avec un effectif actuel d'environ 180 personnes.





- Bausch & Lomb
- Biopha
- Cephalon
- Gilbert
- Merck MF
- Olivital
- OmegaPharma
- Technimede.
- Vifor
- GSK

II-Activités :

ZENITH Pharma fabrique des produits pharmaceutiques sous licence de plusieurs laboratoires et importe d'autres sous la forme fini ou semi-conditionnés.

Ce laboratoire s'adonne à quatre domaines d'activité différents :

- ❖ La pharmacie
- ❖ La parapharmacie
- ❖ La cosmétique
- ❖ La diététique

A ce jour, elle a mis sur le marché plus de 200 produits entre produits importés et produits fabriqués.

Les objectifs du laboratoire ZENITH Pharma s'articule au tour de trois axes :

- Répondre aux attentes des médecins prescripteurs, des pharmaciens dispensateurs et des patients bénéficiaires.
- Permettre l'accès aux médicaments par les citoyens.
- Favoriser l'épanouissement, la créativité et l'expression des hommes et des femmes qui composent l'entreprise.

III-Fiche signalétique de ZENITH pharma :

Tableau 1: fiche signalétique de la société ZENITH Pharma

Siège social	Usine 96, Zone Industrielle Tassila, Inzegane,
---------------------	--



	Agadir
Direction générale et marketing	Les Alizés, la colline 2n° 33, sidi maârouf 20270 CASABLANCA
Forme juridique	Société Anonyme S.A
Capital	12 000 000, 00 DHS
Dénomination sociale	ZENITH Pharma
Activité	Fabrication et importation des produits pharmaceutiques
Nombres d'employés	180
Identification fiscale	6949982
Patente	49706788
Tél	05 28 83 83 74
Fax	05 28 83 79 25
Site web	www.Zenithpharma.ma

IV-Organigramme de ZENITH Pharma :

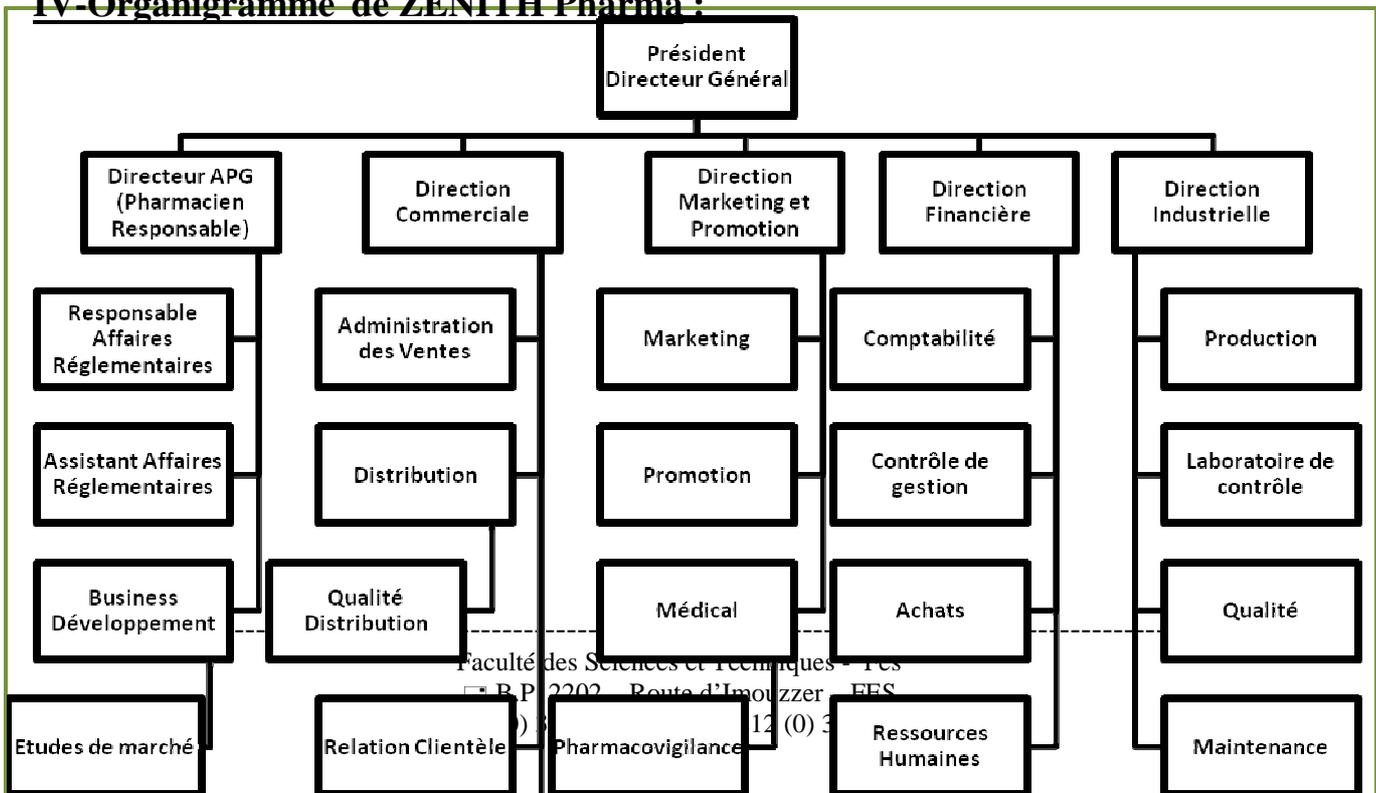




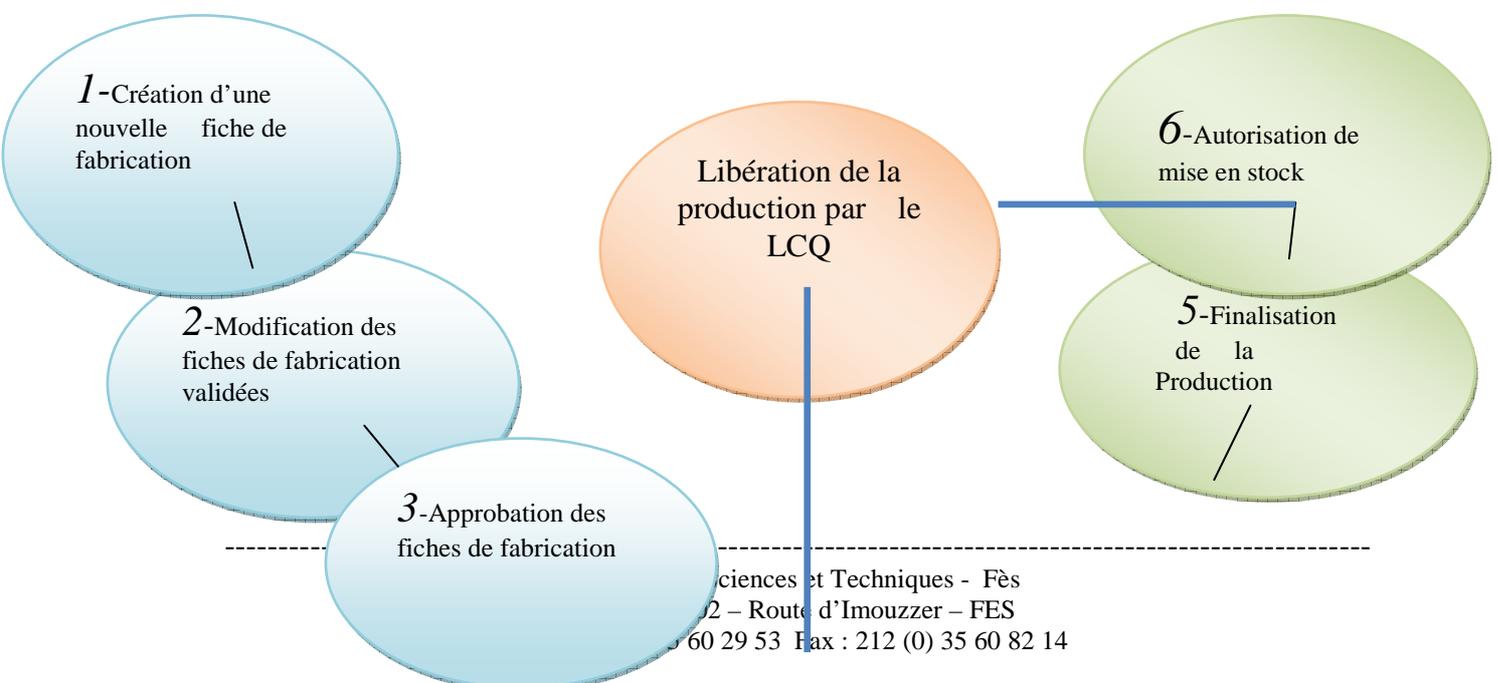
Figure 1: Organigramme de ZENITH Pharma

V-Présentation du laboratoire de contrôle :

Le laboratoire de contrôle a pour but de contrôler la qualité des produits fabriqués suivant les recommandations des bonnes pratiques de fabrication (BPF), des bonnes pratiques de laboratoires (BPL) et des procédures organisationnelles afin d'assurer la conformité (aux normes européennes) et la qualité des matières premières, des articles de conditionnement réceptionnés et des produits fabriqués.

Au laboratoire de ZENITH Pharma, le contrôle de la qualité est effectué selon les techniques établies par le commettant, c'est-à-dire le groupe Tecnimede, mais également selon les normes de la **Pharmacopée Européenne**, The **United States Pharmacopeia (USP)** et the **British Pharmacopeia (BP)**.

Le laboratoire de contrôle a un rôle majeur et primordial dans l'obtention de l'AMM précisément dans la phase de validation (validation analytique et validation du procédé de fabrication), de plus il travaille conjointement avec le service qualité de l'entreprise.



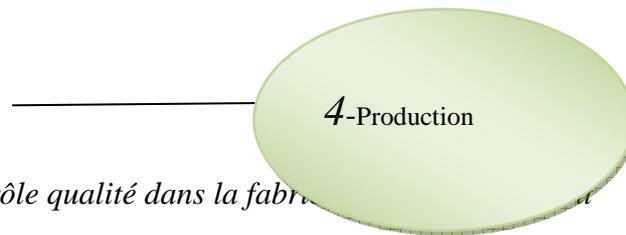


Figure 3 : Le rôle du laboratoire de contrôle qualité dans la fabrication

Le contrôle et assurance qualité dans l'industrie pharmaceutique

I-Quelques notions sur le système qualité des produits pharmaceutique

Aujourd'hui le mot 'médicament' admet une définition unique. Selon l'article 1 de la loi N° 17-04 - { on entend par médicament toute substance ou composition présentée comme possédant des propriétés curatives ou préventives à l'égard des maladies humaines ou animales , ainsi que tout produit pouvant être administré à l'homme ou à l'animal , en vue d'établir un diagnostic médical ou de restaurer , corriger ou modifier leurs fonctions organiques }.

Les médicaments associent principe actif (substance possédant des propriétés pharmacologiques à la base de l'effet thérapeutique) et excipient (support à la matière active sans action pharmacologique, nécessaires à la fabrication, l'administration ou la conservation des médicaments).

Selon l'organisme Mondiale de la santé (OMS), le fondement de la stratégie thérapeutique est la qualité, la sécurité et l'efficacité des médicaments est un principe cardinal dans la pratique de la pharmacie .Un des éléments clés de l'assurance qualité, les Bonnes Pratiques de Fabrication, qui comprennent entre autres, le contrôle Qualité.

De plus, le domaine de la qualité foisonne d'outils et de méthodes et parmi les mesures pratiques de l'assurance qualité du médicament, la qualification et la validation.

1-Notion d'assurance et contrôle qualité du produit pharmaceutique :

1.1-La qualité :

La qualité des médicaments est évidemment de la plus haute importance du point de vue de la santé publique. Lorsqu'on crée un médicament nouveau, il faut commencer par en établir la qualité (les études toxicologiques et cliniques n'auraient aucun sens si le produit ne présentait pas une qualité adéquate et uniforme et si l'on n'avait pas la garantie que celle-ci ne pourrait éventuellement varier que d'un lot à l'autre et dans le temps mais dans des limites bien précises). Par ailleurs, le contrôle de la qualité d'un médicament constitue le premier indicateur, relativement facile à établir, que les caractéristiques du produit peuvent avoir évolué de manière à en avoir peut-être altéré aussi l'innocuité et l'efficacité.

Le Comité OMS d'experts des spécifications relatives aux préparations pharmaceutiques a défini la "qualité" comme suit:



Il dépend de deux groupes de deux facteurs qu'un médicament convienne à l'usage auquel on le destine:

- a) son efficacité et son innocuité à celle-ci limitant celle-là à qui doivent correspondre aux indications de l'étiquette de la campagne de lancement ou de la publicité;
- b) sa conformité aux spécifications: identité, activité, pureté et autres caractéristiques.

1.2 –Notion de l'assurance qualité :

L'assurance de la qualité est une vaste notion puisqu'elle couvre tous les éléments qui, individuellement ou collectivement, influencent la qualité d'un produit. Elle concerne l'ensemble des dispositions prises pour garantir que la qualité des produits pharmaceutiques correspond à l'usage auquel ils sont destinés. Il s'agit d'un système d'organisation et de surveillance du processus tout entier, depuis l'acquisition d'une substance pharmaceutique jusqu'à sa transformation en un produit fini mis à la disposition du consommateur. Son but est d'assurer à l'usager un produit qui satisfait à l'ensemble des spécifications et des normes établies tout au long de sa durée de conservation et à toutes les étapes de l'approvisionnement, et qui est sans danger, efficace et de bonne qualité.

1-3-Les bonnes Pratiques de la fabrication (BPF) :

Les bonnes Pratiques de la Fabrication des médicaments constituent un des éléments de l'assurance de la qualité qui garantit que les produits sont fabriqués et contrôlés de façon Selon les normes de qualité adaptées à leur emploi .Les BPF s'articulent autour des [5M] (Matériels, Méthodes, Main-d'œuvre, Matière, Milieu).

Le but des bonnes pratiques de fabrication est de régir la fabrication des produits pharmaceutiques, mais certains de leurs éléments peuvent être appliqués par les distributeurs et les grossistes. Elles sont donc à la base des inspections effectuées par l'organe de réglementation pharmaceutique.

1.4-Champ d'application des systèmes d'assurance de la qualité des produits pharmaceutiques :

Ils doivent couvrir la conception et le développement des médicaments, l'homologation, l'acquisition des matières premières, l'importation et la fabrication industrielle des produits pharmaceutiques, leur préparation dans les pharmacies et toutes les formes de distribution, y compris la vente de gros et de détail.

1.5-Notion de contrôle qualité :



Le contrôle de la qualité fait partie des bonnes pratiques de fabrication ; il concerne l'échantillonnage, les spécifications, le contrôle, ainsi que les procédures d'organisation de documentation et de libération qui garantissent que les analyses nécessaires et appropriées ont réellement été effectuées eu que les matières premières, les articles de conditionnement et les produits ne sont pas libérés pour l'utilisation, la vente ou l'approvisionnement sans que leur quantité n'ait été jugée satisfaisante.

C'est donc l'ensemble des mesures visant à assurer la production des produits conformes aux spécifications et les exigences des clients.

1.6- Bonnes pratiques de fabrication et contrôle de la qualité des produits pharmaceutique :

L'assurance de la qualité appliquée à la fabrication des médicaments et garantissant notamment la bonne organisation des activités de production et de contrôle est essentielle pour que le consommateur reçoive des médicaments satisfaisant aux normes. C'est à la Vingt-huitième Assemblée mondiale de la Santé, en 1975, qu'a été adopté le texte original des "bonnes pratiques de fabrication et de contrôle de la qualité des médicaments". Un texte révisé a été approuvé par le Comité OMS d'experts des Spécifications relatives aux Préparations pharmaceutiques sous le titre "Bonnes pratiques de fabrication des produits pharmaceutiques". Il se compose de trois parties:

- Gestion de la qualité dans l'industrie pharmaceutique: principes et éléments essentiels;
- Bonnes pratiques de production et de contrôle de la qualité;
- Directives complémentaires (comportant des sections sur les produits pharmaceutiques stériles et les bonnes pratiques de fabrication des principes actifs).

LA VALIDATION ANALYTIQUE

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

De plus pour tout laboratoire, la validation analytique est une nécessité universellement reconnue, en vue de la garantie d'un système d'assurance qualité complet. C'est une composante de mesure que tout laboratoire devrait utiliser pour assurer qu'il produit des résultats précis et sûrs, la qualité des résultats étant extrêmement liée à la validation analytique.

Dans le domaine pharmaceutique, l'exigence de la validation est avant tout une pratique réglementaire. Au Maroc, selon la dernière circulaire du ministère de la santé N°49DMP/00 du 16 juillet 2003, toute méthode analytique décrite dans le dossier d'AMM doit être accompagnée d'une validation complète. [1]

I. DEFINITION :



La validation d'une méthode d'analyse se définit comme « *la confirmation par examen et l'apport de preuves objectives, du fait que les prescriptions particulières en vue d'une utilisation prévue déterminée sont remplies* » [2]

► Valider, c'est démontrer qu'elles correspondent à l'utilisation pour laquelle elles sont proposées et permettent de minimiser les essais effectués et minimiser les deux risques de premier et deuxième espèces c'est à dire le risque d'accepter une procédure qui ne serait pas suffisamment exact ou, au contraire, de rejeter une procédure qui serait fiable.

II. HISTORIQUE DE LA VALADITION ANALYTIQUE

A la suite de rencontres entre l'industrie pharmaceutique américaine et les états unis d'Amérique (USP) en 1985, Les premières publications sur la validation analytique firent surface.

En 1986, un premier texte officiel intitulé : «current concept for the validation of compendial assays» est publié dans le pharmacopoeial forum. L'année suivante, 1987, une note explicative européenne sur la validation analytique (CEE III/ 844/87) est publiée. Cette note sera adoptée en août 1989. Toujours en 1989, l'USP publie, dans son 9^{ème} supplément, « validation of compendial methods, 1225 », texte officialisé dans cette même pharmacopée le 1er janvier 1990.

En 1992 la société française des sciences et techniques pharmaceutiques (SFSTP) publie, dans STP pharma pratiques, un guide pour la validation analytique. Cette proposition a connu un succès beaucoup plus vaste puisqu'il a servi de support pour le développement du logiciel AVA (Qualilab, Orléans). Le sujet est ensuite repris par L'International Conférence on Harmonisation (ICH) qui publie en 1994 un premier document sur les définitions, «Validation of analytical procedure : Terminology and definitions (Q2A)». Cette publication est complétée en 1996 par une seconde publication (Q2B) expliquant comment on peut conduire une validation analytique « Validation of analytical procedure : Methodology ».[3]

La division « centre for Drug Evaluation and research » de la FDA a entre temps son guide : « Validation of chromatography methods – Reviewer guidance » en 1994.

En 2000, la FDA publie son draft le CDER Draft intitulé « Analytical procedure and method validation ». En 2002, une directive de la commission européenne a été émise la « Directive 2002/657/EC (SANCO) » en complément à la directive 96/23/EC au sujet des performances des méthodes analytiques et à l'interprétation des résultats. Une mise à jour de celle-ci a été émise en 2006.

La SFSTP Pharma a également publié en 2003, une harmonisation des démarches comportant des généralités quant à la validation des procédures analytiques quantitatives, suivie d'une publication en 2006, comportant des recommandations quant aux calculs statistiques à effectuer. [4 ; 5]



III. TEXTE DE REFERENCE POUR LA VALIDATION ANALYTIQUE

La validation analytique est régie par des textes réglementaires ou des référentiel tels ceux de l'ICH qui représentent la référence internationale de base en matière de validation analytique pour l'industrie pharmaceutique [6], La FDA, l'EURACHEM, l'European Medicines Agency (EMA), l'International Union of Pure and Applied chemistry (IUPAC), l'Association of Official Analytical Chemists (AOAC). Toutes ces références décrivent et définissent les critères de validation à prendre en considération pour toute validation analytique, sans pour autant en donner une méthodologie expérimentale. En effet toutes ces références se limitent à des concepts généraux. C'est pour ces raisons que des guidelines pratiques ont été mis en place afin de faciliter la tâche aux analystes désireux de la réalisation de la validation de leurs procédures d'analyse.

IV. OBJECTIF DE LA VALIDATION ANALYTIQUE

L'objectif de la validation des méthodes d'analyse est de démontrer qu'elles conviennent aux usages auquel on les destine [6] qu'elles conviennent à l'usage pour lequel elles sont prévues. [7] Une validation analytique permet de donner aux laboratoires ainsi qu'aux autorités compétentes, les garanties que chaque mesure qui sera réalisée ultérieurement en routine, une fois la procédure validée, sera suffisamment proche de la « vraie valeur » inconnue de l'échantillon ou du moins comprise dans une limite acceptable, en fonction de la finalité de la procédure. Le but est de minimiser le risque tant au niveau du producteur que du futur consommateur. [4]

V. LES REGLES D'OR DE LA VALIDATION ANALYTIQUE :

Le processus de validation doit toujours répondre à trois exigences, généralement appelées également « les règles d'or » : [8]

1. Toute la méthode doit être validée. L'intérêt devrait non seulement être porté sur la technique de détection ou la mesure instrumental mais également sur étapes préparatoire, d'extraction ou de dilution de l'échantillon. En effet ces dernières font également partie de la méthode analytique et sont de plus grande importance.
2. La gamme de concentration en entier doit être validée. Cette tâche pourrait s'avérer difficile à cause du fait qu'une méthode peut fonctionner dans une gamme de concentration particulière mais pas dans d'autre.
3. Toute la gamme des matières doit être validée. En effet une matrice peut exercer un effet décisif sur l'analyse.



VI. CHAMP D'APPLICATION :

Le champ d'application de la validation analytique s'étend à toute procédure d'analyse utilisée dans 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. [7]

VII. LES CRITERES DE LA VALIDATION :

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. Les critères à prendre en considération diffèrent selon la nature d'essai à entreprendre. Le tableau ci-dessous, présente un récapitulatif de ces critères :

Tableau 2 : Tableau des critères de validation analytique

Types de test	Dosage	Impuretés		Identification	Dosage bio analyse
		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	✓	✓	✓		

1. Spécificité/Sélectivité

La spécificité d'une procédure analytique est sa capacité à permettre l'évaluation univoque de la substance à analyser, en présence des autres composants susceptibles de l'accompagner. Ceux-ci comprennent typiquement les impuretés, les produits de dégradation, la matrice, etc. [6]

Cette définition se traduit comme suivant :

- Identification : garantir l'identité de la substance à analyser
- Essais de pureté : garantir que l'ensemble des procédures analytiques appliquées permettent une évaluation exacte de la teneur en impuretés d'une substance (substances apparentées, métaux lourds, solvants résiduels, etc.)
- Dosage : fournir un résultat exact permettant d'évaluer avec exactitude la concentration ou l'activité de la substance à analyser un échantillon.

2. 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 la substance à analyser (dans l'échantillon) [6]* sur lequel il a été démontré que la procédure possède une fidélité, une exactitude et une linéarité appropriées.

Pour établir la linéarité, il convient d'établir un graphique des réponses obtenues en fonction de la concentration/teneur ; d'au moins cinq échantillons de concentrations différentes, et de procéder à une évaluation visuelle de ce graphique. Si la relation est linéaire, il faut alors analyser les résultats par des méthodes statistiques appropriées, par exemple en calculant la droite de régression par la méthode des moindres carrés. Il peut être nécessaire dans certains cas, pour obtenir une relation linéaire entre résultats de dosage et concentration, d'appliquer une transformation mathématique aux résultats d'essai avant d'effectuer l'analyse de régression. Les informations fournies par la droite régression peuvent être utile pour obtenir des estimations mathématiques du degré de linéarité.

3. 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 » [9]. Elle est parfois appelée justesse.



Pour exprimer l'exactitude, il est recommandé de déclarer le pourcentage de récupération de la substance dont une quantité connue a été ajoutée à l'échantillon, ou la différence entre la valeur moyenne et la valeur considérée comme véritable avec les intervalles de confiance. [6]

4. 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'essai provenant d'un même échantillon homogène, dans les conditions prescrites » [10]. Elle peut être considérée à 3 niveaux : répétabilité, fidélité intermédiaire et reproductibilité. [6]

La fidélité au moyen d'échantillons homogènes authentiques. Cependant, s'il n'est pas possible d'obtenir un échantillon homogène, elle peut être évaluée au moyen d'échantillons préparés artificiellement ou d'une solution échantillon.

La fidélité d'une procédure analytique est en général exprimée en termes de variance, d'écart type ou de coefficient de variation d'une série de résultats de mesure.

❖ Répétabilité

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

❖ Fidélité intermédiaire

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

❖ Reproductibilité

La reproductibilité est l'expression de la variabilité inter-laboratoires (études collaboratives, généralement conduites aux fins de standardisation de la méthode). [6]

5. Limite de détection

La limite de détection d'une procédure analytique donnée est la plus petite quantité de la substance considérée qui peut être détectée dans un échantillon, sans forcément pouvoir être quantifiée, dans un échantillon, sans forcément pouvoir être quantifiée de façon exacte.

6. Limite de quantification

Limite de quantification d'une procédure analytique est « la plus petite quantité de la substance considérée qui peut être quantifiée, dans un échantillon, avec une exactitude et une fidélité appropriées ». La limite de quantification est un paramètre intervenant dans l'analyse quantitative des substances présentes à faible concentration dans des matrices échantillon ; elle est notamment utilisée pour le dosage des impuretés et/ou des produits de dégradation.



7. 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 à la procédure* » ; elle donne une indication de la fiabilité de la procédure dans les conditions normales d'application. [6]

VIII. DEMARCHE DE LA VALIDATION ANALYTIQUE

Une validation analytique part d'un protocole, et se solde par un rapport. Le protocole définit avant de lancer réellement l'étape de validation. Ensuite à l'issue des manipulations, le rapport devra inclure les résultats expérimentaux, l'exploitation statistique, des interprétations, des commentaires et des conclusions. [12]

IX. SYSTEME DOCUMENTAIRE

La documentation est le principal support d'une approche méthodologique. Elle permet d'établir et de prouver une démarche censée, raisonnée, scientifiquement justifiée, apportant la preuve que le procédé est maîtrisé et contrôlé. Aussi elle est une preuve et un élément de transparence vis-à-vis d'éventuelles inspections. Elle permet de retracer l'historique et l'ensemble des actions menées au cours de la validation. La documentation liée à la validation est composée de :

- Un plan de validation
- Un protocole de validation
- Un rapport de validation

✓ Le protocole de validation

Ce document décrit comment la validation va être réalisée, et comprend les points suivants :

- Une description claire des objectifs (dossier d'AMM etc)
- Une définition des intervenants et leurs responsabilités
- Des références à des procédures générales de validation
- Une présentation du plan expérimental à suivre
- Une référence à la procédure d'analyse écrite à l'issue de la mise au point analytique de la méthode
- Une indication sur les outils statistiques et les arbres de décision à appliquer
- Une proposition de la structure du rapport de validation. [3]

✓ Le rapport de validation

Après réalisation des manipulations et traitements statistiques des données, un rapport devrait être rédigé. Ce rapport doit être en parfait accord avec les règles de BPF. Les recommandations suggèrent que :



-
- La structure du rapport soit pensée dès la rédaction du protocole.
 - L'ensemble des données brutes doivent être consignées
 - En complément des détails statistiques, une synthèse doit être prévue
 - Une conclusion sur chaque critère et une conclusion générale doivent être faites. [12]

X. LA REVALIDATION ANALYTIQUE

Il peut être nécessaire de revalider dans les circonstances suivantes :

- Modification de la voie de synthèse de la substance pharmaceutique,
- Modification de la composition du produit fini,
- Modification de la procédure analytique.

La revalidation sera plus ou moins poussée selon la nature des changements. D'autres changements peuvent aussi rendre nécessaire une revalidation. [6]

Après avoir fait une présentation théorique de la validation analytique et des différents critères à prendre en considération afin de mener à bien, ce rapport de ce stage consiste à présenter une partie pratique dans laquelle une application de toutes ces notions est effectuée.

En effet, dans cette partie expérimentale, une validation analytique de la méthode de détermination du taux de dissolution d'une spécialité pharmaceutique, par spectroscopie

UV-visible, afin de l'utiliser comme alternative à la chromatographie liquide normalement utilisée.

En effet cette technique va permettre d'alléger la pression sur la chaîne de chromatographie liquide, largement utilisée dans le laboratoire, et pallier au problème de disponibilité limitée de celles-ci dans le laboratoire de contrôle.



MATERIELS ET METHODES :

I. LA PAROXÉTINE :

La paroxétine, commercialisée dans certains pays sous les noms de Paxil, Deroxat ou Seroxat, est un antidépresseur inhibiteur sélectif de la recapture de la sérotonine mis sur le marché en 1992 par la compagnie GlaxoSmithKline. Il en existe aujourd'hui plusieurs génériques. Elle est généralement commercialisée sous forme de chlorhydrate hémihydrate de paroxétine (en bref : chlorhydrate de paroxétine), parfois sous forme de chlorhydrate anhydre de paroxétine ou de mésilate de paroxétine. Le 2 juillet 2012, GlaxoSmithKline (GSK) a payé 3 milliards de dollars pour conclure le plus gros accord pour fraude de l'histoire de l'industrie pharmaceutique. Cela concernait le Paxil, le Wellbutrin (bupropione) et l'Avandia (rosiglitazone).

Chimie :

La paroxétine est un dérivé de la phénylpipéridine du groupe des inhibiteurs sélectifs de la recapture de la sérotonine. Sa formule empirique est $C_{19}H_{20}FNO_3$, avec une masse moléculaire (329,3703 en tant que base libre).

Elle est identifiée par la base de données PubChem sous le code 96195 et par la base de données DrugBank sous le code APRD003646.

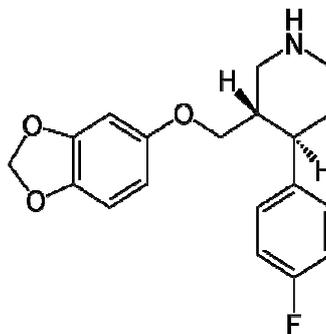


Figure 4 : Formule développée de la Paroxétine

Pharmacologie :



C'est un antidépresseur de la sous-classe des Inhibiteurs sélectif de la recapture de la sérotonine. Elle atteint sa concentration maximale en 4,9 heures (si la prise se fait au cours d'un repas), en 6,4 heures (si la prise se fait à jeun).

Le test de dissolution des comprimés contenant la Paroxétine, a été validée en utilisant la spectrophotométrie UV /visible, cette dernière doit donc être validée avant son adoption pour le contrôle de routine des lots de produits finis.

II. L'ESSAI DE DISSOLUTION :

1. Généralités :

La dissolution est une réaction hétérogène qui consiste en un transfert de matières d'un solide vers une phase liquide. Dans le contexte de l'industrie pharmaceutique, la dissolution peut être définie comme étant la quantité de substance active qui entre en solution par unité de temps dans les conditions standards.

Le test de dissolution est l'une des techniques d'analyses les plus couramment utilisées dans les laboratoires de contrôles de l'industrie pharmaceutique, cet outil permet l'estimation de la libération du principe actif de sa forme galénique dans le tractus digestif.

2. Principe :

Cet essai est destiné à déterminer la vitesse de dissolution des principes actifs des formes solides (telles que les comprimés, les capsules) en utilisant un appareil déterminé et dans des conditions opératoires bien définies. Il consiste à mesurer avec précision, dans des conditions standardisées en fonction du temps, la quantité de substance active libérée par la forme médicamenteuse, passant en solution après immersion dans un milieu liquide approprié. Pour le mener à bien, la forme solide est introduite dans la cuve à un temps T_0 et des prélèvements sont effectués à un intervalle de temps régulier pendant un temps T . L'ensemble des valeurs obtenues dans cet essai conduit à l'établissement d'une courbe de dissolution en portant en ordonnées les pourcentages dissous et en abscisse le temps.

Pour chaque préparation de l'essai, les informations ci-dessous sont données dans les monographies :

- ❖ L'appareil à utiliser
- ❖ La composition, le volume et la température du milieu de dissolution
- ❖ La vitesse de rotation des palettes ou des paniers
- ❖ L'intervalle de temps, la méthode et le volume d'échantillonnage de la solution à examiner
- ❖ La méthode d'analyse (UV, HPLC)
- ❖ La quantité de principes actifs qui doivent se dissoudre dans l'intervalle de temps donné.



3. Appareillage utilisé dans la dissolution de la Paroxétine :

Selon la Pharmacopée Européenne, il y a trois façons de mesurer la dissolution. Chaque méthode se fait sur un comprimé et doit être répétée 5 fois. Les conditions opératoires doivent également être précisées (conditions analytiques). Il est possible de mesurer la dissolution avec un appareil à palette tournante. Il s'agit de déposer le comprimé au fond d'un bécher en verre borosilicaté à fond hémisphérique et de faire tourner une palette de forme et de grandeur définie dans le récipient. Une autre méthode consiste à remplacer la palette par un panier de forme cylindrique grillagé contenant le comprimé. Il s'agit de l'appareil à panier tournant. Cette méthode est moins reproductible que l'appareil à palette tournante. Le choix de l'appareillage dépend des caractéristiques physico-chimiques de la forme pharmaceutique.

Tableau 3 : conditions opératoires

Equipement	Dissolutest à palettes et spectrophotomètre UV-visible
Milieu de dissolution	2g de NaCl dans 7 ml de HCl et compléter avec l'eau purifiée dans une fiole de 1L
Volume de dissolution	900 ml
Appareil	Palettes
Température	37±0.5°C
Nombre de verres	6
Temps d'échantillonnage	Après 60 min
Rotations	60 rpm

L'appareil à palettes touranante, est décrit dans les pharmacopées européennes.



Figure 5: le dissolutest à palettes

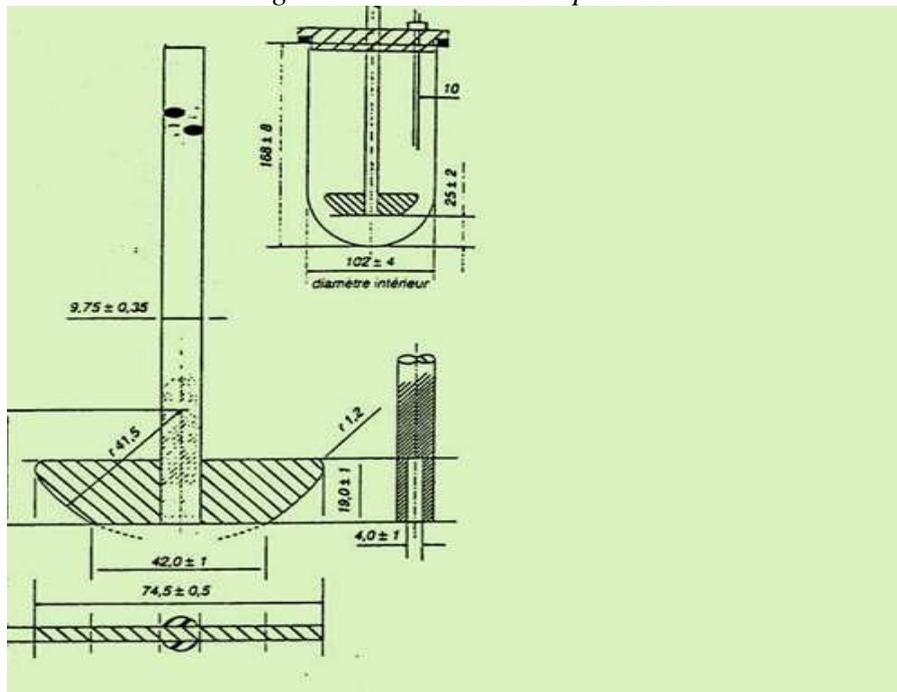


Figure 6 : les dimensions des palettes et les vases utilisés

Il est constitué de 6 récipients cylindriques en verre borosilicaté, d'une capacité maximale de 1L contenant le milieu de dissolution maintenu en agitation par une palette en rotation .C'est dans ces réacteurs qu'est introduite la forme à tester. Les réacteurs baignent dans bain maintenu à une température constante.

III. LA SPECTROPHOTOMETRIE UV-VISIBLE :

1. Définition :

La spectrophotométrie est une méthode analytique quantitative qui consiste à mesurer l'absorbance ou la densité optique d'une substance chimique donnée, généralement en solution. Plus l'échantillon est concentré, plus il absorbe la lumière dans les limites de proportionnalité énoncées par la loi de Beer-Lambert. La densité optique des échantillons est déterminée par un spectrophotomètre préalablement étalonné sur la longueur d'onde d'absorption de la substance à étudier.

2. Principe :

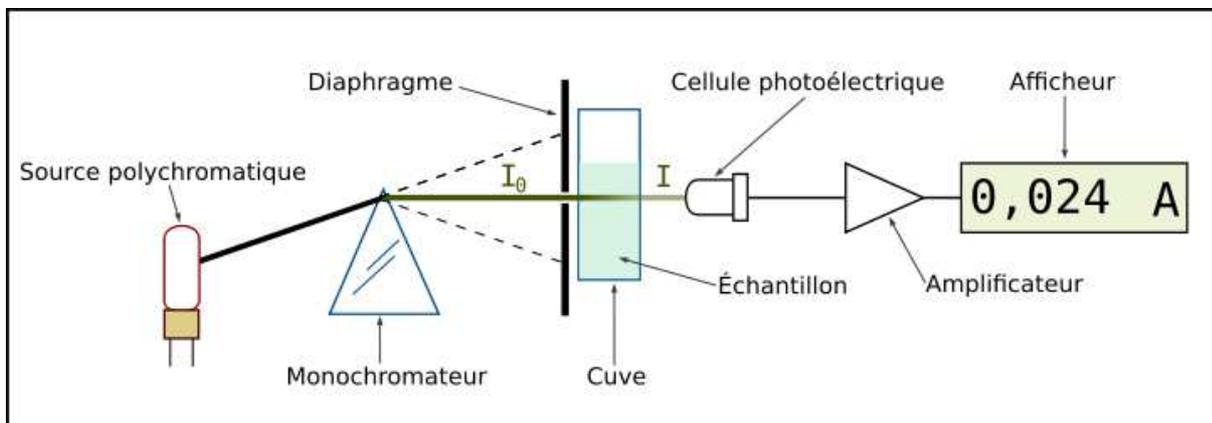


Figure 7 : Schéma de principe du spectrophotomètre UV-visible monofaisceau

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.

Loi de Beer-Lambert :

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

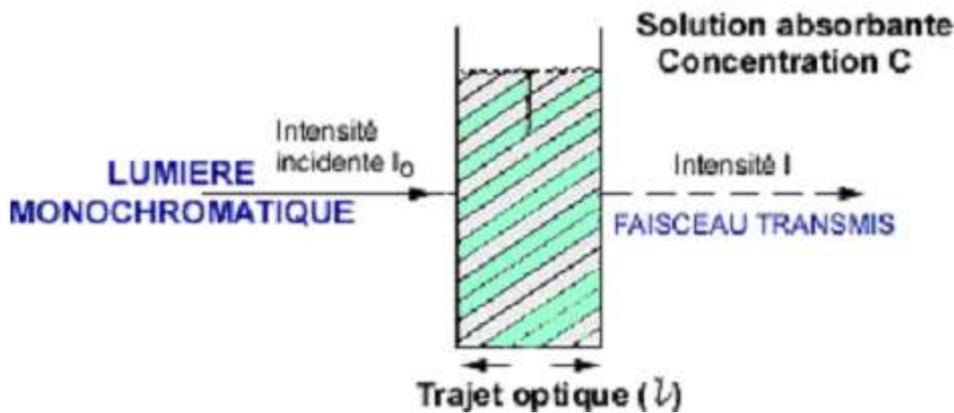


Figure 8: le principe de la loi de Beer-Lambert

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_0 est l'intensité de la lumière incidente

$$I = I_0 e^{-klC}$$

* I est l'intensité après passage à travers l'échantillon (intensité transmise)

* l est la distance traversée par la lumière (épaisseur de la cuve) (en cm)

* T : transmittance

* C est la concentration des espèces absorbantes

* k est une constante caractéristique de l'échantillon.

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

On obtient alors la relation qui est connue par la relation de Beer- Lambert :

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

ϵ : est le coefficient d'extinction molaire ; ϵ est une caractéristique de la substance étudiée à une longueur d'onde donnée. Si C est la molarité, ϵ est en $L.mol^{-1}.cm^{-1}$.

IV. MATERIELS ET APPAREILLAGE :

- Balance analytique Precisa XR 205 SM-DR



- Pipettes et fioles
- Dissolutest Erweka DT 700
- Le spectrophotomètre Lambda 25 UV/Vis, piloté par le logiciel UVWinlab , les mesures se font dans des cuves en quartz de 1 cm.

V. REACTIFS :

- Paroxétine
- Excipients de la forme pharmaceutique (Opadry,cellulose ..)
- Milieu de dissolution

VI. METHODOLOGIE DE VALIDATION :

1. spécificité :

1.1 Objectif :

vérification du fait que le dosage par l'UV permet de doser de façon univoque le principe actif Paroxétine lors de l'essai de dissolution même en présence d'autres composés tels les excipients

1.2 Mode opératoire :

Détermination de l'absorption à 293 et 380 nm de 3 solutions : placebo, principe actif seul, FPR (forme pharmaceutique reconstituée) dans des cuves de 1cm, et en utilisant le milieu de dissolution comme blanc la préparation des 3 solutions est comme suit :

- a. Solution placebo : 208 mg d'excipient dans 900 ml de milieu de dissolution
- b. Solution du principe actif seul : 22 mg de la Paroxétine dans 900 ml de milieu de dissolution
- c. Solution de la forme pharmaceutique reconstituée : 208 mg d'excipients et 22 mg du principe actif Paroxétine dans 900 ml de milieu de dissolution.

1.3 Critères d'acceptation :

La méthode d'analyse du taux de dissolution de Paroxétine est considérée spécifique et sélective si on n'observe aucune absorbance au niveau de la solution placebo, et une absorbance similaire au niveau de la solution du principe actif seul et celle de la forme pharmaceutique reconstituée.

2. Linéarité :



2.1 Objectif :

Apporter la preuve que les résultats obtenus dans l'intervalle de mesure considéré sont directement proportionnels à la concentration en Paroxétine par l'utilisation des tests statistiques.

2.2 Mode opératoire :

Préparation de 3 séries de 2 gammes de concentrations et leur analyse à raison d'une série par jour :

- Une gamme avec la forme pharmaceutique reconstituée.
- Une gamme avec le principe actif.

Tableau 4 : préparation de la gamme avec PA seul

Concentration	Quantité Introduite du PA en mg	Volume final en ml	Concentration finale en $\mu\text{g/ml}$	Solvant
40%	8.8	900	9.77	Milieu de dissolution
60%	13.2		14.66	
80%	17		18.88	
100%	22		24.44	
120%	26.4		29.33	

Tableau 5 : préparation de la gamme avec FPR

Concentration	Quantité des Excipients en mg	Quantité Introduite du PA en mg	Volume final en ml	Concentration finale en $\mu\text{g/ml}$	Solvant
40%	208	8.8		9.77	
60%	208	13.2		14.66	



80%	208	17	900	18.88	Milieu de dissolution
100%	208	22		24.44	
120%	208	26.4		29.33	

- Chaque gamme contient 5 concentrations de 40% jusqu'à 120%

2.3 Critères d'acceptation :

- * Le coefficient de corrélation doit être supérieure ou égale 0.99.
- * Les tests statistiques de validation de la régression linéaire doivent être concluants au risque 5%.

3. L'exactitude :

3.1 Objectif :

Vérification de l'accord entre la valeur moyenne expérimentale et la valeur théorique.

3.2 Mode opératoire :

Déduction de l'exactitude de la méthode à partir des données de l'étude de linéarité par le biais de tests statistiques, pour chaque concentration trois mesures des variables dépendantes sont effectuées. L'opération est répétée pendant trois jours consécutifs.

3.3 Critères d'acceptation :

L'intervalle de confiance doit inclure la valeur 100%.

4. Fidélité : (*répétabilité, fidélité intermédiaire*)

4.1 Objectif :

Démonstration que la méthode est répétable et reproductible. Cette analyse permet de prouver que le degré de dispersion entre une série de dosage provenant de multiples prises d'un même échantillon est acceptable

4.2 Mode opératoire :

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

4.3 Critères d'acceptation :



Le coefficient de variation doit être inférieur à 5%

RESULTATS ET DISCUSSION

I- Résultats :

1- Spécificité (annexe 1) :

D'après l'analyse des spectres obtenus, on constate que il n'y a pas d'absorbance pour le placebo, alors que le principe actif seul et la forme pharmaceutique reconstituée montrent pratiquement la même absorbance.

- Conclusion :

Cette méthode d'analyse permet l'évaluation exclusive du principe actif Paroxétine, même en présence d'excipients, c'est donc une méthode spécifique. L'application de cette technique permettra l'analyse univoque du principe actif même en présence de matrice accompagnante dans la spécialité pharmaceutique.

2- Linéarité :



2.1. Linéarité de la gamme de PA seul (voir annexe 2) :

Tableau 6 : résultats d'étude de linéarité pour le PA seul

jour	% du PA	concentration du PA en µg/ml Xij	Moyennes des Xij	Aa (293nm)	Ab (380nm)	Aa-Ab	Moyenne Yij	Var Yij
1	40%	9,83	9,82	0,1106	0,0056	0,105	0,1039	2,78933E-05
2		9,85		0,1179	0,0093	0,1086		
3		9,78		0,0982	0	0,0982		
1	60%	14,73	14,80	0,1615	0,0023	0,1592	0,1601	8,52033E-05
2		14,85		0,1753	0,0056	0,1697		
3		14,82		0,1513	0	0,1513		
1	80%	19,71	19,64	0,2099	0,001	0,2089	0,2067	2,24433E-05
2		19,51		0,2113	0,0013	0,21		
3		19,71		0,2013	0	0,2013		
1	100%	24,6	24,78	0,2575	0,0013	0,2562	0,2642	5,31233E-05
2		24,62		0,2862	0,0204	0,2658		
3		25,11		0,2705	0	0,2705		
1	120%	29,67	29,48	0,3157	0,0017	0,314	0,3129	5,11E-06
2		29,25		0,3162	0,0018	0,3144		
3		29,51		0,3103	0	0,3103		

$S^2_{ij} = 52,0888381 \quad S^2_T = 0,00587246 \quad S^2_K = 0,006818 \quad \sum S^2_{ij} = 0,000193773$

S^2_{ij} : Variance de toutes les concentrations

S^2_T : Variance totale des absorbances

S^2_K : Variance des moyennes des absorbances

$\sum S^2_{ij}$: Somme des variances des absorbances de chaque groupe

2.1.1. Test d'homogénéité des variances :

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

Hypothèse H0 « il n'y a pas de différence significative entre les variances » (annexe 5)

$$C_{cal} = S^2_{max} / \sum S^2_{ij}$$

$S^2_{max} = 8,52033E-05 \quad \sum S^2_{ij} = 0,000193773 \quad C_{cal} = 0,440 \quad C_{tab} (k=5 ; n=3) = 0.684$

D'après le calcul effectué on constate $C_{cal} < C_{tab}$ donc H0 est acceptée, les variances sont homogènes au seuil de 5%.

2.1.2. Estimation de la droite de régression :

L'équation de la droite de régression est calculée par la méthode des moindres carrés.

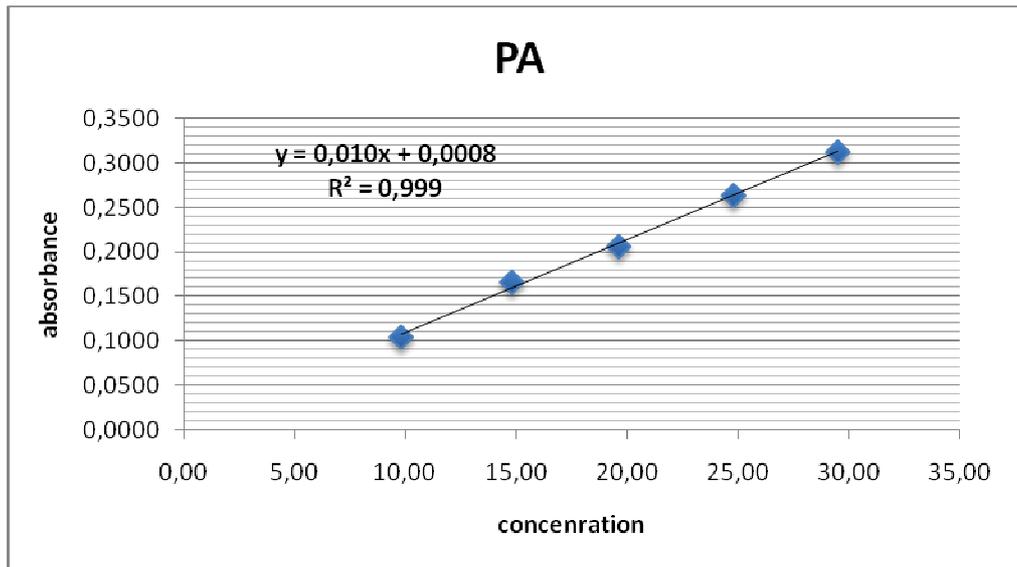


Figure 9: droite de régression de la linéarité pour le PA seul

L'équation de la droite : $Y = 0.01059 X + 0.00085$

La pente a : 0.01059

L'ordonnée à l'origine b : 0.00085

Le coefficient de détermination : 0.999

Le coefficient de corrélation : 0.997

2.1.3. Test d'existence d'une pente significative

On a 2 hypothèses :

H_0 : absence d'une pente significative

H_1 : existence d'une pente significative

Tableau 7 : test d'existence d'une pente significative pour le PA seul

	Degré de liberté	Somme des carrés	Moyenne des carrés	Fcal
Régression	1	0,081823119	0,081823119	2718,5393
Résidus	13	0,000391277	3,00982E-05	
Total	14	0,082214396		

$F_{\text{tab}}(1,13) = 4.67$ (annexe 7)

On constate que $F_{\text{cal}} > F_{\text{tab}}$ H_0 est rejetée donc il existe une pente significative

2.1.4. Test de validité de la droite de régression :

H_0 : « il n'existe pas d'écart significatif entre l'erreur d'ajustement et l'erreur expérimentale »

Tableau 8 : Test de la validité de droite de régression pour le PA seul



Source de variation	Degré de liberté	Somme des carrés des écarts	Variance	Fcal
Erreur de la régression	3	0.000071	0.000024	0.61
Erreur expérimentale	10	0.000388	0.000039	

$F_{tab}(3,10) = 3.71$

On constate que $F_{cal} < F_{tab}$ donc H_0 est acceptée.

2.1.5. Test de comparaison de l'ordonné à l'origine :

Soit S_b l'écart type de l'ordonné à l'origine, on vérifie l'inégalité suivante ; $b/S_b < t(\alpha ; N-2)$. Si cette inégalité est vérifiée on peut affirmer que l'ordonnée à l'origine n'est pas significativement différente de 0 au seuil de 5%.

H_0 « il n'existe pas de différence significative entre l'ordonné à l'origine b et le point 0 »
 La variance de l'ordonné à l'origine S^2_b est exprimée par la relation suivante :

$$S^2_b = S^2_r [1/N + ((\bar{X}_{ij})^2 / S^2_{ij}(N-1))]$$

- $S^2_b = 3,00982E-05 [(1/15 + (19,7^2/52,088*14))] = 1,8024 E-5$
- $S_b = 4,2 E-3$

$t_{exp} = b/S_b = 0,202 \quad t_{tab} = 2,16 \quad \implies t_{exp} < t_{tab} \text{ (annexe6)}$

L'hypothèse H_0 est acceptée, il n'y a pas différence significative entre l'ordonnée à l'origine et le point 0

2.2. Linéarité de la gamme de FPR (voir annexe 3) :

Tableau 9 : résultats d'étude de linéarité pour le FPR seul

jour	% du FPR	concentration du PA en $\mu\text{g/ml } X_{ij}$	Moyennes des X_{ij}	Aa (293nm)	Ab (380nm)	Aa-Ab	Moyenne Y_{ij}	Var Y_{ij}
1	40%	9,85	9,75	0,1026	0	0,1026	0,1001	3,121E-05
2		9,76		0,104	0	0,104		



3		9,63		0,0937	0	0,0937		
1	60%	14,58	14,66	0,1563	0,0076	0,1487	0,1525	1,99433E-05
2		14,61		0,1574	0	0,1574		
3		14,78		0,1513	0	0,1513		
1	80%	19,38	19,40	0,2012	0	0,2012	0,2067	2,37733E-05
2		19,11		0,2086	0	0,2086		
3		19,7		0,2104	0	0,2104		
1	100%	24,61	24,55	0,26	0	0,26	0,2624	8,82333E-06
2		24,53		0,2661	0,0004	0,2657		
3		24,51		0,2614	0	0,2614		
1	120%	29,56	29,57	0,3172	0	0,3172	0,3159	0,00003207
2		29,51		0,3208	0	0,3208		
3		29,63		0,3097	0	0,3097		

$$S^2_{ij} = 52,60285238 \quad S^2_T = 0,00630046 \quad S^2_K = 0,0073 \quad \sum S^2_{ij} = 0,00011582$$

- S^2_{ij} : Variance de toutes les concentrations
 S^2_T : Variance totale des absorbances
 S^2_K : Variance des moyennes des absorbances
 $\sum S^2_{ij}$: Somme des variances des absorbances de chaque groupe

2.2.1. Test d'homogénéité des variances :

Le test de Cochran est appliqué aux variances du groupe Y_{ij} pour vérifier l'homogénéité des variances constitutives de l'erreur expérimentales.

Hypothèse H_0 « il n'y a pas de différence significative entre les variances »

$$C_{cal} = S^2_{max} / \sum S^2_{ij}$$

$$S^2_{max} = 0,00003207 \quad C_{cal} (k=5 ; n=3) = 0.684$$

$C_{cal} < C_{tab}$ Donc H_0 est acceptée les variances sont homogènes au seuil de 5%.

2.2.2. Estimation de la droite de régression

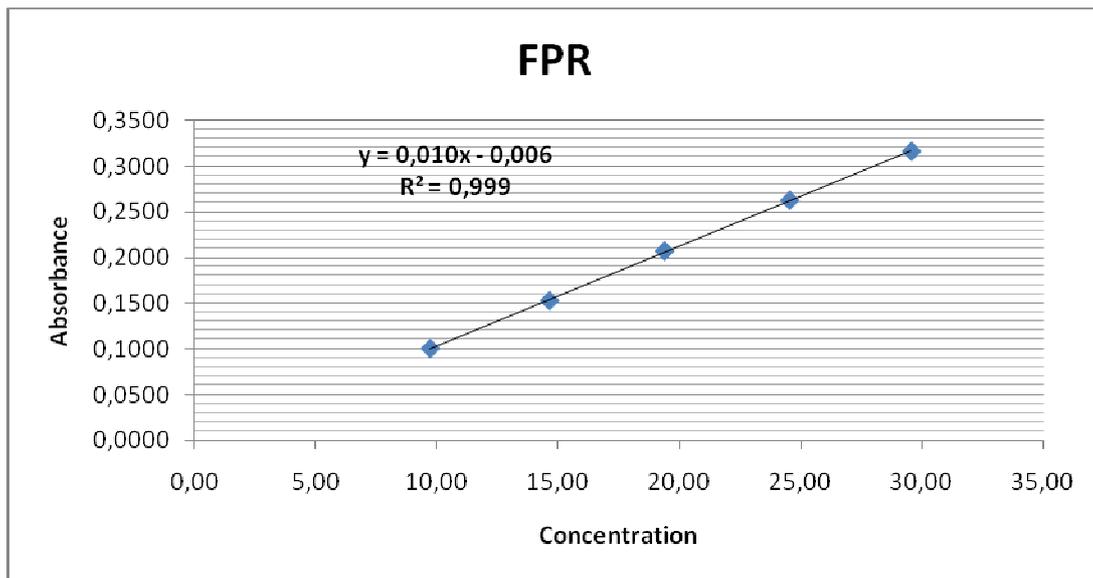


Figure 10 : droite de régression de la linéarité pour FPR

L'équation de la droite : $Y = 0.010 X - 0.006$

La pente a : 0.01093

L'ordonnée à l'origine b : -0.00654

Le coefficient de détermination : 0.999

Le coefficient de corrélation : 0.999

2.2.3. Test d'existence d'une pente significative :

On a 2 hypothèses :

H_0 : absence d'une pente significative

H_1 : existence d'une pente significative

Tableau 10 : Test d'existence d'une pente significative pour FPR

	Degré de liberté	Somme des carrés	Moyenne des carrés	Fcal
Régression	1	0,087952337	0,087952337	4500,073133
Résidus	13	0,00025408	1,95446E-05	
Total	14	0,088206417		

$F_{tab}(1,13) = 4.67$

On constate que $F_{cal} > F_{tab}$ H_0 est rejetée donc il existe une pente significative

2.2.4. Test de validité de la droite de régression :

H_0 : « il n'existe pas d'écart significatif entre l'erreur d'ajustement et l'erreur expérimentale »

Tableau 11 : Test de la validité de droite de régression pour FPR

Source de	Degré de	Somme des	Variance	Fcal



variation	liberté	carrés des écarts		
Erreur de la regression	3	0.000008	0.000003	0.12
Erreur expérimentale	10	0.000232	0.000023	

$F_{tab}(3,10) = 3.71$

On constate que $F_{cal} < F_{tab}$ donc H_0 est acceptée.

2.2.5. Test de comparaison de l'ordonné à l'origine :

H_0 « il n'existe pas de différence significative entre l'ordonné à l'origine b et le point 0 »

La variance de l'ordonné à l'origine S^2b est exprimée par la relation suivante :

$$S^2b = S^2r [1/N + ((\bar{X}_{ij})^2 / S^2_{ij}(N-1))]$$

- $S^2b = 1,95446E-05 [(1/15 + (19,58^2/52,602*14))] = 0,000011477$
- $Sb = 0,003387$

$t_{exp} = b/Sb = 1,9309 \quad t_{tab} = 2,16 \quad \implies \quad t_{exp} < t_{tab}$

L'hypothèse H_0 est acceptée, il n'y a pas différence significative entre l'ordonnée à l'origine et le point 0.

2.3. Comparaison entre la gamme du principe actif seul et la forme pharmaceutique :

2.3.1 Comparaison des pentes des droites de régression des deux pentes :

Cette comparaison s'effectue par le biais de test student suivant :

$t = |a_1 - a_2| / (\sqrt{S^2a_1 + S^2a_2})$ avec $S^2a = S^2r / SCE_x$

D1 : Droite de régression du principe actif seul.

D2 : Droite de régression de la forme pharmaceutique reconstituée.

a_1 : la pente de la droite D1.

a_2 : la pente de la droite D2.

S^2a_1 : variance de la pente de la droite D1.

S^2a_2 : variance de la pente de la droite D2.



$t_{cal} = |0.010592 - 0.010928| / \sqrt{(4.12 \text{ E-}8 + 2.65 \text{ E-}8)} = 1.29$ et $t_{tab} = 2.055$ (annexe6) $t_{cal} < t_{tab}$ il n'y a donc pas de différence significative entre les pentes des deux droites, avec 5% de risque de se tromper. On peut donc conclure l'inexistence d'un effet de matrice.

2.3.2 Comparaison des ordonnées à l'origine des droites de régression des deux pentes :

Cette comparaison s'effectue par le biais du test student suivant :

$$t_{cal} = |b_1 - b_2| / (\sqrt{S^2_{b1} + S^2_{b2}}) \text{ avec } S^2_b = S^2_r [1/N + ((\bar{X}_{ij})^2 / S^2_{ij}(N-1))]$$

b_1 : la pente de la droite D1.

b_2 : la pente de la droite D2.

S^2_{b1} : variance de la pente de la droite D1.

S^2_{b2} : variance de la pente de la droite D2.

$$t_{cal} = |0.000850 + 0.0065004| / \sqrt{(1,8024 \text{ E-}5 + 1.1477 \text{ E-}5)} = 1.35 \quad t_{tab} = 2.055$$

$t_{cal} < t_{tab}$ il n'y a donc pas de différence significative entre les pentes des deux droites, avec 5% de risque de se tromper. On peut donc conclure l'inexistence d'erreur systématique.

❖ Conclusion :

Les différents tests statistiques effectués sont concluants au risque 5%. On peut donc déduire que les courbes des deux gammes, aussi bien la forme pharmaceutique reconstituée, que celle du principe actif seul, peuvent être assimilées à une seule même droite passant par l'origine. La méthode de dosage décrite est donc linéaire dans l'intervalle de concentration choisit.

3. Exactitude :

Tableau 12 : Tableau des résultats de l'étude de l'exactitude

jour	% du FPR	concentration du PA en $\mu\text{g/ml } X_{ij}$	Aa-Ab	concentration retrouvée	recouvrement Y%	moyennes des Y%	variances des Y%
1	40%	9,85	0,1026	9,686065415	98,33568949	96,9298593	20,57667894
2		9,76	0,104	9,818233949	100,5966593		
3		9,63	0,0937	8,845851163	91,85722911		
1	60%	14,58	0,1487	14,03818642	96,28385751	98,21113948	9,202342303
2		14,61	0,1574	14,85951946	101,7078676		
3		14,78	0,1513	14,28364227	96,64169332		
1	80%	19,38	0,2012	18,99450645	98,01086918	100,6299462	6,380901137
2		19,11	0,2086	19,69311155	103,0513425		
3		19,7	0,2104	19,86304253	100,827627		
1	100%	24,61	0,26	24,54558487	99,73825628	100,8933064	1,619035288
2		24,53	0,2657	25,08369962	102,2572345		
3		24,51	0,2614	24,67775341	100,6844284		
1	120%	29,56	0,3172	29,94561354	101,3045113	100,869303	4,047187386
2		29,51	0,3208	30,28547549	102,6278397		
3		29,63	0,3097	29,23756783	98,67555797		



3.1. Test d'homogénéité des variances :

H_0 « les variances sont homogènes au seuil de 5% »

$$S^2_{\max} = 20,5766789 \quad \sum S^2_{ij} = 41,8261451 \quad C_{\text{cal}} = 0,491 \quad C_{\text{tab}} (k=5 ; n=3) = 0.684$$

$C_{\text{cal}} < C_{\text{tab}}$ Donc H_0 est acceptée les variances sont homogènes au seuil de 5%.

3.2. Test de validité des moyennes :

Tableau 13 : Test de la validité des moyennes

Source de variation	Degré de liberté	Somme des carrés des écarts	Variance	Fcal
Variation intergroupe	4	40,08	10,02	1,2
Variation intragroupe	10	83,65	8,37	
Variation totale	14	123,73		

$$F_{\text{tab}} (0,05 ; 4 ; 10) = 3.48$$

On constate que $F_{\text{cal}} < F_{\text{tab}}$ donc H_0 acceptée il n'y a pas de différence statistiquement significative entre les moyennes.

3.3 Estimation d'intervalle de confiance :

$$IC = [Y_m \pm t * S_y / \sqrt{N}]$$

Avec :

Y_m : moyenne totale des recouvrements

S_y : Ecart type totale des recouvrements

t : coefficient de student (ddl = N-1=14)

$$IC = [99,50671 \pm 2.144 * (2,972867 / \sqrt{15})] = [97,86 ; 101,15]$$

L'intervalle comprend 100% donc la méthode est exacte

❖ Conclusion :



Les résultats de l'exactitude confirment que l'intervalle de confiance que du taux de recouvrement moyen comprend la valeur 100% notre méthode est donc bien exacte, son application ultérieure permettre d'obtenir des résultats suffisamment proches des vraies valeurs.

4. La fidélité :

4.1. Coefficient de variation :

- La répétabilité :

Les coefficients de variation de chaque série sont calculés, avec la relation suivante :

$$C.V.= [\text{Ecart type} / \text{Moyenne}] * 100$$

Les résultats de calculs des C.V. sont présentés dans les tableaux suivants :

Tableau 14 : coefficient de variation de l'étude de la répétabilité (jour 1) (annexe 4)

FPR à 100%	quantité introduite en µg/ml	absorbance à 293m	absorbance à 380 nm	Aa-Ab	Absorbance/quantité	Moyenne	Ecart-type	CV%
1	25,25	0,2717	0,0014	0,2703	0,01070495	0,010677569	0,0002447	2,29188577
2	24,68	0,2692	0,0012	0,268	0,010858995			
3	24,92	0,2714	0,0158	0,2556	0,010256822			
4	24,92	0,2702	0,001	0,2692	0,010802568			
5	24,47	0,2669	0	0,2669	0,010907233			
6	24,68	0,26	0	0,26	0,010534846			

D'après ces calculs, la méthode est bien jugée répétable au seuil de risque 5 % car le CV<5%

- La fidélité intermédiaire :

- La série intermédiaire jour 2 :

Tableau 15 : coefficient de variation de l'étude de la fidélité intermédiaire jour 2 (par MAHOU Achraf) (annexe 4)

FPR à 100%	quantité introduite en µg/ml	absorbance à 293m	absorbance à 380 nm	Aa-Ab	Absorbance/quantité	Moyenne	Ecart-type	CV%
1	25,17	0,263	0	0,263	0,010448947	0,010671029	0,0002574	2,41210661
2	24,46	0,2645	0	0,2645	0,010813573			
3	25,08	0,2626	0	0,2626	0,010470494			
4	24,62	0,2735	0	0,2735	0,011108855			
5	24,96	0,2667	0	0,2667	0,010685096			



6	25,24	0,265	0	0,265	0,010499208
---	-------	-------	---	-------	-------------

- La série intermédiaire jour 3 :

Tableau 16 : coefficient de variation de l'étude de fidélité intermédiaire jour 3(annexe 4)

FPR à 100%	quantité introduite en µg/ml	absorbance à 293m	absorbance à 380 nm	Aa-Ab	Absorbance/quantité	Moyenne	Ecart-type	CV%
1	25,36	0,2698	0	0,2698	0,010638801	0,01073888	0,0001015	0,94506757
2	24,58	0,2625	0	0,2625	0,010679414			
3	25,08	0,2684	0	0,2684	0,010701754			
4	25,33	0,2709	0	0,2709	0,010694828			
5	24,44	0,2641	0	0,2641	0,010806056			
6	24,55	0,2679	0	0,2679	0,010912424			

D'après ces calculs on constate que le CV de la série intermédiaire jour 1 ; 2et 3 <5% donc la fidélité intermédiaire est satisfaisante.

Tableau 17 : les résultats de l'étude de la fidélité

Jour	Abs	quantité introduite	quantité retrouvée	recouvrement Y%	Moy (Y%)	Var(Y%)
1	0,2703	25,25	25,51796766	101,061258	100,8027617	5,337412838
1	0,268	24,68	25,30083364	102,5155334		
1	0,2556	24,92	24,13019805	96,83065028		
1	0,2692	24,92	25,41412095	101,9828289		
1	0,2669	24,47	25,19698693	102,9709315		
1	0,26	24,68	24,54558487	99,4553682		
2	0,263	25,17	24,82880316	98,64443051	100,7410171	5,904806362
2	0,2645	24,46	24,9704123	102,0867224		
2	0,2626	25,08	24,79104072	98,84784976		
2	0,2735	24,62	25,82006716	104,8743589		
2	0,2667	24,96	25,17810571	100,873821		
2	0,265	25,24	25,01761535	99,11891977		
3	0,2698	25,36	25,47076461	100,436769	101,3815691	0,91800224
3	0,2625	24,58	24,78160011	100,8201795		
3	0,2684	25,08	25,33859608	101,0310848		
3	0,2709	25,33	25,57461131	100,965698		
3	0,2641	24,44	24,93264986	102,0157523		
3	0,2679	24,55	25,29139303	103,0199309		

4.2. Test d'homogénéité des variances :



H_0 : « les variances sont homogènes au seuil 5% »

$S^2_{\max} = 5,904806362$ $\sum S^2_{ij} = 12,16022144$ $C_{\text{cal}} = 0,485$ $C_{\text{tab}} (k=3 ; n=6) = 0.707$

$C_{\text{cal}} < C_{\text{tab}}$ donc H_0 acceptée les variances sont homogènes

4.3. Test de validité des moyennes :

Tableau 18 : Test de validité des moyennes

Source des variations	Somme des carrés	Degré de liberté	Moyenne des carrés	Fcal	Valeur critique pour F
Entre Groupes	1,498274541	2	0,74913727	0,18481668	3,682320344
A l'intérieur des groupes	60,8011072	15	4,053407147		
Total	62,29938174	17			

à l'aide du test du Fisher a permis de mettre en évidence l'effet du facteur jour il n' y a pas de différence statistiquement significative puisque $F_{\text{cal}} < F_{\text{tab}}$

▪ Conclusion :

Les variances des trois groupes sont considérés homogènes au risque 5% et la fidélité de la méthode est jugée satisfaisante puisque les coefficients de variation de la répétabilité et de la reproductibilité sont inférieurs à 5% et le test de Fisher des série 1 ; 2 et 3 qui a montré que le test n'est pas significatif.

II. Discussion :

Le but du présent travail a été mené à bien, puisque la validation analytique du test de dissolution a bien été satisfaisante. Cette validation s'est basée sur quatre critères.

En effet, ces test statistiques ont fournit la preuve que la méthode est bel bien spécifique, puisqu'elle permet l'analyse univoque du principe actif même en présence des excipients. De plus ces tests statistiques ont permis de démontrer que la méthode est linéaire au risque 5%, qu'elle est exacte comme intervalle de confiance du taux de recouvrement comprend la valeur 100%, et qu'elle est fidèle étant donné que ces coefficients de variation de répétabilité et de la fidélité intermédiaire sont inférieurs à 5% et le test de Fisher pour les séries 1 ; 2 et 3 qui a montré il n' y a pas différence significative entre les moyennes.



CONCLUSION GENERALE



De nos jours, la qualité est requise dans tous les domaines. Mais c'est pour l'industrie pharmaceutique qu'elle représente une importance capitale.

Afin de garantir la qualité des médicaments, le recours à des méthodes analytiques validées est nécessaire. En effet, des résultats analytiques fiables en conformité avec les réglementations internationales sont requis d'autant plus qu'à la base de ces résultats, sont prises des décisions critiques mettant en jeu la vie de milliers de personnes.

Pour mener à bien cette étude, plusieurs référentiels réglementaires, et plusieurs guidelines, sont à la disposition des analystes, mais tous ces référentiels peuvent différer au niveau de plusieurs points.

Par conséquent la validité de la méthode dépend en partie du référentiel, terminologie et méthodologie choisie. Pour cette raison plusieurs tentatives d'harmonisation ont été mises en place.

En 2003, la SFSTP a publié un guide qui propose une nouvelle vision quant aux bases de la validation avec une distinction des règles de décision qui reposent sur le profil d'exactitude. En 2006, un deuxième numéro propose une méthodologie de calcul statistique, simplifiant ainsi la tâche aux analystes et palliant les faiblesses de l'ancienne procédure.

Ainsi, toute industrie soucieuse du perfectionnement de son système qualité se doit de revoir sa politique qualité.

Références Bibliographiques

- [1] : Circulation du ministre de la santé N°49 DMP/00 du 16 Juillet 2003, modifiant complètement la circulation N°48 DMP/00 du 10 Décembre 1998 relative à la procédure de demande d'obtention de l'autorisation de débit d'une spécialité pharmaceutique en pharmacie d'officine ou l'hôpital
- [2] : ISO 17025, 2000, General requirements for the competence of testing and calibration laboratories. ISO, Geneva, Switzerland
- [3] : J. Caporal et E. Chapuzet, validation analytique : du protocole au rapport. STP Pharma Pratiques, 1997. 7 (5) p : 360-363.
- [4] : Ph. Hubert, J.J. Nguyen-Huu, B. Boulanger, E. Chapuzet, P. Chiap, N. Cohen, P.A. Compagnon, W. Dewé, M. Feinberg, M. Lallier, M. Laurentie, N. Mercier, G. Muzard, C. Nivet, L. Valat ; validation of quantitative analytical procedures, Harmonization of approaches Part I. STP Pharma Pratiques 2003. 13(3) 101-138.



-
- [5] Ph. Hubert, J.J. Nguyen-Huu, B. Boulanger, E. Chapuzet, P. Chiap, N. Cohen, P.A. Compagnon, W. Dewé, M. Feinberg, M. Lallier, M. Laurentie, N. Mercier, G. Muzard, C. Nivet, L. Valat ; Harmonization des démarche : I Statistiques, STP Pratique, 2006 ; 16 (1), p : 30-60.
- [6] : International Conference on Harmonization (ICH) of Technical Requirements for registration of Pharmaceuticals for Human Use, Topic Q2 (R1) : Validation of Analytical Procedures : Text and Methodology, 2005.
- [7] : WELAC Guidance Documents WGD2, Eurachem/Western European Laboratory Accreditation Cooperation (WELAC) Chemistry, Teddington, UK, firsted, 1993.
- [8] : EURACHEM, The Fitness for Purpose of Analytical ethods.. A Laboratory Guide to Method Validation and Related Topics, 1998..
- [9] : Feinburg M. Boulanger B Dewé W., Hubert Ph. New advances in method validation and measurement uncertainty aimed at improving the quality of chemical data, Analytical and bioanalytical chemistry, 2004.
- [10] : ICH harmonised tripartite guideline. Validation of analytical procedures: methodology Q2B. international conference on harmonisation of technical requirements for registration of pharmaceutical for human use; 6 novembre 1996. [11] : ISO 17025, 2000, General requirements for the competence of testing and calibration laboratories. ISO, Geneva, Switzerland.