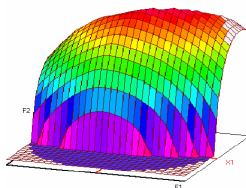


Année Universitaire : 2013-2014



**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**

**La validation analytique et étude statistique de
DONEPEZIL 5 mg comprimé pelliculé
(Nouveau produit "DOZYL")**

Présenté par:

Nom et prénom : Samya ARHERLOU

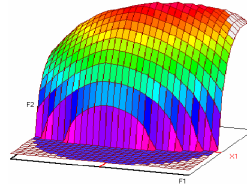
Encadré par:

- Nom et prénom : Charafa MEREZAK BOTTU
- Nom et prénom : EL Mestafa EL HADRAMI FST Fès

Soutenu Le 16 Juin 2014 devant le jury composé de:

- EL Mestafa EL HADRAMI
- B.IHSSANE
- Ch. AMEZIANE

Stage effectué à : BOTTU



Master ST CAC Agiq

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

Nom et prénom: ARHERLOU Samya

Année Universitaire : 2013/2014

**Titre: La validation analytique et étude statistique de DONEPEZIL 5 mg
Comprimé Pelliculé
(Nouveau produit "DOZYL")**

Résumé :

Le contrôle analytique d'un médicament ou de certains de ses constituants est indispensable pour garantir que le médicament en question restera sûr et efficace pendant toute sa durée de validité proposée. Ce contrôle doit autant que possible être effectué selon des spécifications élaborées et validées lors de la mise au point du produit.

La validation des méthodes analytiques a pour principal objectif de s'assurer qu'une méthode analytique donnée donnera des résultats suffisamment fiables et reproductibles, compte tenu du but de l'analyse. Il faut donc définir correctement à la fois les conditions dans lesquelles la méthode sera utilisée et le but dans lequel elle sera employée. C'est dans ce cadre que nous avons réalisé la validation analytique des méthodes de dosage de Donépézil HCl comprimé pelliculé 5 mg par HPLC.

Après traitement et étude statistique des résultats trouvés, nous pouvons juger la validité des méthodes analytiques comme fiables et reproductibles, conformément avec les principes de bonnes pratiques de fabrication. Donc les deux méthodes de dosage de Donépézil HCl sont valides et prêtes à être utilisées comme méthode de routine au sein de laboratoire de contrôle de BOTTU.

Mots clés: Validation Analytique, Qualité, Dosage, Dissolution, Donépézil HCl.

Dédicaces

A **Dieu** Le Tout Miséricordieux, ton amour, ta miséricorde et tes grâces à mon endroit m'ont fortifiée dans la persévérance et l'ardeur au travail.

A ma **Mère**, à celle qui m'a donné le jour, et qui a veillé sur moi dans le total dévouement et abnégation. Je te dédie ce travail en gage de mon profond respect, gratitude, et amour, pour tes sacrifices, ton attention, affection, et réconfort...MERCİ MAMAN
Que dieu ait son âme.

A mon **Père**, à celui qui m'a appris la droiture, la franchise, la responsabilité et le sens du devoir. Je te dédie ce travail en témoignage de ma grande estime, mon respect et mon amour, pour tous les sacrifices pour ta protection, et ta compréhension...MERCİ PAPA.

A mon **Frère** et ma **Sœur**, qui je le sais ma réussite est très importante pour vous. Que Dieu vous paye pour tous vos bienfaits.

A toute la **promotion MST** Chimie et analyse chimique : application à la gestion industrielle de la qualité 2014.
Je vous souhaite une bonne continuation dans votre vie personnelle ainsi que professionnelle.

Samya Arherlou

Remerciement

Avant d'entamer le détail de mon travail, et avant de traiter les différents volets, j'aimerais tout d'abord exprimer ma profonde gratitude à tous ceux qui m'ont beaucoup appris au cours de ce stage, et à ceux qui ont eu la gentillesse de faire de ce stage un moment très enrichissant.

Je tiens à remercier mes encadrantes de stage **Madame. MEREZAK Charafet JAFRI Nadia**, pour m'avoir acceptée dans votre secteur et pour l'intérêt que vous avez porté pour cette étude au long de la période du stage.

Je tiens à exprimer ma profonde reconnaissance à mon encadrant **Monsieur. EL HADRAMEL Mestafa**, qui m'a accordé de son temps précieux, pour son soutien, sa disponibilité pour mener à bien ce modeste projet

Je tiens à remercier **Monsieurs. KABAB** et **MATWAL** Techniciens qualité du laboratoire de contrôle qualité de BOTTU qui ont supervisé mon stage au jour le jour, mais également toute l'équipe de l'entreprise car chacun d'entre vous a su trouver un peu de temps pour m'aider dans ma missions.

Je remercie également messieurs les professeurs membres de jury **Monsieur. B. IHSSANE**
Et **Monsieur. Ch. AMEZIANE** pour leur disponibilité et leurs conseils.

Merci à tous ceux que j'ai omis de citer.

Liste des Abréviations

AC : Articles de conditionnement
ACN : Acétonétrile
AMM : Autorisation de mise sur le marché
BPF : Bonnes pratiques de fabrication
BPL : Bonnes pratiques de laboratoire
CV : Coefficient de variation
DDL : Degré de liberté
HPLC : Chromatographie Liquide à Haute Performance
ISO : organisation internationale de standardisation
ICH : conférence international d'harmonisation
LCQ : Laboratoire de contrôle de qualité
MP : Matière première
PF : Produits finis
R&D : Recherche et développement
SFSTP : Société française de sciences et techniques et pharmaceutiques

Liste des Figures

Figure1 : Organigramme de BOTTU.....	5
Figure2: Organigramme du LCQ.....	6
Figure 3 : Formule chimique du Donépézil.....	18
Figure 4 : Chromatogramme superposés de PA, Placebo, Blanc, Témoin	27
Figure5 :La droite de régression de dosage de Donépézil HCL.....	30
Figure6 : Graphique des résidus de dosage de Donépézil HCL.....	30
Figure7 : Chromatogramme superposés de PA, Placebo, Blanc, Témoin	34
Figure8 : La droite de régression de dosage suite à une dissolution de DonépézilHCL.....	37
Figure9 : Graphique des résidus de dosage suite à une dissolution de Donépézil HCL.....	37

Liste des Tableaux

Tableau n°1 : Comparaison SFSTP-ICH.....	12
Tableau n°2 : Critère d'acceptation de la précision du système.....	22
Tableau n°3 : Préparation des essais de linéarité pour le dosage de Donépézipil.....	22
Tableau n°4 : Préparation des essais de linéarité pour le dosage suite à une dissolution de Donépézipil.....	22
Tableau n°5 : Préparation des essais de linéarité (Impureté A, B, Donépézipil) pour le dosage des substances apparentées de Donépézipil.....	23
Tableau n°6 : Préparation des essais de linéarité (Impureté C) pour le dosage des substances apparentées de Donépézipil.....	23
Tableau n°7 : Critères d'acceptation de la linéarité.....	23
Tableau n°8 : Préparation des essais de l'exactitude pour le dosage de Donépézipil.....	24
Tableau n°9 : Préparation des essais de l'exactitude pour le dosage suite à une dissolution de Donépézipil.....	24
Tableau n°10 : Préparation des essais de l'exactitude (Impureté A, B, Donépézipil) pour le dosage des substances apparentées de Donépézipil.....	25
Tableau n°11 : Préparation des essais de l'exactitude (Impureté C) pour le dosage des substances apparentées de Donépézipil.....	25
Tableau n°12 : Critères d'acceptation de l'exactitude.....	25
Tableau n°13 : Tableau des résultats pour la linéarité de Dosage de DonépézipilHCl.....	28
Tableau n°14 : Tableau de Cochran pour la linéarité de dosage de DonépézipilHCl.....	28
Tableau n°15 : Tableau des Critères de la droite de régression pour le dosage de DonépézipilHCl.....	29
Tableau n°16 : Vérification de l'existence d'une pente significative pour le dosage de DonépézipilHCl par test de Fisher.....	29
Tableau n°17 : Vérification de la validité de la droite de régression de dosage de DonépézipilHCl.....	29
Tableau n°18 : Comparaison de l'ordonnée à l'origine : Test de Student pour le dosage de DonépézipilHCl.....	30
Tableau n°19 : Tableau des standards pour l'exactitude.....	30
Tableau n°20 : Tableau des résultats obtenus pour l'étude de la justesse de dosage de DonépézipilHCl.....	31
Tableau n°21 : Tableau de Cochran pour l'exactitude de dosage de DonépézipilHCl.....	31
Tableau n°22 : Vérification de la validité des moyennes par Test de Fisher pour le dosage de DonépézipilHCl.....	31
Tableau n°23 : Estimation de l'intervalle de confiance du recouvrement moyen pour le dosage de DonépézipilHCl.....	32

Tableau n°24 : Tableau des résultats obtenus pour l'étude de la fidélité de dosage de DonépéziHCl.....	32
Tableau n°25 : Tableau de Cochran pour la fidélité de dosage de DonépéziHCl.....	33
Tableau n°26 : Tableau de Vérification de l'homogénéité des moyennes des niveaux : test de GRUBBS.....	33
Tableau n°27 : Calcul du coefficient de répétabilité pour le dosage de DonépéziHCl.....	33
Tableau n°28 : Calcul du coefficient de fidélité intermédiaire pour le dosage de DonépéziHCl.....	34
Tableau n°29 : Tableau des résultats pour la linéarité de dosage suite à une dissolution de DonépéziHCl.....	35
Tableau n°30 : Tableau de Cochran pour la linéarité de dosage suite à une dissolution de DonépéziHCl.....	35
Tableau n°31 : Tableau des Critères de la droite de régression pour le dosage suite à une dissolution de DonépéziHCl.....	36
Tableau n°32 : Vérification de l'existence d'une pente significative pour le dosage suite à une dissolution de DonépéziHCl par le test de Fisher.....	36
Tableau n°33 : Vérification de la validité de la droite de régression pour le dosage suite à une dissolution de DonépéziHCl.....	36
Tableau n°34 : Comparaison de l'ordonnée à l'origine pour le dosage suite à une dissolution de DonépéziHCl : Test de Student.....	37
Tableau n°35 : Tableau des standards pour l'exactitude de dosage suite à une dissolution de DonépéziHCl.....	37
Tableau n°36 : Tableau des résultats obtenus pour l'étude de la justesse de dosage de DonépéziHCl.....	38
Tableau n°37 : Tableau de Cochran pour l'exactitude de dosage suite à une dissolution de DonépéziHCl.....	38
Tableau n°38 : Vérification de la validité des moyennes par Test de Fisher pour le dosage suite à une dissolution de DonépéziHCl.....	38
Tableau n°39 : Estimation de l'intervalle de confiance du recouvrement moyen pour le dosage suite à une dissolution de DonépéziHCl.....	39
Tableau n°40 : Tableau des résultats obtenus pour l'étude de la fidélité de dosage suite à une dissolution de DonépéziHCl.....	39
Tableau n°41 : Tableau de Cochran pour la fidélité de dosage suite à une dissolution de DonépéziHCl.....	40
Tableau n°42 : Tableau de Vérification de l'homogénéité des moyennes des niveaux pour le dosage suite à une dissolution de DonépéziHCl : test de GRUBBS.....	40
Tableau n°43 : Calcul du coefficient de répétabilité pour le dosage suite à une dissolution de DonépéziHCl.....	40
Tableau n°44 : Calcul du coefficient de fidélité intermédiaire pour le dosage de DonépéziHCl.....	41

-Sommaire-

<u>Introduction</u>	1
<u>Chapitre 1 : Rappels sur la qualité dans l'industrie pharmaceutique et la validation analytique :</u>	
A.	L
<u>'industrie pharmaceutique au Maroc</u>	3
<u>B. Présentation générale de BOTTU</u>	3
1. Présentation.....	3
2. Principaux chiffres.....	4
3. Présentation de l'organigramme de BOTTU.....	4
C.Présentation du LCQ	6
1. Organigramme du LCQ	6
2. Présentation du laboratoire de contrôle qualité.....	6
<u>C.Notion qualité au sein de l'industrie pharmaceutique</u>	7
1. Bonne Pratique de fabrication(BPF).....	7
2. ISO 9001 V 2008.....	8
3. La pharmacopée.....	8
4. International Conférence of Harmonization (ICH).....	8
5. La société française des sciences et technique pharmaceutiques (SFSTP).....	8
<u>E. La réalisation et programmation d'une validation analytique</u>	9
1. Plan directeur de validation.....	9
2. La procédure générale de la validation analytique	9
3. Le protocole de validation.....	9
<u>F. Critère de la validation analytique</u>	10
1. Types de méthodes d'analyse à valider	10
2. Spécificité.....	10
3. Linéarité.....	10
4. Fidélité.....	11
5. Exactitude.....	11

6. Seuil de détection.....	11
7. Seuil de quantification.....	11

G. Etude statistique de la validation..... 12

1. Linéarité.....	13
2. Exactitude.....	16
3. Seuil de détection LD et seuil de quantification.....	16

Chapitre 2 : Validation analytique de Donépézil comprimé pellicule :Matériel et méthode

A. Protocole de validation analytique de Donépézil comprimé pelliculé18

1. Présentation du principe actif.....	18
2. Matériels.....	18
3. Méthodes.....	19
4. Méthode de validation de Donépézil.....	22

B. Résultats et discussion 27

1. Méthode d'identification de DonépézilHCl.....	27
2. Méthode de dosage de DonépézilHCl.....	27
3. Méthode de dosage suite à une dissolution de DonépézilHCl.....	34

Conclusion

Introduction

Le médicament est une substance administrée à l'homme ou à l'animal en vue de corriger ou modifier une ou plusieurs de ses fonctions organiques. Il peut avoir des effets thérapeutiques (préventifs ou curatifs) et toxiques. Cette toxicité peut provenir d'interactions médicamenteuses, de mésusages mais aussi d'une mauvaise qualité du médicament.

L'objectif de la qualité d'un produit de santé est de garantir une efficacité et une sécurité suffisante pour le patient. La maîtrise du procédé de fabrication du produit ainsi que la maîtrise de toute contamination susceptible d'altérer sa qualité permet de répondre à cette attente. C'est pour cela que les méthodes utilisées pour le contrôle de la qualité des médicaments doivent être validées.

Lors de mon stage de fin d'étude réalisé au sein du laboratoire de Contrôle de qualité de BOTTU Industrie, j'ai eu pour mission la validation analytique de plusieurs méthodes de dosage par Chromatographie Liquide à Haute Performance du principe actif DONEPEZIL d'un nouveau produit « DOZYL » dans le cadre d'obtention d'une AMM (Autorisation de Mise sur le Marché).

Ce présent-mémoire est donc le reflet des travaux réalisés durant ce stage.

Dans un premier temps, un rappel sur la validation analytique d'une méthode et son importance au sein de laboratoire est nécessaire.

En effet, la validation analytique d'une méthode est un point clé des Bonnes Pratiques de Fabrication (BPF) ainsi du contrôle de la qualité. Elle prouve l'efficacité de la méthode, et assure la qualité des produits envers les patients.

Nous présenterons, dans un second temps, les critères d'une validation analytique d'une méthode d'analyse.

Pour finir, nous rentrerons dans le vif du sujet, à savoir la validation de méthodes d'analyse.

Après avoir abordé les généralités sur la validation de telles méthodes, nous détaillerons la démarche à suivre pour les valider et nous présenterons les résultats obtenus.

Chapitre 1 : Rappels sur la qualité dans l'industrie pharmaceutique et la validation analytique

A. L'INDUSTRIE PHARMACEUTIQUE AU MAROC

Forte dans son demi-siècle d'existence, l'industrie pharmaceutique marocaine constitue un secteur clé de l'économie nationale. Le niveau de sa production, son savoir-faire, ses apports technologiques, sa masse d'investissement attestent de son dynamisme et de sa contribution à la croissance économique et nationale.

Les récents développements du marché pharmaceutique mondial ainsi que le nouveau contexte international des échanges sont par ailleurs autant de motifs pour inciter l'industrie pharmaceutique à davantage de performance. Ainsi afin de mieux remplir sa mission l'industrie pharmaceutique marocaine s'est engagée sur une série d'actions :

- Investir dans la qualité et la mise à niveau sur les normes internationales
- Fabriquer un médicament irréprochable et à un prix compétitif
- Approvisionner efficacement le marché local
- Préserver l'emploi tout en assurant la formation du personnel

L'activité de l'industrie pharmaceutique au Maroc s'exerce dans un cadre strict et fixé par des textes législatifs émanant du ministère de la santé. Celui-ci est chargé entre autre d'arrêter les normes de fabrication, de conditionnement, de circulation, de vente et de stockage de médicaments par le biais de la direction des médicaments et de la pharmacie.

B. PRESENTATION GENERALE DE BOTTU

1. Présentation :

Créée en 1952, BOTTU fut d'abord une filiale des Laboratoires BOTTU-France, avant de devenir indépendante trente ans plus tard. L'activité de BOTTU concerne l'enregistrement, la production, la distribution et la commercialisation de produits pharmaceutiques. Son produit leader, **DOLIPRANE®** (Paracétamol) occupe le premier rang en unités vendues sur le marché intérieur.

Elle est divisée sur deux sites : site PROMEGAL et site BOTTU dont leurs productions englobent les différents domaines pharmaceutiques.

BOTTU opère dans 4 domaines :

- Pharmacie
- Parapharmacie
- Dentaire
- Diététique

Ces produits sont commercialisés à partir d'accords signés avec des laboratoires de renom :

- BOTTU SA
- THERAPLIX (SANOFI-AVENTIS)
- DEXO

- BOEHRINGER INGELHEIM
- CLL PHARMA
- ETHYPHARM
- FOURNIER (DEBAT)
- JOHNSON ET JOHNSON (MARTIN)
- PROCTER & GAMBLE (NATIVELE)
- OMEGA PHARMA FRANCE
- IREX (SANOFI-SYNTHELABO)
- RIOM-CERM
- GRUNENTHAL
- MILLET INNOVATION
- ODOST

2. Principaux chiffres :

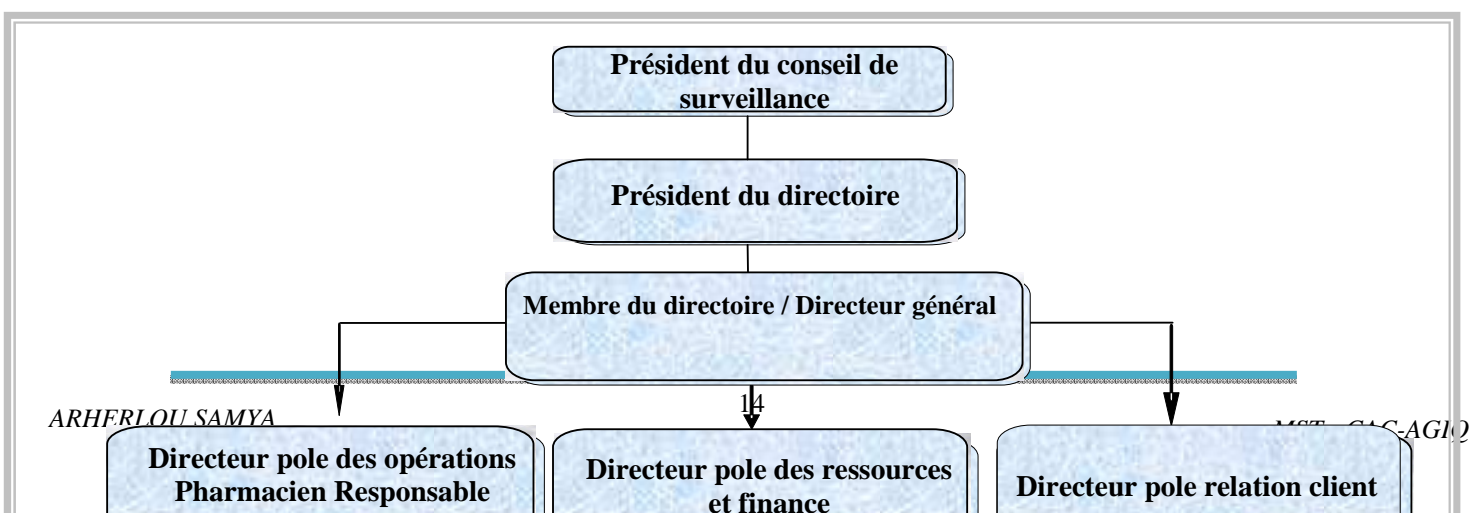
Avec une production annuelle de 33 millions d'unités pour une capacité de 40 millions et un chiffre d'affaires de 449 millions de dirhams, BOTTU se classe aujourd'hui parmi les plus grands laboratoires marocains.

La société BOTTU a mis en place une organisation à la mesure de ses ambitions. Forte d'un effectif de 456 personnes, l'entreprise attache une importance particulière à la formation et à l'épanouissement de son personnel.

3. Présentation de l'organigramme de BOTTU

Avec un effectif de 456 personnes, en hausse régulière, la société BOTTU attache une importance toute particulière à la formation de son personnel. Source de motivation et de créativité, l'épanouissement professionnel est en effet le secret de la performance et de la croissance de l'entreprise.

La figure ci-dessous résume l'organigramme de BOTTU, et ses différentes directions.

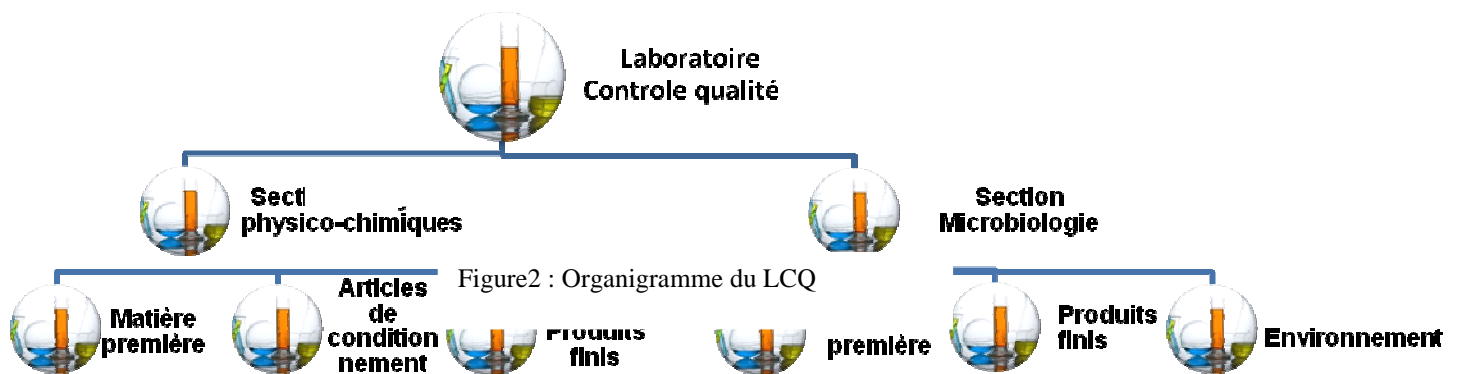




C. PRESENTATION DU LCQ

1. Organigramme du LCQ

Le Laboratoire de Contrôle de Qualité (LCQ) représente le noyau vif de toute industrie pharmaceutique sans lequel l'industrie ne peut exister. Le contrôle de qualité fait partie des BPF. Il concerne l'échantillonnage, l'établissement des spécifications, la validation et la mise en œuvre des procédures de contrôle ainsi que les procédures d'organisation (figure 2).



2. Présentation du laboratoire de contrôle qualité

La qualité des médicaments est évidemment de la plus haute importance du point de vue de la santé publique. 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 alerté aussi l'innocuité et l'efficacité. C'est pour ceci que dans toute industrie pharmaceutique de production, il y a un laboratoire d'analyse.

Mon stage de fin d'étude s'est déroulé dans le département de contrôle de qualité plus précisément au sein de l'unité des nouveaux produits qui est chargée d'étudier la faisabilité des nouveaux médicaments.

Le laboratoire de contrôle de qualité de BOTTU est constitué de quatre services :

- **Service de contrôle des matières premières (MP) et des articles de conditionnement (AC) :**

- Contrôle des MP:

Toute matière entrant dans la composition et la fabrication d'un médicament passe au laboratoire de contrôle qui vérifiera que les caractéristiques du produit correspondant bien aux spécifications qui ont été définies préalablement dans leur monographie figurant dans la pharmacopée.

- Contrôle des AC:

Tous les éléments entrant dans le conditionnement subissent des tests qui permettent de vérifier que leurs caractéristiques correspondent aux spécifications définies par un cahier de charge.

- **Service de contrôle de la stabilité des produits :**



Afin de vérifier que le médicament conserve toutes ses propriétés tout au long de sa période d'utilisation, dans l'environnement déclaré dans le dossier d'enregistrement, on le stresse, en lui faisant subir de fortes variations de températures et d'humidité.

- **Service de contrôle des produits finis (PF) :**

Une fois les médicaments conditionnés des échantillons sont prélevés pour subir des contrôles afin de vérifier si les caractéristiques du produit correspondent bien aux spécifications qui ont été définies préalablement dans son dossier technique.

- **Service de contrôle des nouveaux produits (R&D):**

Chargé de développement et de la validation des nouvelles méthodes analytiques.

D. NOTION QUALITE AU SEIN DE L'INDUSTRIE PHARMACEUTIQUE

Afin de faire face aux enjeux de la concurrence et en vue de répondre aux nouvelles exigences des clients, BOTTU s'engage à mettre en œuvre tous les moyens nécessaires pour améliorer l'efficacité du système qualité conformément à la norme ISO 9001 version 2008, BPF, ICH, SFSTP, Pharmacopée.

1. Bonne pratique de fabrication (BPF) :

Les BPF constituent un des éléments de l'Assurance de la Qualité ; elles garantissent que les produits sont fabriqués et contrôlés de façon cohérente et selon les normes de qualité adaptées à leur emploi et requises par l'autorisation de mise sur le marché.

Les Bonnes Pratiques de Fabrication s'appliquent à la fois à la production et au contrôle de la qualité. Les exigences de base des BPF sont les suivantes :

- 1- Le procédé doit être capable de produire de façon répétée des médicaments répondant à leurs spécifications ;
- 2- les étapes critiques de la fabrication et toutes les modifications importantes sont validées ;
- 3- Tous les moyens nécessaires à la mise en œuvre des BPF sont fournis ;
- 4- Les instructions et les procédures sont rédigées dans un style approprié, particulièrement adapté aux moyens fournis ;
- 5- Les opérateurs reçoivent une formation afin de mettre correctement en œuvre les procédures ;
- 6- Des relevés sont établis, manuellement et/ou avec des appareils d'enregistrement, pendant la fabrication, toute déviation significative est enregistrée de façon détaillée et examinée ;
- 7- Des dossiers de fabrication sont établis en vue de retracer l'historique complet d'un lot ;
- 8- La distribution des médicaments comporte le minimum de risques pour leur qualité ;
- 9- Un système de rappel est organisé pour le cas où il s'avérerait nécessaire de rappeler un lot de produit ;
- 10- Les causes des défauts de fabrication recherchées sont examinées ;



2. ISO 9001 V 2008 :

La norme ISO 9001 définit une série d'exigences concernant la mise en place d'un système de management de la qualité dans un organisme qui a besoin de démontrer son aptitude à fournir régulièrement un produit conforme aux exigences des clients et aux exigences légales et réglementaires applicables, et vise à accroître la satisfaction de ses clients par l'application efficace du système, y compris les processus pour l'amélioration continue du système et l'assurance de la conformité aux exigences des clients et aux exigences légales et réglementaires applicables.

La norme ISO 9001 V 2008 elle donne lieu à une « accréditation » reconnue internationalement.

3. La pharmacopée :

La Pharmacopée européenne est un recueil de normes communes, à l'échelle européenne, destinées au contrôle de la qualité des médicaments à usage humain ou vétérinaire.

C'est une norme pharmaceutique destinée à assurer l'uniformité de la qualité des médicaments fabriqués. Elle est une référence essentielle dans l'évaluation des données relatives à la qualité d'AMM nationales et européennes des médicaments auxquels se réfèrent toujours les directives révisées.

4. International Conference of Harmonization (ICH) :

L'ICH est une structure internationale qui rassemble les autorités de réglementation et les représentants de l'industrie pharmaceutique d'Europe, du Japon et des États-Unis pour discuter des aspects scientifiques et techniques de l'enregistrement des médicaments, dans le but ultime de rendre les médicaments plus rapidement accessibles aux patients, sans pour autant amoindrir les exigences en matières de la qualité, sécurité et efficacité.

Nous allons nous intéresser plus particulièrement au projet d'harmonisation Q-2 relatif à la validation analytique. Deux guidelines ICH ont été dédiés à la validation analytique :

- Q-2A : validation des procédures analytiques : définition et terminologie.
- Q-2B : validation des méthodes analytiques : méthodologie.

5. La société française des sciences et techniques pharmaceutiques (SFSTP) :

SFSTP est un guide de recommandations réglementaires communément admises et appliquées dans l'industrie pharmaceutique nationale.

Son objectif est :

- de faire progresser les connaissances ;
- de les diffuser ;
- et de promouvoir une information pertinente et ciblée ;
- en assurant une veille réglementaire pour ses adhérents concernés par le médicament ;
- et qui interviennent tout au long du cycle de vie du médicament ;

E. LA REALISATION ET PROGRAMMATION D'UNE VALIDATION ANALYTIQUE

1. Plan directeur de validation

Les réglementations relatives aux bonnes pratiques (BPF, BPL, etc.), ainsi que les documents normaux ou réglementaires (ICH, SFSTP, ISO..) suggèrent que toutes les procédures de validation, au sens large, répondent à certains critères d'acceptabilité. Cette demande impose que ces procédures soient validées. Pour cette raison il existe un plan qui dirige et gère tout type de validation et dans tous les secteurs, c'est le plan directeur de validation.

Ce document résume la philosophie de l'entreprise, ses intentions et son approche afin d'établir l'adéquation des performances.



Il permet donc ;

- D'identifier quels items sont sujets à la validation.
- De définir la nature et l'étendue des tests à réaliser pour la validation.
- De décrire les responsabilités hiérarchiques et les recommandations quant aux documents liés au travail réalisé et résultats obtenus.

2. La procédure générale de la validation analytique :

C'est la procédure qui décrit l'organisation générale de la validation au niveau de l'industrie pharmaceutique.

Cette procédure a pour objectif de définir les modalités des procédures et d'assurer une bonne gestion et maîtrise des documents.

Elle est appliquée à tous les procédures et les opérations réalisées au niveau de l'industrie y incluant le protocole de validation analytique.

Cette présente procédure indique :

- le principe ;
- l'objet ;
- le domaine d'application ;
- les références et documents associés ;
- les responsabilités ;
- définitions des critères de validation analytique ;
- la méthodologie ;
- gestion des résultats : collecte, vérification et approbation des résultats de validation analytique ;

3. le protocole de validation :

Le protocole de validation doit répondre aux critères suivants :

- Définir clairement les objectifs, le produit, le dosage, les guides d'application de la procédure.
- Définir les intervenants et leurs responsabilités.
- Faire référence à la procédure générale de validation et la procédure validée.
- Donner les rubriques de validation choisies et raisons de leur choix (si nécessaire).
- Présenter le plan expérimental qui sera choisi en particulier dans le cas de regroupement d'essais dans plusieurs rubriques (linéarité/ exactitude, répétabilité/robustesse).
- Présenter une structure de rapport de validation.

F. CRITERE DE LA VALIDATION ANALYTIQUE :

1. Types de méthodes d'analyse à valider :

Il sera question ici des quatre types de méthodes d'analyse les plus couramment utilisés :

- Épreuves d'identification.
- Dosage du principe actif par HPLC.
- Dosage suite à une dissolution par HPLC.
- Dosage des substances apparentées par HPLC.

2. Spécificité :

La spécificité d'une méthode est sa capacité à permettre une évaluation univoque de la substance à examiner (analyte) en présence d'autres composants potentiellement présents (impuretés, produit de dégradation, ...).



En d'autres termes, une méthode d'analyse est dite « spécifique » lorsqu'elle permet de garantir que le signal mesuré provient seulement de la substance à analyser ou qu'elle permet de mesurer quantitativement un paramètre physicochimique ou un groupement fonctionnel d'une ou de plusieurs substances dans l'échantillon.

En ce qui concerne les techniques chromatographiques, celles-ci sont plutôt sélectives que spécifiques.

Le degré de sélectivité de la méthode de dosage dépend de la qualité de séparation chromatographique et de la sélectivité intrinsèque du mode de détection.

Très souvent, la spécificité se fonde sur une absence d'interférences.

3. Linéarité :

La linéarité d'une procédure d'analyse est sa capacité (à l'intérieur d'un certain intervalle) d'obtenir des résultats directement proportionnels à la concentration (quantité) en substance à examiner dans l'échantillon.

Elle permet donc de vérifier que la relation entre les quantités introduites dans le système de mesure et la réponse instrumentale est une droite passant, par l'origine.

Selon l'ICH on évalue la linéarité par un examen visuel d'une courbe des valeurs du signal analytique tracées en fonction de la concentration de la substance à analyser. Si la relation est linéaire, les résultats doivent être évalués au moyen des méthodes statistiques appropriées, comme par exemple, la régression des moindres carrés.

4. Fidélité :

La fidélité est un terme général s'appliquant à la variabilité entre les essais répétés. Elle exprime l'étroitesse de l'accord (degré de dispersion) entre une série de mesures provenant de multiples prises d'un même échantillon homogène dans des conditions définies. Elle fournit une indication sur les erreurs dues au hasard. La fidélité s'exprime par la mesure de la reproductibilité et de la répétabilité. Ces deux mesures extrêmes de la variabilité sont suffisantes pour convenir à la plupart des cas courants.

La répétabilité se rapporte à des essais de la même grandeur effectués dans des conditions aussi stables que possible et à des courts intervalles de temps, dans un même laboratoire, par un même opérateur employant le même équipement, tandis que la **reproductibilité** a trait à des essais effectués dans des conditions fortement variables, à des jours différents, dans différents laboratoires, avec des opérateurs différents et un équipement différent.

La répétabilité et la reproductibilité sont deux extrêmes, le premier mesurant la variabilité minimale des résultats et le second la variabilité maximale des résultats.

5. Exactitude :

L'exactitude exprime l'étroitesse de l'accord entre la valeur qui est acceptée comme une valeur conventionnellement vraie, soit comme une valeur de référence acceptée standard international, (par exemple standard d'une pharmacopée) et la valeur trouvée (valeur moyenne) obtenue en appliquant la procédure d'analyse un certain nombre de fois.

6. Seuil de détection :

C'est la plus petite quantité d'une substance à examiner dans un échantillon pouvant être détectée, mais non quantifiée comme une valeur exacte. Le seuil de détection, est généralement un paramètre des essais limites.



7. Seuil de quantification :

C'est la plus petite quantité d'une substance à examiner pouvant être dosée dans les conditions expérimentales décrites avec une fidélité et une exactitude définies.

G. ETUDE STATISTIQUE DE LA VALIDATION

L'étude statistique de la validation analytique est basé sur une méthodologie commune inspirée de la stratégie des guidelines ICH (International Conference on Harmonization) et celles de la SFSTP (Société Française des Sciences Techniques et Pharmaceutiques) pour mieux encore optimiser le nombre d'essais à réaliser et satisfaire à l'étude des critères de validation.

Un parallèle entre les textes ICH et les propositions de la SFSTP est proposé dans le tableau suivant :

Critères	SFSTP	ICH
Spécificité	Vérification du non interférence des excipients (comparaison des chromatogrammes placebo et forme pharmaceutique).	Vérification du non interférence des excipients.
Intervalle	$\pm 40\%$ (par rapport à la valeur théorique).	$\pm 20\%$
Linéarité	5 niveaux de concentration sur trois séries.	Minimum 5 niveaux de concentration.
Exactitude	5 niveaux de concentrations (3 valeurs par niveau de concentration).	Minimum 3 niveaux de concentration avec 3 valeurs par niveau de concentration.
fidélité	Répétabilité : 6 valeurs sur le niveau de concentration équivalente au 100% -Fidélité intermédiaire : Sur 3 séries.	Répétabilité : Minimum 3 niveaux de concentration avec 3 valeurs par niveau ou 6 valeurs pour le niveau de concentration équivalente à 100%.

Tableau 1 : Comparaison SFSTP - ICH

1. Liné

arité :



La droite de régression est étudiée sur k concentrations différentes avec n répétitions par mesure. L'analyse de la variance permet de déterminer l'existence d'une pente significative et la validité de domaine de linéarité de la droite de régression.

$Y = a + b.x$: droite de régression caractérisée par (a) l'ordonnée à l'origine et (b) la pente de la droite.

a. Calcul de la pente « a »:

Le coefficient « a » de la droite de régression est obtenu par la formule suivante.

$$a = \frac{\sum (x_i - \bar{x})(y_i - \bar{y})}{\sum (x_i - \bar{x})^2}$$

Avec \bar{x} : La moyenne des mesures.

\bar{y} : La moyenne des réponses.

b. Calcul de l'ordonnée à l'origine « b »:

Le coefficient « b » de la droite de régression est obtenu par la formule suivante.

$$b = \bar{y} - a\bar{x}$$

Avec \bar{x} : La moyenne des mesures.

\bar{y} : La moyenne des réponses.

c. Calcul de coefficient de détermination R^2 :

Le coefficient de détermination (R^2) est un indicateur qui permet de juger la qualité d'une régression linéaire. D'une valeur comprise entre 0 et 1, il mesure l'adéquation entre le modèle et les données observées.

$$R^2 = \frac{SCE_{Régression}}{SCE_{totale}} = \frac{\sum_{i=1}^n (\hat{Y}_i - \bar{Y})^2}{\sum_{i=1}^n (Y_i - \bar{Y})^2}$$

Avec $SCE_{Régression}$: Somme des carrés des écarts.

SCE_{totale} : Somme des carrés des écarts.

\hat{Y}_i : La valeur estimée par le modèle.

\bar{Y} : La moyenne des Y_i .

d. Test d'homogénéité des variances « Cochran » :

Le test de Cochran permet de détecter les valeurs aberrantes en termes de dispersion et il va s'appliquer sur les écarts types de mesures.

C'est principalement un test de variabilité inter-laboratoire et il convient de l'appliquer en premier.

la variance s^2 pour chaque échantillon :

$$s^2 = \frac{\sum (x_i - \bar{x})^2}{n-1}$$

la plus grande des variances :

$$s^2_{\max}$$

la somme des variances :

$$\sum s_i^2$$

le rapport entre la plus grande des variances et la somme des variances :

$$C_{\text{test}} = \frac{s^2_{\max}}{\sum s_i^2}$$



On lit la valeur de C_{table} dans la table de Cochran pour un risque α généralement choisi à 5% et pour n et k .

$$C_{table} = C_{\alpha}(n,k)$$

Si C_{test} est plus petit ou gal à C_{table} , alors on accepte l'hypothèse selon laquelle les variance des populations sont égales entre elles.

Dans le cas contraire, on rejette l'hypothèse d'égalité des variances.

e. Test de l'existence d'une pente significative :

Le but de ce test est de déterminer si la pente observée est vraiment significative, c'est à dire qu'elle ne résulte pas seulement de la dispersion des résultats. Le test F_1 est calculé de la façon suivante :

$$F_1 = \frac{S_l^2}{S_r^2}$$

Avec S_l^2 : Variation due à la régression.

S_r^2 : Variation résiduelle.

On compare la valeur calculée avec celle lue sur la table de Snedecor $F(1-a, 1, N-2)$

Conclusion :

si $F < F(1-a, 1, N-2)$ on déclarera qu'il n'y a pas dépendance linéaire	si $F > F(1-a, 1, N-2)$ on déclarera que la pente est significative
--	---

f. Test de la validité de la droite de régression :

Ce test consiste à vérifier si la droite de régression est bien une droite dans tout le domaine choisi, c'est-à-dire vérifier que l'erreur de modèle « S_L » est bien inférieure à l'erreur expérimentale « S_E ». Le test F_1 est calculé de la façon suivante :

$$F_2 = \frac{S_L^2}{S_E^2}$$

Avec S_L^2 : Variation due à l'erreur du modèle.

S_E^2 : Variation expérimentale.

On compare la valeur calculée avec celle lue sur la table de Snedecor $F(1-a, k-2, N-k)$

Conclusion :

si $F < F(1-a, k-2, N-k)$ l'erreur de modèle est négligeable	si $F > F(1-a, k-2, N-k)$ on déclarera que y et x ne sont pas liés par une relation linéaire
--	--

2. Fidélité :

La fidélité dépend uniquement de la distribution des erreurs aléatoires et n'a aucune relation avec la valeur vraie ou spécifiée.

La mesure de fidélité est exprimée en termes d'infidélité et est calculée à partir de l'écart-type des résultats d'essais. Une fidélité moindre est reflétée par un plus grand écart-type. Le terme "résultats d'essai indépendants" signifie des résultats obtenus d'une façon non influencée par un résultat précédent sur le même matériau d'essai ou similaire.



Les mesures quantitatives de la fidélité dépendent de façon critique des conditions stipulées. Les conditions de répétabilité et de la fidélité intermédiaire sont des ensembles particuliers de conditions extrêmes.

a. Test d'homogénéité des variances :

Avant de commencer les calculs un test de Cochran est recommandé pour détecter la ou les variances suspectes ou aberrantes.

b. Test de GRUBBS : recherche d'une moyenne aberrante.

Ce test permet de détecter les valeurs aberrantes en termes de dispersion de moyennes. Le principe de ce test est de comparer les valeurs absolues des écarts réduits, en d'autres termes :

$$G_i = \frac{|\bar{y}_i - \bar{y}|}{S_{\bar{y}_i}}$$

Avec \bar{y}_i : Point de mesure le plus éloigné de la moyenne.

\bar{y} : Moyenne des mesures.

$S_{\bar{y}_i}$: Ecart type des mesures.

Si la valeur G_i est supérieur à la valeur tabulée $G_{(\alpha;p)}$, la mesure de laboratoire incriminé est supprimée. Dans le cas contraire la moyenne testée est considérée comme correcte au seuil de probabilité choisie.

c. Estimation de la répétabilité et de la fidélité intermédiaire :

- Calcul d'écart type de la répétabilité :

$$S_r = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^p S_i^2}{N - p}}$$

- Calcul d'écart type de la fidélité intermédiaire :

$$S_R = \sqrt{S_r^2 + S_L^2}$$

Avec :

$$S_L^2 = \frac{s_d^2 - s_r^2}{\bar{n}_i}; S_d^2 = \left[\frac{\sum_{i=1}^p n_i (\bar{y}_i - \bar{y})^2}{p-1} \right]$$

d. Estimation de coefficient de variation CV% pour la répétabilité et la fidélité intermédiaire :

Répétabilité : $CV_r \% = 100 \frac{S_r}{\bar{m}}$

Fidélité intermédiaire : $CV_R \% = 100 \frac{S_R}{\bar{m}}$

3. Exactitude :

a. Calcul de recouvrement :

$$R\% = 100 \times \frac{\text{Quantité trouvée}}{\text{Quantité introduite}}$$



La quantité trouvée est calculée par la formule suivante :

$$Q.T = \frac{\text{Réponse}}{\text{Facteur de réponse}} ; \quad F.R = \frac{\sum \text{Réponse des témoins}}{N}$$

b. Test d'homogénéité des variances :

On applique le test de Cochran pour vérifier l'homogénéité des variances.

c. Test d'homogénéité des moyennes :

Le test s'effectue par ANOVA afin de vérifier l'homogénéité des moyennes de différents niveaux.

d. Estimation du recouvrement moyen :

Le recouvrement moyen et son intervalle de confiance est calculé par la formule suivante :

$$IR_m = Y_{moy} \pm \frac{t_{(\alpha; N-1)}}{\sqrt{N}} \times S_T$$

Avec Y_{moy} : La moyenne des R%.

S_T : Ecart type estimé total.

4. **Seuil de détection LD et Seuil de quantification LQ:**

$$LD = 3 \times C \times \frac{N}{S}$$

$$LQ = 10 \times C \times \frac{N}{S}$$

Avec C : la concentration de l'essai.

N/S : signal/bruit.

Chapitre 2 :

Validation analytique de

Donépézil comprimé

pellicule : matériel et

méthode





A. PROTOCOLE DE VALIDATION ANALYTIQUE DE DONEPEZIL COMPRIME PELLICULE.

1. Présentation du Principe actif :

Le Donépézil, présent sous la forme de chlorhydrate de Donépézil a une action parasymphomimétique indirecte par son effet inhibiteur réversible d'acétylcholinestérase. Il est utilisé dans les formes légères à modérément sévères de la maladie d'Alzheimer.

Le Donépézil inhibe réversiblement l'acétylcholinestérase. Il potentialise alors l'action de l'acétylcholine en empêchant sa dégradation par l'augmentation de sa concentration dans la fente synaptique.

Il est appelé parasymphomimétique indirect car il potentialise les transmissions parasymphomique sans se lier à des récepteurs membranaires. De par sa structure, il passe la barrière hémato-encéphalique. Il active les récepteurs nicotiniqes et les récepteurs muscariniqes et présente la formule chimique ci-dessous :

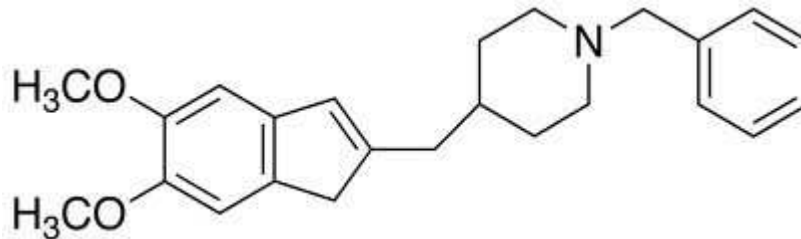


Figure 3 :

Donépézil

Formule chimique du

2. Matériels :

a. Réactifs et solvants :

Tous les solvants et réactifs utilisés dans l'analyse chromatographique sont de grade chromatographique :

- Acétonitrile ACN ;
- Eau Ultra Pure ;
- Triéthylamine ;
- Acide phosphorique ;
- Donépézil HCl 5 mg ;
- HCl 0.1N

b. Appareillage :

Les analyses par HPLC ont été réalisées sur un chromatographe liquide de marque WATERS. Cet appareil entièrement automatisé, est muni des éléments suivants :

- Une pompe UltiMate ;
- Un injecteur automatique couplé à un passeur d'échantillon à plateau ;



- Un compartiment pour thermostatisation de la colonne ;
- Un détecteur à UV visible ;

L'ensemble du système chromatographique est piloté par un ordinateur muni d'un logiciel Empower version 3.0.

La qualification de l'appareil HPLC est réalisée après chaque année et après chaque intervention technique sur l'appareil.

3. Méthodes :

Dans cette partie nous présenterons les conditions de travail, les solutions ainsi que les méthodes utilisées pour mener à bien cette étude.

a. Conditions Chromatographiques :

Conditions opératoires : Dosage et identification de Donepezil par HPLC

- Colonne : Zorbax SB-CN, 5 μ m, 250×4,6mm
- Débit : 1,0 ml/min
- Détection : UV à 230 nm
- Volume d'injection : 10 μ l
- Phase mobile : solution tampon pH 5,0/Acétonitrile (1000/400)
- Diluent : phase mobile

Conditions opératoires : Dosage suite à une dissolution de Donepezil par HPLC

Paramètres de dissolution :

- Appareil : dissolu test
- Système : Palettes
- Vitesse : 50 tour/min
- Milieu de dissolution : HCL 0.1 N
- Volume de dissolution : 900 ml
- Température du milieu de dissolution : 37°C \pm 0,5°C
- Durée : 30 minutes

Système chromatographique :

- Colonne : KROMASIL C18 10 μ m, dimension : 150 x 4.0 ou équivalent.
- Débit : 1.0 ml/min
- Détecteur : 271 nm
- Température des échantillons : 20 °C
- Température colonne : 35°C
- Volume d'injection : 50 μ l

Conditions opératoires : Dosage des substances apparentées par HPLC



- Colonne : Zorbax SB-CN, 5 μ m, 250 \times 4,6mm
- Débit : 1,0 ml/min
- Détection : UV à 230 nm
- Volume d'injection : 10 μ l
- Phase mobile : solution tampon pH 5,0/Acétonitrile (1000/400)
- Diluent : phase mobile
- Temps d'analyse : 60 min

b. Préparation des solutions :

1. Préparation des solution pour Dosage et identification de Donepezil par HPLC :

Solution Tampon pH 5,0:

On met 10 ml de triéthylamine dans une fiole de 1l, puis on ajoute 900 ml de l'eau purifiée et on ajuste à pH 5,0 \pm 0,1 avec l'acide phosphorique puis on complète à 1000 ml avec de l'eau purifiée.

Solution Standard :

Dans une fiole jaugée de 10 ml, on dissout 20,0 mg de donepezil HCl avec le diluent, puis on complète au trait de jauge avec le même solvant. On dilue 1 ml de cette solution dans une fiole de 10 ml avec le diluent.

Solution Essai :

On détermine le poids moyen de 10 comprimés et on broie les dans un mortier.

Dans une fiole jaugée de 10 ml, on pèse environ 550,0 mg de la poudre broyée, on ajoute le diluent, on porte aux ultrasons pendant 3 min puis on complète au trait de jauge avec le même solvant. On Dilue 1 ml de cette solution dans une fiole de 10 ml avec le diluent.

2. Préparation des solutions pour le Dosage suite à une dissolution de Donepezil par HPLC :

Phase mobile :(Acétonitrile – Eau – Acide perchlorique) :(350 – 650 – 1)

La phase mobile est Mélangée, bien agitée, Filtrée et dégazée.

Diluent : (Méthanol – HCL 0.1 N) : (3 – 1)

Solution standard mère (à préparer en double)

On pèse une quantité équivalente à 110 mg de Donepezil HCL standard de travail dans une fiole jaugée de 100 ml, on dissout et on complète au volume avec le diluent. On agite. On transfère 1 ml de cette solution Dans une fiole jaugée de 10 ml et on complète au trait de jauge avec le milieu de dissolution. La concentration de cette solution est de 0,11mg/ml.

Solution standard de travail :

On transfère 1,0 ml de la solution standard mère Dans une fiole jaugée de 20 ml et on complète au trait de jauge avec le milieu de dissolution. La concentration finale est de 0,0055mg/ml.

Solutions essai :

On place un comprimé dans chacun des six bols de dissolution. Après 30 minutes, on prélève les essais de chaque bol de dissolution. On filtre et on jette les premiers ml.



3. Préparation des solutions pour Dosage des substances apparentées par HPLC :

Solution Tampon pH 5,0:

On met 10 ml de triméthylamine dans une fiole de 1l, on ajoute 900 ml de l'eau purifiée et on ajuste à pH 5,0 ± 0,1 avec l'acide phosphorique puis on complète à 1000 ml avec de l'eau purifiée.

Préparation de la Solution standard A :

On pèse environ 2 mg de Donepezil HCl dans une fiole de 100 ml, on ajoute le diluent et porter aux ultrasons pendant 2 à 3 min, puis on complète au trait de jauge avec le même solvant.

Préparation de la Solution standard B :

On pèse environ 3 mg de l'impureté B dans une fiole de 100 ml, on dissout avec le diluent puis on complète au trait de jauge avec le même solvant.

Préparation de la Solution standard :

Dans une fiole de 10 ml, on met 1 ml de la solution B et 1 ml de la solution A et on complète au trait de jauge avec le même solvant.

Solution Essai :

On détermine le poids moyen de 10 comprimés et on broie les dans un mortier.

Dans une fiole jaugée de 10 ml, on pèse environ 550,0 mg de la poudre broyée, on ajoute le diluent, on porte aux ultrasons pendant 3 min puis on complète au trait de jauge avec le même solvant.

c. La conformité de système :

La vérification de la conformité du système (system suitability) est effectuée au début de chaque analyse.

Les critères d'acceptation des résultats obtenus sont mentionnés dans le tableau suivant :

Nombre des Plateaux théorique	Facteur de symétrie	CV du TR	CV de surface des pics	La résolution
≥ 2000	entre 0.8 – 1.5	≤ 2%	≤ 2%	≥ 1.5

4. M
é
t

hode de validation de Donépézil :

a. Spécificité :

Elle sera évaluée en analysant en parallèle, et selon les conditions opératoires, une solution de Donepezil HCl, une solution essai et une solution placebo (le placebo est un mélange de tous les excipients de la formulation).

Critères d'acceptation :

La spécificité est satisfaisante si on a : L'absence des pics qui interfèrent au temps de rétention correspondant au Donépézil HCl.

b. Linéarité :

Cinq concentrations réparties sur l'intervalle d'étude seront préparées selon la technique. Chaque concentration sera réalisée par trois prises.

1. Méthode de dosage de Donépézil :



olution	% théorique en donepezil HCl	Solvant qsp (ml)	Quantité de donepezil HCl (mg)
Témoin 1	70 %	1:10	14,0
Témoin 2	85 %	1:10	17,0
Témoin 3	100 %	1:10	20,0
Témoin 4	115 %	1:10	23,0
Témoin 5	130 %	1:10	26,0

Tableau 3 : Préparation des essais de linéarité pour le dosage de Donépézil.

2. Méthode de dosage suite à une dissolution de Donépézil :

olution	% théorique en donepezil HCl	Quantité de donepezil HCl (mg)
Témoin 1	30 %	33,0
Témoin 2	50 %	55,0
Témoin 3	75 %	82,5
Témoin 4	100 %	110,0
Témoin 5	120 %	132,0

Tableau 4 : Préparation des essais de linéarité pour le dosage suite à une dissolution de Donépézil.

3. Méthode de dosage des substances apparentées de Donépézil :

olution	% théorique	Quantité de donepezil(mg)	Quantité de L'impureté A(mg)	Quantité de L'impureté B(mg)
Témoin 1	0,02 %	$\frac{2 \text{ mg}}{100} \times \frac{2}{100}$	$\frac{2 \text{ mg}}{100} \times \frac{2}{100}$	$\frac{3 \text{ mg}}{100} \times \frac{2}{100}$
Témoin 2	0,10%	$\frac{2 \text{ mg}}{100} \times \frac{1}{10}$	$\frac{2 \text{ mg}}{100} \times \frac{1}{10}$	$\frac{3 \text{ mg}}{100} \times \frac{1}{10}$
Témoin 3	0,30%	$\frac{2 \text{ mg}}{100} \times \frac{3}{10}$	$\frac{2 \text{ mg}}{100} \times \frac{3}{10}$	$\frac{3 \text{ mg}}{100} \times \frac{3}{10}$
Témoin 4	0,50%	$\frac{2 \text{ mg}}{100} \times \frac{5}{10}$	$\frac{2 \text{ mg}}{100} \times \frac{5}{10}$	$\frac{3 \text{ mg}}{100} \times \frac{5}{10}$
Témoin 5	1,00%	$\frac{2 \text{ mg}}{100}$	$\frac{2 \text{ mg}}{100}$	$\frac{3 \text{ mg}}{100}$



Témoin 6	2,00%	$\frac{2 \text{ mg}}{50}$	$\frac{2 \text{ mg}}{50}$	$\frac{3 \text{ mg}}{50}$
----------	-------	---------------------------	---------------------------	---------------------------

Tableau 5 : Préparation des essais de linéarité (Impureté A, B, Donépézil) pour le dosage des substances apparentées de Donépézil.

olution	% théorique	Quantité de L'impureté C(mg)
Témoin 1	0,05%	$\frac{2 \text{ mg}}{100} \times \frac{5}{100}$
Témoin 2	0,10%	$\frac{2 \text{ mg}}{100} \times \frac{1}{10}$
Témoin 3	0,30%	$\frac{2 \text{ mg}}{100} \times \frac{3}{10}$
Témoin 4	0,50%	$\frac{2 \text{ mg}}{100} \times \frac{5}{10}$
Témoin 5	1,00%	$\frac{2 \text{ mg}}{100}$
Témoin 6	2,00%	$\frac{2 \text{ mg}}{50}$

Tableau 6 : Préparation des essais de linéarité (Impureté C) pour le dosage des substances apparentées de Donépézil

4. Critères d'acceptation :

Etude statistique	Critère d'acceptation
Coefficient de détermination	$R^2 \geq 0.999$
Test d'existence des pentes significatives (test de Fisher)	$F_1 > 4.67$
Test de la validité de la droite de régression	$F_{nl} < 3.708$
Test d'homogénéité des variances (Test de Cochran)	$C < 0.684$

Tableau 7 : Critères d'acceptation de la linéarité.

c. Exactitude :

L'exactitude sera évaluée par la préparation des échantillons reconstitués du placebo et de Donepezil HCl dans une gamme de concentrations égale à 70, 100 et 130% de la teneur théorique de Donepezil HCl. Pour chaque concentration, nous préparons trois essais qui seront réalisés selon les tableaux suivant :

1. Méthode de dosage de Donépézil :

Nbre d'essais	Nbre de séries	% théorique de donepezil HCl	Quantité de donepezil HCl (mg)	Placebo (mg)
1	1	70 %	14,0	
2			14,0	
3			14,0	



4	2	100 %	20,0	530
5			20,0	
6			20,0	
7	3	130 %	26,0	
8			26,0	
9			26,0	

Tableau 8: Préparation des essais de l'exactitude pour le dosage de Donépézil.

2. Méthode de dosage suite à une dissolution de Donépézil :

Nbre d'essais	Nbre de séries	% théorique de donepezil HCl	Quantité de donepezil HCl (mg)	Placebo (mg)
1	1	30 %	1,67	147,2
2			1,67	
3			1,67	
4	2	75 %	4,17	
5			4,17	
6			4,17	
7	3	120 %	6,67	
8			6,67	
9			6,67	

Tableau 9 : Préparation des essais de l'exactitude pour le dosage suite à une dissolution de Donépézil.

3. Méthode de dosage des substances apparentée de Donépézil :

Nbre d'essais	Nbre de séries	% théorique de donepezil HCl	Quantité de donepezil HCl (mg/ml)	Quantité de L'impureté B(mg/ml)	Quantité de L'impureté A(mg/ml)
1	1	0.02 %	0,000418	0,000594	0,000406
2			0,000418	0,000594	0,000406
3			0,000418	0,000594	0,000406
4	2		0,01045	0,01485	0,01015
5			0,01045	0,01485	0,01015



6		0.50 %	0,01045	0,01485	0,01015
7	3	2.00 %	0,0418	0,0594	0,0406
8			0,0418	0,0594	0,0406
9			0,0418	0,0594	0,0406

Tableau 10 : Préparation des essais de l'exactitude (Impureté A, B, Donépézil) pour le dosage des substances apparentées de Donépézil.

Nbre d'essais	Nbre de séries	% théorique de donepezil HCl	Quantité de donepezil HCl (mg)
1	1	0,05%	0,001035
2			0,001035
3			0,001035
4	2	0,50%	0,01035
5			0,01035
6			0,01035
7	3	2,00%	0,0414
8			0,0414
9			0,0414

Tableau 11 : Préparation des essais de l'exactitude (Impureté C) pour le dosage des substances apparentées de Donépézil.

4. Critères d'acceptation :

Etude statistique	Critère d'acceptation
Test d'homogénéité des moyennes (test de Fisher)	$F_1 < 19.32$
Test d'homogénéité des variances (Test de Cochran)	$C < 0.871$

Tableau 12 : Critères d'acceptation de l'exactitude.

d. Fidélité :

La fidélité sera effectuée par l'analyse de 6 essais préparés en 3 séries à 100% pendant trois jours.

Critères d'acceptation :

La fidélité est satisfaisante si on a une égalité des variances et le coefficient de variation est :

- Inférieur ou égal à 2,0 % (on peut accepter jusqu'à 2,5%) pour le Dosage de Donépézil.
- Inférieur ou égal à 6,0 % pour le dosage suite à une dissolution de Donépézil.
- Inférieur ou égal à 5.0% pour le dosage des substances apparentées de Donépézil.

e. Limite de détection et quantification :

A partir des solutions des impuretés inconnus, A, B, et C, on effectue des dilutions de Donépézil dans la phase mobile jusqu'à la disparitions de signal.

Critères d'acceptation :



-
- Le coefficient de variation du temps de rétention des 6 injections du Donépézil doit être $\leq 1\%$.
 - Le coefficient de variation de la surface des pics des 6 injections du Donépézil doit être $\leq 5\%$.



B. RESULTATS ET DISCUSSIONS : BILAN DE LA VALIDATION ANALYTIQUE DE DONEPEZIL HCl

1. Méthode d'identification de Donépézil HCl :

a. Spécificité :

Les essais de spécificité ont présenté des pics de PA, Placebo, Blanc et du Témoin bien séparés à la longueur d'onde de 230 nm. En effet le chromatogramme suivant montre qu'il n'y a aucune interférence.

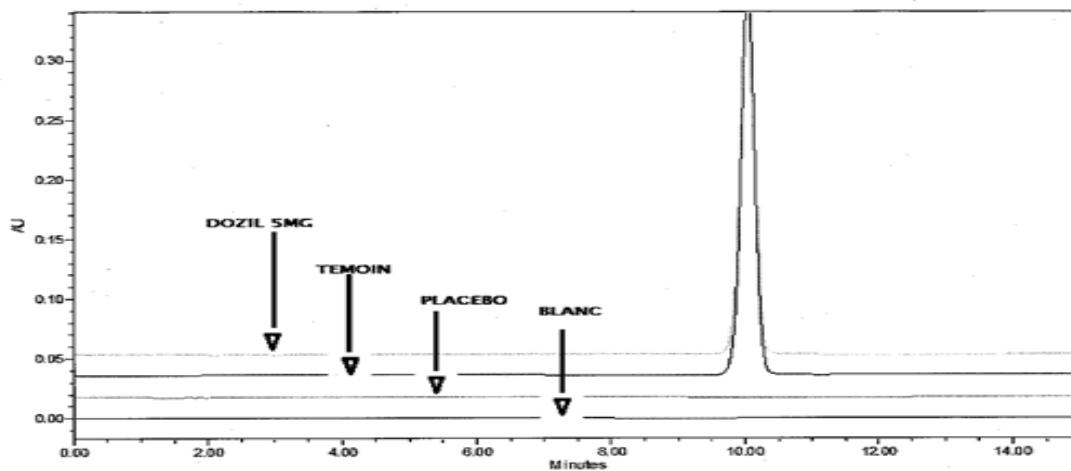


Figure 4 : Chromatogramme superposés de PA, Placebo, Blanc, Témoin

La spécificité est satisfaisante puisque :

- Le témoin de donepezil HCl et l'essai présentent le même profil du chromatogramme.
- le placebo ne présente aucun pic dans le temps de rétention de donepezil HCl.

2. Méthode de dosage de Donépézil HCl

a. Spécificité :

Voir la spécificité, ci – dessus, de l'identification de Donépézil HCl.

b. Linéarité :

La linéarité permet de montrer qu'il existe une relation entre les concentrations en Donépézil HCl et les réponses ainsi trouvées.

Le tableau suivant regroupe les résultats trouvés :



% théorique en donepezil HCl	Quantité en donepezil HCl (mg) (X _{ij})	Aires(Y _{ij})	VAR
70%	14,20	3031204	1971827625
	14,10	3010904	
	14,30	3095930	
85%	15,40	3234253	395263080
	15,20	3233493	
	15,12	3268302	
100%	19,55	4073169	6357254539
	18,81	3920660	
	19,37	4037257	
115%	23,81	4961144	1,5356E+10
	23,17	4827627	
	24,35	5075208	
130%	28,40	5993618	2402061765
	28,50	5907942	
	28,45	5992022	

Tableau 13 : Tableau des résultats pour la linéarité de Dosage de Donépézil HCl.

b.1. vérification de l'homogénéité des variances intergroupe :

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

Tableau 14 : Tableau de Cochran pour la linéarité de dosage de Donépézil HCl.



TEST DE COCHRAN			
S^2_{max}	$\sum_{i=1}^p s_i^2$	C0 calculé	C (5%,3,5)
15355622824,3333000	26482029834,333300	0,580	0,684
$C_{calculé} < C_{tabulé} (0,05 ; k ; n-1)$			
C/C : Les variances sont homogènes au risque de 5%			

Conclusion : Les variances des différents groupes sont homogènes pour l'ensemble des points de gamme de l'intervalle étudié de Donépézil au risque de 5%.

b.2. Détermination de l'équation de la droite de régression linéaire :

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

Critères de la droite de régression		
Pente de la droite	b	204381.88
Ordonnée à l'origine	a	119347.02
Coefficient de corrélation	R ²	0.999
Equation de la droite de régression		
Y=204381.88x + 119347.02		

Tableau 15 : Tableau des Critères de la droite de régression pour le dosage de Donépézil HCl.

b.3. Vérification de l'existence d'une pente significative :

Ce test consiste à vérifier l'hypothèse nulle :

H0 : b=0 contre H1 : b≠0

ANALYSE DE VARIANCE

<i>Origine de la variation</i>	<i>SCE</i>	<i>ddl</i>	<i>CM</i>	<i>F_{calculé}</i>	<i>F_{tabulé}</i>
Variation due à la régression	17885624752582,30	1,00	17885624752582,30		
Variation Résiduelle	109346980033,60	13,00	8411306156,43	2126,38	4.67
Variation total	17885624752582,30	1,00	17885624752582,30		
$F_{calculé} > F_{tabulé} (0,05 ; 1 ; 13) ; p < 0,05$					

Tableau 16 : Vérification de l'existence d'une pente significative pour le dosage de Donépézil HCl par test de Fisher.

Conclusion : En utilisant le test de Fischer, à partir des résultats brutes, $F_{calculé} > F_{tabulé} (0,05 ; 1 ; 13) ; p < 0,05$, nous pouvons conclure l'existence d'une pente significative, donc il y'a une dépendance linéaire entre la prise d'essai et les aires, au seuil de probabilité considérée.

b.4. Vérification de la validité de la droite de régression :

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



Origine de la variation	SCE	ddl	CM	$F_{calculé}$	$F_{tabulé}$
Erreur de la régression	56382920364,93	3,00	18794306788,31	3,55	3,71
Erreur Expérimentale	52964059668,67	10,00	5296405966,87		

$$F_{calculé} < F_{tabulé} (0.05 ; 3 ; 10) ; p < 0.05$$

Tableau 17 : Vérification de la validité de la droite de régression de dosage de Donépézil HCl.

Conclusion : L'ajustement est valide au seuil de probabilité considérée. Donc l'erreur du modèle est négligeable, le domaine de linéarité est considéré comme valide au seuil de 5%.

b.5. Comparaison de l'ordonnée à l'origine avec 0 : Test de student

Comparaison de l'ordonnée à l'origine avec zéro : $H_0 : a=0$

$ a $	S_a	$t_{calculé} = a /S_a$	$t_{tabulé} (0.05 ; N-2)$
119347.02	43606,29764	2,03692157	2,16

Tableau 18 : Comparaison de l'ordonnée à l'origine : Test de Student pour le dosage de Donépézil HCl.

Conclusion : $t_{calculé} < t_{tabulé} ; p < 0.000$ L'ordonnée à l'origine n'est pas significativement différente de 0 au seuil de probabilité $\alpha=5\%$

Figure 5 : la droite de régression de dosage de Donépézil HCl.

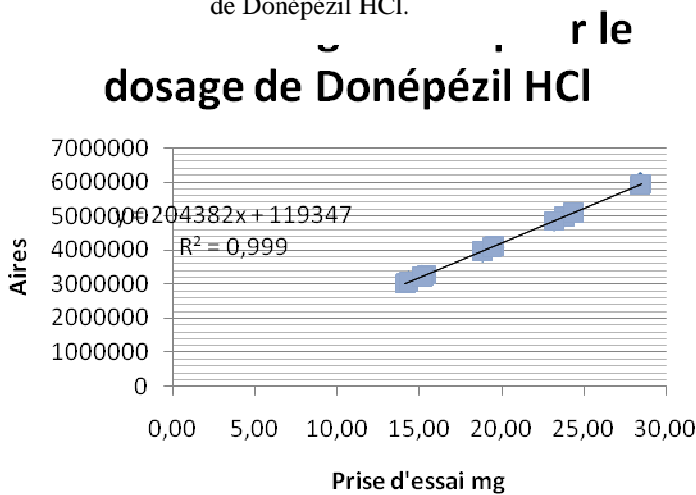
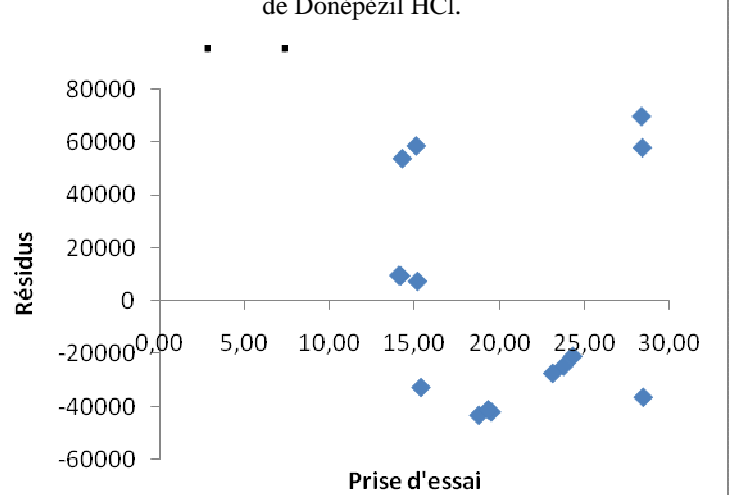


Figure 6 : Graphique des résidus de dosage de Donépézil HCl.



La méthode de dosage de Donepezil HCl est linéaire, elle est validée par un coefficient de détermination de 0,9986 et un histogramme de résidus petits et aléatoires.

c. Exactitude:

Soient les données brutes d'une procédure de justesse sont exprimées par le pourcentage de recouvrement par rapport à la quantité introduite en Donépézil HCl. Les résultats obtenus sont cités dans le tableau suivant :

	Réponse	PRISE TEMOIN	FACTEUR DE REPONSE
STANDARD 1	4929374,9	20,6	239290,044



STANDARD 2	4865581	20,3	239683,792
MOY			239486,918
CV%			0,12

Tableau 19 : Tableau des standards pour l'exactitude.

N° de séries	% théorique de DONEPEZIL	POURCENTAGE DE RECOUVREMENT (%)	QUANTITE TROUVEE (mg)	Si ²
1	30%	100,40%	13,05	2,14985E-05
		99,51%	13,33	
		99,73%	13,76	
2	75%	100,34%	20,67	3,54511E-05
		100,67%	20,54	
		99,52%	20,10	
3	120%	99,63%	27,70	1,91098E-05
		99,33%	28,11	
		100,19%	26,91	
Moyenne		99,92%		
CV%		0,48%		

Tableau 20: Tableau des résultats obtenus pour l'étude de la justesse de dosage de Donépézil HCl.

c.1. vérification de l'homogénéité des variances intergroupe

TEST DE COCHRAN			
S ² max	$\sum_{i=1}^p s_i^2$	C0 calculé	C (5%,3,3)
0,0000355	0,000076	0,466	0,871
$C_{calculé} < C_{tabulé} (0,05 ; k ; n-1)$ C/C : Les variances sont homogènes au risque de 5%			

Tableau 21:
Tableau de Cochran pour l'étude de justesse de dosage de Donépézil HCl.

Conclusion : Les variances de % de recouvrement pour Donépézil HCl des différents groupes sont homogènes au risque de 5%.

c.2. Vérification de la validité des moyennes



Le test de la validité des moyennes s'effectue par in test de Fischer qui consiste à comparer les erreurs inter et intra groupes.

Tableau 22: Vérification de la validité des moyennes par Test de Fisher pour le dosage de Donépézil HCl.

Source de variation	SCE	DDL	Variations	F _{calculé}	F _(5%, 6, 2)
Variation intragroupe	0,00019	6	0,000031	2,467	19,33
Variation intergroupe	0,000152	2	0,000076		
Totale	0,000337	8	0,000042		
F_{calculé} < F_{tabulé} (0,05 ; 6 ; 2) ; p < 0,05					

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

c.3. Estimation de l'intervalle de confiance du recouvrement moyen

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

$$IC_{R.M} = m \pm t_{(5\% ; 8)} * S / \sqrt{N}$$

N	y	ST	t(5%, 8)	IRM	
				min	max
9	99,92%	0,0048	2,30600414	98,82%	101,03%

Tableau 23: Estimation de l'intervalle de confiance du recouvrement moyen pour le dosage de Donépézil HCl.

Conclusion : Le taux de recouvrement varie entre 98.82% et 101.03%. L'intervalle comprend le 100% donc la méthode est exacte.

d. Fidélité:

Le tableau suivant regroupe les données utilisées pour évaluer la fidélité de la méthode d'analyse de Donépézil HCl.

Jour	essai	qté introd.(mg)	aires	qté retrouv.	R%	Si ²	y _i
1	1/1	19,21	4737847,000	19,19	99,88	1,84798683	100,99
	2/1	21,3	5323576,000	21,56	101,21		
	3/1	21,00	5285899,000	21,41	101,93		
	4/1	20,70	5272252,000	21,35	103,14		
	5/1	20,80	5131614,000	20,78	99,91		
	6/1	21,60	5326782,000	21,57	99,87		
2	1/2	21,50	5289275,000	21,56	100,27	0,78635708	100,86
	2/2	19,92	4953279,000	20,19	101,37		
	3/2	18,99	4736668,000	19,31	101,69		
	4/2	20,04	5005312,000	20,40	101,82		
	5/2	21,80	5329948,000	21,72	99,66		
	6/2	21,00	5170312,000	21,07	100,35		
	1/3	19,30	4745772,000	19,31	100,07	0,10515933	99,94
	2/3	21,70	5328239,000	21,68	99,92		
	3/3	21,70	5312378,000	21,62	99,63		



3	4/3	21,40	5286004,000	21,51	100,52		
	5/3	21,00	5144403,000	20,94	99,69		
	6/3	21,90	5372475,000	21,86	99,83		
Moyenne					100,60		
S _i					1,02		

Tableau 24: Tableau des résultats obtenus pour l'étude de la fidélité de dosage de Donépézil HCl.

d.1. vérification de l'homogénéité des variances intergroupe

TEST DE COCHRAN			
S ² max	$\sum_{i=1}^p s_i^2$	C0 calculé	C (5%,3,6)
0,7863571	2,739503	0,287	0,707
$C_{calculé} < C_{tabulé} (0,05 ; k ; n-1)$ C/C : Les variances sont homogènes au risque de 5%			

Tableau 25: Tableau de Cochran pour la fidélité de dosage de

Donépézil HCl.

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

d.2. Vérification de l'homogénéité des moyennes des niveaux (test de GRUBBS)

Le test de GRUBBS permet de détecter les valeurs aberrantes en termes de dispersion de moyennes. Le principe est de comparer les valeurs absolues des écarts réduits, en d'autres termes :

$$G_a = \frac{\text{Max}(x_i) - \bar{X}}{S_x} ; \quad G_b = \frac{\bar{X} - \text{Min}(x_i)}{S_x}$$

TEST DE GRUBBS	Test des moyennes		G1 calculé	G _{table(5%, 3)}
		MAX[y _{i mov}]	100,99	0,39
	MIN[y _{i mov}]	99,94	0,64	
TEST DE GRUBBS	Test des valeurs suspectes		G2 calculé	G _{table(5%, 6)}
	Série incriminée : 1			
	MAX[y _i]	100,52		
MIN[y _i]	99,63	0,358		

Tableau 26: Tableau de Vérification de l'homogénéité des moyennes des niveaux : test de GRUBBS.



Conclusion : Les valeurs $G1 < G_{table}(5\%, 3)$, alors les moyennes testées sont considérées comme correctes au seuil de probabilité de 5%. Les valeurs $G2 < G_{table}(5\%, 6)$, donc les résultats des deux séries incriminées sont homogènes. Ce test de Grubbs montre qu'il n'existe pas des moyennes aberrantes dans l'ensemble des données.

d.3. Estimation de la répétabilité :

Répétabilité	Variance ($S_r^2 = SCE_r / (N-P)$)	Cvr
	0,9132	0,95%

Tableau 27: Calcul du coefficient de répétabilité pour le dosage de Donépézil HCl.

Conclusion : Le calcul du coefficient de variation $0.95\% < 2\%$ (valeur fixée par les normes pharmaceutiques) montre que la répétabilité de la méthode de dosage est jugée très satisfaisante.

d.4. Estimation de la fidélité intermédiaire

Reproductibilité	n	$S_d^2 = SCE_d / (P-1)$	$S_L^2 = (S_r^2 + S_d^2) / 7$	$S_R^2 = S_r^2 + S_L^2$	CVR
	6	1,9597	0,149500	1,06	1,02

Tableau 28: Calcul du coefficient de fidélité intermédiaire pour le dosage de Donépézil HCl.

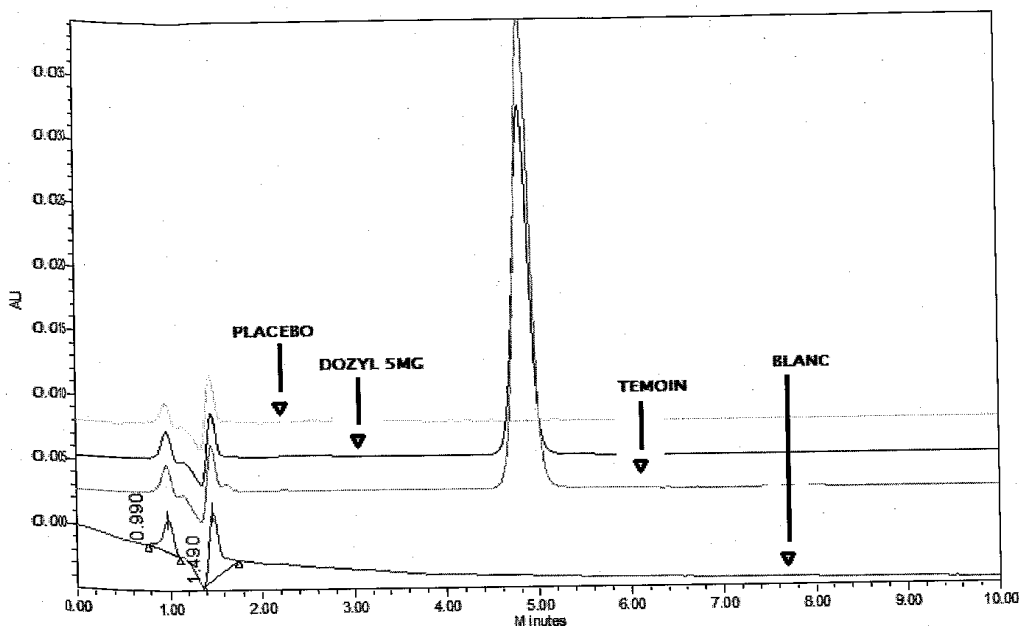
Conclusion : Le calcul du coefficient de variation $1,02\% < 2\%$ (valeur fixée par les normes pharmaceutiques) montre que la fidélité intermédiaire de la méthode de dosage est jugée très satisfaisante. La méthode de dosage de Donepezil est fidèle, elle est validée par un CV de fidélité intermédiaire de 0.95 % et CV de répétabilité de 1.02 %.

3. Méthode de dosage suite à une dissolution de Donépézil HCl :

a. Spécificité :

Les essais de spécificité ont présenté des pics de PA, Placebo, Blanc et du Témoin bien séparés à la longueur d'onde de 230 nm. En effet le chromatogramme suivant montre qu'il n'y a aucune interférence.

Figure 7 : Chromatogramme superposés de PA, Placebo, Blanc, Témoin.





La spécificité est satisfaisante puisque:

- Le témoin de Donépézil HCl et l'essai présentent le même profil du chromatogramme.
- Le placebo ne présente aucun pic dans le temps de rétention de donepezil HCl.

b. Linéarité :

La linéarité permet de montrer qu'il existe une relation entre les concentrations en Donépézil HCl et les réponses ainsi trouvées.

Le tableau suivant regroupe les résultats trouvés :

% théorique en donepezil HCl	Quantité en donepezil HCl (mg) Xij	Aires (Yij)	VAR
30%	32,2	1331204	1971827625
	32,0	1310904	
	32,3	1395930	
50%	55,4	2334253	1177963843
	55,6	2385501	
	55,3	2399426	
75%	83,3	3473169	1750187872
	83,1	3520660	
	83,1	3437257	
100%	109,8	4561144	597522824
	109,7	4527627	
	109,9	4575208	
120%	134,9	5469644	3918759681
	135,1	5507942	
	135,3	5592022	

Tableau 29 : Tableau des résultats pour la linéarité de dosage suite à une dissolution de Donépézil HCl.

b.1. vérification de l'homogénéité des variances intergroupe :

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

TEST DE COCHRAN			
S ² max	$\sum_{i=1}^p s_i^2$	C0 calculé	C (5%,3,5)
3918759681,3333300	9416261846,333330	0,416	0,684
$C_{calculé} < C_{tabulé} (0,05 ; k ; n-1)$ C/C : Les variances sont homogènes au risque de 5%			

Tableau 30 : Tableau de Cochran pour la linéarité de dosage suite à



une dissolution de Donépézil HCl.

Conclusion : Les variances des différents groupes sont homogènes pour l'ensemble des points de gamme de l'intervalle étudié de Donépézil au risque de 5%.

b.2. Détermination de l'équation de la droite de régression linéaire :

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

Critères de la droite de régression		
Pente de la droite	b	40473,6
Ordonnée à l'origine	a	90087,7
Coefficient de corrélation	R ²	0.999
Equation de la droite de régression		
Y=40473,6x+ 90087,7		

Tableau 31 : Tableau des Critères de la droite de régression pour le dosage suite à une dissolution de Donépézil HCl.

b.3. Vérification de l'existence d'une pente significative :

Ce test consiste à vérifier l'hypothèse nulle :

$$H_0 : b=0 \text{ contre } H_1 : b \neq 0$$

ANALYSE DE VARIANCE

Origine de la variation	SCE	ddl	CM	F _{calculé}	F _{tabulé}
Variation due à la régression	33302544606285,00	1,00	33302544606285,00	11889,33	4,67
Variation Résiduelle	36413569443,82	13,00	2801043803,37		
Variation total	33338958175728,80	14,00	2381354155409,20		

$$F_{\text{calculé}} > F_{\text{tabulé}} (0.05 ; 1 ; 13) ; p < 0.05$$

Tableau 32 : Vérification de l'existence d'une pente significative pour le dosage suite à une dissolution de Donépézil HCl par le test de Fisher.

Conclusion : En utilisant le test de Fischer, à partir des résultats brutes, $F_{\text{calculé}} > F_{\text{tabulé}} (0.05 ; 1 ; 13) ; p < 0.05$, nous pouvons conclure l'existence d'une pente significative, donc il y'a une dépendance linéaire entre la prise d'essai et les aires, au seuil de probabilité considérée.

b.4. Vérification de la validité de la droite de régression :

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

Origine de la variation	SCE	ddl	CM	F _{calculé}	F _{tabulé}
Erreur de la régression	17581045751,16	3,00	5860348583,72	3,11	3,71
Erreur Expérimentale	18832523692,67	10,00	1883252369,27		

$$F_{\text{calculé}} > F_{\text{tabulé}} (0.05 ; 3 ; 10) ; p < 0.05$$



Tableau 33 : Vérification de la validité de la droite de régression pour le dosage suite à une dissolution de Donépézil HCl.

Conclusion : L'ajustement est valide au seuil de probabilité considérée. Donc l'erreur du modèle est négligeable, le domaine de linéarité est considéré comme valide au seuil de 5%.

b.5. Comparaison de l'ordonnée à l'origine avec 0 : Test de student

Comparaison de l'ordonnée à l'origine avec zéro : **H0 : a=0**

lal	S _a	t _{calculé} =lal/S _a	t _{tabulé} (0.05 ; N-2)
90087,7	32200,1757	2,09774016	2,16

Tableau 34 :

l'ordonnée à l'origine pour le dosage suite à une dissolution de Donépézil HCl : Test de Student.

Comparaison de

Conclusion : $t_{calculé} < t_{tabulé}$; $p < 0.000$ L'ordonnée à l'origine n'est pas significativement différente de 0 au seuil de probabilité $\alpha=5\%$.

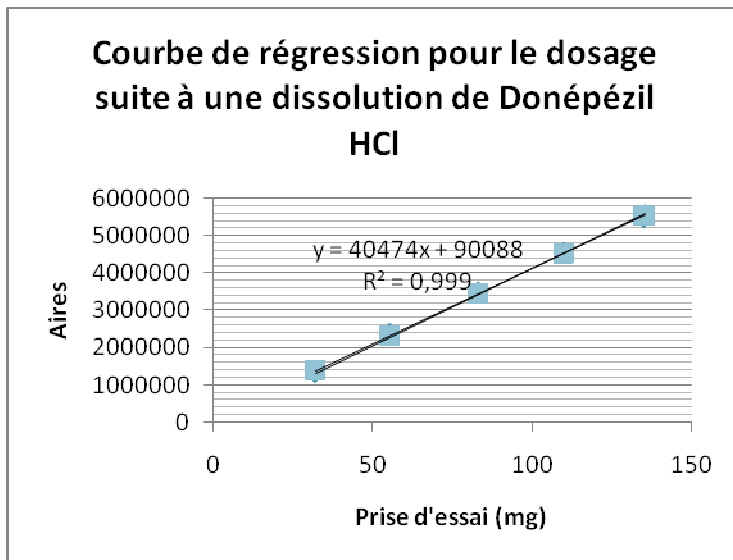


Figure 8 : la droite de régression de dosage suite à une dissolution de Donépézil HCl.

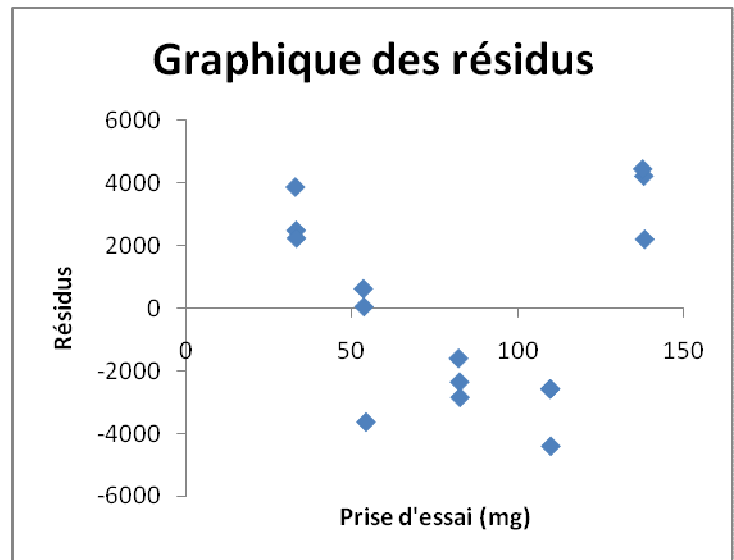


Figure 9 : Graphique des résidus de dosage suite à une dissolution de Donépézil HCl.

Soient les données brutes d'une procédure de justesse sont exprimées par le pourcentage de recouvrement par rapport à la quantité introduite en Donépézil HCl. Les résultats obtenus sont cités dans le tableau suivant :

	Réponse	PRISE TEMOIN	FACTEUR DE REPONSE
STANDARD 1	456231,5	110,5	4128,792
STANDARD 2	462229,9	112,4	4112,366
MOY			4120,579



CV%			0,28%
-----	--	--	-------

Tableau 35: Tableau des standards pour l'exactitude de dosage suite à une dissolution de Donépézil HCl.

N° de séries	% théorique de DONEPEZIL	POURCENTAGE DE RECOUVREMENT (%)	QUANTITE TROUVEE (mg)	Si ²
1	30%	97,11%	1,57	9,26212E-05
		98,92%	1,56	
		98,59%	1,55	
2	75%	98,46%	4,03	5,37607E-05
		98,63%	4,03	
		99,81%	3,97	
3	120%	101,15%	6,47	0,000151991
		98,88%	6,46	
		99,18%	6,40	
Moyenne		98,97%		
CV%		1,10%		

Tableau 36: Tableau des résultats obtenus pour l'étude de la justesse de dosage suite à une dissolution de Donépézil HCl.

c.1. vérification de l'homogénéité des variances intergroupe

TEST DE COCHRAN			
S ² max	$\sum_{i=1}^p s_i^2$	C0 calculé	C (5%,3,3)
0,0001520	0,000298	0,509	0,871
$C_{calculé} < C_{tabulé} (0,05 ; k ; n-1)$ C/C : Les variances sont homogènes au risque de 5%			

Tableau 37: Tableau de Cochran pour l'exactitude de dosage suite à une dissolution

de Donépézil HCl.

Conclusion : Les variances de % de recouvrement pour Donépézil HCl des différents groupes sont homogènes au risque de 5%.

c.2. Vérification de la validité des moyennes

Le test de la validité des moyennes s'effectue par in test de Fischer qui consiste à comparer les erreurs inter et intra groupes.



Tableau 38: Vérification de la validité des moyennes par Test de Fisher pour le dosage suite à une dissolution de

Source de variation	SCE	DDL	Variances	F _{calculé}	F _(5%, 6, 2)
Variation intragroupe	0,00095	6	0,000158	1,885	19,33
Variation intergroupe	0,000597	2	0,000298		
Totale	0,001547	8	0,000193		

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

Donépézil HCl.

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

c.3. Estimation de l'intervalle de confiance du recouvrement moyen

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

$$IC_{R,M} = m \pm t_{(5\% ; 8)} * S/\sqrt{N}$$

N	y	ST	t(5%, 8)	IRM	
				min	max
9	98,97%	0,0109	2,306004135	96,46%	101,48%

Tableau 39: Estimation de l'intervalle de confiance du recouvrement moyen pour le dosage suite à une dissolution de Donépézil HCl.

Conclusion : Le taux de recouvrement varie entre 98.97% et 101.48%. L'intervalle comprend le 100% donc la méthode est exacte.

d. Fidélité:

Le tableau suivant regroupe les données utilisées pour évaluer la fidélité de la méthode de dosage suite à une dissolution de Donépézil HCl.

Jour	essai	qté introd.(mg)	aires	qté retrouv.	R%	Si ²	y _i
1	1/1	5,01	451427,000	4,81	95,93	2,84214033	94,63
	2/1	5,11	445946,000	4,75	92,93		
	3/1	5,02	443667,000	4,73	94,27		
	4/1	5,07	449551,000	4,79	94,44		
	5/1	5,15	449641,000	4,79	92,98		
	6/1	4,99	455095,000	4,85	97,23		
2	1/2	5,09	452826,000	4,79	94,26	1,33837947	94,21
	2/2	5,14	446414,000	4,73	92,01		
	3/2	4,95	444750,000	4,71	95,21		
	4/2	5,03	450618,000	4,77	94,88		
	5/2	5,08	451496,000	4,78	94,09		
	6/2	5,09	455412,000	4,82	94,83		
	1/3	5,04	454381,000	4,80	95,36	1,05639824	94,10
	2/3	5,09	447704,000	4,73	93,03		



3	3/3	5,05	444330,000	4,70	93,02		
	4/3	5,05	451457,000	4,77	94,52		
	5/3	5,10	451835,000	4,78	93,60		
	6/3	5,07	455753,000	4,82	95,09		
Moyenne					94,31		
S_i					1,26		

Tableau 40: Tableau des résultats obtenus pour l'étude de la fidélité de dosage suite à une dissolution de Donépézil HCl.

d.1. vérification de l'homogénéité des variances intergroupe

TEST DE COCHRAN			
S ² max	$\sum_{i=1}^p s_i^2$	C0 calculé	C (5%,3,6)
1,3383795	5,236918	0,256	0,707
$C_{calculé} < C_{tabulé} (0,05 ; k ; n-1)$ C/C : Les variances sont homogènes au risque de 5%			

Tableau 41: Tableau de Cochran pour la fidélité de dosage suite à une dissolution de Donépézil HCl.

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

d.2. Vérification de l'homogénéité des moyennes des niveaux (test de GRUBBS) :

Le test de GRUBBS permet de détecter les valeurs aberrantes en termes de dispersion de moyennes. Le principe est de comparer les valeurs absolues des écarts réduits, en d'autres termes :

$$G_a = \frac{\text{Max}(x_i) - \bar{X}}{S_x} ;$$

$$G_b = \frac{\bar{X} - \text{Min}(x_i)}{S_x}$$

TEST DE GRUBBS	Test des moyennes		G1 calculé	G _{table(5%, 3)}
	MAX[y _{i moy}]	94,63	0,25	1,155
	MIN[y _{i moy}]	94,10	0,17	
	Test des valeurs suspectes			G2 calculé
	Série incriminée : xx			
	MAX[y _i]	97,23	1,540	
MIN[y _i]	92,93	1,009		

Tableau 42: Tableau de Vérification de l'homogénéité des moyennes des niveaux pour le dosage suite à une dissolution de Donépézil HCl : test de GRUBBS.



Conclusion : Les valeurs $G1 < G_{table}(5\%, 3)$, alors les moyennes testées sont considérées comme correctes au seuil de probabilité de 5%. Les valeurs $G2 < G_{table}(5\%, 6)$, donc les résultats des deux séries incriminées sont homogènes. Ce test de Grubbs montre qu'il n'existe pas des moyennes aberrantes dans l'ensemble des données.

d.3. Estimation de la répétabilité :

Répétabilité	Variance (S_r^2)= $SCE_r/(N-P)$	CVR
	1,7456	1,40

Tableau 43: Calcul du coefficient de répétabilité pour le dosage suite à une dissolution de Donépézil HCl.

Conclusion : Le calcul du coefficient de variation 1.40 % < 6% (valeur fixée par les normes pharmaceutiques) montre que la répétabilité de la méthode de dosage est jugée très satisfaisante.

d.4. Estimation de la fidélité intermédiaire

Reproductibilité	n	$S_d^2 = SCE_d / (P-1)$	$S_L^2 = (S_r^2 + S_d^2) / 7$	$S_R^2 = S_r^2 + S_L^2$	CVR
	6	0,4630	0,183236	1,93	1,47

Tableau 44: Calcul du coefficient de fidélité intermédiaire pour le dosage de Donépézil HCl.

Conclusion : Le calcul du coefficient de variation 1,47 % < 6% (valeur fixée par les normes pharmaceutiques) montre que la fidélité intermédiaire de la méthode de dosage est jugée très satisfaisante.

La méthode de dosage de Donepezil est fidèle, elle est validée par un CV de fidélité intermédiaire de 1.40 % et CV de répétabilité de 1.47 %.



Conclusion

Suite à la mise en place d'un nouveau médicament DOZYL 5mg de principe actif Donépézil HCl, une validation partielle des méthodes de dosage a donc été nécessaire.

Le but de la validation d'une méthode analytique est de démontrer qu'elle correspond à l'usage pour lequel elle est prévue et de prouver par conséquent la fiabilité des résultats obtenus dans les limites bien définies. En d'autres termes, cette validation nous permet de vérifier, quantifier la maîtrise d'une méthode.

La validation analytique pour le dossier AMM doivent démontrer que les critères des tests appliqués et les critères d'acceptation sont suffisants pour garantir une qualité reproductible du médicament à libération.

Cette validation consiste à déterminer certaines caractéristiques telle que : la spécificité, la fidélité intermédiaire, la répétabilité, l'exactitude, la linéarité, qui ont été vérifiés.

Dans notre cas, les résultats obtenus sont satisfaisants. La méthode de dosage ainsi que la méthode de dissolution sont donc validées.