

N° d'ordre :

REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE
MINISTERE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR ET DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE

UNIVERSITE MOULOU D MAMMERI DE TIZI-OUZOU

FACULTE DES SCIENCES

DEPARTEMENT DE CHIMIE



DOMAINE : SCIENCES DE LA MATIERE
FILIERE : CHIMIE

MEMOIRE DE MASTER

SPECIALITE : CHIMIE PHARMACEUTIQUE

THEME

**VALIDATION D'UNE METHODE DE DOSAGE DU
BISOPROLOL FUMARATE DANS DES COMPRIMES DE 5
mg PAR HPLC**

Présenté par :

AIT TALEB Karima

BELLIK Messaouda

Soutenu publiquement, le 12 /10 /2017 devant le Jury composé de :

M^{me} M.CHEBLI eps MAKHLOUFI

MCA - UMMTO

PRESIDENTE

M^r M.MAMOU

MAHU- UMMTO

ENCADREUR

M^{me} L.BELMAHDI

MAA - UMMTO

EXAMINATRICE

M^{me} F.BELKESSAM

MCB - UMMTO

EXAMINATRICE

Remerciements

*Ce travail a été réalisé au sein du laboratoire de chimie analytique du département de pharmacie de la faculté de médecine de l'UMMTO sous la direction de **D^r M. MAMOU**, maitre assistant en chimie analytique et chef de département de pharmacie qui a proposé le thème de ce mémoire.*

*La première personne que nous tenons à remercier est notre encadreur **D^r M. MAMOU**, pour l'orientation, la confiance, la patience qui a constitué un apport considérable sans lequel ce travail n'aurait pas pu être mené au bon port. Nous voudrions également lui témoigner notre gratitude pour ses précieux conseils qu'il nous a prodigué, pour son investissement et son écoute qui ont grandement contribué à la qualité de ce travail et surtout pour tout le temps qu'il a pu consacrer à notre mémoire, malgré ses nombreuses responsabilités, merci.*

*Nous remercions **M^r A. TIGHRINE**
Doctorant en biochimie sciences alimentaires, Microbiologie à
l'UMMTO pour le temps qu'il nous a consacré et pour ses conseils.*

*Nous tenons également à remercier **D^r M. BOURSOUTI**
Résident en chimie analytique
Pour son aide, ses précieux conseils et de nous avoir épaulé moralement tous les jours
dans la construction de ce mémoire.*

*Nous voudrions remercier **D^r K. AKLI**
Résidente en chimie analytique
Pour sa gentillesse, son accueil et surtout pour son soutien moral durant toute la période
du travail*

*Nos vifs remerciements vont également aux membres du jury pour l'intérêt qu'ils ont
porté à notre travail en acceptant d'évaluer notre travail.*

*On remercie vivement **M^{me} MAKHLOUFI** d'avoir accepté de présider le jury, on
remercie également **M^{me} BELMAHDI** et **M^{me} BELKESSAM** d'avoir accepté d'examiner
notre travail.*

*Enfin, on voudrait remercier tout particulièrement nos familles auprès de qui on a trouvé
un soutien sans commune mesure.*

KARIMA et MESSAOUDA

Je dédie ce mémoire

À mes chers parents, pour tous leurs sacrifices, leur amour, leur tendresse, leur soutien et leurs prières tout au long de mes études, Que ce travail soit l'accomplissement de vos vœux tant allégués, et le fruit de votre soutien infailible,

Papa, maman, je vous suis très reconnaissante, Merci d'être toujours là pour moi.

À ma sœur, pour ses encouragements permanents, et son soutien moral.

À mon frère, pour appui et son encouragement.

A mon binôme Messa, qui n'a jamais baissé les bras et qui a tenu jusqu'à la fin avec moi.

À toutes les personnes dont les noms ne figurent pas dans ces dédicaces et qui ont été patients avec moi et m'ont soutenu jusqu'au bout, merci.

KARIMA

Je dédie ce mémoire ;

A ma raison d'être dans ce monde, mes chers parents qui m'ont aidé et soutenu tout au long de mes études, Aucun hommage ne pourrait être à la hauteur de l'amour Dont ils ne cessent de me combler, Que dieu leur procure bonne santé et longue vie ;

A celui que j'aime beaucoup et qui m'a soutenu tout au long de ce projet : mon mari ADEL merci d'être là pour moi, tu as toujours trouvé les mots pour me remonter le moral et m'encourager ;

A mes chers frères AMINE et ILIAS

A ma cher sœur AMINA

A ma belle famille que j'aime beaucoup

A toute la famille BELLIK et RAIH

A mon binôme MIMA,

Tout au long de ce travail nous avons passé des moments de folie qui font du bien quand la fatigue et le stress nous envahissait, on a traversé ensemble ce chemin et passé par des hauts et des bas pour mener à bien ce travail, on va enfin pouvoir souffler car cette fois ci c'est terminé !

Enfin à tous ceux qui m'ont aidé de près ou de loin pour que ce projet soit possible, je vous dit merci.

MESSAOUDA

SOMMAIRE

Introduction générale	1
Objectifs	2

PARTIE THEORIQUE

Chapitre I: Bisoprolol fumarate

1. Bêta-bloquant	3
1.2 Classifications des Bêta-bloquants	3
1.2 Mécanisme d'action	3
2. Bisoprolol fumarate	3
2.1 Définition	3
2.2 Propriétés physico-chimique et organoleptiques	4
3. Mécanisme de synthèse du bisoprolol.....	5
4. Exemples de génériques commercialisés en Algérie	6

Chapitre II: Validation analytique

1. Définition de la validation analytique	7
2. Aspect réglementaire.....	7
3. Objectifs d'une validation analytique.....	8
4. Critères de validation	9
5. Place de la validation dans le cycle de vie d'une méthode	10
6. Protocole en phase de la validation	11
7. Démarches statistique de la validation	13
7.1 Spécificité.....	13
7.2 Fonction de réponse	13
7.3 Alignement des observations	14
7.4 Prédiction inverses.....	14
7.5 Calcul de la justesse et de la fidélité	15
7.5.1 Justesse	15
7.5.2 Fidélité.....	16
7.6 Calcul de l'exactitude.....	16
7.6.2 Calcul de l'intervalle de tolérance.....	16
7.6.3 Profil d'exactitude	17

7.7 Choix de la fonction de réponse	18
7.8 Linéarité	18
7.9 Limites de quantification.....	18

PARTIE PRATIQUE

Matériels et méthodes

1. Matériel	19
1.1 Appareillage	19
1.2 Matières premières	20
2. Méthodes	20
2.1 Conditions expérimentales	20
2.1.1 Choix du protocole de validation	20
2.1.2 Choix des paramètres de la validation.....	20
2.2 Préparation des solutions	20
2.2.1 Préparation du diluant	20
2.2.2 Préparation de la solution placebo.....	20
2.2.3 Préparation des solutions standards.....	21
2.2.1 Préparation de la phase mobile	21
2.3 Conditions chromatographique.	21
3. Traitement des données	22

Résultats et discussion

I. Résultats	23
1. Spécificité et effet matrice	23
1.1. Par comparaison des chromatogrammes	23
1.2. Confirmation de la spécificité sur les deux gammes d'étalonnage et de validation.....	25
1.3 Vérification d'erreurs systématiques.....	28
2. Fonctions de réponse	28
3. Exactitude.....	29
3.1 Alignement des observations	29
3.2 Prédiction inverses	30
4. Justesse	30
5. Fidélité.....	31
6. Erreur totale	32

7. Intervalle de tolérance	33
8. Profil d'exactitude	33
9. Intervalle de dosage	34
10. Linéarité de la méthode	34
11. Robustesse	37
II. Discussions	40
1. Spécificité.....	40
1.1. Comparaison des chromatogrammes	40
1.2. Confirmation de la spécificité sur les deux gammes d'étalonnage et de validation.....	40
2. Choix de la fonction de réponse	40
2.1 Fonction de réponse	40
2.1 Méthode basée sur le profil d'exactitude	40
2.2 Méthode basée sur le calcul des indices	40
3. Critères de performance de la fonction de réponse choisie.....	41
4. Critère de décision sur la validité de la méthode	41
4.1 Profil d'exactitude	41
4.2 Intervalle de dosage	41
4.3 Linéarité	41
5. Robustesse.....	41
6. Conclusion	41
Conclusion générale	42

Bibliographie

Annexes

- **Annexe I** : Données brutes de la validation analytique.
- **Annexe II** : Chromatographie liquide à haute performance HPLC.
- **Annexe III** : Monographie du bisoprolol fumarate.
- **Annexe IV** : Table de student.

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 01: Propriétés physicochimiques et organoleptiques	4
Tableau 02: Choix du nombre de standards d'étalonnage et de validation en fonction du Protocole choisi.	12
Tableau 03: Exemples de fonction de réponse	13
Tableau 04: Règles d'alignement pour différentes fonctions de réponses	14
Tableau 05: Calcul des prédictions inverses pour différentes fonctions de réponse	15
Tableau 06: Appareillages du laboratoire de chimie analytique utilisés dans ce présent Travail	19
Tableau 07: Les matières premières utilisées dans ce présent travail.....	20
Tableau 08 : Les masses théoriques des niveaux de concentration du biosprolol fumarate.....	21
Tableau 09 : Résultats de la comparaison des chromatogrammes.....	24
Tableau 10 : Résultats obtenus sur la gamme sans matrice	25
Tableau 11: Pente et l'ordonnée à l'origine obtenues à partir de la gamme sans matrice	26
Tableau 12 : Résultats obtenus sur la gamme avec matrice.....	26
Tableau 13 : Pente et l'ordonnée à l'origine obtenues à partir de la gamme avec matrice.....	27
Tableau 14 : Comparaison des pentes par le test de student.....	27
Tableau 15 : Données des droites SE et SV.....	28
Tableau 16 : Vérification des erreurs systématiques par le test de student	28
Tableau 17 : Résultats obtenus pour la fonction $y=ax+b$	28
Tableau 18 : Alignement des réponses observées avec les trois séries de validation.....	29
Tableau 19 : Prédications inverses obtenus avec les SV	30
Tableau 20 : Biais absolu, biais relatif et recouvrement pour chaque niveau de concentration théorique des SV	30
Tableau 21 : Calcul de fidélité en écarts types relativisés	31
Tableau 22 : Calcul de fidélité en coefficients de variations	32
Tableau 23 : Calcul d'erreur totale pour chaque niveau de concentration.....	32
Tableau 24 : Calcul des limites de l'intervalle de tolérance pour chaque niveau de concentration	33
Tableau 25 : Vérification de la linéarité de la méthode	34
Tableau 26 : Données de la droite du SV	35
Tableau 27 : Comparaison de la pente à 1 et l'ordonnée à l'origine à 0 avec le test de student.	35

Tableau 28 : Données issues de l'utilitaire d'analyse	36
Tableau 29 : Données brutes et résultats de l'étude de la robustesse	37
Tableau 30 : Plan factoriel de l'étude de la robustesse	38
Tableau 31 : Calcul des effets des paramètres et leurs intervalles de confiance	39
Tableau 32 : Résultats de la confirmation de la spécificité	40

LISTE DES FIGURES

Figure 01 : Logigramme permettant de sélectionner un protocole de validation.....	12
Figure 02 : Chromatogramme du diluant avec placebo non chargé de PA.....	23
Figure 03 : Chromatogramme du standard d'étalonnage, niveau 100%.....	23
Figure 04 : Chromatogramme du standard de validation, niveau100%	24
Figure 05 : Courbes d'étalonnage obtenues pour les SE et SV des trois séries	25
Figure 06 : Superposition des courbes d'étalonnage et de validation	27
Figure 07 : Profil d'exactitude de la fonction lineaire simple $y = ax+b$	33
Figure 08 : Courbe de linéarité de la méthode	35

LISTE DES ABREVIATIONS

ACN : Acétonétrile

AMM : Autorisation de Mise sur le Marché

ASI : Activité Sympathomimétique Intrinsèque

BPF : Bonnes Pratiques de Fabrication

Cp : Comprimé

CV : Coefficient de variation

CYP3A4 : Cytochrome P 450

DCI : Dénomination Commune Internationale

DL: Dose Létale

FDA: Food and Drug Administration

HPLC: High Performance Liquid Chromatography

HTA: Hypertension artérielle

ICH: International Conference of Harmonization

ISO: International Standard Organisation

IUPAC: International Union of Pure and Applied Chemistry

LD : Limite de Détection

LQ : Limite de Quantification

LQ_{inf}: Limite de Quantification inférieure

LQ_{sup}: Limite de Quantification supérieure

MSE : Mean Squared Error

MSM : Mean Square Model

PA : Principe Actif

QSP : Quantité Suffisante Pour

SCE : Somme des Carrés des Ecart

SE : Standard d'Etalonnage

SFSTP : Société Française des Sciences et Techniques Pharmaceutiques

SV : Standard de Validation

PARAMETRES STATISTIQUES

- a:** Pente de la droite de régression linéaire
- b:** Ordonnée à l'origine de la droite de régression
- $\hat{\beta}$: Estimateur de la pente de régression linéaire
- α :** Risque
- C:** Test de Cochran
- CV:** Coefficient de Variation
- D:** Droite de régression linéaire
- F:** Test de Fisher
- i:** Indice des valeurs individuelles dans le groupe j
- I_{R_m} :** Intervalle de confiance de recouvrement moyen R_m
- j:** Indice de groupe
- k:** Nombre de groupes
- m_j :** Moyenne de n_j valeurs du groupe j
- \bar{m}_j : Moyenne des moyennes des groupes
- n_j :** Nombre d'observations du groupe j
- \bar{n}_j : Nombre moyen de valeurs par groupe
- N:** Nombre total d'observations y_{ij} dans l'ensemble des k groupes
- NDL:** Nombre de degré de liberté
- \bar{NDL} : Nombre de degré de liberté du groupe j
- P:** Seuil de probabilité
- R:** Coefficient de corrélation
- R_m :** Taux de recouvrement moyen
- S^2 :** Variance
- S:** Ecart type estimé de n valeurs
- $S_{x_{ij}}$:** Ecarts types respectifs des variables x_{ij}
- $S_{y_{ij}}$:** Ecarts types respectifs des variables x_{ij} et y_{ij}
- t:** t de student
- \bar{x} : Moyenne des valeurs X_{ij} des k groupes
- X_{100} :** Concentration à la solution de référence
- X_{ij} :** Quantité retrouvée

x_{ij} : Valeur brute indépendante

\bar{X}_j : Moyenne des valeurs x_{ij} du groupe j

\bar{y} : Moyenne des observations y_{ij} des k groupes

\bar{Y} : Recouvrement moyen

y'_{ij} : Valeurs estimées

y100 : Observations à la solution de référence

Yij : Pourcentage de recouvrement

y_{ij} : Valeur brute dépendante

\bar{Y}_j : Moyenne des observations y_{ij} dans chaque groupe j

DEFINITION DE QUELQUES PARAMETRES STATISTIQUES

1. Coefficient de corrélation

Quotient de la covariance de deux caractères par le produit de leurs écarts types.

2. Coefficient de variation

Pour un caractère positif, il s'exprime par le rapport de l'écart type à la moyenne. Dans la plupart des cas, il est donné en pourcentage.

3. Ecart type

L'écart type se définit comme étant la racine carré de la variance.

4. Ordonnée à l'origine

Endroit où la droite d'un graphique coupe l'axe des ordonnées.

5. Pente

Angle que fait une droite sur un graphe par rapport à l'horizontale. Il est exprimé sous forme d'un rapport entre les valeurs de Y et celle de X.

6. Risque α

Probabilité de rejeter une hypothèse vraie à l'issue d'un test statistique.

7. Variance

La variance est un paramètre statistique mesurant la dispersion des individus autour de la Moyenne.

GLOSSAIRE

Ce lexique donne les principales définitions des termes utilisés pour la rédaction de se présent manuscrit et dont la connaissance est utile.

Agoniste

Molécule douée d'affinité et d'efficacité pour un récepteur donné.

Antagoniste

Substance susceptible d'empêcher ou de diminuer un effet pharmacodynamique provoqué par un agoniste.

Autorisation de mise sur le marché (AMM)

Acte administratif permettant la commercialisation d'une spécialité pharmaceutique et en fixant les conditions.

Biais

Différence entre l'espérance de résultats d'essai et une valeur acceptée comme référence.

Blanc

Essai réalisé en l'absence de matrice (blanc réactif) ou sur une matrice qui ne contient pas l'analyte (blanc matrice).

Bonnes pratiques de fabrication (BPF)

Ensemble de règles et de procédures devant être respectées lors de la fabrication d'un médicament.

Effet matrice

L'effet matrice produit une source d'erreur répétable pour un échantillon donné, mais aléatoire d'un échantillon à l'autre. Cette erreur est liée à l'interaction des composés présents dans le produit à analyser sur le mesurage de l'analyte recherché. L'effet matrice se manifeste dans les méthodes présentant un signal non spécifique.

Excipient

Un excipient est une substance neutre visant à faciliter la prise du médicament, sa conservation et son absorption. C'est la partie variant réellement entre un générique et le médicament princeps.

Excipient à effet notoire

« Un excipient dont la présence peut nécessiter des précautions d'emploi pour certaines catégories particulières de patients ».

Logiciel ORIGIN 6.0

Origin 0.6 est un programme informatique exclusif pour la représentation graphique scientifique interactive et l'analyse des données. Elle est produite par OriginLab Corporation, et fonctionne sur Microsoft Windows. Les analyses des données dans Origin incluent des statistiques, traitement du signal, ajustement de courbe et d'analyse de pointe. Origin importe des fichiers de données dans différents formats tels que du texte ASCII, Excel, Il exporte également le graphique pour différents formats de fichiers image tel que JPEG.

Médicament

Toute substance ou composition présentée comme possédant des propriétés curatives ou préventives à l'égard des maladies humaines, ainsi que tout produit administré à l'homme en vue d'établir un diagnostic médical, de restaurer, corriger ou modifier ses fonctions organiques.

Métabolites

Substances résultant de la transformation (du métabolisme) subie par le principe actif dans l'organisme. Un même principe actif peut donner naissance à plusieurs métabolites et ceux-ci à une cascade de métabolites.

Pharmacopée

Recueil de mises à jour périodiques, prévu par le code de la santé publique, auparavant dénommé « Codex », rédigé par la « Commission Nationale de la Pharmacopée » sous l'autorité du ministre chargé de la santé. Ce recueil contient la nomenclature des drogues, des médicaments simples et composés, des articles officinaux, une liste des dénominations communes, les tableaux de posologie usuelles et maximales, les caractères des médicaments, les moyens permettant de les identifier, les méthodes de contrôle, les procédés de préparation, de stérilisation et de conservation, les règles de conditionnement, les principales incompatibilités ainsi que des renseignements pouvant être utiles au pharmacien pour sa pratique.

Placebo

Préparation absolument semblable à un médicament, sauf qu'il est dépourvu de principe actif.

Principe actif

Substance active, d'un médicament est chacun des composants de ce médicament qui possède un effet thérapeutique. Cette substance est souvent en très faible proportion dans le médicament par rapport aux excipients.

Protocole

Document descriptif et normatif planifiant intégralement dans le détail un essai ou une étude avant sa mise en œuvre

Test de Student t

Les tests de Student sont utilisés dans le cadre des tests relatifs à la moyenne des échantillons de petite taille. Dans le cas où les échantillons sont de grande taille ($n > 30$), on utilise souvent des approximations par des lois normales.

INTRODUCTION GENERALE

Avec la mise en place des systèmes d'assurance qualité dans les laboratoires de l'industrie pharmaceutiques, « la validation des méthodes d'analyse » est aujourd'hui un objectif important et omniprésent. Le résultat d'analyse est l'indicateur visible et le dernier verrou permettant de garantir la qualité, l'efficacité et la sécurité du patient. C'est pourquoi, Aujourd'hui, l'effort se porte plutôt vers la qualité métrologique des mesures ce qui se traduit par des exigences de validation des méthodes et d'estimation de l'incertitude accrues. Toute nouvelle méthode d'analyse mise au point au sein d'un laboratoire doit faire l'objet d'une validation analytique, avant sa mise en routine, cette dernière repose sur un ensemble de mesures expérimentales, et de tests statistiques qui permettent de prouver qu'une procédure est suffisamment exacte et fiable.

De nos jours de nouvelles tendances et de nouveaux concepts scientifiques apparaissent et proposent de revoir les bases mêmes de la validation analytique pour une démarche harmonisée, avec notamment l'apparition de l'utilisation du profil d'exactitude comme outil de décision, permettant de simplifier l'approche de la validation d'une procédure analytique tout en contrôlant le risque associé à son utilisation.

Notre étude porte sur la mise au point et la validation d'une méthode de dosage par HPLC et il a été choisi comme principe actif le bisoprolol fumarate.

Le présent travail a été réalisé au niveau du laboratoire de Chimie analytique du département de Pharmacie à la faculté de médecine sous le régiment du département de Chimie de l'Université Mouloud MAMMERI de Tizi-Ouzou.

C'est ainsi que notre manuscrit est réparti en deux parties :

- La première partie est consacrée à une synthèse bibliographique qui est répartie en trois chapitres :
 - Chapitre I : Bisoprolol fumarate
 - Chapitre II : Les comprimés
 - Chapitre III : Validation analytique
- La seconde partie est dédiée à l'aspect pratique de notre travail, dans laquelle nous définissons les équipements et méthodes utilisées, décrivons les protocoles expérimentaux et présentons les résultats afférant.

Un traitement statistique des résultats de la validation analytique est réalisé afin de vérifier ses critères conformément au protocole préétabli.

OBJECTIFS

L'objectif de notre travail est de mettre au point et valider une méthode de dosage du bisoprolol fumarate dans des comprimés de 5mg par HPLC, qui soit simple, sensible et rapide pouvant être appliquée en routine en utilisant le profil d'exactitude comme outil de décision. Ce dernier est décrit dans le guide de validation élaboré par une commission de la Société Française des Sciences Techniques et Pharmaceutiques (SFSTP), publié dans la revue STP Pharma Pratique en janvier 2006.

PARTIE THEORIQUE

Chapitre I

BISOPROLOL FUMARATE

1. Bêta-bloquant

Un bêta-bloquant est un médicament utilisé en cardiologie qui bloque l'action des médiateurs du système adrénergique tels que l'adrénaline. [1]

1.2 Classifications des Bêta-bloquants

Selon les récepteurs, on distingue :

- **β -bloquants non-cardioselectifs**

Antagoniste β_1 et β_2 : bloquent à la fois les récepteurs β_1 cardiaques et β_2 des autres organes.

Avantage : Présence d'une Activité sympathomimétique intrinsèque. (ASI)

- **β -bloquants cardioselectifs**

Antagoniste β_1 : bloquent seulement les récepteurs β_1 cardiaques.

Avantage : Cardiosélectivité (β_1). [1]

1.2 Mécanisme d'action

Les bêtabloquants sont des antagonistes de type compétitif : l'occupation des récepteurs par l'antagoniste (le bêta-bloquant) ou l'agoniste (la catécholamine endogène) est fonction des concentrations respectives de l'un et de l'autre. Du fait de cette occupation ils prennent la place de ces médiateurs sur les récepteurs β mais ne provoquent pas de réaction de la part du récepteur, ou une réaction moins forte que s'il avait reçu un médiateur. Certains β -bloquants empêchent l'apparition des médiateurs adrénergiques, et indirectement s'opposent à leurs actions. On peut distinguer deux sous-groupes, selon leur localisation : récepteurs bêta-1 au niveau des fibres myocardiques; récepteurs bêta-2 au niveau des fibres musculaires lisses bronchiques, vasculaires et utérine. [2]

2. Bisoprolol fumarate

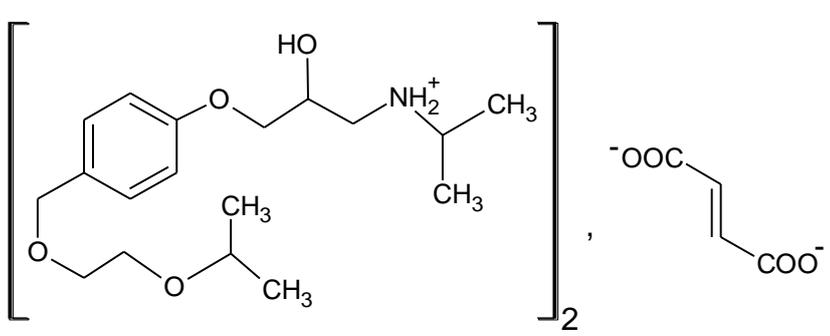
2.1 Définition

Le fumarate de bisoprolol est une molécule de la classe des bêta-bloquants, appartient précisément aux cardioselectifs, utilisée pour traiter l'angine de poitrine (douleurs dans la poitrine causées par des blocages des artères fournissant le sang au muscle cardiaque) ou l'hypertension (tension artérielle élevée). [3]

Le fumarate de bisoprolol est un agent de blocage des adrénorécepteurs synthétique, bêta-sélectif (β_1), cet agent est obtenu en associant le bisoprolol à l'acide fumarique qui est un acide dicarboxylique insaturé de formule chimique : HOOC-CH=CH-COOH .

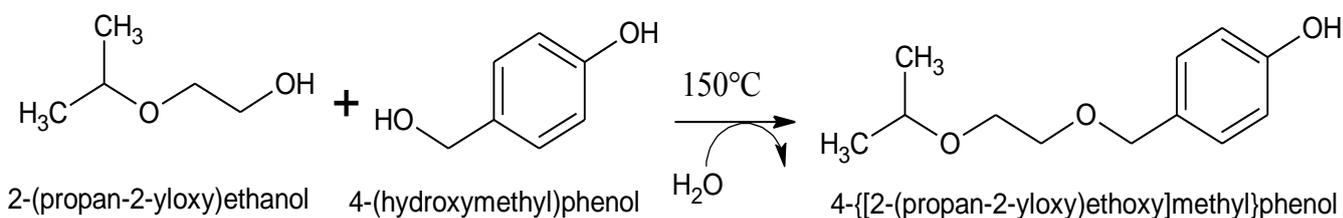
2.2 Propriétés physico-chimique et organoleptiques

Tableau 01 : Propriétés physico-chimiques et organoleptiques. [3-4]

Fumarate de bisoprolol	Propriétés physicochimiques /organoleptiques
Poids moléculaire	767
Formule brute	$(\text{C}_{18}\text{H}_{31}\text{NO}_4)_2 \cdot \text{C}_4\text{H}_4\text{O}_4$ $\text{C}_{40}\text{H}_{66}\text{N}_2\text{O}_{12}$
Aspect	Poudre cristalline blanche
Solubilité	Facilement soluble dans l'eau, le méthanol et le chloroforme.
T° fusion	100 °C
Structure chimique	
Nom chimique	(±) -1- [4 - [[2- (1-méthyléthoxy) éthoxy] méthyl] phénoxy] -3 - [(1-méthyléthyl) amino] -2-propanol (E) - 2-butènedioate (2: 1) (sel)

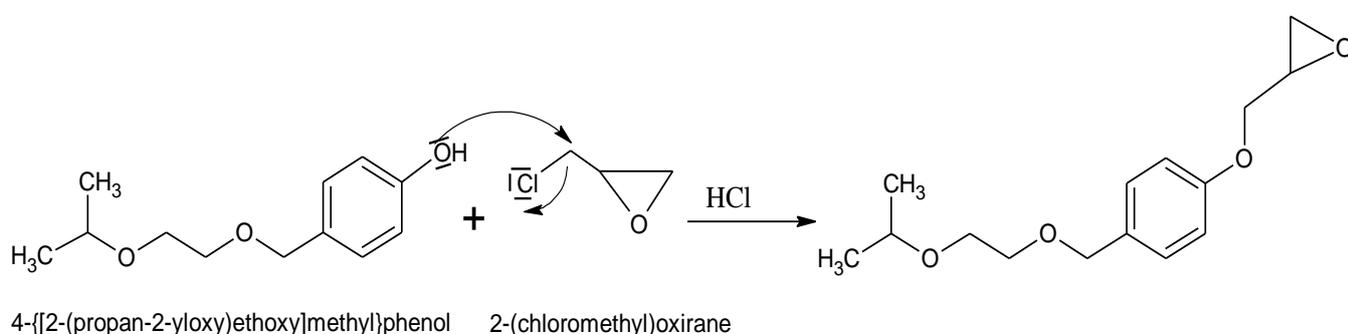
3. Mécanisme de synthèse du bisoprolol

Etape 01 : Réaction de condensation. [5]

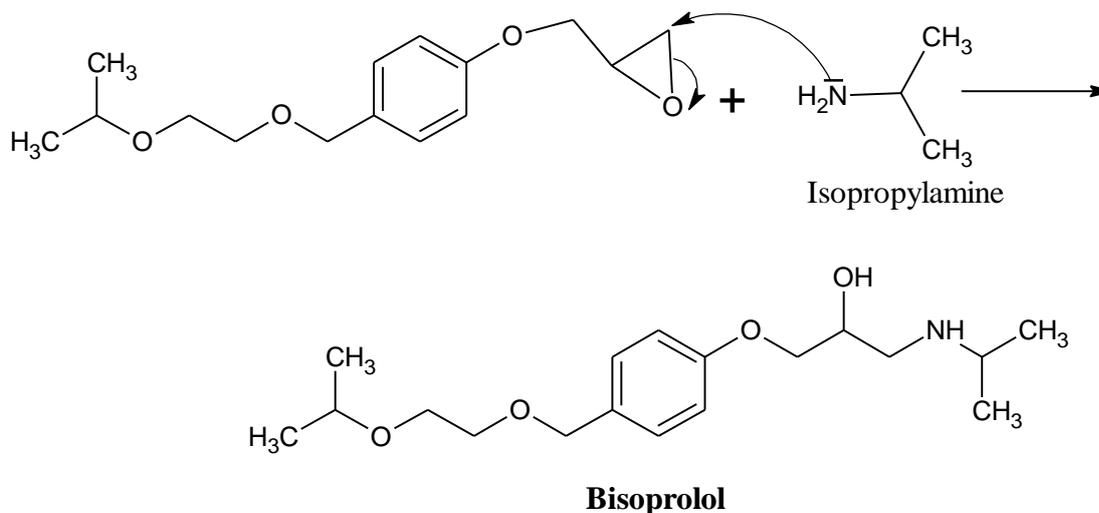


Etape 02 : SN2. [5]

SN2 : Attaque du doublet de l'oxygène et départ simultané de l'halogène, bon groupement sortant. SN2 favorisée car le dérivé halogéné est primaire.



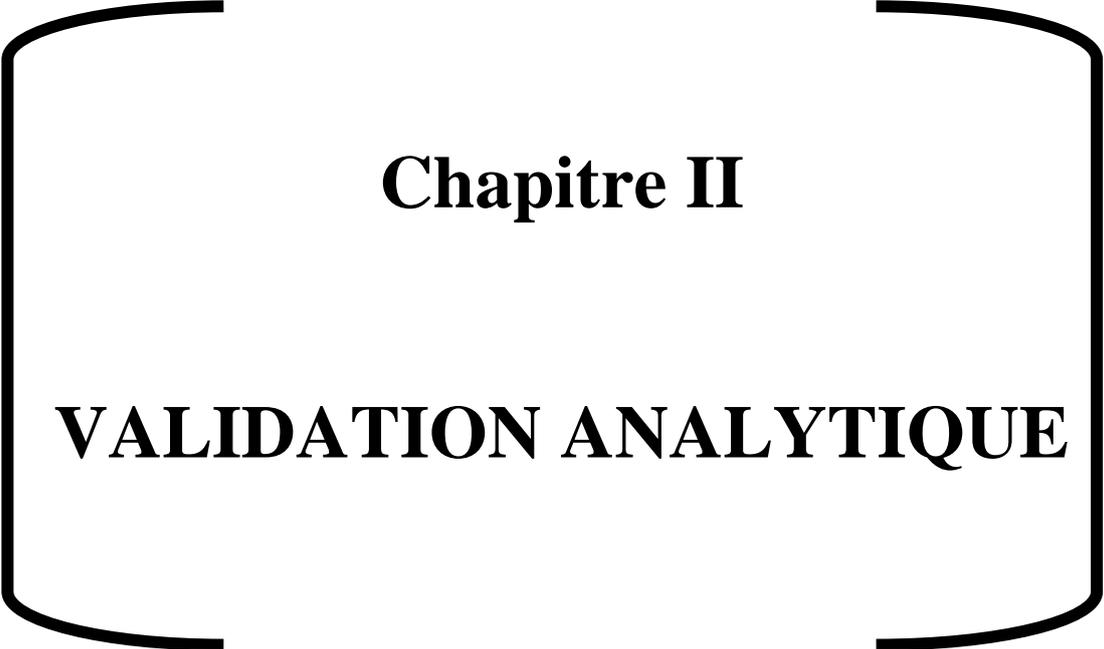
Etape 03 : Attaque nucléophile de doublet de l'azote sur le carbone le moins encombré de l'époxyde et ouverture de l'époxyde. [5]



4. Exemples de génériques commercialisés en Algérie

On trouve le bisoprolol sous forme de comprimés pelliculés sécables à différents dosages allant de 1,25 à 10 mg, commercialisé par plusieurs laboratoires tels que :

- **LESLA 10mg** : LABORATOIRE BIOPHARM ;
- **BIPROTENS 5mg** : LABORATOIRE EL KENDI ;
- **BISOPROLOL BEKER 5mg** : LABORATOIRES BEKER ;
- **DIPROLOL 5mg** : LABORATOIRES SANAMED ;
- **PRODOL 5mg** : LABORATOIRES PHARMALLIANCE. [6]



Chapitre II

VALIDATION ANALYTIQUE

Le contexte industriel impose aux entreprises pharmaceutiques de démontrer que l'ensemble des procédés et des méthodes utilisés pour l'élaboration d'un produit de santé conduit effectivement au résultat attendu. Les laboratoires pharmaceutiques sont tenus de prouver que les méthodes d'analyses employées sont parfaitement valides et fiables.

Si la qualité d'une méthode analytique n'est pas confirmée, la décision de conformité ou non des produits finis basée sur les données obtenues par le Contrôle Qualité en utilisant cette procédure analytique devient contestable. C'est pourquoi l'assurance de la fiabilité de la méthode garantie par la validation est non seulement une exigence réglementaire, mais également un critère essentiel de l'assurance de la Qualité.

Actuellement, de nouvelles tendances et de nouveaux concepts scientifiques apparaissent afin de faire évoluer la validation des méthodes analytiques, avec notamment l'apparition de l'utilisation du profil d'exactitude comme outil de décision. Ces nouveaux outils et concepts ont pour la plupart comme objectif commun de remettre les résultats obtenus au centre de la notion de validation analytique.

1. Définition de la validation analytique

La norme ISO définit la validation ainsi :

« La validation est la confirmation par examen et apport de preuves objectives du fait que les exigences particulières en vue d'une utilisation prévue déterminée sont remplies » [7]

2. Aspect réglementaire

Des référentiels décrivent les procédures de la validation analytique dans le but de fournir des recommandations sur la manière d'appréhender les différentes caractéristiques de la validation pour chaque méthode analytique et aussi, aider les industriels avec des indications sur les données qui devraient être présentées dans un dossier d'enregistrement, ce qui est une exigence réglementaire, toute validation de méthode analytique présentée dans un dossier d'AMM doit répondre à ses exigences.

Les principaux référentiels sont :

- Les documents ISO : **ISO17025** « Exigences générales concernant la compétence des laboratoires d'étalonnages et d'essais » et **ISO 5725** « Exactitude (justesse et fidélité) des résultats et méthodes de mesures ;
- Les documents ICH:

- **ICH Q2A**: Text on validation of analytical procedures “definitions and terminology” (1995);
- **ICH Q2 B**: Text on validation of analytical procedures “methodology” (1997);
- **ICH Q2 (R1)**: Validation of analytical procedures: text and methodology (2005);
 - Les documents FDA (Guidance for industry): validation of bioanalytical method (2001).

Il existe également des publications ne constituant pas des exigences réglementaires, comme les guides de validation analytique de la SFSTP :

- SFSTP « Guide de validation analytique – Rapport d’une commission SFSTP »

- I. Méthodologie, paru dans STP Pharma Pratique en 1992 ;
- II. Exemples d’application, paru dans STP Pharma Pratique en 1992 ;

- SFSTP « Méthodes chromatographiques de dosage dans les milieux biologiques : stratégie de validation. Rapport d’une commission SFSTP » paru dans STP Pharma Pratique en 1997 ;

- SFSTP « Validation des procédures analytiques quantitatives : Harmonisation des démarches »

- I. Généralités, paru dans STP Pharma Pratique en 2003;
- II. Statistiques, paru dans STP Pharma Pratique en 2006;
- III. Exemples d’application, paru dans STP Pharma Pratique en 2006;
- IV. Exemples d’application, paru dans Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis en 2008. [8]

3. Objectifs d’une validation analytique

Selon l’ICH, Le but de la validation d'une procédure analytique est de démontrer qu'elle correspond à l'usage pour lequel elle est prévue.

Elle a pour principal objectif de démontrer l’aptitude et la fiabilité d’une méthode vis-à-vis des exigences réglementaires et normatives en vigueur. Elle permet de garantir que chaque mesure qui doit être réalisée en routine est comprise dans une limite d’acceptation appropriée au type de procédure analytique et au produit concerné. [8]

4. Critères de validation

Les principaux critères de validation sont ceux couramment utilisés dans les laboratoires d'analyse et dont la nécessité de l'étude a fait l'objet d'un large consensus. Ces critères sont les suivants :

- **Spécificité (sélectivité)**

La spécificité d'une procédure analytique est sa capacité à permettre l'évaluation univoque de la substance à analyser en présence d'autres composés potentiellement présents [9].

- **Linéarité**

La linéarité d'une procédure d'analyse est sa capacité à l'intérieur d'un certain intervalle de dosage d'obtenir des résultats directement proportionnels à la quantité (exemple : concentration) en analyte dans l'échantillon. [9]

- **Justesse (biais)**

Exprime l'étroitesse de l'accord entre la valeur moyenne obtenue à partir d'une série de résultats d'essais et une valeur qui est acceptée soit comme une valeur conventionnellement vraie, soit comme une valeur de référence. [9]

- **Fidélité**

La fidélité Exprime l'étroitesse de l'accord entre une série de mesures provenant de multiples prises d'un même échantillon homogène dans des conditions prescrites. Elle est exprimée en termes de coefficient de variation à partir d'une série de mesures et traduit uniquement la distribution des erreurs aléatoires et n'a aucune relation avec la valeur vraie ou spécifiée.

La fidélité peut être évaluée à trois niveaux :

- La **répétabilité** exprime la fidélité sous des conditions opératoires identiques et sur un court intervalle de temps ;
- La **fidélité intermédiaire** exprime les variations intra-laboratoires : jours différents, analystes différents, équipements différents... ;
- La **reproductibilité** exprime la fidélité inter-laboratoire. [9]

- **Exactitude**

L'exactitude exprime l'étroitesse de l'accord entre le résultat d'essai et la valeur de référence acceptée, aussi appelée « valeur conventionnellement vraie ». [9]

- **Limite de détection**

C'est la plus petite quantité de l'analyte dans un échantillon pouvant être détectée, mais non quantifiée comme une valeur exacte dans les conditions expérimentales décrites de la procédure. [9]

- **Limite de quantification**

C'est la plus petite quantité de l'analyte dans un échantillon pouvant être dosée dans les conditions expérimentales décrites avec une exactitude définie. [9]

- **Fonction de réponse**

Exprime procédure d'analyse traduit, à l'intérieur de l'intervalle de dosage, la relation existant entre la réponse (signal) et la concentration (quantité) en substance à examiner dans l'échantillon. [9]

- **Intervalle de dosage**

L'intervalle de dosage d'une procédure d'analyse est la région entre les niveaux supérieur et inférieur (ces valeurs incluses) pour laquelle il a été démontré que la procédure est appropriée quant à son exactitude (justesse + fidélité) et sa linéarité, en utilisant la méthode décrite. [9]

- **Sensibilité**

La sensibilité d'une procédure d'analyse peut être définie comme étant le rapport de la variation de la réponse de la méthode d'analyse à la variation de la quantité d'analyte.

Autrement dit une procédure est dite « sensible » si une faible variation de la concentration ou de la quantité d'analyte entraîne une variation significative de la réponse. [9]

5. Place de la validation dans le cycle de vie d'une méthode

Comme tout processus, les méthodes d'analyse naissent, évoluent et disparaissent ; ce périple peut être résumé sous la forme d'un cycle de vie.

Le cycle de vie d'une méthode est un concept souligné dans la norme ISO 17025. [7]

Pour bien comprendre le rôle et la place de la validation, il convient de décrire les différentes étapes de ce cycle, depuis la création de la méthode analytique jusqu'à son remplacement par une autre. Ce cycle comprend les étapes suivantes :

- Sélection d'une méthode ;
- Mise au point de la méthode (développement) ;
- Validation de la méthode ;
- Estimation de l'incertitude (Utilisation en routine) ;
- Revalidation, Après un certain temps d'utilisation. [10]

6. Protocole en phase de la validation

Au terme de la phase de validation et avant son exploitation en routine, la procédure d'analyse doit être complètement décrite sous forme d'un mode opératoire standardisé. Selon les référentiels, les principaux objectifs de la phase de validation sont de :

- Démontrer la spécificité (sélectivité) ;
- Valider la fonction de réponse (ou modèle d'étalonnage utilisé en routine) ;
- Estimer la fidélité (répétabilité et fidélité intermédiaire) ;
- Estimer la justesse ;
- Estimer l'exactitude ;
- Valider les seuils de quantification ;
- Valider l'intervalle de dosage ;
- Vérifier la linéarité de la procédure analytique. [9]

Après avoir vérifié la spécificité de la méthode d'analyse, on opère sur deux ensembles d'échantillons :

- **Standards d'étalonnage (SE)** : peuvent être réalisés sans la matrice (si on a démontré l'absence d'effet matrice) ou avec la matrice, utilisé pour évaluer les différentes fonctions de réponse $y = f(x)$ afin d'effectuer les prédictions inverses. [9]
- **Standards de validation (SV)** : doivent toujours être réalisés avec la matrice, utilisé dans le but de déterminer l'erreur totale à chaque niveau de concentration, calculer l'intervalle de tolérance et tracer le profil d'exactitude et déterminer les limites inférieures et supérieures de quantification (intervalle de dosage). [9]

En ce qui concerne la préparation des SE et SV, celle-ci dépend du protocole de validation choisi. Le logigramme de la figure 2, présente la démarche proposée dans le guide SFSTP 2003 pour sélectionner un protocole expérimental de la validation en fonction des contraintes ou des spécificités liées à la procédure de dosage sous épreuve. Ajouté à ce logigramme le tableau II déterminant le choix du nombre de standards d'étalonnage et de validation en fonction du protocole choisi. [9]

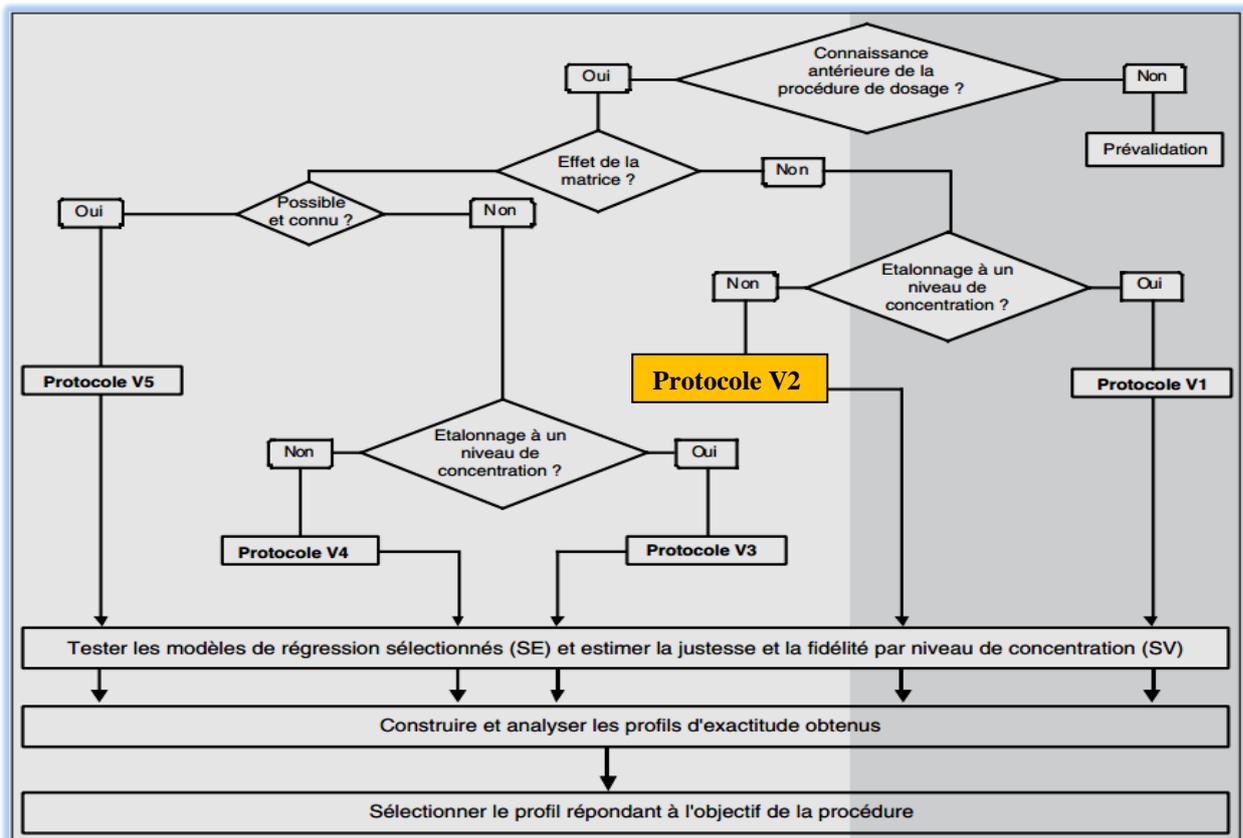


Figure 02 : Logigramme permettant de sélectionner un protocole de validation. [9]

Tableau 02 : Choix du nombre de standards d'étalonnage et de validation en fonction du Protocole choisi. [9]

Standards	Niv. de conc.	Protocole				
		V1	V2	V3	V4	V5
SE. Etalonnage sans la matrice	Bas		2		2	
	Médian	2	2 ⁽²⁾	2	2 ⁽²⁾	
SE. Etalonnage avec la matrice	Haut	2 ⁽¹⁾	2	2 ⁽¹⁾	2	
	Bas				2	2
SE. Etalonnage avec la matrice	Médian			2	2 ⁽²⁾	2 ⁽²⁾
	Haut			2 ⁽¹⁾	2	2
SV. Validation avec la matrice	Addit.					2 ⁽³⁾
	Bas	3	3	3	3	3
SV. Validation avec la matrice	Médian	3	3	3	3	3
	Haut	3	3	3	3	3
Nbre minimum séries		3	3	3	3	3
Nbre total essais (min.)		33	45	39	63	45

7. Démarches statistique de la validation

7.1 Spécificité

La spécificité peut être démontrée de deux façons :

- Soit en comparant les chromatogrammes obtenus à partir des trois solutions précédemment préparées : les chromatogrammes obtenus à partir du SV100% et SE 100% doivent renfermer des pics au même temps de rétention, avec des surfaces comparables. Le chromatogramme obtenu à partir de la solution placebo ne doit pas présenter un pic au même temps de rétention que l'analyte.
- Soit par la comparaison de la droite obtenue des standards de validation (avec matrice) avec celle obtenue à partir des standards d'étalonnage. La comparaison des droites est basée sur le test **t** de Student selon une stratégie statistique qui permet la recherche d'effet matrice et/ou de l'erreur systématique en vérifiant la spécificité de la méthode pour le dosage du principe actif seul et aussi pour la forme reconstituée. [11-12]

7.2 Fonction de réponse

Les mesures effectuées sur les SE permettent de déterminer la relation entre la réponse Y donnée par l'instrument et la concentration X des solutions. Cette relation est une fonction de type :

$$Y = f(X) + \varepsilon$$

Avec ε , l'erreur résiduelle associée à la fonction de réponse. Cette fonction n'est pas nécessairement linéaire mais elle doit être strictement monotone sur l'intervalle de dosage envisagé. La fonction de réponse doit être ajustée, c'est-à-dire que ses paramètres doivent être évalués de telle sorte que l'erreur résiduelle ε soit minimisée. Le Tableau 03 illustre quelques exemples des différentes fonctions de réponse pouvant être envisagées lors d'une validation des méthodes analytiques. [12]

Tableau 03 : Exemples de fonction de réponses. [12]

Type	équation	paramètres	linéaire
Droite passant par l'origine	$Y = \beta X$	β	Oui
Droite	$Y = \alpha + \beta X$	α, β	Oui
Fonction quadratique	$Y = \alpha + \beta X + \gamma X^2$	α, β, γ	Oui
Fonction logistique à 4 paramètres	$Y = \alpha + \frac{\delta - \alpha}{1 + (\frac{x}{\gamma})^\beta}$	$\alpha, \beta, \gamma, \delta$	Non
Fonction logistique à 5 paramètres	$Y = \alpha + \frac{\delta - \alpha}{1 + (\frac{x}{\gamma})^\beta}$	$\alpha, \beta, \gamma, \delta, \Psi$	Non

7.3 Alignement des observations

Si, pour un niveau de concentration, les quantités introduites ne sont pas identiques pour toutes les séries (souvent pour des raisons de pesées qui doivent être indépendantes), il est indispensable de procéder à un alignement sur la concentration moyenne. Cela consiste à transformer les réponses observées ($Y_{ijk} \rightarrow Y_{ijk,c}$) afin de les aligner sur cette concentration moyenne. Cet alignement s'effectue par interpolation en ajoutant à la réponse observée la différence entre la valeur de la fonction de réponse considérée à la concentration moyenne et la valeur de cette fonction à la concentration introduite. En validation, l'alignement s'applique aux réponses obtenues avec les échantillons de validation en utilisant les équations ou les fonctions de réponse obtenues avec les standards d'étalonnage. Ainsi l'alignement des répétitions du niveau de concentration j de la série i s'effectue, [12], comme suit :

$$Y_{ijk,c} = Y_{ijk} + f(\bar{x}_{ij}) - f(x_{ijk})$$

Tableau 04: Règles d'alignement pour différentes fonctions de réponses. [12]

Fonction de réponse	Règle d'alignement
Droite passant par l'origine	$Y_{ijk,c} = y_{ijk} + \hat{\beta}_i [\bar{x}_{ij} - x_{ijk}]$
Droite	$Y_{ijk,c} = y_{ijk} + \hat{\beta}_i [\bar{x}_{ij} - x_{ijk}]$
Fonction quadratique	$Y_{ijk,c} = y_{ijk} + \hat{\beta}_i [\bar{x}_{ij} - x_{ijk}] + \hat{\gamma}_i [\bar{x}_{ij}^2 - x_{ijk}^2]$
Logistique à 4 paramètres	$Y_{ijk,c} = y_{ijk} + (\hat{\delta}_i - \hat{\alpha}_i) \left[\frac{1}{1 + \left(\frac{\hat{\gamma}_i}{\bar{x}_{ij}}\right)^{\hat{\beta}_j}} - \frac{1}{1 + \left(\frac{\hat{\gamma}_i}{x_{ijk}}\right)^{\hat{\beta}_j}} \right]$

7.4 Prédiction inverses

Pour les méthodes indirectes, les modèles d'étalonnage servent à déduire les concentrations calculées, à partir des données du plan de validation, en utilisant la fonction inverse du modèle d'étalonnage, selon le modèle mathématique suivant : $x_{cal} = f^{-1}(y)$

Si les observations ont été alignées, il faut remplacer les y par les y_{calc} (la valeur de y alignée sur la moyenne des x). La fonction inverse est appelée équation de prédiction inverse. Le tableau 05 fournit ces équations selon la fonction de réponse choisie. [12]

Tableau 05 : Calcul des prédictions inverses pour différentes fonctions de réponse. [12]

Type	Equation
Fonction affine passant par l'origine	$x_{ijk,calc} = \frac{y_{ijk}}{\hat{\beta}_i}$
Fonction affine	$x_{ijk,calc} = \frac{y_{ijk} - \hat{\alpha}_i}{\hat{\beta}_i}$
Fonction quadratique	$x_{ijk,calc} = \frac{-\hat{\beta}_i + \sqrt{\hat{\beta}_i^2 - 4\hat{\gamma}_i(\hat{\alpha}_i - y_{ijk})}}{\hat{\beta}_i}$
Fonction logistique à 4 paramètres	$x_{ijk,calc} = \hat{\gamma}_i \left(\frac{\hat{\delta}_i - \hat{\alpha}_i}{y_{ijk} - \hat{\alpha}_i} - 1 \right)^{\frac{1}{\hat{\beta}_i}}$
Fonction logistique à 5 paramètres	$x_{ijk,calc} = \hat{\gamma}_i \left(\left(\frac{\hat{\delta}_i - \hat{\alpha}_i}{y_{ijk} - \hat{\alpha}_i} - 1 \right)^{\frac{1}{\hat{\beta}_i}} \right)^{\frac{1}{\hat{\beta}_i}}$

7.5 Calcul de la justesse et de la fidélité

7.5.1 Justesse

La justesse (ou le biais) de la méthode au niveau de concentration est obtenue en calculant la différence entre la moyenne arithmétique des concentrations introduites et la moyenne des concentrations calculées. Le biais peut s'exprimer en termes absolu, relatif ou de recouvrement par rapport aux quantités introduites [11-12], comme suit :

$$\mathbf{Biais}_j = \hat{\mu}_j - \bar{x}_j$$

$$\mathbf{Biais}(\%)_j = \frac{\hat{\mu}_j - \bar{x}_j}{\bar{x}_j} \times 100$$

$$\mathbf{Recouvrement}(\%)_j = \frac{\hat{\mu}_j}{\bar{x}_j} \times 100$$

\bar{x}_j : Moyenne des concentrations introduites

$\hat{\mu}_j$: Moyenne des concentrations prédites

7.5.2 Fidélité

L'estimation de la variance intra-série donne une estimation de la variance de répétabilité tandis que la somme des estimations des variances intra et inter-série donne une estimation de la variance de fidélité intermédiaire. [12]

L'écart-type de répétabilité : $\hat{\sigma}_r$

L'écart-type de fidélité intermédiaire du niveau : $\hat{\sigma}_{FI} = \sqrt{\hat{\sigma}_r^2 + \sigma_B^2}$

7.6 Calcul de l'exactitude

L'exactitude d'un résultat (par opposition à celui de la méthode analytique) exprime l'étroitesse de l'accord entre le résultat d'essai et la valeur de référence acceptée, aussi appelée valeur conventionnellement vraie, à savoir pour chaque mesure :

$$\text{Exactitude} = X - \mu$$

Pour chaque modèle et chaque observation l'exactitude de la mesure en valeur relative est donnée comme suit :

$$\text{Exactitude (\%)} = \frac{X - \mu}{\mu} \times 100$$

L'erreur maximale relative observée pour chaque modèle sur l'ensemble des séries montre déjà l'impact du choix de la fonction de réponse sur l'exactitude des résultats [11,12].

7.6.2 Calcul de l'intervalle de tolérance

Ce qui nous importe cependant en validation, ce n'est pas la validité des résultats calculés que nous obtenions avec l'erreur totale, mais plutôt une garantie ou une représentation de ce que la même procédure analytique pourra donner comme résultats dans le futur, C'est le rôle de l'intervalle de Tolérance. L'estimation des paramètres $\hat{\mu}_{j,B,j}$ et $\hat{\sigma}_{r,j}$ à chaque niveau de concentration j a pour but de permettre d'estimer la proportion attendue d'observations dans les limites d'acceptation prédéfinies $[-\lambda, \lambda]$, c'est-à-dire :

$$E_{\mu, \sigma} \{ P[|X - \mu_T| < \lambda] | \hat{\mu}_M, \hat{\sigma}_M \} \geq \beta$$

L'intervalle de tolérance sera calculé pour chaque niveau de concentration envisagé avec les standards de validation et pour chaque modèle mathématique. Pratiquement, l'intervalle de tolérance se calcule comme suit en valeur absolue :

$$E_{\hat{\mu}_M, \hat{\sigma}_M} \{ P_X [\hat{\mu}_M - k\hat{\sigma}_M < X < \hat{\mu}_M + k\hat{\sigma}_M | \hat{\mu}_M, \hat{\sigma}_M] \} = \beta$$

Où :

$$\hat{\sigma}_{FI,j}^2 = \hat{\sigma}_{r,j}^2 + \sigma_{B,j}^2$$

$$R_j = \frac{\hat{\sigma}_{B,j}^2}{\hat{\sigma}_{r,j}^2}$$

$$B_j = \sqrt{\frac{R_j + 1}{nR_j + 1}}$$

$$v = \frac{(R + 1)^2}{\frac{(R + 1/K)^2}{I - 1} + \frac{1 - 1/K}{I \times K}}$$

$Q_t = \left(v; \frac{1+\beta}{2}\right)$ le quantil de la distribution t de student pour v degrés de liberté et β la probabilité. [12]

le meme intervalle en echec relative devient :

$$biats(\%)_j - Q_t\left(v; \frac{1+\beta}{2}\right) \sqrt{1 + \frac{1}{pn\beta_j^2}} CV_{FI,j} ; biats(\%)_j + Q_t\left(v; \frac{1+\beta}{2}\right) \sqrt{1 + \frac{1}{pn\beta_j^2}} CV_{FI,j}$$

Deux termes sont contenus dans l'intervalle de tolérance : l'un étant la justesse et l'autre étant, à un facteur près, le coefficient de variation de fidélité intermédiaire. C'est la raison pour laquelle cet intervalle peut ainsi être considéré comme une expression de l'exactitude des résultats. Mais l'intervalle de tolérance intègre une dimension supplémentaire, celle de chance (ou risque) pour des résultats futurs, conditionnellement à des résultats passés. La méthode peut dès lors être considérée comme exacte au niveau de chance β pour le niveau de concentration en question, si l'intervalle de tolérance est inclus dans les limites $[-\gamma, \gamma]$ définies à priori en fonction des objectifs de la méthode. [12]

7.6.3 Profil d'exactitude

Selon l'équation ci-dessous, les bornes de ces intervalles sont :

$$L_j(\text{Borne superieure}) = biats(\%)_j - Q_t\left(v; \frac{1+\beta}{2}\right) \sqrt{1 + \frac{1}{pn\beta_j^2}} CV_{FI,j}$$

$$U_j(\text{Borne inferieur}) = biats(\%)_j + Q_t\left(v; \frac{1+\beta}{2}\right) \sqrt{1 + \frac{1}{pn\beta_j^2}} CV_{FI,j}$$

Le profil d'exactitude de la méthode s'obtient en reliant d'une part les bornes L_j entre elles ($L_1 \rightarrow L_2 \rightarrow \dots \rightarrow L_m$) et d'autre part les bornes U_j entre elles ($U_1 \rightarrow U_2 \rightarrow \dots \rightarrow U_m$). [12]

7.7 Choix de la fonction de réponse

L'utilisation de certaines fonctions ne permet pas à la procédure analytique d'atteindre ses objectifs vus que pour certaines concentrations, les limites de tolérances sortent des limites d'acceptation. Par ailleurs, parmi les fonctions de réponses acceptables, on pourra remarquer que certaines fournissent des résultats meilleurs que d'autres. Ce seront ces dernières qui devront être retenues, sachant que le coefficient de détermination R^2 ne renseigne pas sur la qualité des résultats.

Le profil d'exactitude, qui est le reflet direct de ce que la procédure analytique est capable, permet de juger l'adéquation de différentes pratiques et permet de prendre des décisions sur le choix de la fonction de réponse adéquate [7].

7.8 Linéarité

La linéarité de la méthode de dosage est vérifiée sur l'intervalle de validation, en utilisant les données des premières répétitions de chaque niveau de concentration, pour les trois séries de validation. La linéarité est, dans un premier temps, évaluée par comparaison visuelle des représentations graphiques des réponses instrumentales y en fonction des concentrations introduites (x) selon la fonction $[y=f(x)]$, pour la forme pharmaceutique reconstituée et pour les standards d'étalonnage. Dans un deuxième temps, la linéarité de la relation entre les concentrations retrouvées (x_{calc}) et les concentrations introduites (x) est évaluée en représentant graphiquement la fonction $[x_{calc}=f(x)]$ pour les trois séries de validation conjointement. Une analyse statistique de la droite obtenue est effectuée, la pente est comparée à la valeur de référence 1, l'ordonnée à l'origine est comparée à la valeur de référence 0, et une vérification de l'ajustement est effectuée [8].

7.9 Limites de quantification

Le profil d'exactitude, construit à partir des intervalles de mesures attendues, permet donc de décider des niveaux de concentration pour lesquels une procédure est apte à fournir des résultats dans les limites d'acceptation. Ainsi, par définition, quand elle se produit, l'intersection entre le profil d'exactitude et les limites d'acceptation définissent les limites de quantification basse (LQinf) et haute (LQsup) de la procédure. Entre ces deux limites, il y a bien sûr l'intervalle de dosage. De la sorte, les limites de quantification sont bien les valeurs extrêmes qui peuvent être quantifiées avec une exactitude définie. [12]

PARTIE PRATIQUE

La partie pratique de ce travail a été réalisée au laboratoire de chimie analytique du département de pharmacie de l'université de Tizi-Ouzou, il a pour objet de valider une méthode de dosage du bisoprolol fumarate dans des comprimés de 5mg conformément au protocole de validation analytique établi par une commission de la société française des sciences et techniques pharmaceutiques publié dans la revue STP Pharma pratique en janvier 2006.

1. Matériel

1.1 Appareillage

Tableau 06 : Appareillages du laboratoire de chimie analytique utilisés dans ce présent travail.

Désignation		Spécifications	Usage
Appareil HPLC (SHIMADZU LC20)	pompe	LC20AT	Analyse des solutions et obtention des chromatogrammes
	Injecteur automatique	SIL 20A	
	Contrôleur	CBM-20	
	Compartiment de la colonne	CTO-20 A	
	Colonne	C 18	
	Détecteur	Détecteur spectrophotométrique	
	Logiciel d'exploitation	LC-solution	
Purificateur d'eau		Human power I	Purification de l'eau
Pompe à vide		Fisher bioblok- scientific Pmax =4 bar	Filtration de la phase mobile
Bain ultrasons : sonicateur		Advantage-LAB	Dissolution (solubilisation)
Agitateur magnétique		STUART	Homogénéisation des solutions
Balance de précision		KERN	Pesée
Etuve		MEMMERT	Séchage

1.2 Matières premières

Tableau 07: les matières premières utilisées dans ce présent travail.

Principe actif	Bisoprolol Fumarate matière première
Excipients	Placebo qsp 1 comprimé
Réactifs	Eau purifiée, Acétonitrile grade HPLC, Acide Chlorhydrique, Triéthylamine(TEA).

2. Méthodes

2.1 Conditions expérimentales

2.1.1 Choix du protocole de validation

Le logigramme de la figure 5 nous permet de sélectionner un protocole de validation. Les études préalables nous ont orienté qu'il n'y a pas d'effet matrice et à partir du tableau II nous avons choisi le nombre de SE et de SV. Le protocole adopté pour notre travail est le protocole V2 modifié en utilisant 5 niveaux de concentration pour les SE et les SV.

2.1.2 Choix des paramètres de la validation

- **Limites d'acceptabilité (λ) :** $\lambda = \pm 5\%$
- **Probabilité de confiance (β) :** $\beta = 95\%$ on choisit $\geq 95\%$ dans le domaine pharmaceutique.[15]

2.2 Préparation des solutions

2.2.1 Préparation du diluant

Dans une fiole jaugée de 2000 ml, mélanger 1800 ml d'HCl 0.01N avec 200 ml d'acétonitrile grade HPLC, agiter et mettre le mélange à l'ultrason pendant 10 minutes.

2.2.2 Préparation de la solution placebo

Peser 4g de placebo dans 100ml de diluant suivi d'une filtration.

2.2.3 Préparation des solutions standards

Pour chaque série (jour) :

- Peser dans des fioles de 100 ml, les différentes masses correspondant à chaque niveau de concentration (cinq pesées par niveau) du fumarate de bisoprolol, dissoudre dans un volume suffisant du diluant, mettre à l'ultrason pendant deux minutes pour une dissolution totale ;
- Prendre les deux fioles correspondantes aux deux premières pesées et remplir jusqu'au trait de jauge avec le même diluant, on obtient ainsi deux **solutions standards d'étalonnage** (sans matrice) ;
- Ajouter 5ml de la solution placebo aux trois fioles restantes puis, compléter avec le diluant au trait de jauge afin d'obtenir les **solutions standards de validation**.

Tableau 08 : Les masses théoriques des niveaux de concentration du bisoprolol fumarate.

Niveau de concentration en %	80	90	100	110	120
Masse théorique du bisoprolol fumarate en mg	20	22.5	25	27.5	30

2.2.1 Préparation de la phase mobile

Tampon phosphate / ACN 30/70

Phase aqueuse : dans 1l d'eau, ajouter 4ml de TEA et 3.12g de NaH_2PO_4 , Ajuster le pH à 4.2 à l'aide de l'acide phosphorique.

Phase Organique : ACN

2.3 Conditions chromatographique

- **Colonne** : longueur 15 cm, diamètre 4.6 mm, taille de particules 5 μm ,
- **Phase stationnaire** : Octadécylsilylé pour chromatographie (C18)
- **Détection** : longueur d'onde $\lambda=225$ nm.
- **Volume d'injection** : 20 μl ;

- **Débit** : 1 ml/ min ;
- **Température** : ambiante.

3. Traitement des données

Les données brutes de la validation sont traitées à l'aide d'une feuille de calcul Excel (version 2016), préalablement établie et validée. Cette feuille de calcul est adaptée au protocole V2 modifié.

I. Résultats

1. Spécificité et effet matrice

La spécificité de la méthode est démontrée par deux méthodes :

1.1. Par comparaison des chromatogrammes

L'évaluation de la spécificité est faite par la comparaison du chromatogramme d'un SE et un SV d'un même niveau de concentration (niveau 100%) ainsi que celui de la solution placebo. Elle est illustrée dans les figures suivantes :

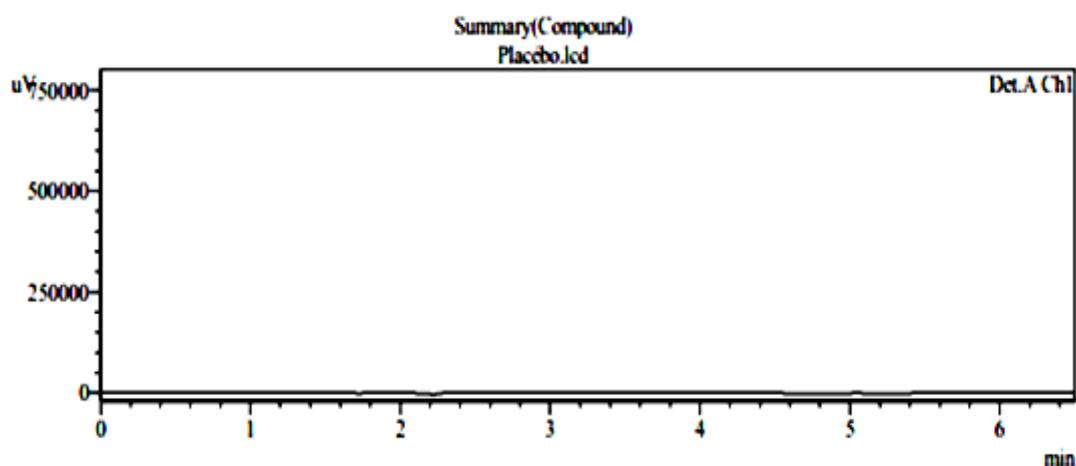


Figure 02: Chromatogramme du diluant avec placebo non chargé de PA.

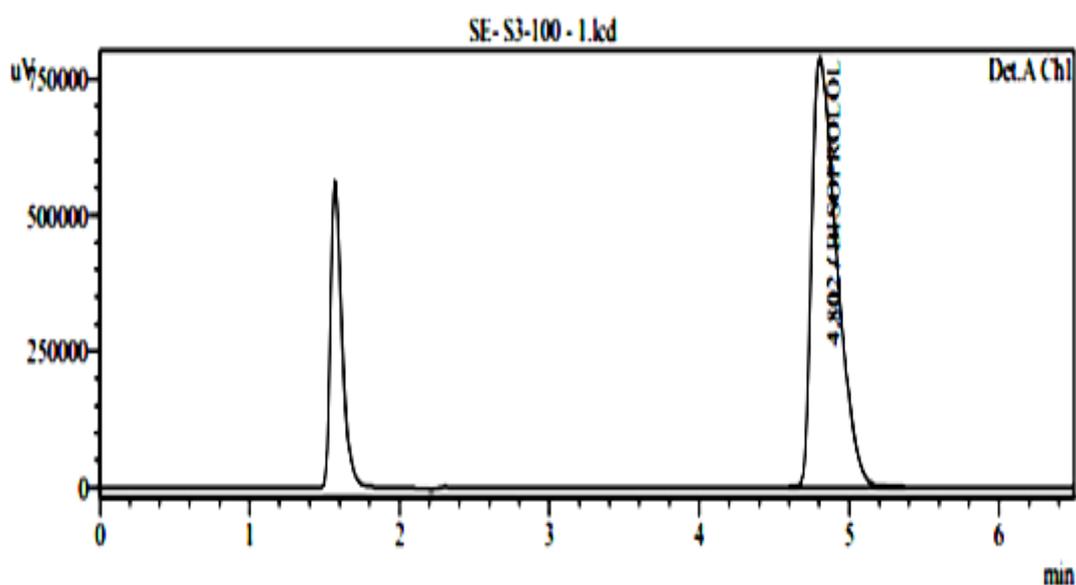


Figure 03: Chromatogramme du standard d'étalonnage, niveau 100%.

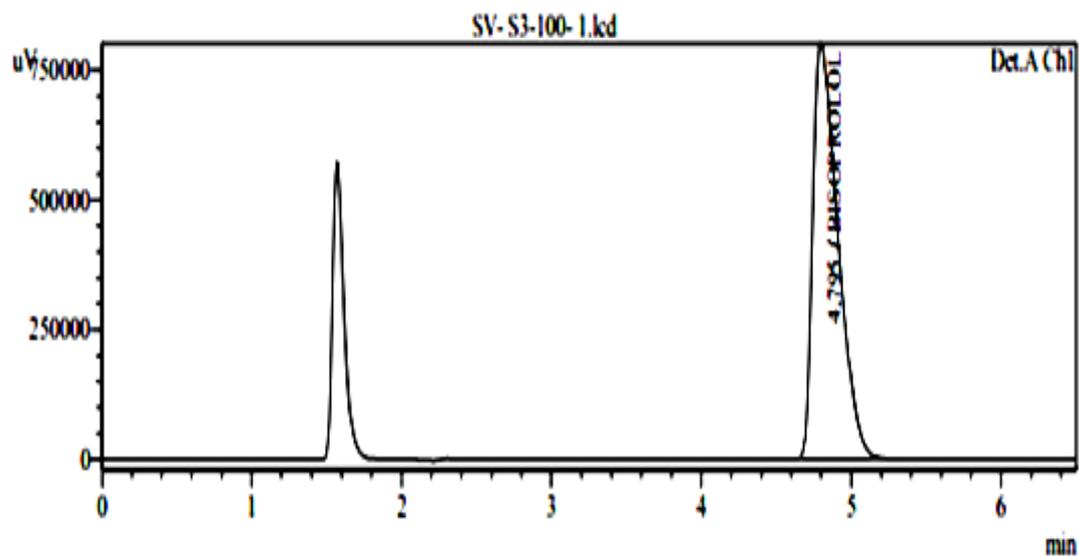


Figure 04: Chromatogramme du standard de validation, niveau 100%.

Le tableau suivant représente les résultats de la superposition des trois chromatogrammes :

Tableau 09: Résultats de la comparaison des chromatogrammes.

Solutions	Temps de rétention (min)	Superposition
solution placebo	Absence	Absence
Standard d'étalonnage	4.802	Concluante
Standard de validation	4.795	

1.2. Confirmation de la spécificité sur les deux gammes d'étalonnage et de validation

La figure ci-dessous regroupe les différentes fonctions de réponses qui expriment la relation existant entre les masses introduites en abscisse et les aires de pics (réponses) en ordonnées.

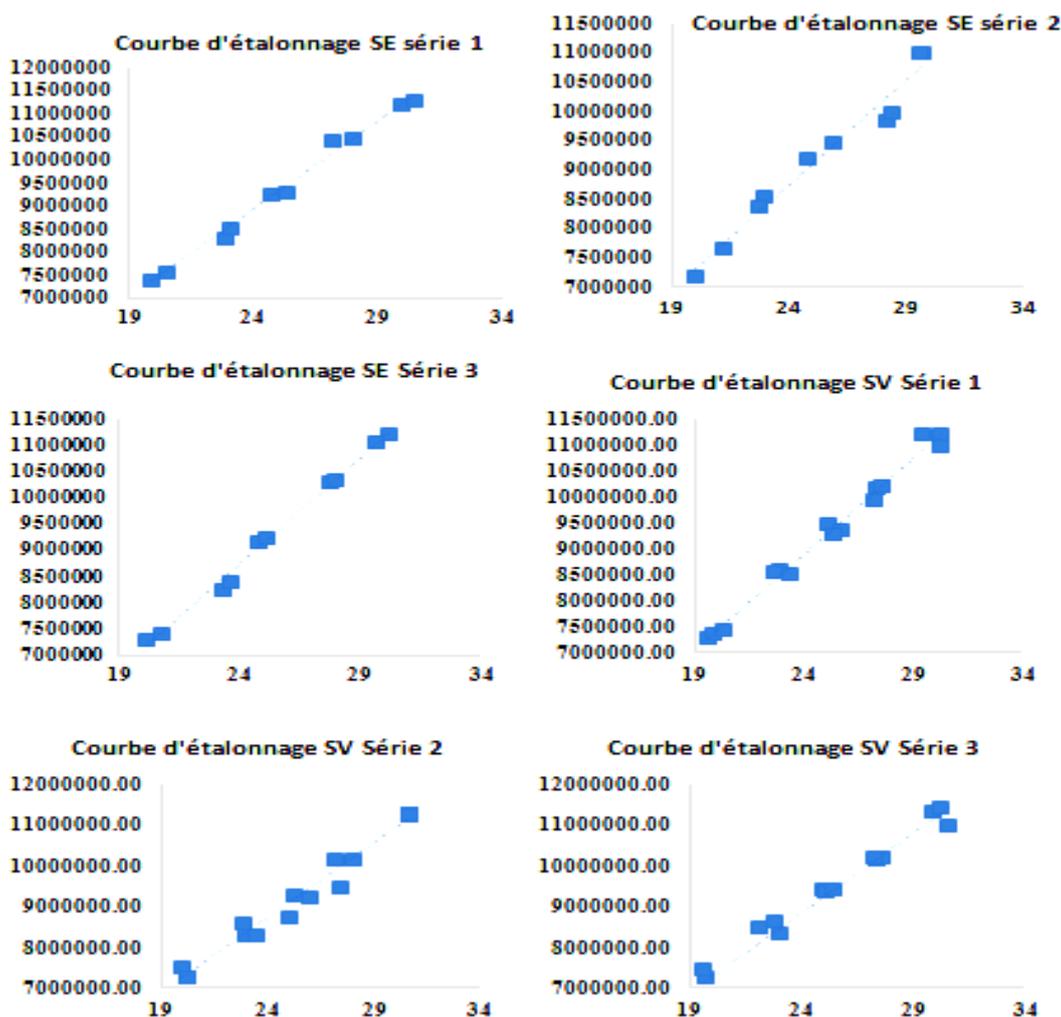


Figure 05 : Courbes d'étalonnage obtenues pour les SE et SV des trois séries.

Les résultats de la comparaison des deux pentes de la droite de régression obtenue sur la gamme SE et la droite obtenue sur la gamme SV sont évalués dans les tableaux suivants :

Tableau 10: Résultats obtenus à partir de la gamme sans matrice.

Niveaux de concentration (%)	Masses introduites (mg)	Réponse
80	19.87	7434159
	20.44	7601830
90	22.8	8351184
	23.03	8545753
100	24.73	9298097
	25.29	9340606

110	27.11	10450238
	27.94	10492147
120	29.89	11212286
	30.49	11318180
	Pente	383271.18
	Ordonnée à l'origine	-238271.50

Tableau 11: Pente et l'ordonnée à l'origine obtenues à partir de la gamme sans matrice.

Données droite d'étalonnage SE 1			
		Ecart-type	variance
Pente	383271.18	12344.33	152382581
Ordonné à l'origine	-238271.50	313571.26	98326937686

Tableau 12: Résultats obtenus à partir de la gamme avec matrice.

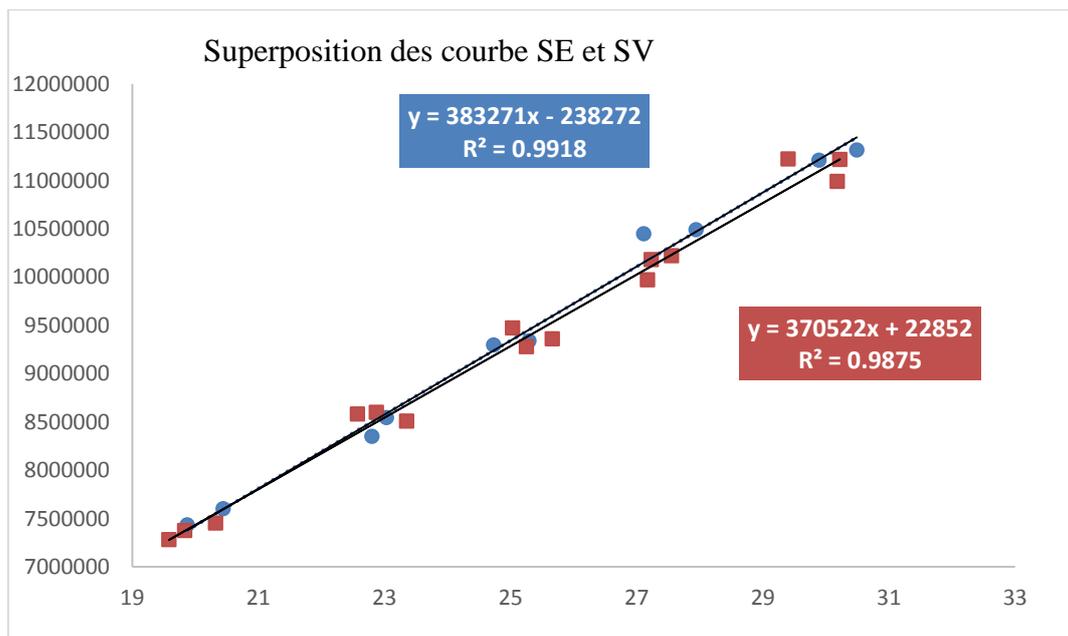
Niveaux de concentration (%)	Masses introduites (mg)	Réponse
80	19.58	7155013
	19.83	7345085
	20.32	7610367
90	22.87	8577422
	22.57	8444881
	23.35	8670308
100	25.03	9365943
	25.66	9494652
	25.25	9256054
110	27.23	10149377
	27.17	9916915
	27.55	10312464
120	30.18	11087426
	30.22	11329988
	29.4	11021134
	Pente	370522.438
	Ord à l'origine	22852.1743

Tableau 13: Pente et l'ordonnée à l'origine obtenues à partir de gamme avec matrice.

Données droite de validation SV1			
		Ecart-type	Variance
Pente	370522.44	11578.72	134066677.11
Ordonné à l'origine	22852.17	293177.07	85952793173

Tableau 14 : Comparaison des pentes par le test de student.

Test de student		
ddl	21	VRAI
β	0.95	
α	0.05	
t0 =	2.07961384	
tc =	0.75325726	

**Figure 06:** Superposition des courbes d'étalonnage et de validation.

1.3 Vérification d'erreurs systématiques

Tableau 15: Données des droites SE et SV.

Données droite d'étalonnage SE1				Données droite de validation SV 1			
		Ecart-type	Variance			Ecart-type	Variance
Pente	383271.18	12344.33	152382581	Pente	370522.44	11578.72	134066677.11
Ord,à l'origine	-238271.50	313571.26	9832693768	Ord,à l'origine	22852.17	293177.07	85952793173

Tableau 16: Vérification des erreurs systématiques par le test de student.

Test de student		
ddl	7	VRAI
β	0.95	
α	0.05	
t0 =	2.36462425	
tc =	0.75325726	
si vrai: absence d'erreur systématique		

2. Fonctions de réponse

La relation existante entre l'aire du pic (réponse instrumentale) et la masse introduite dans les standards d'étalonnage (concentration), obtenue sur chacune des trois séries, est représentée pour quatre modèles mathématiques. Les résultats qui seront désormais élucidés sont basés sur le modèle mathématique choisi, en l'occurrence la fonction de réponse : $y=ax+b$ qui nous a donné les résultats suivants :

- Modèle: $y = ax+b$

Tableau 17: Résultats obtenus pour la fonction $y=ax+b$

Niveaux de concentration (%)	Gamme standard d'étalonnage					
	Série 1		Série 2		Série 3	
	Variables 1	Réponse	Variables 2	réponse	Variables 3	réponse
80	19.87	7601830	21.19	7680045	20.74	7446688
	20.44	7434159	19.98	7202787	20.08	7336505
90	22.8	8351184	22.94	8536445	23.2	8265417

	23.03	8545753	22.7	8377379	23.6	8446298
100	24.73	9298097	24.73	9206527	24.74	9186045
	25.29	9340606	25.8	9488968	25.08	9257962
110	27.11	10450238	28.1	9838084	27.73	10339116
	27.94	10492147	28.31	9995499	27.88	10373942
120	29.89	11212286	29.6	11006265	30.1	11243171
	30.49	11318180	29.59	10990441	29.59	11106506
	Pente	382493.43	Pente	360601.35	Pente	408107.99
	Ord, l'origine	- 218704.12	Ord,origine	111193.39	Ord,origine	- 1014356.40

3. Exactitude

3.1 Alignement des observations

L'alignement appliqué aux réponses obtenues avec les trois séries des standards de validation, sur la moyenne des masses introduites pour chaque niveau de concentration théorique est résumé dans le tableau suivant :

Tableau 18: Alignement des réponses observées avec les trois séries de validation.

Alignement des réponses		
Série 1	Série 2	Série 3
7281235.83	7305481.24	7293107.36
7375684.47	7558064.99	7468292.57
7453544.70	7324523.77	6396943.08
8600371.61	8653570.14	8507416.60
8582578.63	8362269.39	8638349.01
8509660.76	8326183.48	8373696.39
9474316.14	9352209.26	9447004.82
9362054.28	8796828.28	9396185.47
9280278.58	9289900.46	9444513.71
10182526.43	10206783.92	10195618.58
9973014.04	9526420.10	10237949.49
10223215.53	10237768.98	10200830.93
10993077.62	11321860.02	10999614.99
11220339.88	11341610.96	11331206.05
11225130.49	11316935.02	11450698.96

3.2 Prédiction inverses

Tableau 19: Prédiction inverses obtenus avec les SV

Prédiction inverse			Moyenne par série
Série 1	Série 2	Série 3	
19.61	19.95	20.36	19.94
19.85	20.65	20.79	
20.06	20.00	18.16	
23.06	23.69	23.33	23.14
23.01	22.88	23.65	
22.82	22.78	23.00	
25.34	25.63	25.63	25.24
25.05	24.09	25.51	
24.83	25.45	25.63	
27.19	28.00	27.47	27.32
26.65	26.11	27.57	
27.30	28.08	27.48	
29.31	31.09	29.44	30.30
29.91	31.14	30.25	
29.92	31.08	30.54	

4. Justesse

La justesse est exprimée en biais absolu, biais relatif en et taux de recouvrement pour chaque niveau de concentration théorique des standards de validation comme indiqué dans le tableau suivant :

Tableau 20 : biais absolu, biais relatif et recouvrement pour chaque niveau de concentration théorique des SV.

Biais absolu	Biais relatif	Recouvrement	
-0.02	-0.090	100.14%	99.66%
		100.13%	
		98.71%	
0.28	1.238	100.82%	100.17%
		101.95%	
		97.73%	
0.00	0.019	101.25%	99.07%
		97.62%	

		98.35%	
-0.04	-0.143	99.86%	99.01%
		98.07%	
		99.09%	
0.08	0.271	97.13%	99.28%
		98.96%	
		101.77%	

5. Fidélité

La fidélité en ses deux conditions de répétabilité (MSM) et de fidélité intermédiaire (MSE), est exprimée en écarts types relativisés et en coefficients de variation suite à l'étude de la variance du modèle choisi qui a donné les résultats suivants dans le tableau ci-dessous :

Tableau 21: Calcul de fidélité en écarts types relativisés.

MSM	MSE ₁	MSE ₂	Ecat type de répétabilité	Ecat type inter-série
0.16	0.73	0.59	0.85	0.00
0.10	0.12	0.12	0.35	0.00
0.28	0.26	0.26	0.51	0.04
0.17	0.46	0.39	0.68	0.00
1.56	0.15	0.50	0.39	0.40

Tableau 22: Calcul de fidélité en coefficients de variations.

Ecat type de FI	CV répétabilité	CV fidélité intermédiaire
0.85	4.28	4.28
0.35	1.53	1.53
0.51	2.02	2.03
0.68	2.47	2.47
0.55	1.28	1.83

6. Erreur totale

Le calcul d'erreur totale est résumé dans le tableau suivant :

Tableau 23: Calcul d'erreur totale pour chaque niveau de concentration.

Erreur totale absolue	Erreur totale relative	Erreur maximale observée
0.87	4.368	6.37
0.63	2.772	5.67
0.52	2.048	2.95
0.71	2.613	3.23
0.64	2.103	1.91

7. Intervalle de tolérance

Tableau 24: Calcul des limites de l'intervalle de tolérance pour chaque niveau de concentration.

Erreur totale absolue	Erreur totale relative	Erreur maximale observée
0.87	4.368	6.37
0.63	2.772	5.67
0.52	2.048	2.95
0.71	2.613	3.23
0.64	2.103	1.91

8. Profil d'exactitude

La figure ci-dessous dans laquelle l'axe horizontal représente les masses théorique allant de 20 mg à 30 mg et l'axe vertical le biais relatif représente le profil d'exactitude :

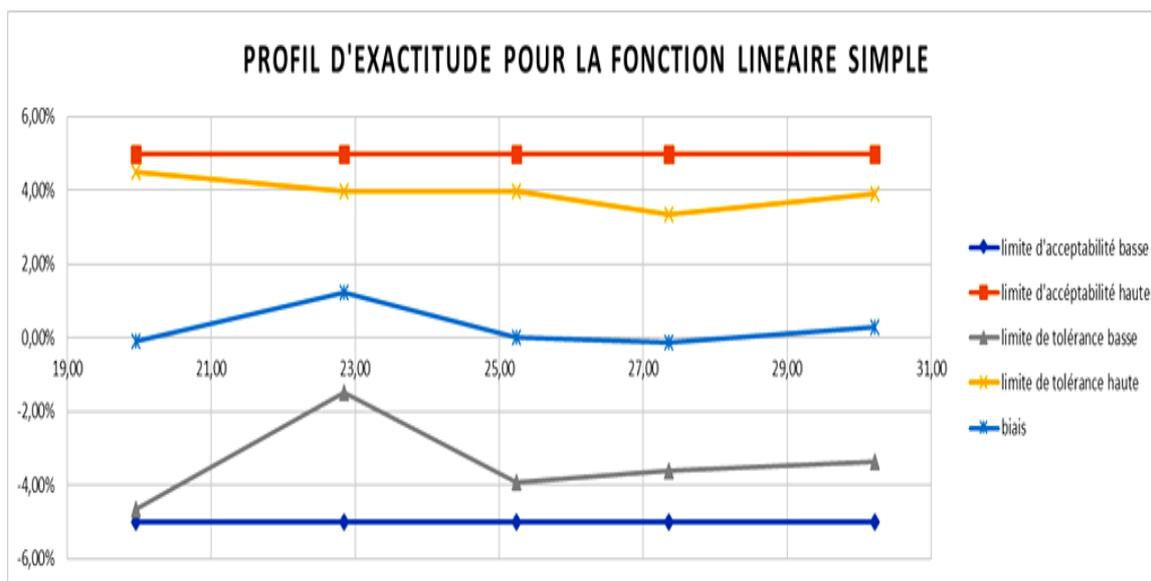


Figure 07: Profil d'exactitude de la fonction lineaire simple $y = ax + b$.

9. Intervalle de dosage

Les limites de quantification sont tirées du profil d'exactitude, elles représentent les points d'intersection (premier point pour la limite basse et le dernier point pour la limite haute) du tracé des limites de tolérance avec les limites d'acceptabilité. Le profil d'exactitude obtenu (figure 08) montre qu'il n'y a pas d'intersection entre la limite d'acceptabilité et la limite de tolérance donc l'intervalle de dosage s'étant de 19.54 µg/ml à 30.57 µg/ml (de 80% à 120%).

10. Linéarité de la méthode

Tableau 25 : Vérification de la linéarité de la méthode.

Vérification de la linéarité de la méthode		
Niveau de concentration (%)	Concentration introduite	Concentration prédite
80	19.58	19.61
	20.08	19.95
	19.66	20.36
90	22.87	23.06
	22.75	23.69
	22.08	23.33
100	25.03	25.34
	25.20	25.63
	24.90	25.63
110	27.23	27.19
	27.12	28.00
	27.25	27.47
120	30.18	29.31
	30.57	31.09
	30.45	29.44

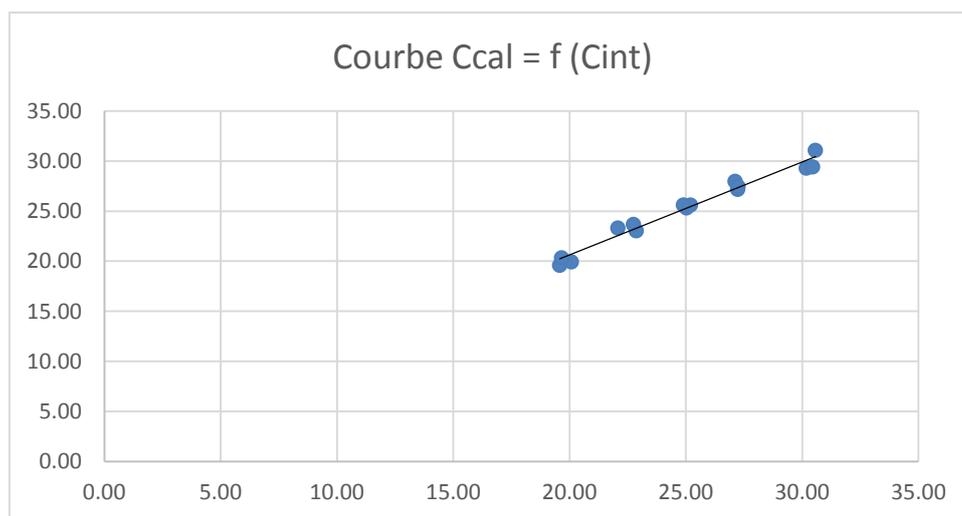


Figure 08: Courbe de linéarité de la méthode.

Tableau 26 : Données de la droite du SV.

Données droite de validation SV1			
		Ecart-type	Variance
Pente	0.93	0.04	0.00172
Ordonné à l'origine	1.05	1.05	1.09762

Tableau 27: Comparaison de la pente à 1 et l'ordonnée à l'origine à 0 avec le test de student.

Test de Student					
ddl	13	Vrai	ddl	13	Vrai
β	0.95		β	0.95	
α	0.05		α	0.05	
t0 =	2.16036866		t0 =	2.16036866	
tc =	1.6940159		tc =	1	
si vrai: la pente est comparable avec 1			si vrai: l'ord à l'org est comparable avec 0		

Tableau 28: Données issu de l'utilitaire d'analyse.

	Coefficients	Erreur-type
Constante	1.04767561	1.04767561
Variable X 1	0.929753673	0.041467336

11. Robustesse

Tableau 29: Données brutes et résultats de l'étude de la robustesse.

Masse (concentration) pour une teneur théorique de 100%		25mg								
N° de l'essai	Facteur A (teneur en %)	Facteur B (débit)	Facteur C ((λ en nm)	Masse (concentration) - introduite Echantillon	Masse (concentration) - Standard	Teneur introduite (%)	Aire (absorbance) échantillon	Aire (absorbance) standard	Masse (Concentration) estimée	Reponse (Teneur en %)
1	90%	0.7	223	22.75	25.08	91.00	12013205	12876492	23.40	93.59
2	110%	0.7	223	27.54	25.08	110.16	14218575	12876492	27.69	110.78
3	90%	1.3	223	22.75	25.08	91.00	6451755	6832010	23.68	94.74
4	110%	1.3	223	27.54	25.08	110.16	7638978	6832010	28.04	112.17
5	90%	0.7	227	22.75	25.08	91.00	12069419	12768642	23.71	94.83
6	110%	0.7	227	27.54	25.08	110.16	14270099	12768642	28.03	112.12
7	90%	1.3	227	22.75	25.08	91.00	6483754	6863574	23.69	94.77
8	110%	1.3	227	27.54	25.08	110.16	7667540	6483754	29.66	118.64
									Ecart-type	10.39
									t°(0,05,7)	2.36

Tableau 30: Plan factoriel de l'étude de la robustesse.

Essai	Facteurs			Interactions			
	A (teneur)	B (débit)	C (λ en nm)	AB	AC	BC	ABC
1	-1	-1	-1	1	1	1	-1
2	1	-1	-1	-1	-1	1	1
3	-1	1	-1	-1	-1	-1	1
4	1	1	-1	1	1	-1	-1
5	-1	-1	1	1	1	-1	1
6	1	-1	1	-1	-1	-1	-1
7	-1	1	1	-1	-1	1	-1
8	1	1	1	1	1	1	1
Niveau bas	90%	0.70	223				
Niveau haut	110%	1.30	227				

Tableau 31: Calcul des effets des paramètres et leurs intervalles de confiance.

Essai	Facteurs			Interactions			
	A	B	C	AB	AC	BC	ABC
1	-93.59	-93.59	-93.59	93.59	93.59	93.59	-93.59
2	110.78	-110.78	-110.78	-110.78	-110.78	110.78	110.78
3	-94.74	94.74	-94.74	-94.74	-94.74	-94.74	94.74
4	112.17	112.17	-112.17	112.17	112.17	-112.17	-112.17
5	-94.83	-94.83	94.83	94.83	94.83	-94.83	94.83
6	112.12	-112.12	112.12	-112.12	-112.12	-112.12	-112.12
7	-94.77	94.77	94.77	-94.77	-94.77	94.77	-94.77
8	118.64	118.64	118.64	118.64	118.64	118.64	118.64
Somme	75.77	9.00	9.07	6.83	6.83	3.93	6.33
Effet	9.47	1.12	1.13	0.85	0.85	0.49	0.79
Limite inferieur	0.78	-7.56	-7.56	-7.84	-7.84	-8.20	-7.90
Limite superieur	18.16	9.81	9.82	9.54	9.54	9.18	9.48
Facteur significatif (S) ou Non significatif (NS)	S	NS	NS	NS	NS	NS	NS

II. Discussions

1. Spécificité

1.1. Comparaison des chromatogrammes

Selon les résultats obtenus, la spécificité de la méthode est confirmée par :

- L'absence du pic au temps de rétention théorique dans le chromatogramme obtenu à partir du blanc des solutions (placebo).
- Les temps de rétention du pic du bisoprolol dans le standard d'étalonnage et le standard de validation sont comparables à dire similaire.

1.2. Confirmation de la spécificité sur les deux gammes d'étalonnage et de validation

La discussion des résultats obtenus est résumée dans le tableau suivant :

Tableau 32: Résultats de la confirmation de la spécificité.

Test	Résultats	signification
Les pontes sont-elles comparables ?	Oui	Pas d'effet matrice
Les ordonnées à l'origine sont-elles comparables ?	Oui	Pas d'erreurs systématiques

On peut dire qu'avec un risque de 5%, statistiquement la méthode est spécifique ainsi qu'une absence d'effet matrice et d'erreur systématique est confirmée.

2. Choix de la fonction de réponse

La fonction de réponse peut être choisie en ayant recours à deux méthodes ;

2.1 Méthode basée sur le profil d'exactitude

Tous les modèles mathématiques testés en vue de l'obtention des profils d'exactitudes, donnent des intervalles de validité (intervalle de dosage). Nous avons opté pour le modèle de régression linéaire avec l'équation $y = ax + b$ en raison de sa simplicité.

2.2 Méthode basée sur le calcul des indices

Les indices concernés ainsi que leurs formules de calculs sont développées dans l'annexe numéro quatre.

Compte tenu de la complexité de cette méthode nous avons opté pour la méthode du profil d'exactitude.

3. Critères de performance de la fonction de réponse choisie

L'estimations de la fidélité et de la justesse ne sont pas une fin en soi, ils sont une étape intermédiaire obligatoire pour pouvoir évaluer si la procédure analytique va vraisemblablement pouvoir ou non quantifier avec une exactitude suffisante chacune des quantités inconnues, en d'autre termes elles ne renseignent pas sur la qualité des résultats et ne permettent pas de prendre une décision sur la validité de la méthode.

4. Critère de décision sur la validité de la méthode

4.1 Profil d'exactitude

L'ensemble des erreurs (biais+fidélité intermédiaire) ne sortent pas des limites d'acceptation. La méthode mise au point dans cette étude est valide pour l'intervalle de dosage où le profil d'exactitude est compris dans les limites d'acceptation de $\pm 5\%$.

4.2 Intervalle de dosage

Selon les résultats, la méthode est tenue pour valide dans l'intervalle de dosage allant de 195.4 $\mu\text{g/ml}$ à 305.7 $\mu\text{g/ml}$.

4.3 Linéarité

La linéarité de la droite est confirmée par un coefficient de détermination $R^2 = 0,9918$ et une pente différente de zéro et statistiquement comparable à 1 au risque de 5 % ; ($a=0.93$, ainsi que l'ordonnée à l'origine qui est également comparable avec 0 au risque de 5 %, ($b=1.05$).

Ce qui nous amène à conclure que la linéarité de la méthode de dosage est validée.

Conclusion

La méthode de dosage du bisoprolol fumarate dans des comprimés de 5mg par HPLC développée dans cette étude est exacte et valide dans l'intervalle de dosage [80%; 120%] au risque $\pm 5\%$.

CONCLUSION GENERALE

Les résultats issus des méthodes analytiques ont un rôle essentiel dans de nombreux domaines suite aux décisions qui sont prises sur leur base. En industrie pharmaceutique, La fiabilité des résultats analytiques est primordiale et doivent être en accord avec les exigences et les besoins des utilisateurs finaux, ce qui fait de la validation l'élément crucial du cycle de vie d'une méthode analytique.

Contrairement aux autres guides et documents officiels, Les guides SFSTP 2003-2006 vont au-delà d'un simple rappel de concepts généraux de la validation et proposent un protocole expérimental pour son application. Ce protocole repose sur le profil d'exactitude comme outil de décision.

Nous avons procédé à l'application de ce protocole pour mener à bien cette étude en ayant pour objectif de mettre au point et valider une méthode capable de doser le fumarate bisoprolol dans des comprimés de 5 mg par HPLC. Cette étude a été réalisée au niveau du laboratoire de Chimie analytique du département de Pharmacie à la faculté de médecine de Tizi-Ouzou.

Les résultats obtenus attestent la spécificité, l'exactitude, la fidélité, la linéarité et la robustesse de la méthode et donc sa validité, et prouvent qu'elle est apte à être utilisée en routine pour doser le fumarate bisoprolol dans des comprimés de 5 mg dans un intervalle de dosage correspondant à [80% ; 120%] garantissant ainsi des résultats fiables d'excellents taux de recouvrement.

BIBLIOGRAPHIE

[1]: Documents and Settings, Cours de pharmacie, IFSI Bêta-bloquants ; 2006.

[2]: Université numérique des sciences pharmaceutiques francophone, Fiche pratique - Pharmaco-thérapeutique-Bêta-bloquants. Disponible sur le site suivant : <http://webcache.googleusercontent.com/search?q=cache:http://ifsigonnesse.free.fr/Pub/1re%2520Annee/Cours/0-Transverses/Pharmaco/Betabloquants.pdf>

[3]: The American Society of Health-System Pharmacists, Bisoprolol Fumarat; 2016.

[4]: DrugBank, Bisoprolol. In: DrugBank ; 2017.

Disponible sur: <https://www.drugbank.ca/drugs/DB00612>.

[5]: I. Ait Mohamed, N. Aouabed, J. Latarzag, S. Maldague, Université catholique de Louvain, Séminaire intégré des sciences pharmaceutiques, Emencor mitis® : Bisoprolol, 2008.

[6]: Pharm'net : référentiel Algérien du médicament, Bisoprolol Fumarate. Disponible sur : <http://www.pharmnet-dz.com/d-167-bisoprolol-fumarate>.

[7]: Exigences générales concernant la compétence des laboratoires d'étalonnages et d'essais. ISO/CEI 17025: 2005.

[8]: I. Pinguet, Validation analytique : Application de la procédure SFSTP 2003-2006 au domaine de la phytothérapie. Sciences pharmaceutiques. 2015.

[9]: Ph.Hubert, J.J. Nguyen-Huu B. Boulanger, E. Chapuzet, P. Chiap, N. Cohen, P.A. Compagnon, W. Dewe, M. Feinberg, M. Lallier, M. Laurentie, N. Mercier, G. Muzard, C. Nivet, L. Valat, Validation des procédures analytiques quantitatives, STP Pharma Pratiques ; 2003.

[10]: M. Feinberg, Validation des méthodes d'analyse au moyen du profil d'exactitude, édition techniques de l'ingénieur ; 2013.

[11]: Commission SFSTP, Validation des procédures analytiques quantitatives ; 1992.

[12]: Ph.Hubert, J.J. Nguyen-Huu B. Boulanger, E. Chapuzet, P. Chiap, N. Cohen, P.A. Compagnon, W. Dewe, M. Feinberg, M. Lallier, M. Laurentie, N. Mercier, G. Muzard, C.

Nivet, L. Valat, Validation des procédures analytiques quantitatives : Harmonisation des démarches Partie II Statistiques. STP Pharma Pratiques ; 2006.

ANNEXES

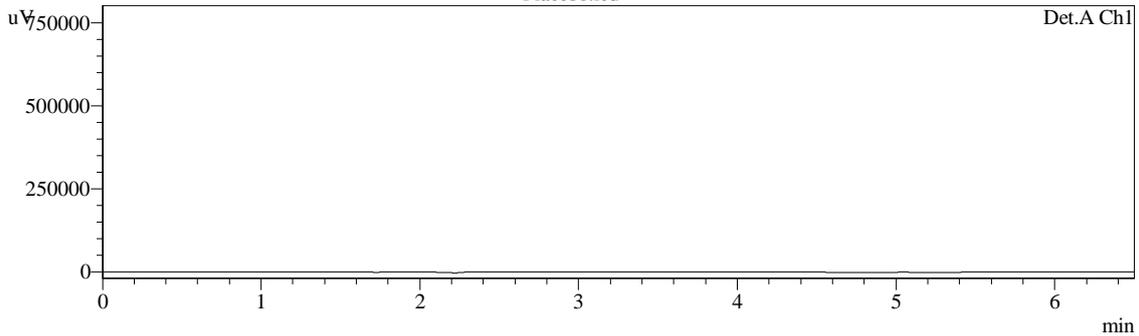
ANNEXE I
DONNEES BRUTES DE LA
VALIDATION

Spécificité

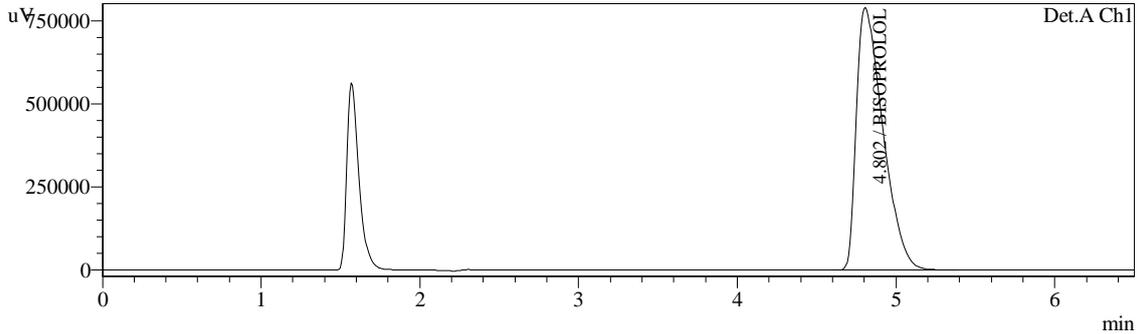
Sample Information

Sample Name : Bisoprolol 1
 Sample ID : STD
 Tray# : 11
 Vial# : 3
 Injection Volume : 20 uL
 Data Filename : SERIE 1 S V 80-1.lcd
 Method Filename : Bisoprolol2.lcm
 Batch Filename : SANS DILUTION.lcb
 Report Filename : Default.lcr
 Date Acquired : 11/08/2017 11:59:24
 Data Processed : 11/08/2017 17:19:46

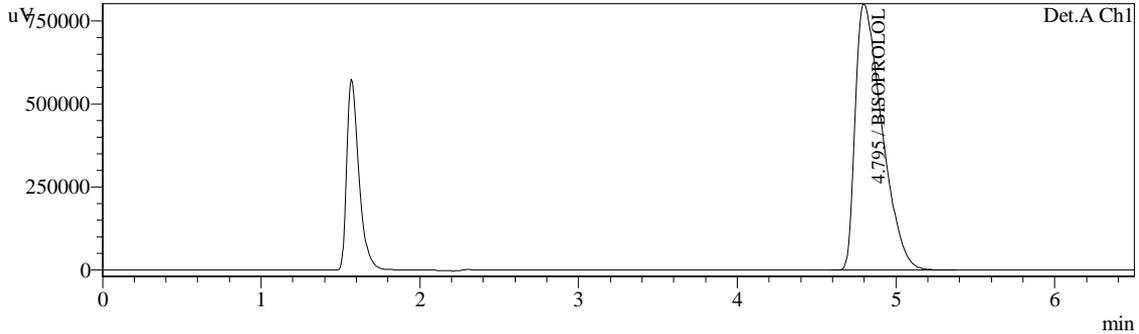
Summary(Compound)
Placébo.lcd



SE- S3-100 - 1.lcd



SV- S3-100- 1.lcd



<< Detector A >>

ID#1 Compound Name: BISOPROLOL

Title	Sample Name	Sample ID	Ret. Time	Area	Height	Conc.
Placébo.lcd	Bisoprolol	placébo	0.000	0	0	0.000
SE- S3-100 - 1.lcd	bisoprolol2	STD	4.802	9186045	788735	0.000
SV- S3-100- 1.lcd	bisoprolol2	STD	4.795	9378156	802222	0.000
Average			4.798	9282101	795479	0.000
%RSD			0.104	1.463	1.199	0.000
Maximum			4.802	9378156	802222	0.000
Minimum			4.795	9186045	788735	0.000

Sample ID	Ret. Time	Area	Height	Conc.
	0.005	135843	9537	0.000

<< Detector B >>

ID#1 Compound Name: TYR

Title	Sample Name	Sample ID	Ret. Time	Area	Height	Conc.
Placébo.lcd	Bisoprolol	placébo	0.000	0	0	0.000
SE- S3-100 - 1.lcd	bisoprolol2	STD	0.000	0	0	0.000
SV- S3-100- 1.lcd	bisoprolol2	STD	0.000	0	0	0.000
Average			0.000	0	0	0.000
%RSD			0.000	0.000	0.000	0.000
Maximum			0.000	0	0	0.000
Minimum			0.000	0	0	0.000
Standard Deviation			0.000	0	0	0.000

ID#2 Compound Name: PHE

Title	Sample Name	Sample ID	Ret. Time	Area	Height	Conc.
Placébo.lcd	Bisoprolol	placébo	0.000	0	0	0.000
SE- S3-100 - 1.lcd	bisoprolol2	STD	0.000	0	0	0.000
SV- S3-100- 1.lcd	bisoprolol2	STD	0.000	0	0	0.000
Average			0.000	0	0	0.000
%RSD			0.000	0.000	0.000	0.000
Maximum			0.000	0	0	0.000
Minimum			0.000	0	0	0.000
Standard Deviation			0.000	0	0	0.000

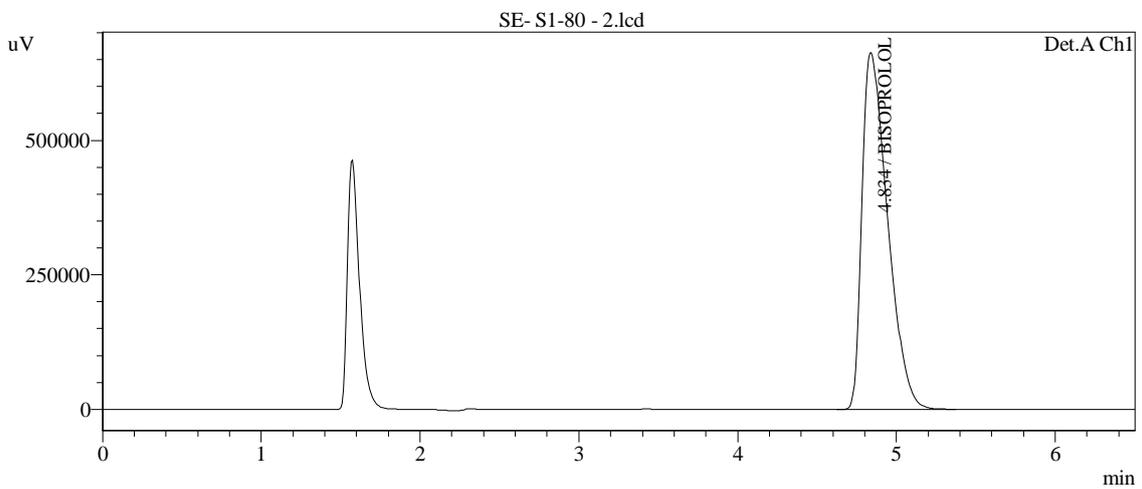
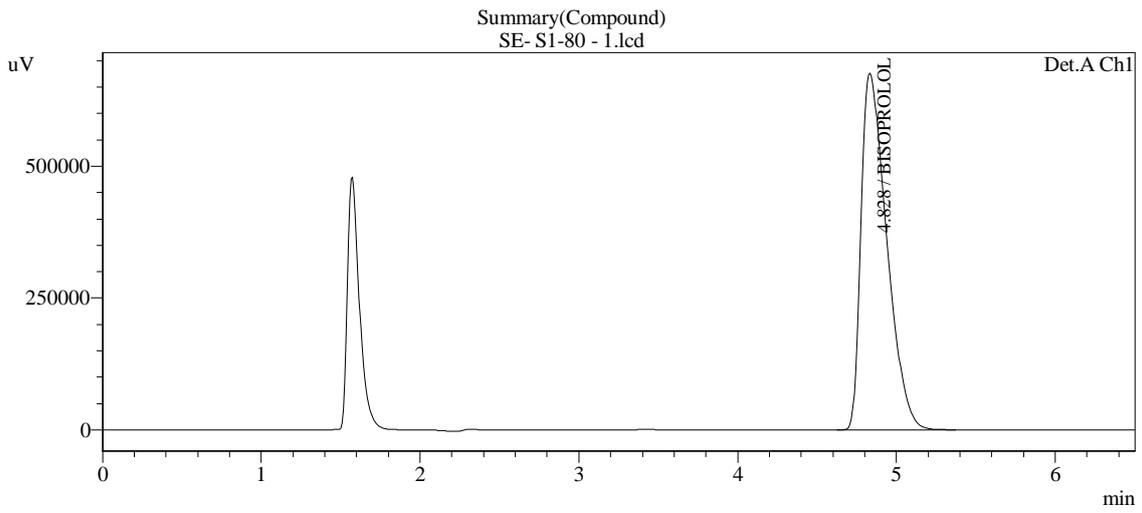
ID#3 Compound Name: EI

Title	Sample Name	Sample ID	Ret. Time	Area	Height	Conc.
Placébo.lcd	Bisoprolol	placébo	0.000	0	0	0.000
SE- S3-100 - 1.lcd	bisoprolol2	STD	0.000	0	0	0.000
SV- S3-100- 1.lcd	bisoprolol2	STD	0.000	0	0	0.000
Average			0.000	0	0	0.000
%RSD			0.000	0.000	0.000	0.000
Maximum			0.000	0	0	0.000
Minimum			0.000	0	0	0.000
Standard Deviation			0.000	0	0	0.000

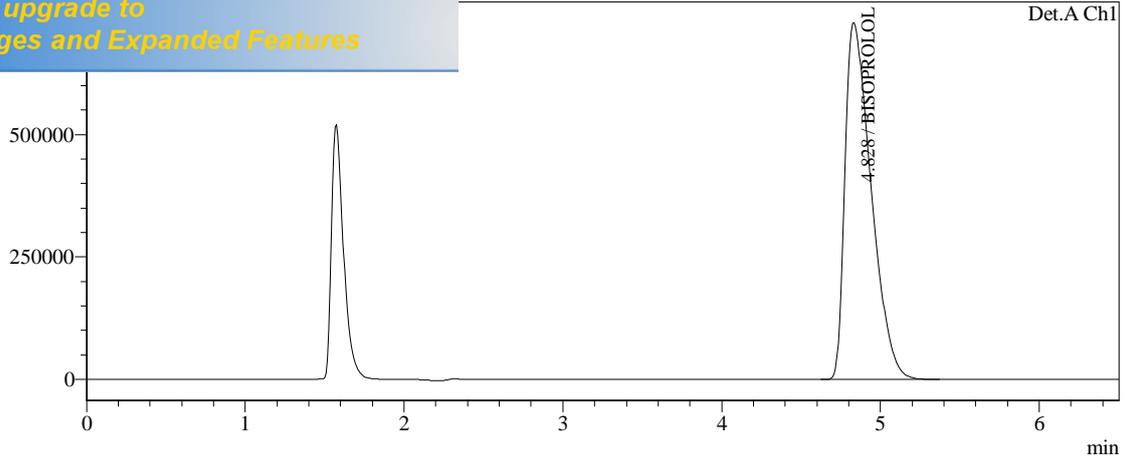
Linéarité

Sample Information

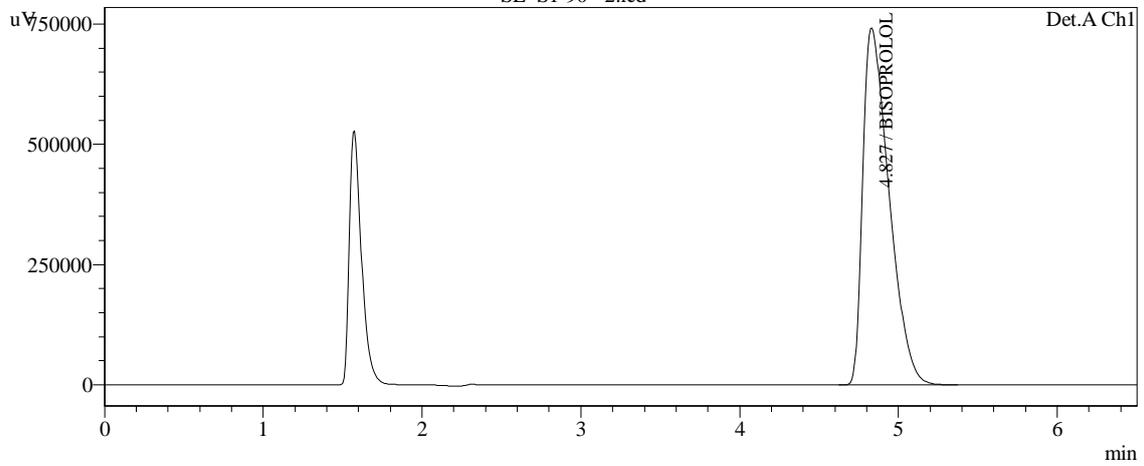
Sample Name : Bisoprolol
Sample ID : STD
Tray# : 1
Vial# : 11
Injection Volume : 20 uL
Data Filename : SE- S1-100 - 1.lcd
Method Filename : Bisoprolol3-3.lcm
Batch Filename : BISOPROLOL SERE REFAITE.lcb
Report Filename : Default.lcr
Date Acquired : 12/08/2017 06:10:58
Data Processed : 12/08/2017 08:40:03



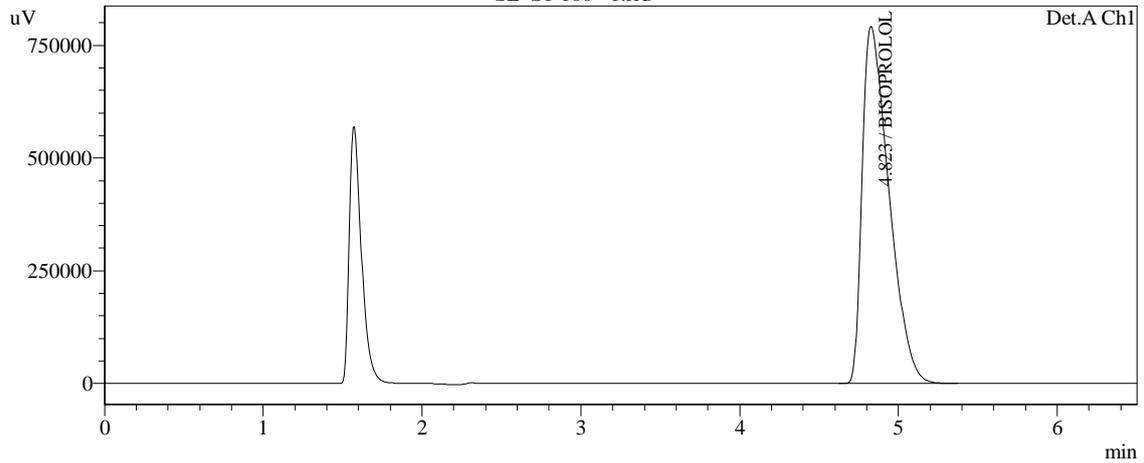
SE- S1-90 - 1.lcd



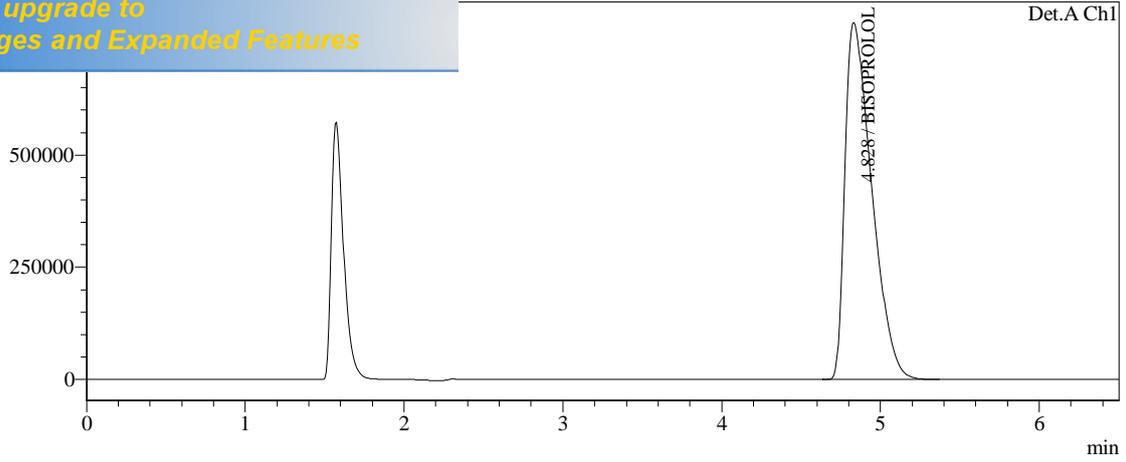
SE- S1-90 - 2.lcd



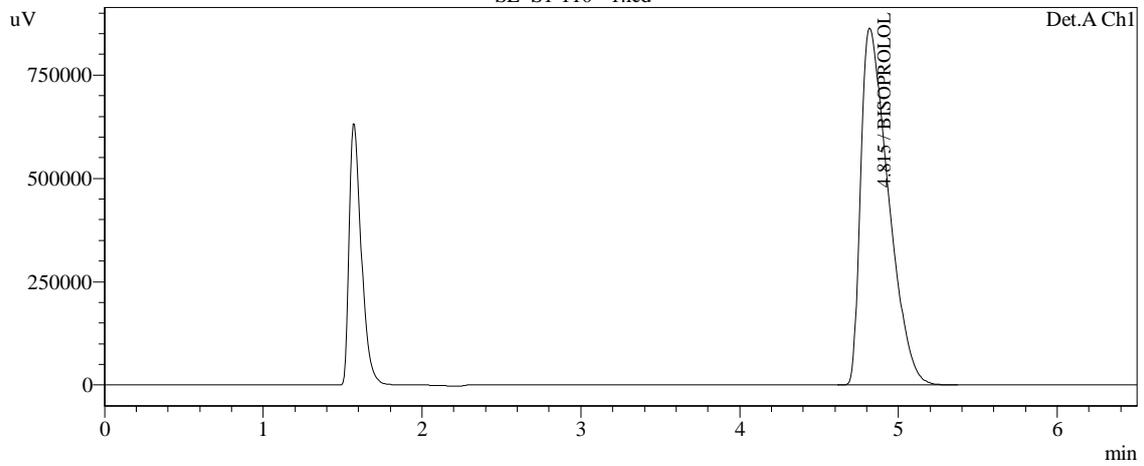
SE- S1-100 - 1.lcd



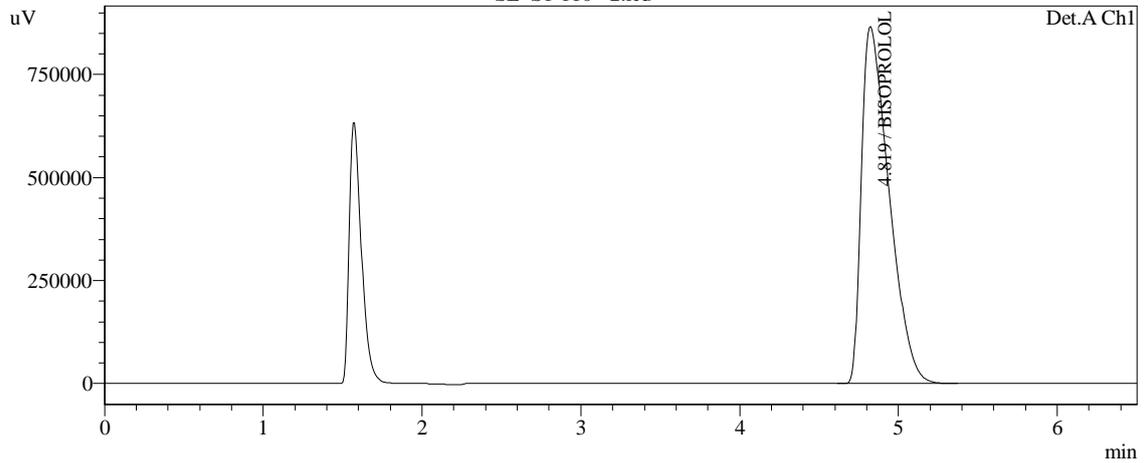
SE- S1-100 - 2.lcd

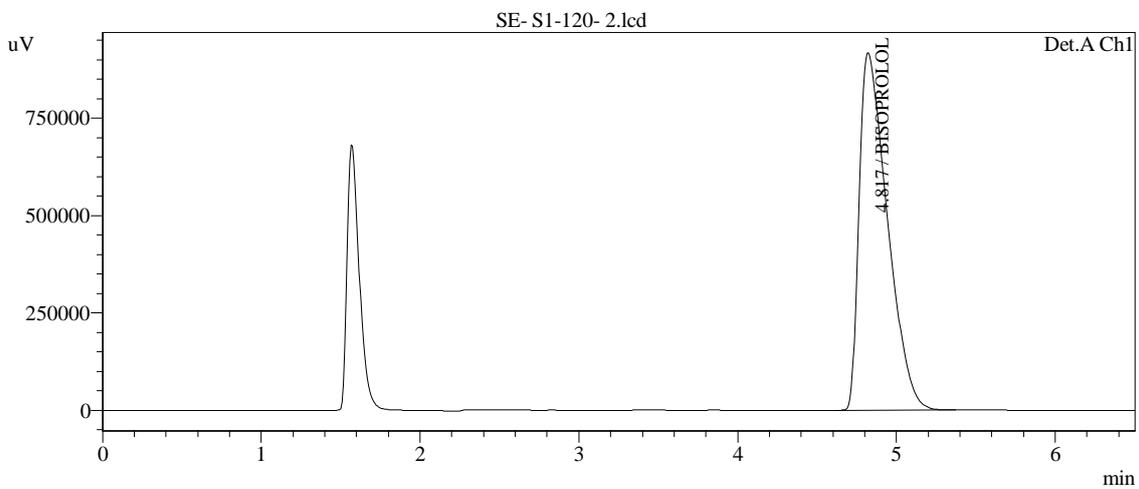
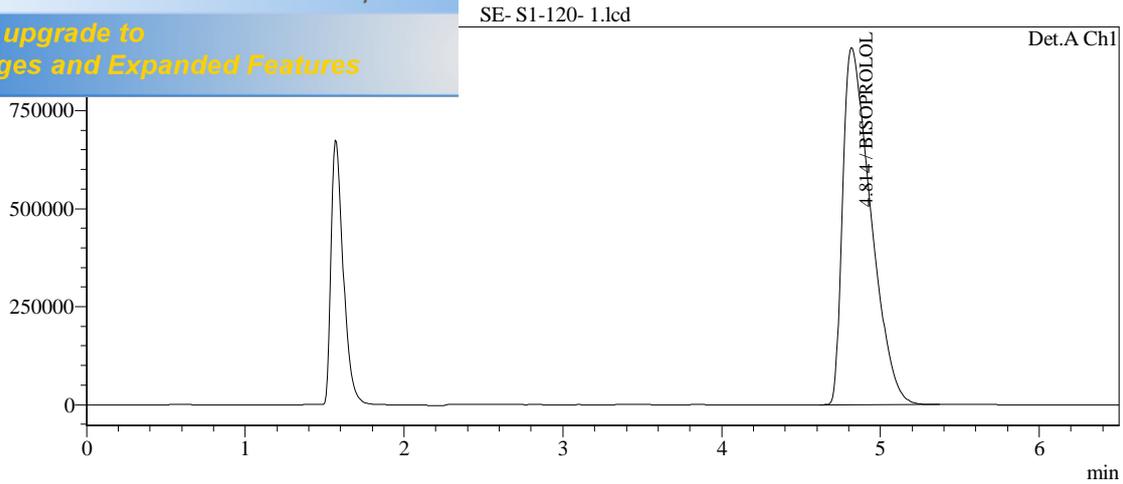


SE- S1-110 - 1.lcd



SE- S1-110 - 2.lcd





<< Detector A >>

ID#1 Compound Name: BISOPROLOL

Title	Sample Name	Sample ID	Ret. Time	Area	Height	Conc.
SE- S1-80 - 1.lcd	Bisoprolol	STD	4.828	7601830	676712	0.000
SE- S1-80 - 2.lcd	Bisoprolol	STD	4.834	7434159	663507	0.000
SE- S1-90 - 1.lcd	Bisoprolol	STD	4.828	8351184	729029	0.000
SE- S1-90 - 2.lcd	Bisoprolol	STD	4.827	8545753	742281	0.000
SE- S1-100 - 1.lcd	Bisoprolol	STD	4.823	9298097	792375	0.000
SE- S1-100 - 2.lcd	Bisoprolol	STD	4.828	9340606	795718	0.000
SE- S1-110 - 1.lcd	Bisoprolol	STD	4.815	10450238	864248	0.000
SE- S1-110 - 2.lcd	Bisoprolol	STD	4.819	10492147	867270	0.000
SE- S1-120- 1.lcd	Bisoprolol	STD	4.814	11212286	911811	0.000
SE- S1-120- 2.lcd	Bisoprolol	STD	4.817	11318180	918070	0.000
Average			4.823	9404448	796102	0.000
%RSD			0.141	15.121	11.635	0.000
Maximum			4.834	11318180	918070	0.000
Minimum			4.814	7434159	663507	0.000
Standard Deviation			0.007	1422087	92627	0.000

<< Detector B >>

ID#1 Compound Name: TYR

Title	Sample Name	Sample ID	Ret. Time	Area	Height	Conc.
SE- S1-80 - 1.lcd	Bisoprolol	STD	0.000	0	0	0.000
SE- S1-80 - 2.lcd	Bisoprolol	STD	0.000	0	0	0.000
SE- S1-90 - 1.lcd	Bisoprolol	STD	0.000	0	0	0.000
SE- S1-90 - 2.lcd	Bisoprolol	STD	0.000	0	0	0.000
SE- S1-100 - 1.lcd	Bisoprolol	STD	0.000	0	0	0.000
SE- S1-100 - 2.lcd	Bisoprolol	STD	0.000	0	0	0.000
SE- S1-110 - 1.lcd	Bisoprolol	STD	0.000	0	0	0.000
SE- S1-110 - 2.lcd	Bisoprolol	STD	0.000	0	0	0.000
SE- S1-120- 1.lcd	Bisoprolol	STD	0.000	0	0	0.000
SE- S1-120- 2.lcd	Bisoprolol	STD	0.000	0	0	0.000
Average			0.000	0	0	0.000
%RSD			0.000	0.000	0.000	0.000

Sample ID	Ret. Time	Area	Height	Conc.
	0.000	0	0	0.000
	0.000	0	0	0.000
	0.000	0	0	0.000

ID#2 Compound Name: PHE

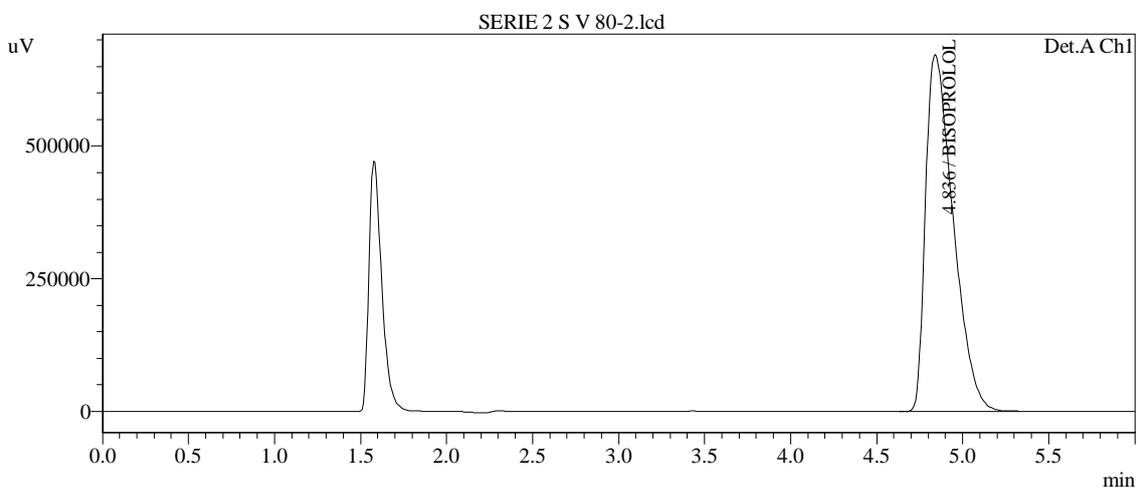
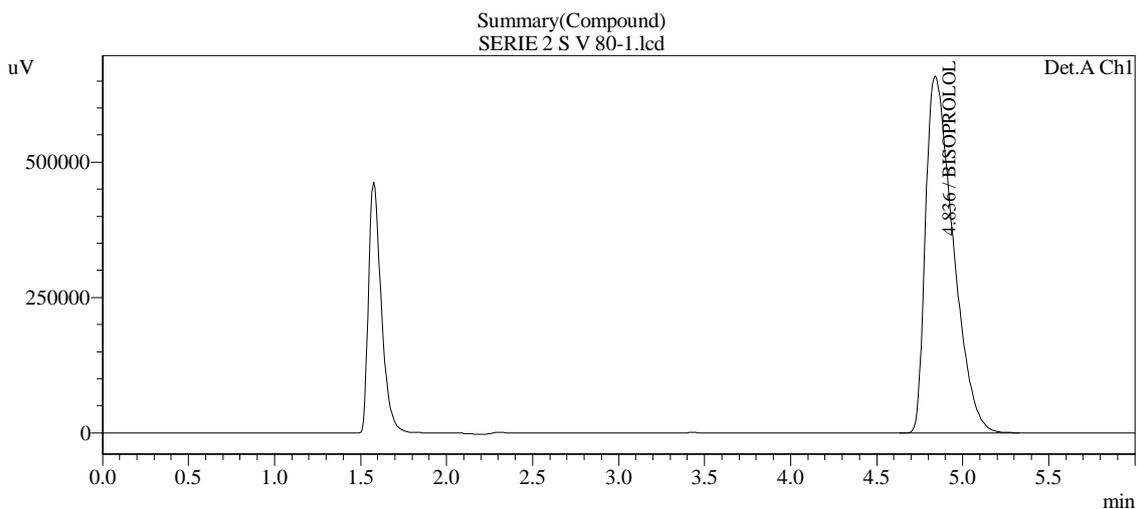
Title	Sample Name	Sample ID	Ret. Time	Area	Height	Conc.
SE- S1-80 - 1.lcd	Bisoprolol	STD	0.000	0	0	0.000
SE- S1-80 - 2.lcd	Bisoprolol	STD	0.000	0	0	0.000
SE- S1-90 - 1.lcd	Bisoprolol	STD	0.000	0	0	0.000
SE- S1-90 - 2.lcd	Bisoprolol	STD	0.000	0	0	0.000
SE- S1-100 - 1.lcd	Bisoprolol	STD	0.000	0	0	0.000
SE- S1-100 - 2.lcd	Bisoprolol	STD	0.000	0	0	0.000
SE- S1-110 - 1.lcd	Bisoprolol	STD	0.000	0	0	0.000
SE- S1-110 - 2.lcd	Bisoprolol	STD	0.000	0	0	0.000
SE- S1-120- 1.lcd	Bisoprolol	STD	0.000	0	0	0.000
SE- S1-120- 2.lcd	Bisoprolol	STD	0.000	0	0	0.000
Average			0.000	0	0	0.000
%RSD			0.000	0.000	0.000	0.000
Maximum			0.000	0	0	0.000
Minimum			0.000	0	0	0.000
Standard Deviation			0.000	0	0	0.000

ID#3 Compound Name: EI

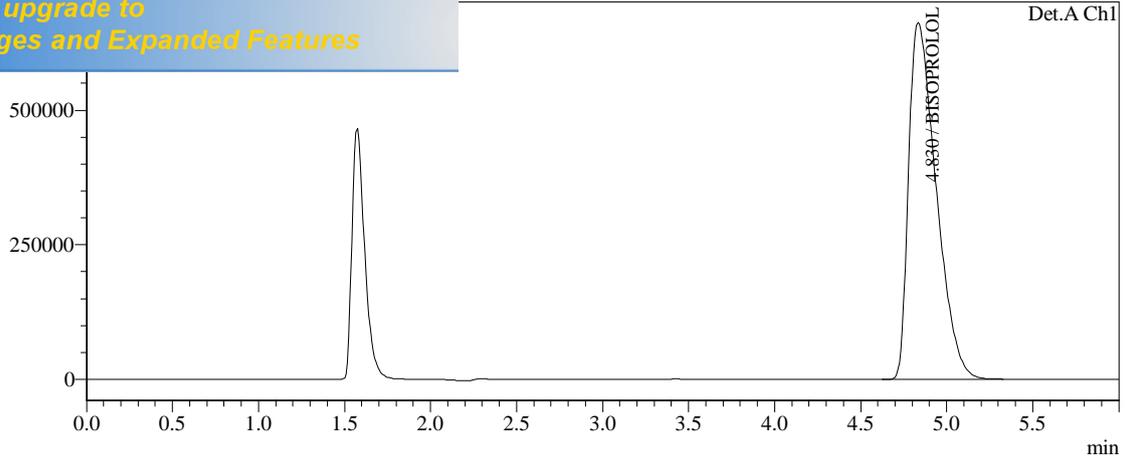
Title	Sample Name	Sample ID	Ret. Time	Area	Height	Conc.
SE- S1-80 - 1.lcd	Bisoprolol	STD	0.000	0	0	0.000
SE- S1-80 - 2.lcd	Bisoprolol	STD	0.000	0	0	0.000
SE- S1-90 - 1.lcd	Bisoprolol	STD	0.000	0	0	0.000
SE- S1-90 - 2.lcd	Bisoprolol	STD	0.000	0	0	0.000
SE- S1-100 - 1.lcd	Bisoprolol	STD	0.000	0	0	0.000
SE- S1-100 - 2.lcd	Bisoprolol	STD	0.000	0	0	0.000
SE- S1-110 - 1.lcd	Bisoprolol	STD	0.000	0	0	0.000
SE- S1-110 - 2.lcd	Bisoprolol	STD	0.000	0	0	0.000
SE- S1-120- 1.lcd	Bisoprolol	STD	0.000	0	0	0.000
SE- S1-120- 2.lcd	Bisoprolol	STD	0.000	0	0	0.000
Average			0.000	0	0	0.000
%RSD			0.000	0.000	0.000	0.000
Maximum			0.000	0	0	0.000
Minimum			0.000	0	0	0.000
Standard Deviation			0.000	0	0	0.000

Sample Information

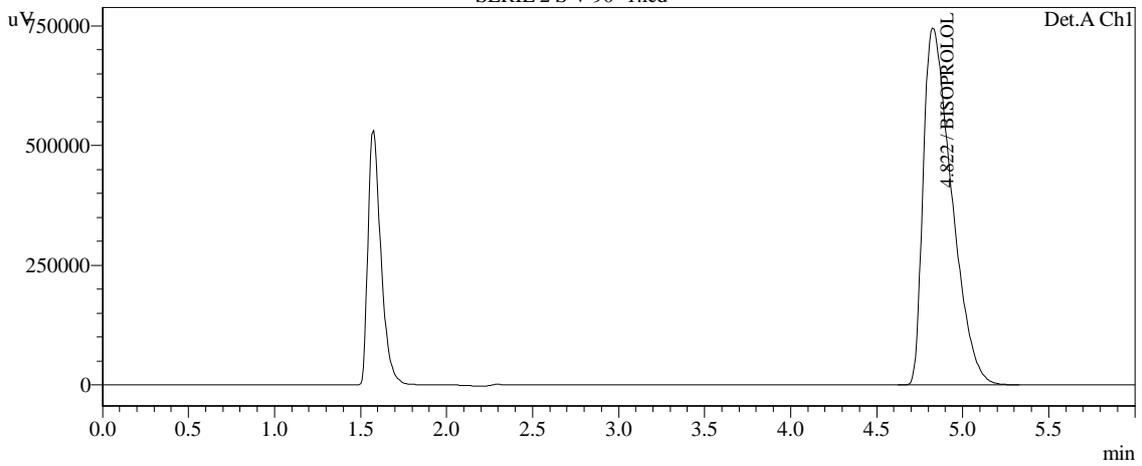
Sample Name : Bisoprolol 1
Sample ID : STD
Tray# : 11
Vial# : 3
Injection Volume : 20 uL
Data Filename : SERIE 1 S V 80-1.lcd
Method Filename : Bisoprolol2.lcm
Batch Filename : SANS DILUTION.lcb
Report Filename : Default.lcr
Date Acquired : 11/08/2017 11:59:24
Data Processed : 11/08/2017 17:19:46



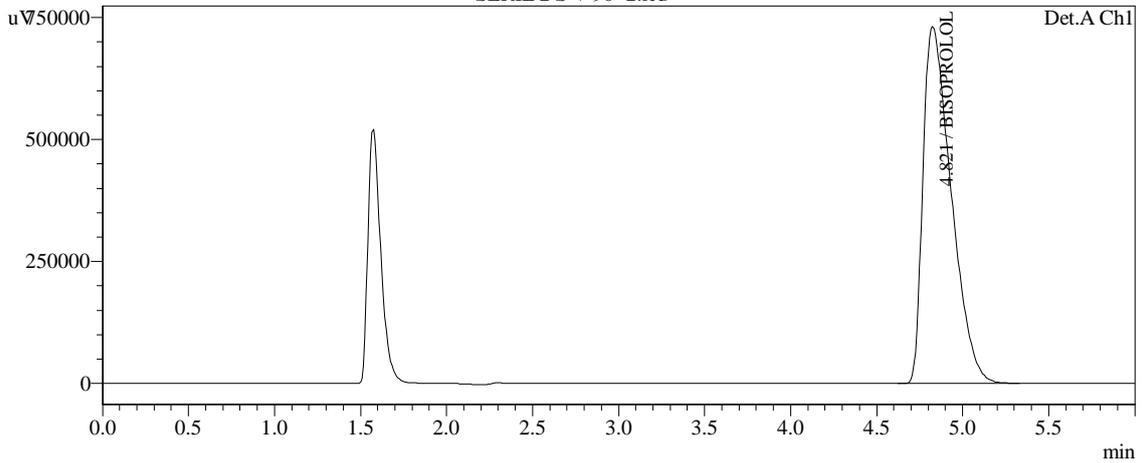
SERIE 2 S V 80-3.lcd



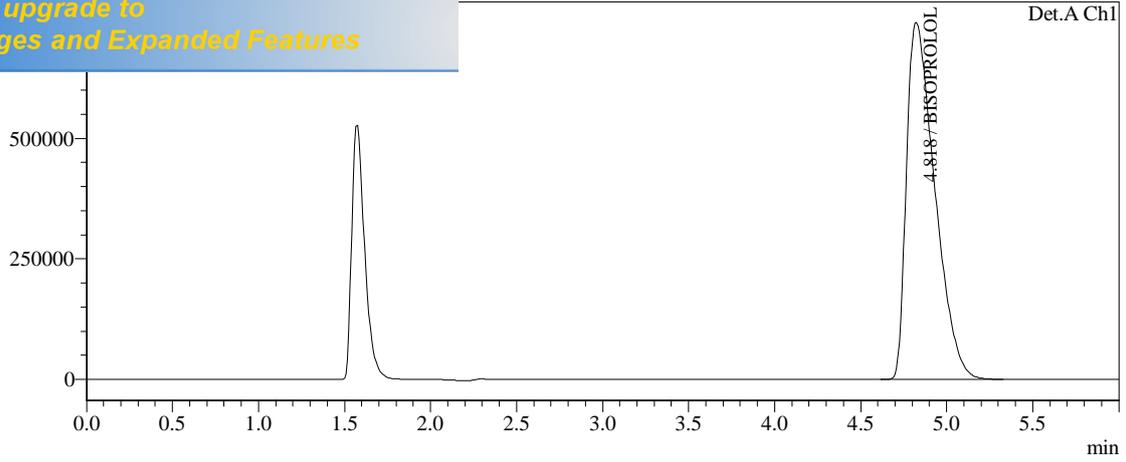
SERIE 2 S V 90 -1.lcd



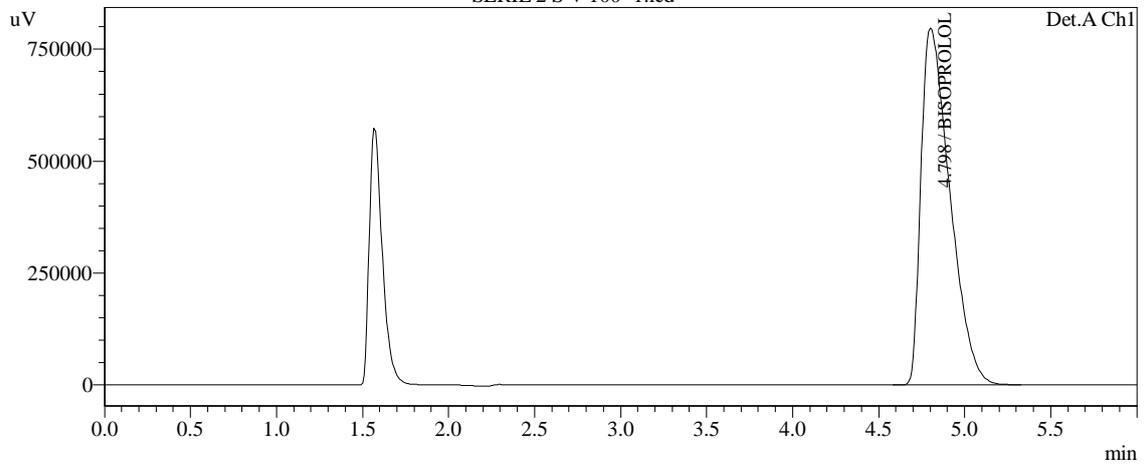
SERIE 2 S V 90 -2.lcd



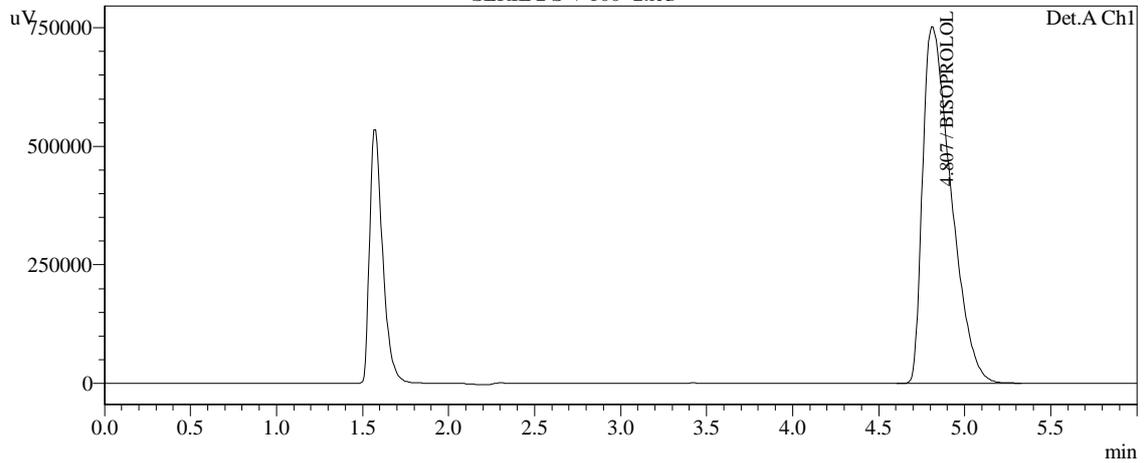
SERIE 2 S V 90 -3.lcd



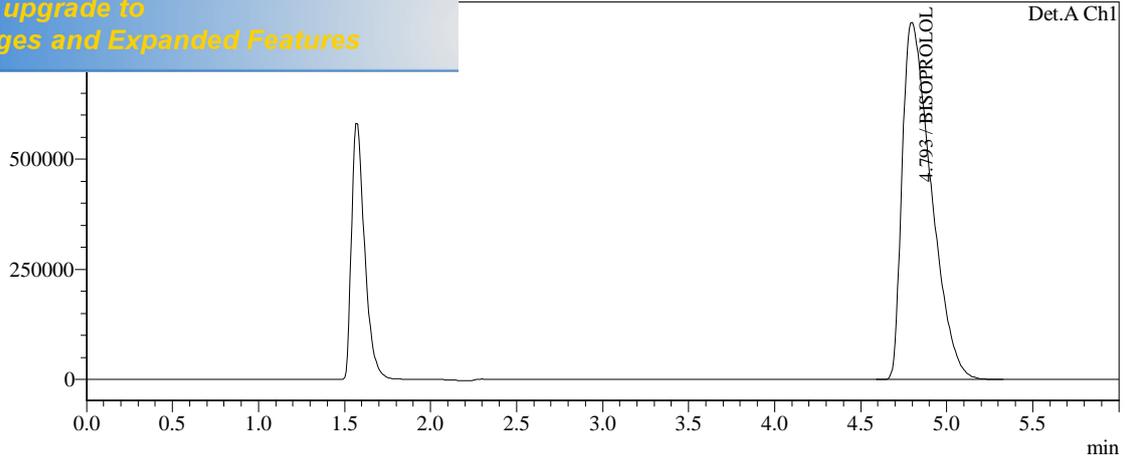
SERIE 2 S V 100 -1.lcd



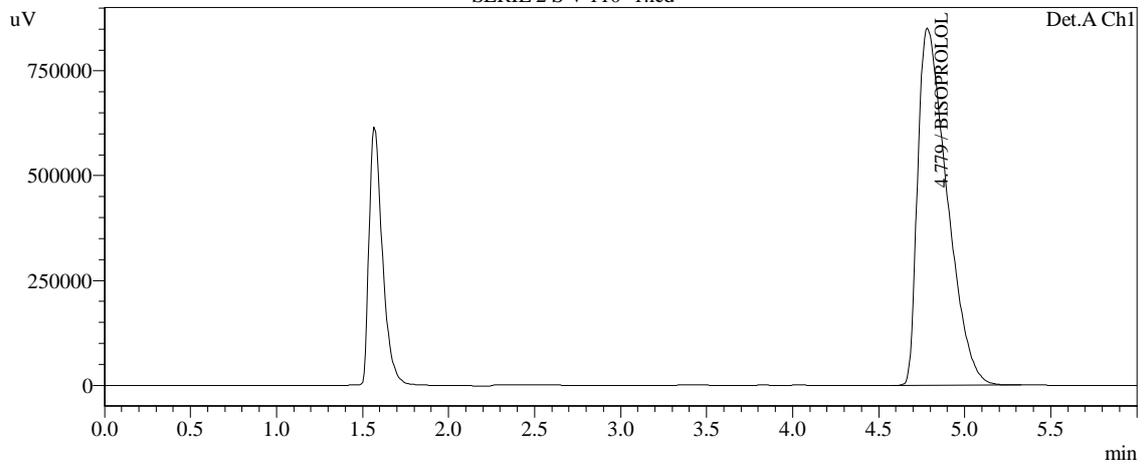
SERIE 2 S V 100 -2.lcd



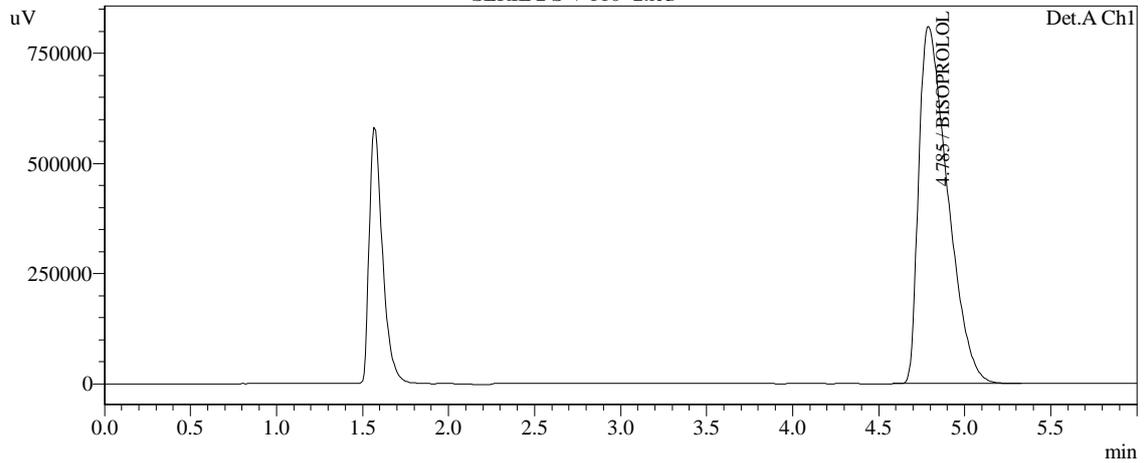
SERIE 2 S V 100 -3.lcd



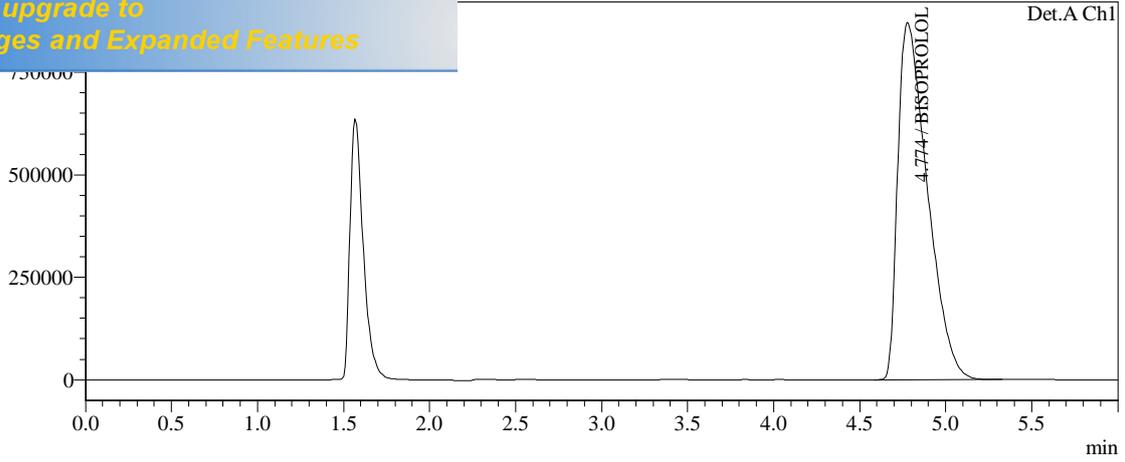
SERIE 2 S V 110 -1.lcd



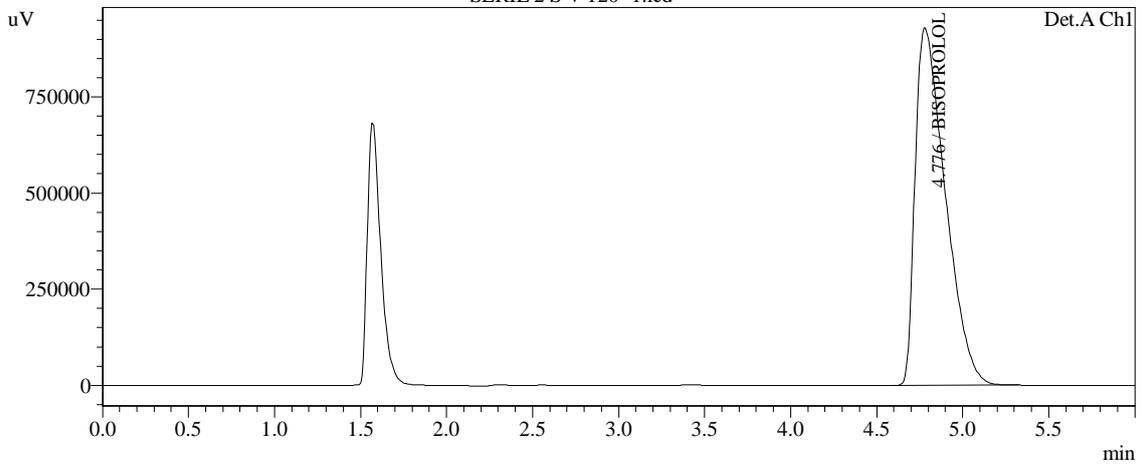
SERIE 2 S V 110 -2.lcd



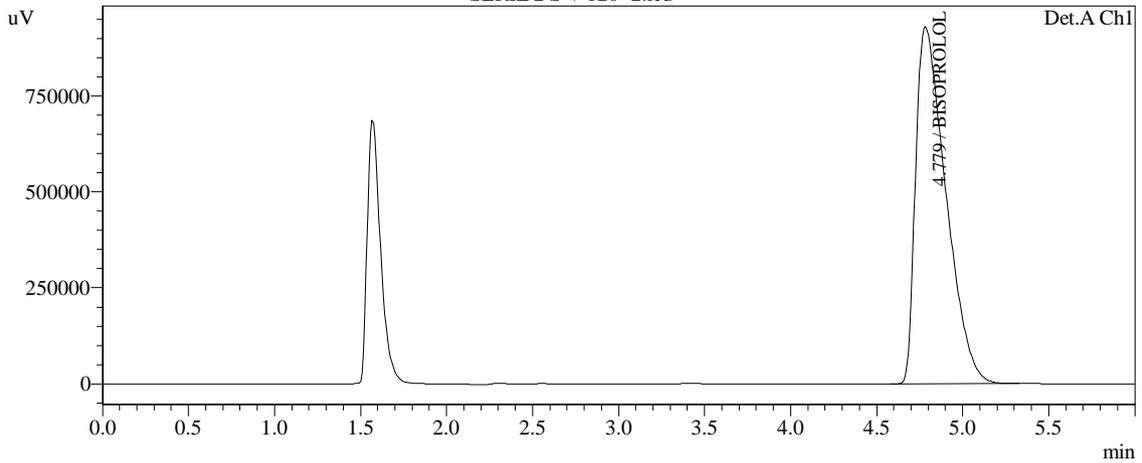
SERIE 2 S V 110 -3.lcd



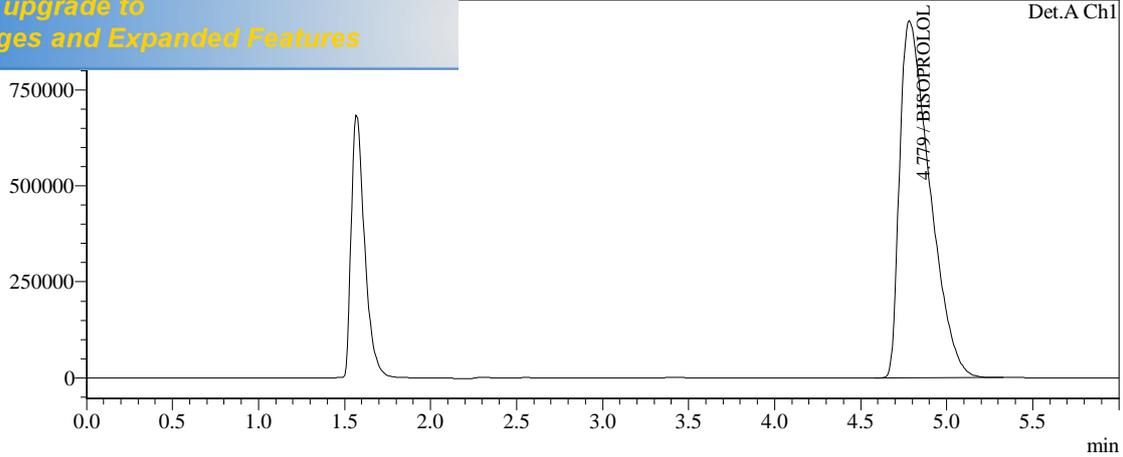
SERIE 2 S V 120 -1.lcd



SERIE 2 S V 120 -2.lcd



SERIE 2 S V 120 -3.lcd



<< Detector A >>

ID#1 Compound Name: BISOPROLOL

Title	Sample Name	Sample ID	Ret. Time	Area	Height	Conc.
SERIE 2 S V 80-1.lcd	Bisoprolol 1	STD	4.836	7319506	659489	0.000
SERIE 2 S V 80-2.lcd	Bisoprolol 1	STD	4.836	7499416	672769	0.000
SERIE 2 S V 80-3.lcd	Bisoprolol 1	STD	4.830	7369148	663448	0.000
SERIE 2 S V 90 -1.lcd	Bisoprolol 1	STD	4.822	8545197	745857	0.000
SERIE 2 S V 90 -2.lcd	Bisoprolol 1	STD	4.821	8326570	732119	0.000
SERIE 2 S V 90 -3.lcd	Bisoprolol 1	STD	4.818	8470256	740734	0.000
SERIE 2 S V 100 -1.lcd	Bisoprolol 1	STD	4.798	9308860	797691	0.000
SERIE 2 S V 100 -2.lcd	Bisoprolol 1	STD	4.807	8638731	752959	0.000
SERIE 2 S V 100 -3.lcd	Bisoprolol 1	STD	4.793	9491347	811054	0.000
SERIE 2 S V 110 -1.lcd	Bisoprolol 1	STD	4.779	10085661	853004	0.000
SERIE 2 S V 110 -2.lcd	Bisoprolol 1	STD	4.785	9474146	811569	0.000
SERIE 2 S V 110 -3.lcd	Bisoprolol 1	STD	4.774	10411166	872368	0.000
SERIE 2 S V 120 -1.lcd	Bisoprolol 1	STD	4.776	11323135	929591	0.000
SERIE 2 S V 120 -2.lcd	Bisoprolol 1	STD	4.779	11339061	931204	0.000
SERIE 2 S V 120 -3.lcd	Bisoprolol 1	STD	4.779	11318210	931464	0.000
Average			4.802	9261361	793688	0.000
%RSD			0.487	15.203	11.993	0.000
Maximum			4.836	11339061	931464	0.000
Minimum			4.774	7319506	659489	0.000
Standard Deviation			0.023	1408046	95185	0.000

<< Detector B >>

ID#1 Compound Name: TYR

Title	Sample Name	Sample ID	Ret. Time	Area	Height	Conc.
SERIE 2 S V 80-1.lcd	Bisoprolol 1	STD	0.000	0	0	0.000
SERIE 2 S V 80-2.lcd	Bisoprolol 1	STD	0.000	0	0	0.000
SERIE 2 S V 80-3.lcd	Bisoprolol 1	STD	0.000	0	0	0.000
SERIE 2 S V 90 -1.lcd	Bisoprolol 1	STD	0.000	0	0	0.000
SERIE 2 S V 90 -2.lcd	Bisoprolol 1	STD	0.000	0	0	0.000
SERIE 2 S V 90 -3.lcd	Bisoprolol 1	STD	0.000	0	0	0.000
SERIE 2 S V 100 -1.lcd	Bisoprolol 1	STD	0.000	0	0	0.000
SERIE 2 S V 100 -2.lcd	Bisoprolol 1	STD	0.000	0	0	0.000
SERIE 2 S V 100 -3.lcd	Bisoprolol 1	STD	0.000	0	0	0.000
SERIE 2 S V 110 -1.lcd	Bisoprolol 1	STD	0.000	0	0	0.000
SERIE 2 S V 110 -2.lcd	Bisoprolol 1	STD	0.000	0	0	0.000
SERIE 2 S V 110 -3.lcd	Bisoprolol 1	STD	0.000	0	0	0.000
SERIE 2 S V 120 -1.lcd	Bisoprolol 1	STD	0.000	0	0	0.000
SERIE 2 S V 120 -2.lcd	Bisoprolol 1	STD	0.000	0	0	0.000
SERIE 2 S V 120 -3.lcd	Bisoprolol 1	STD	0.000	0	0	0.000
Average			0.000	0	0	0.000
%RSD			0.000	0.000	0.000	0.000
Maximum			0.000	0	0	0.000
Minimum			0.000	0	0	0.000
Standard Deviation			0.000	0	0	0.000

ID#2 Compound Name: PHE

Title	Sample Name	Sample ID	Ret. Time	Area	Height	Conc.
SERIE 2 S V 80-1.lcd	Bisoprolol 1	STD	0.000	0	0	0.000
SERIE 2 S V 80-2.lcd	Bisoprolol 1	STD	0.000	0	0	0.000
SERIE 2 S V 80-3.lcd	Bisoprolol 1	STD	0.000	0	0	0.000
SERIE 2 S V 90 -1.lcd	Bisoprolol 1	STD	0.000	0	0	0.000
SERIE 2 S V 90 -2.lcd	Bisoprolol 1	STD	0.000	0	0	0.000
SERIE 2 S V 90 -3.lcd	Bisoprolol 1	STD	0.000	0	0	0.000

[Click Here to upgrade to
Unlimited Pages and Expanded Features](#)

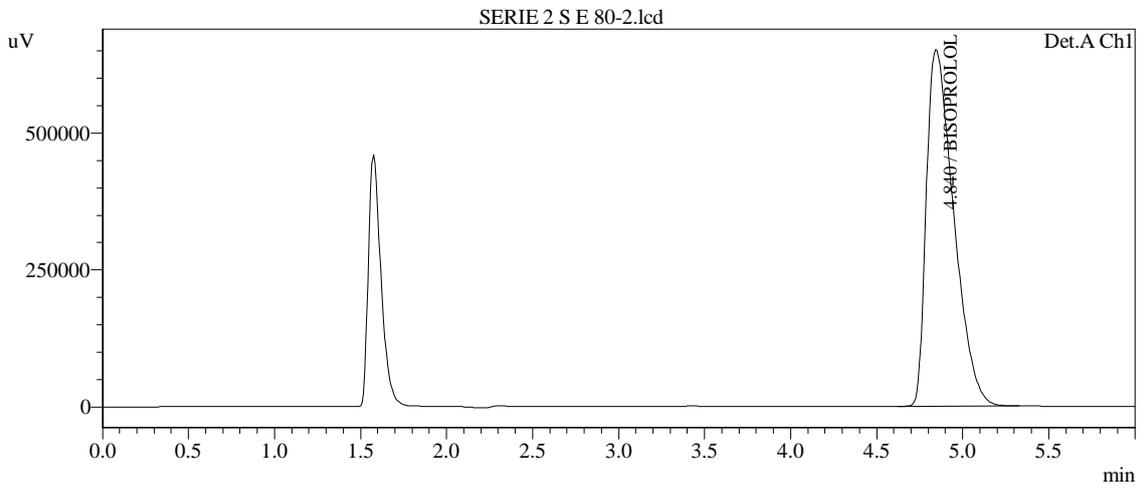
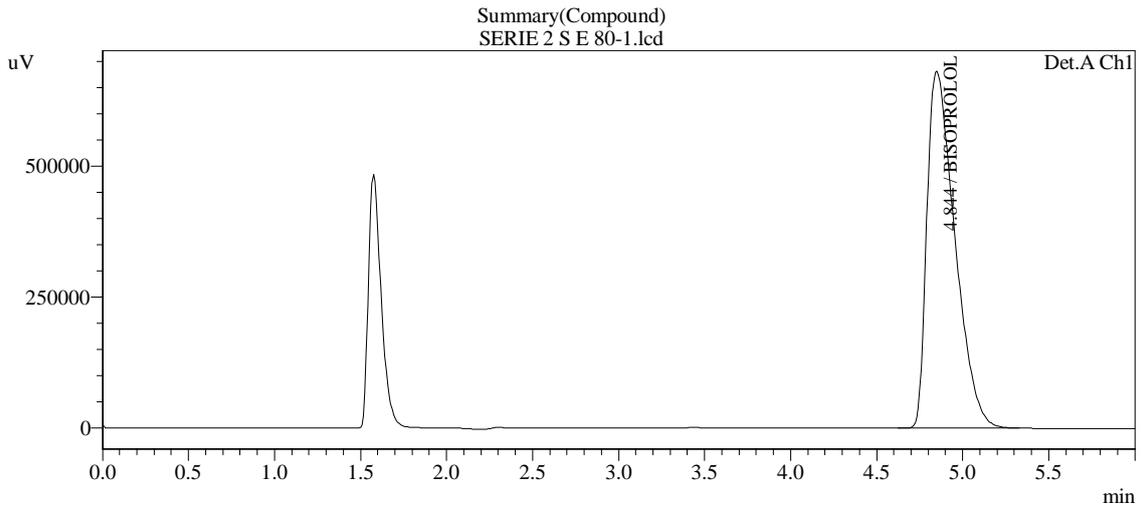
Sample ID	Ret. Time	Area	Height	Conc.		
	0.000	0	0	0.000		
	0.000	0	0	0.000		
	0.000	0	0	0.000		
SERIE 2 S V 110 -1.lcd	Bisoprolol 1	STD	0.000	0	0	0.000
SERIE 2 S V 110 -2.lcd	Bisoprolol 1	STD	0.000	0	0	0.000
SERIE 2 S V 110 -3.lcd	Bisoprolol 1	STD	0.000	0	0	0.000
SERIE 2 S V 120 -1.lcd	Bisoprolol 1	STD	0.000	0	0	0.000
SERIE 2 S V 120 -2.lcd	Bisoprolol 1	STD	0.000	0	0	0.000
SERIE 2 S V 120 -3.lcd	Bisoprolol 1	STD	0.000	0	0	0.000
Average			0.000	0	0	0.000
%RSD			0.000	0.000	0.000	0.000
Maximum			0.000	0	0	0.000
Minimum			0.000	0	0	0.000
Standard Deviation			0.000	0	0	0.000

ID#3 Compound Name: EI

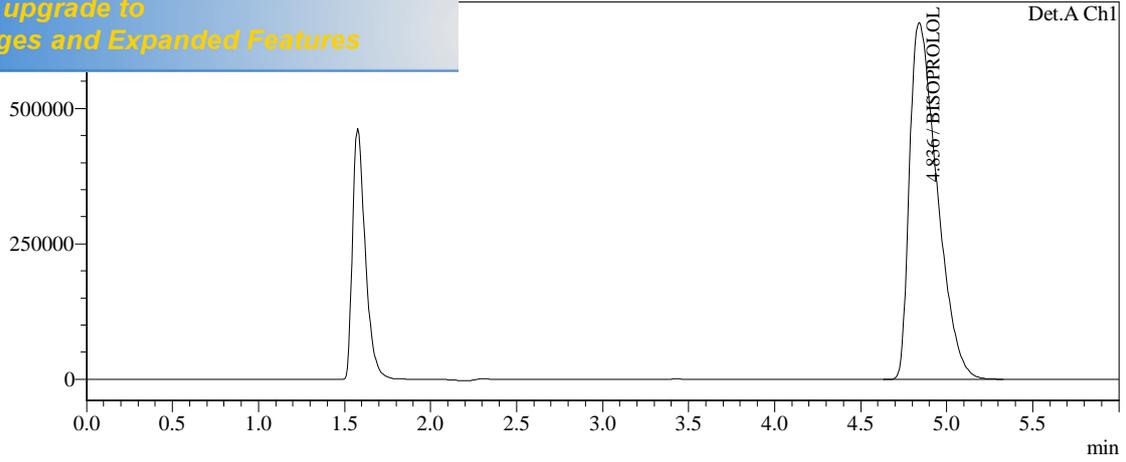
Title	Sample Name	Sample ID	Ret. Time	Area	Height	Conc.
SERIE 2 S V 80-1.lcd	Bisoprolol 1	STD	0.000	0	0	0.000
SERIE 2 S V 80-2.lcd	Bisoprolol 1	STD	0.000	0	0	0.000
SERIE 2 S V 80-3.lcd	Bisoprolol 1	STD	0.000	0	0	0.000
SERIE 2 S V 90 -1.lcd	Bisoprolol 1	STD	0.000	0	0	0.000
SERIE 2 S V 90 -2.lcd	Bisoprolol 1	STD	0.000	0	0	0.000
SERIE 2 S V 90 -3.lcd	Bisoprolol 1	STD	0.000	0	0	0.000
SERIE 2 S V 100 -1.lcd	Bisoprolol 1	STD	0.000	0	0	0.000
SERIE 2 S V 100 -2.lcd	Bisoprolol 1	STD	0.000	0	0	0.000
SERIE 2 S V 100 -3.lcd	Bisoprolol 1	STD	0.000	0	0	0.000
SERIE 2 S V 110 -1.lcd	Bisoprolol 1	STD	0.000	0	0	0.000
SERIE 2 S V 110 -2.lcd	Bisoprolol 1	STD	0.000	0	0	0.000
SERIE 2 S V 110 -3.lcd	Bisoprolol 1	STD	0.000	0	0	0.000
SERIE 2 S V 120 -1.lcd	Bisoprolol 1	STD	0.000	0	0	0.000
SERIE 2 S V 120 -2.lcd	Bisoprolol 1	STD	0.000	0	0	0.000
SERIE 2 S V 120 -3.lcd	Bisoprolol 1	STD	0.000	0	0	0.000
Average			0.000	0	0	0.000
%RSD			0.000	0.000	0.000	0.000
Maximum			0.000	0	0	0.000
Minimum			0.000	0	0	0.000
Standard Deviation			0.000	0	0	0.000

Sample Information

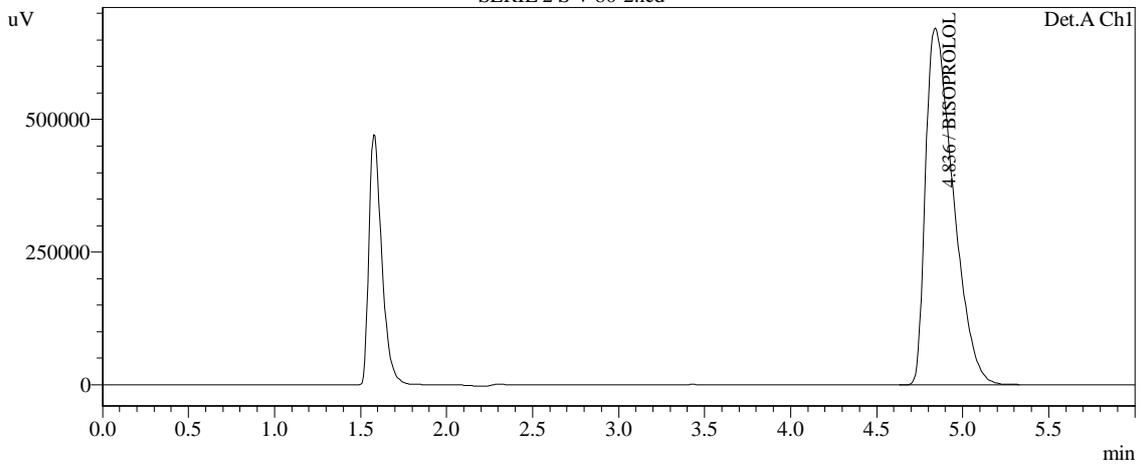
Sample Name : Bisoprolol 1
Sample ID : STD
Tray# : 11
Vial# : 1
Injection Volume : 20 uL
Data Filename : SERIE 2 S E 80-1.lcd
Method Filename : Bisoprolol2-2.lcm
Batch Filename : SANS DILUTION.lcb
Report Filename : Default.lcr
Date Acquired : 11/08/2017 1626:07
Data Processed : 11/08/2017 2228:26



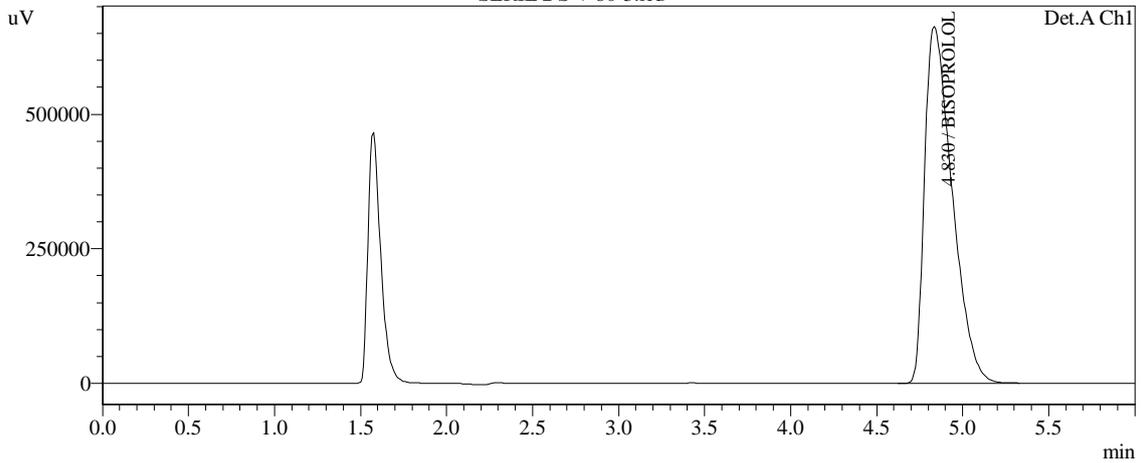
SERIE 2 S V 80-1.lcd

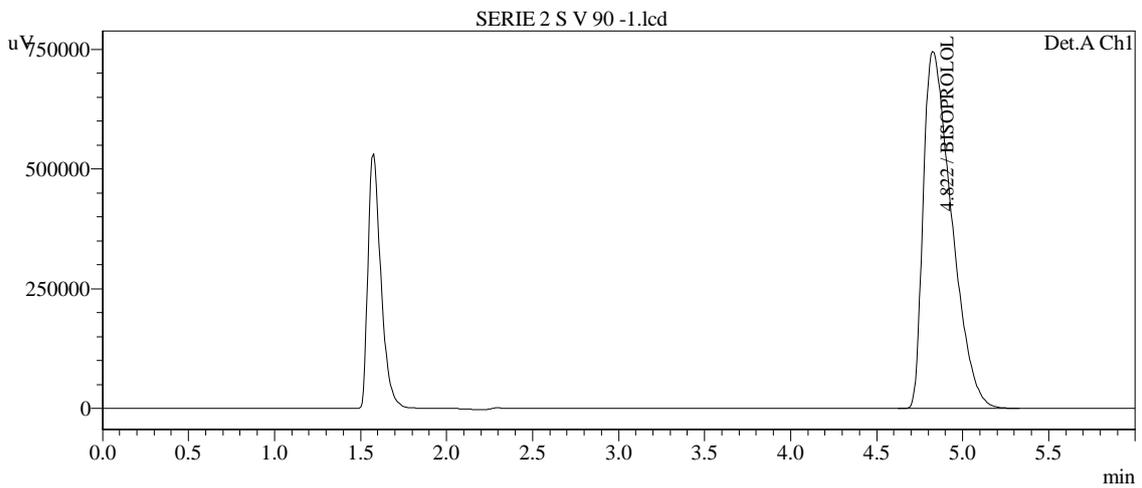
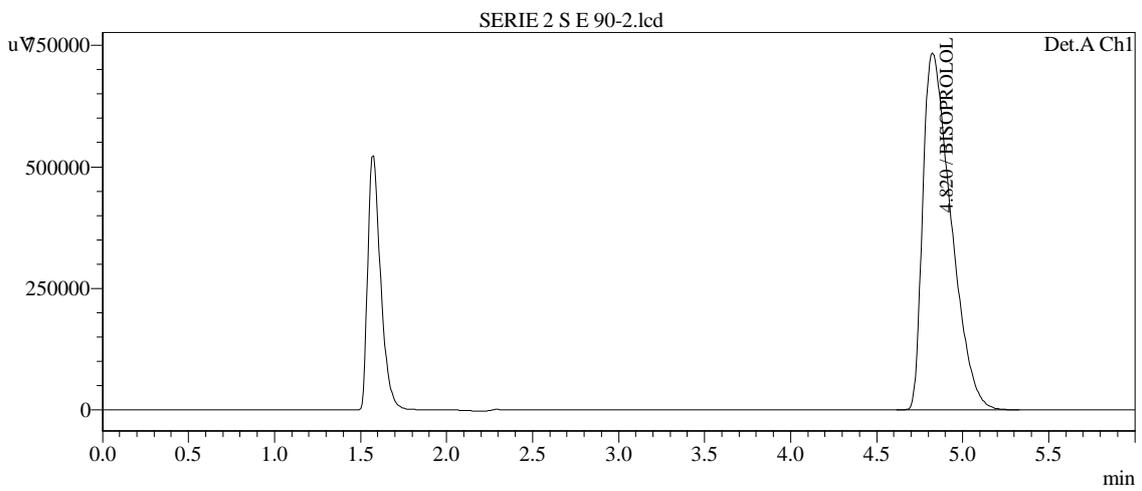
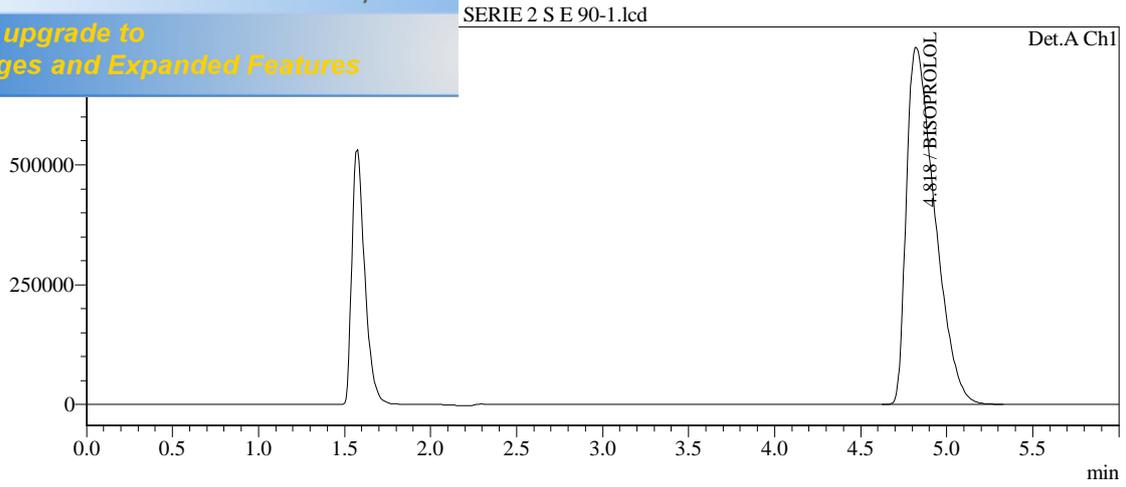


SERIE 2 S V 80-2.lcd

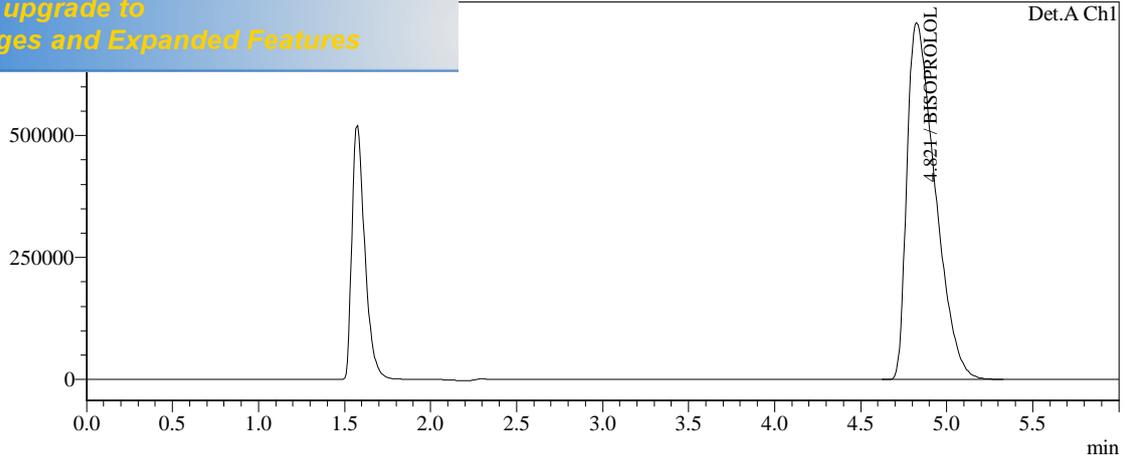


SERIE 2 S V 80-3.lcd

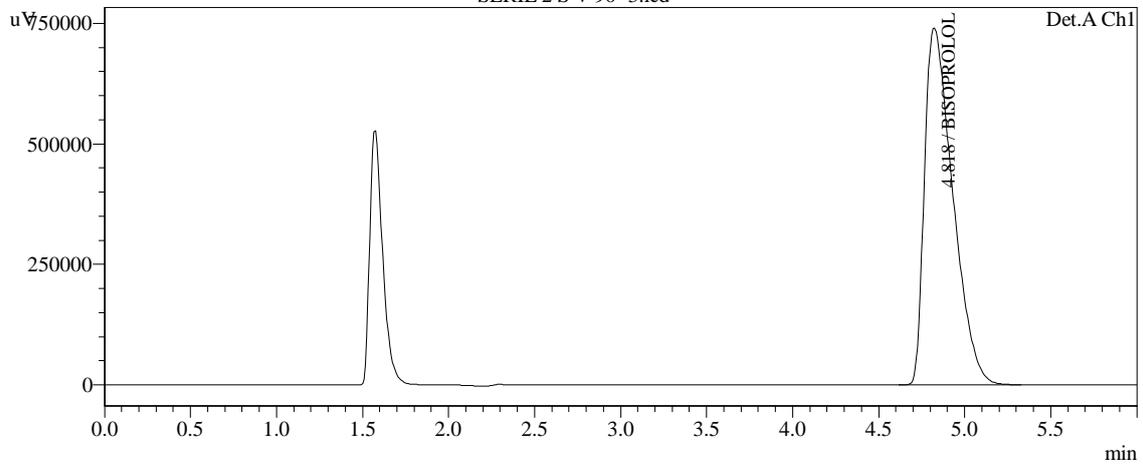




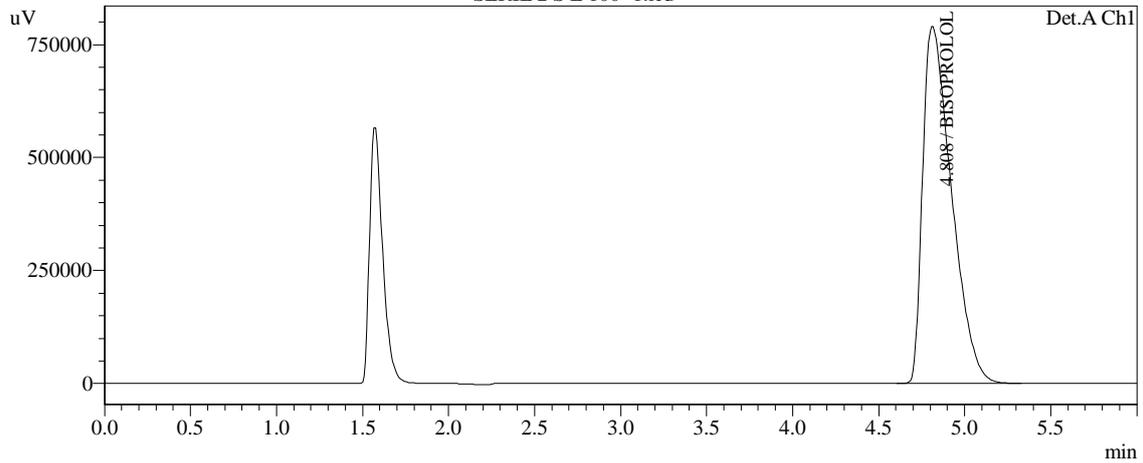
SERIE 2 S V 90 -2.lcd



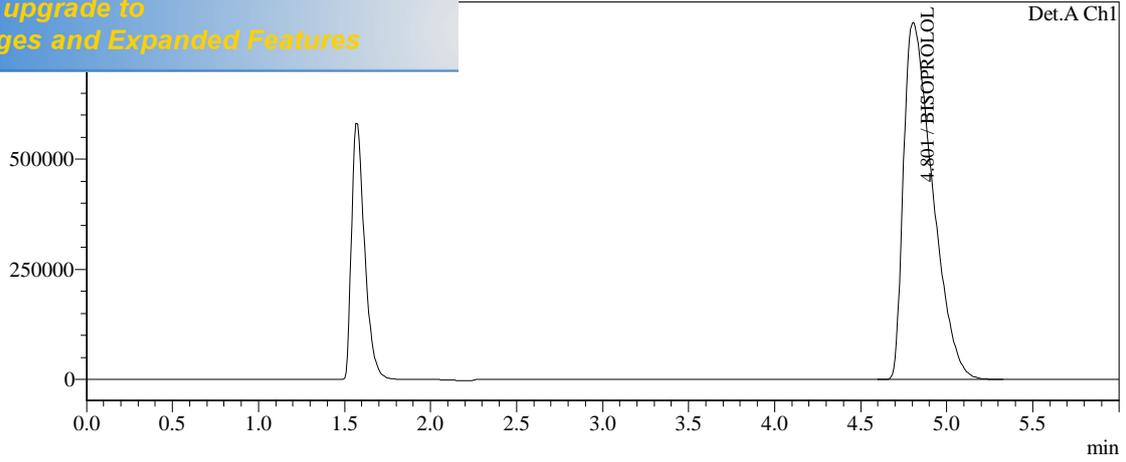
SERIE 2 S V 90 -3.lcd



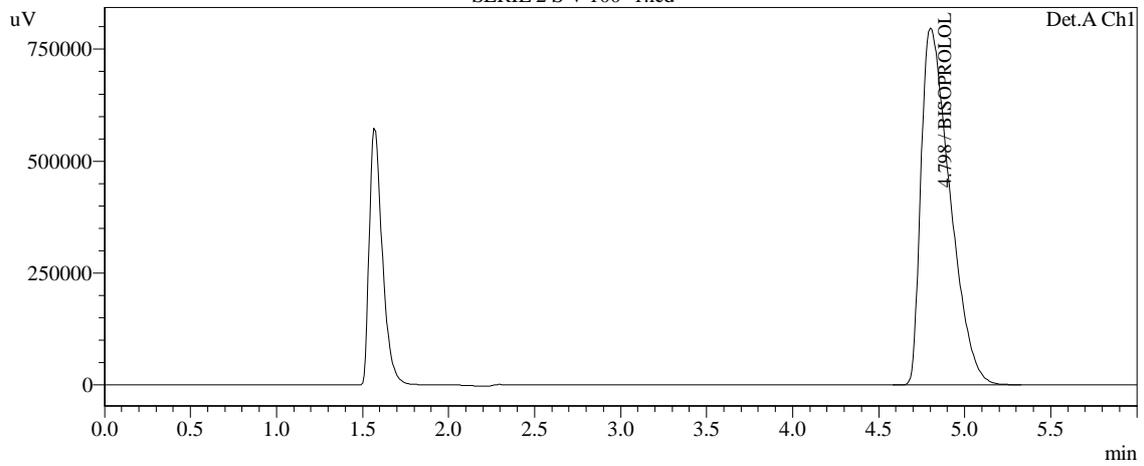
SERIE 2 S E 100 -1.lcd



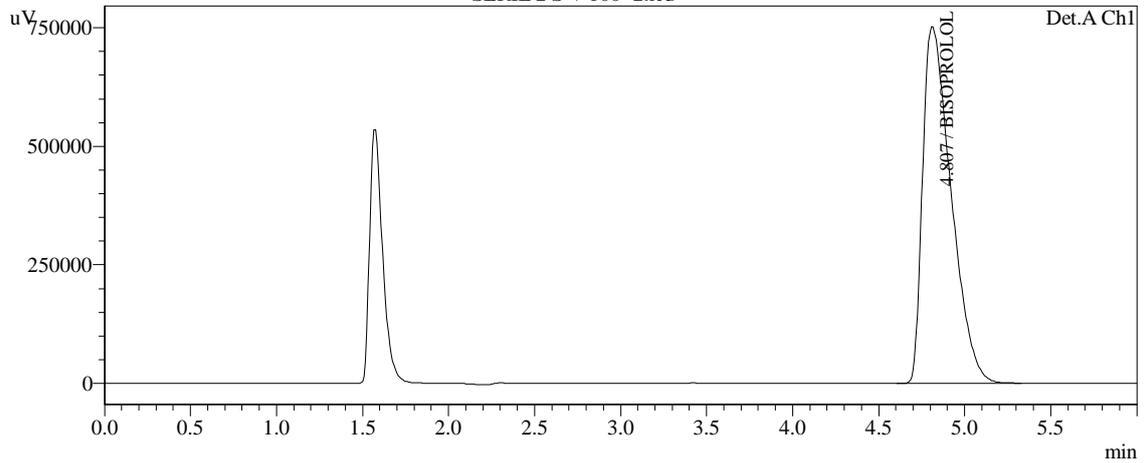
SERIE 2 S E 100 -2.lcd



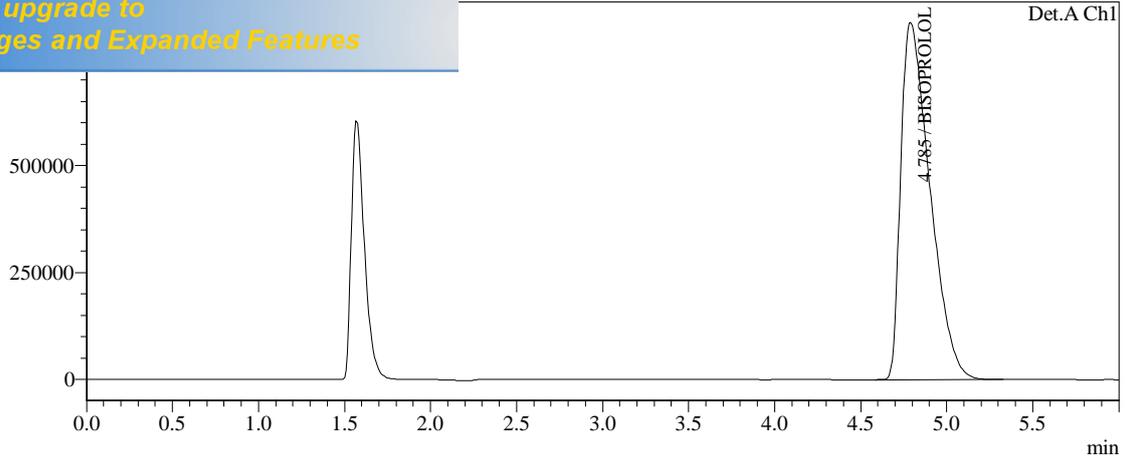
SERIE 2 S V 100 -1.lcd



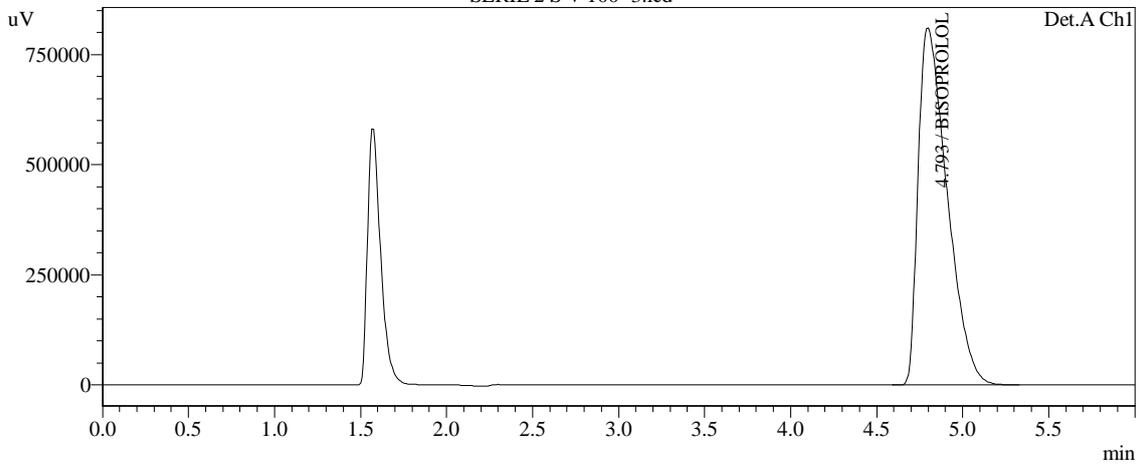
SERIE 2 S V 100 -2.lcd



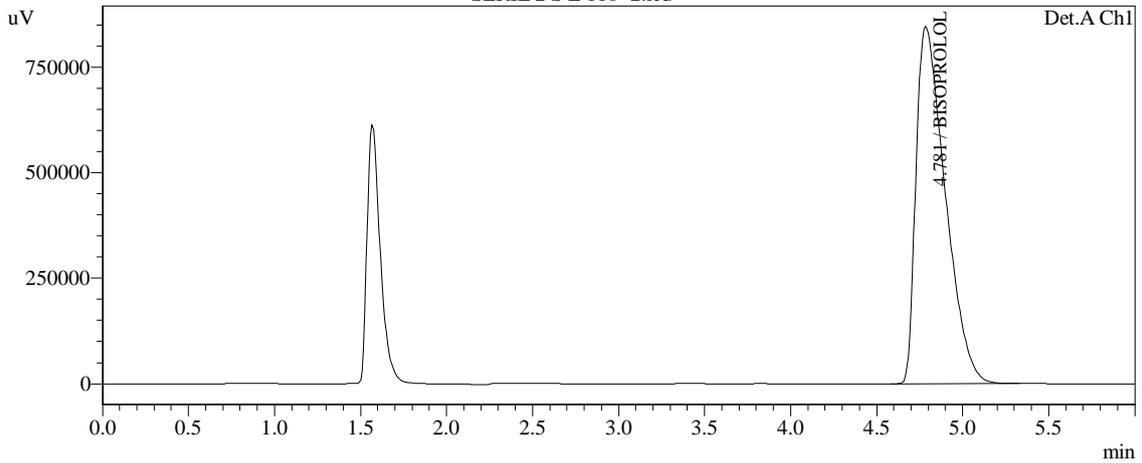
SERIE 2 S E 110 -1.lcd



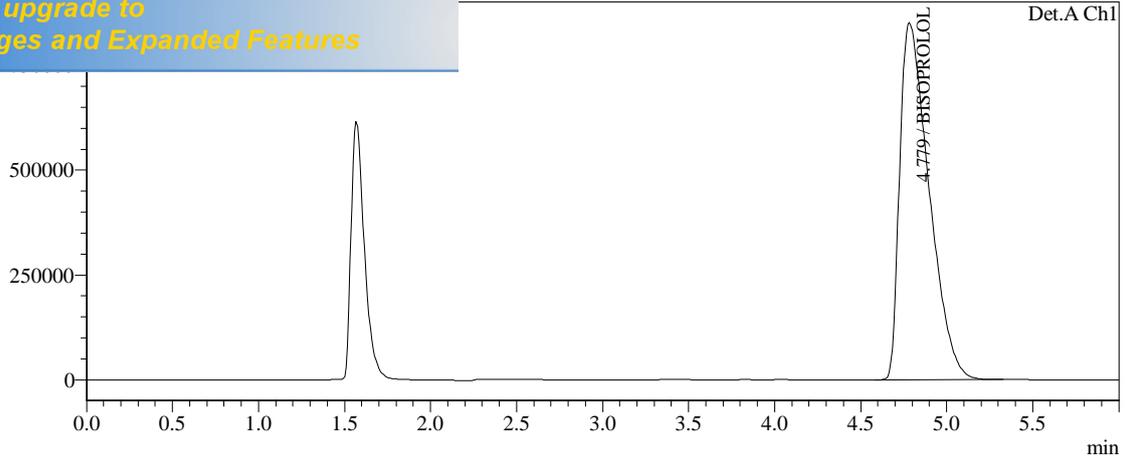
SERIE 2 S V 100 -3.lcd



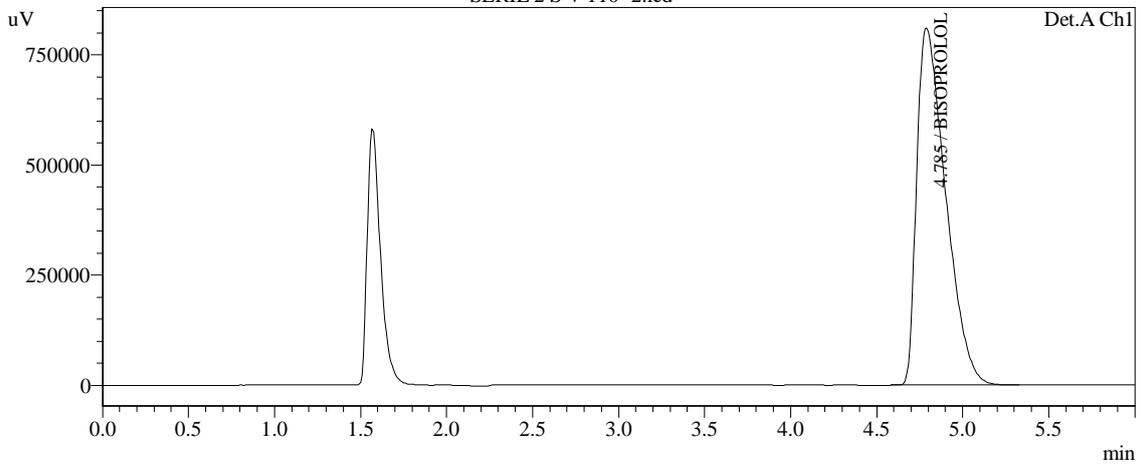
SERIE 2 S E 110 -2.lcd



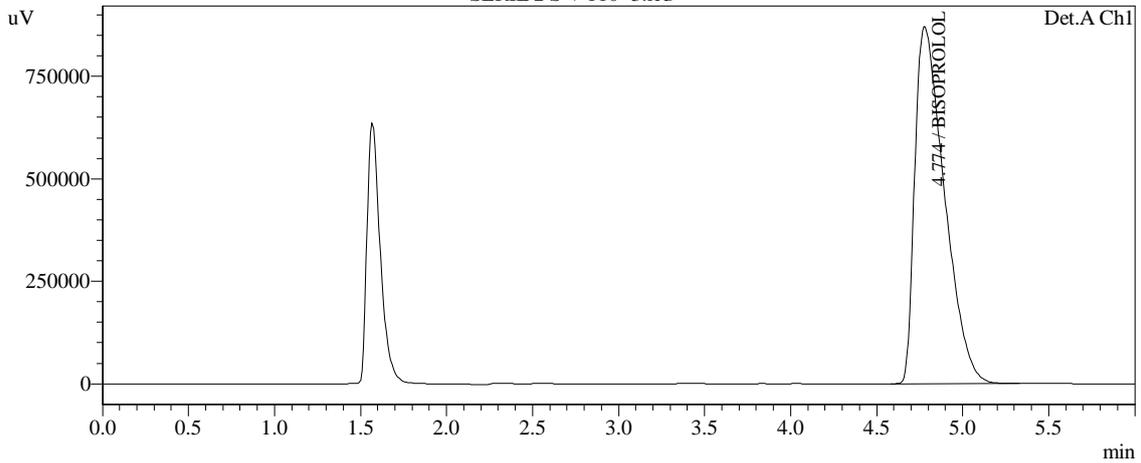
SERIE 2 S V 110 -1.lcd



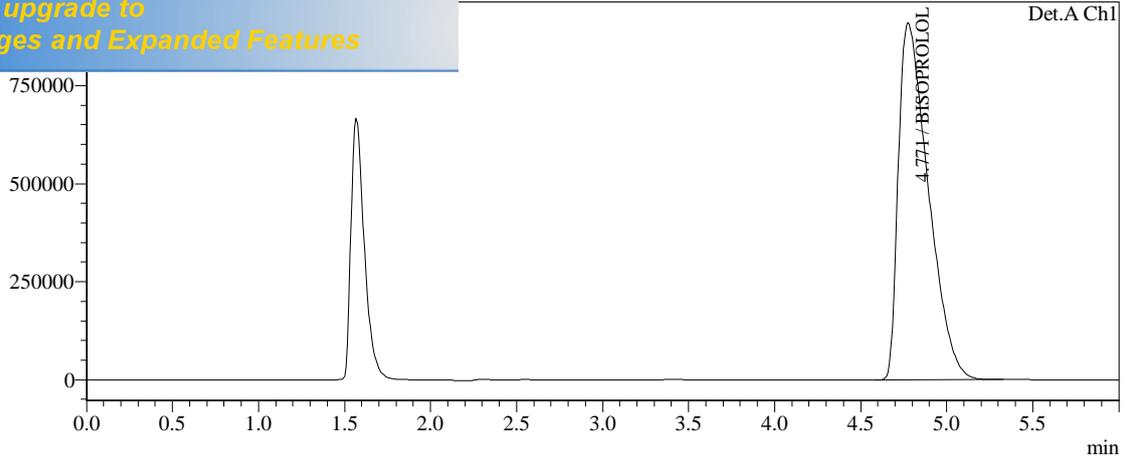
SERIE 2 S V 110 -2.lcd



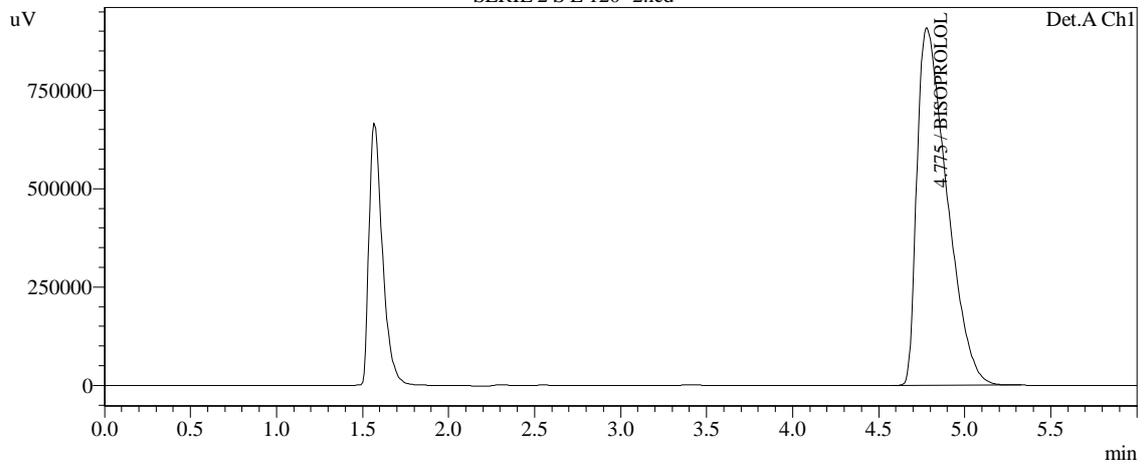
SERIE 2 S V 110 -3.lcd



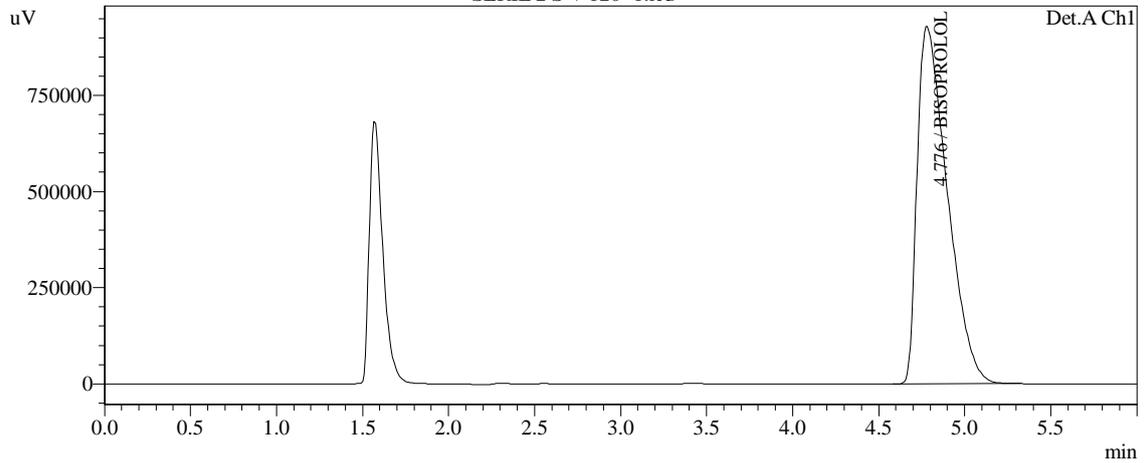
SERIE 2 S E 120 -1.lcd



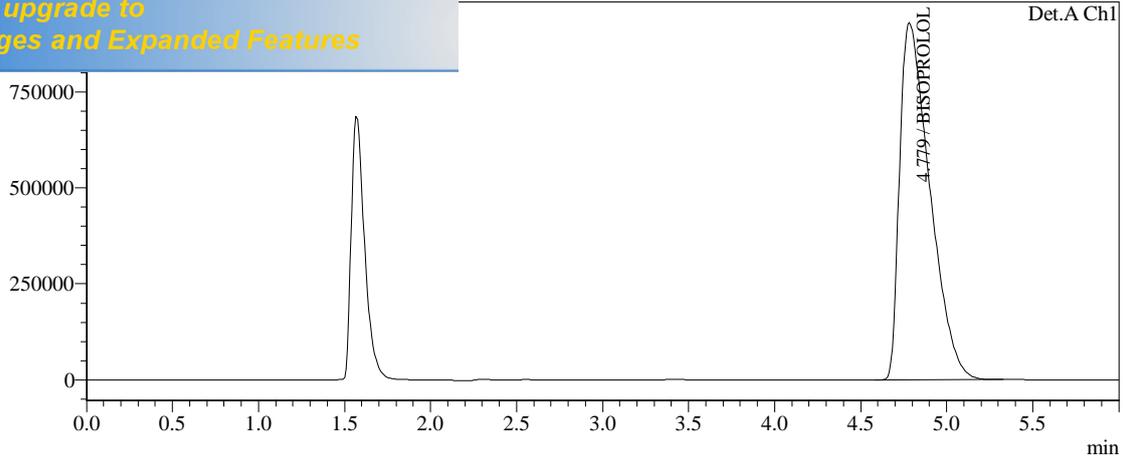
SERIE 2 S E 120 -2.lcd



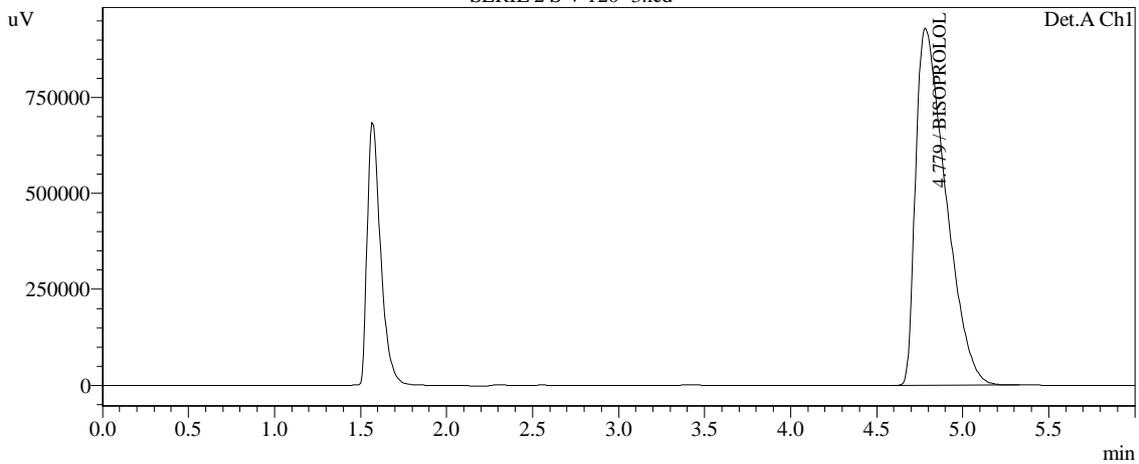
SERIE 2 S V 120 -1.lcd



SERIE 2 S V 120 -2.lcd



SERIE 2 S V 120 -3.lcd



<< Detector A >>

ID#1 Compound Name: BISOPROLOL

Title	Sample Name	Sample ID	Ret. Time	Area	Height	Conc.
SERIE 2 S E 80-1.lcd	Bisoprolol 1	STD	4.844	7680045	681664	0.000
SERIE 2 S E 80-2.lcd	Bisoprolol 1	STD	4.840	7202787	651173	0.000
SERIE 2 S V 80-1.lcd	Bisoprolol 1	STD	4.836	7319506	659489	0.000
SERIE 2 S V 80-2.lcd	Bisoprolol 1	STD	4.836	7499416	672769	0.000
SERIE 2 S V 80-3.lcd	Bisoprolol 1	STD	4.830	7369148	663448	0.000
SERIE 2 S E 90-1.lcd	Bisoprolol 1	STD	4.818	8536445	745441	0.000
SERIE 2 S E 90-2.lcd	Bisoprolol 1	STD	4.820	8377379	734890	0.000
SERIE 2 S V 90 -1.lcd	Bisoprolol 1	STD	4.822	8545197	745857	0.000
SERIE 2 S V 90 -2.lcd	Bisoprolol 1	STD	4.821	8326570	732119	0.000
SERIE 2 S V 90 -3.lcd	Bisoprolol 1	STD	4.818	8470256	740734	0.000
SERIE 2 S E 100 -1.lcd	Bisoprolol 1	STD	4.808	9206527	790642	0.000
SERIE 2 S E 100 -2.lcd	Bisoprolol 1	STD	4.801	9488968	810962	0.000
SERIE 2 S V 100 -1.lcd	Bisoprolol 1	STD	4.798	9308860	797691	0.000
SERIE 2 S V 100 -2.lcd	Bisoprolol 1	STD	4.807	8638731	752959	0.000
SERIE 2 S E 110 -1.lcd	Bisoprolol 1	STD	4.785	9838084	835479	0.000
SERIE 2 S V 100 -3.lcd	Bisoprolol 1	STD	4.793	9491347	811054	0.000
SERIE 2 S E 110 -2.lcd	Bisoprolol 1	STD	4.781	9995499	847655	0.000
SERIE 2 S V 110 -1.lcd	Bisoprolol 1	STD	4.779	10085661	853004	0.000
SERIE 2 S V 110 -2.lcd	Bisoprolol 1	STD	4.785	9474146	811569	0.000
SERIE 2 S V 110 -3.lcd	Bisoprolol 1	STD	4.774	10411166	872368	0.000
SERIE 2 S E 120 -1.lcd	Bisoprolol 1	STD	4.771	11006265	911566	0.000
SERIE 2 S E 120 -2.lcd	Bisoprolol 1	STD	4.775	10990441	909287	0.000
SERIE 2 S V 120 -1.lcd	Bisoprolol 1	STD	4.776	11323135	929591	0.000
SERIE 2 S V 120 -2.lcd	Bisoprolol 1	STD	4.779	11339061	931204	0.000
SERIE 2 S V 120 -3.lcd	Bisoprolol 1	STD	4.779	11318210	931464	0.000
Average			4.803	9249714	792963	0.000
%RSD			0.501	14.430	11.446	0.000
Maximum			4.844	11339061	931464	0.000
Minimum			4.771	7202787	651173	0.000
Standard Deviation			0.024	1334774	90761	0.000

Sample ID	Ret. Time	Area	Height	Conc.	
	0.000	0	0	0.000	
SERIE 2 S E 80-2.lcd	Bisoprolol 1	STD	0.000	0	0.000
SERIE 2 S V 80-1.lcd	Bisoprolol 1	STD	0.000	0	0.000
SERIE 2 S V 80-2.lcd	Bisoprolol 1	STD	0.000	0	0.000
SERIE 2 S V 80-3.lcd	Bisoprolol 1	STD	0.000	0	0.000
SERIE 2 S E 90-1.lcd	Bisoprolol 1	STD	0.000	0	0.000
SERIE 2 S E 90-2.lcd	Bisoprolol 1	STD	0.000	0	0.000
SERIE 2 S V 90 -1.lcd	Bisoprolol 1	STD	0.000	0	0.000
SERIE 2 S V 90 -2.lcd	Bisoprolol 1	STD	0.000	0	0.000
SERIE 2 S V 90 -3.lcd	Bisoprolol 1	STD	0.000	0	0.000
SERIE 2 S E 100 -1.lcd	Bisoprolol 1	STD	0.000	0	0.000
SERIE 2 S E 100 -2.lcd	Bisoprolol 1	STD	0.000	0	0.000
SERIE 2 S V 100 -1.lcd	Bisoprolol 1	STD	0.000	0	0.000
SERIE 2 S V 100 -2.lcd	Bisoprolol 1	STD	0.000	0	0.000
SERIE 2 S E 110 -1.lcd	Bisoprolol 1	STD	0.000	0	0.000
SERIE 2 S V 100 -3.lcd	Bisoprolol 1	STD	0.000	0	0.000
SERIE 2 S E 110 -2.lcd	Bisoprolol 1	STD	0.000	0	0.000
SERIE 2 S V 110 -1.lcd	Bisoprolol 1	STD	0.000	0	0.000
SERIE 2 S V 110 -2.lcd	Bisoprolol 1	STD	0.000	0	0.000
SERIE 2 S V 110 -3.lcd	Bisoprolol 1	STD	0.000	0	0.000
SERIE 2 S E 120 -1.lcd	Bisoprolol 1	STD	0.000	0	0.000
SERIE 2 S E 120 -2.lcd	Bisoprolol 1	STD	0.000	0	0.000
SERIE 2 S V 120 -1.lcd	Bisoprolol 1	STD	0.000	0	0.000
SERIE 2 S V 120 -2.lcd	Bisoprolol 1	STD	0.000	0	0.000
SERIE 2 S V 120 -3.lcd	Bisoprolol 1	STD	0.000	0	0.000
Average			0.000	0	0.000
%RSD			0.000	0.000	0.000
Maximum			0.000	0	0.000
Minimum			0.000	0	0.000
Standard Deviation			0.000	0	0.000

ID#2 Compound Name: PHE

Title	Sample Name	Sample ID	Ret. Time	Area	Height	Conc.
SERIE 2 S E 80-1.lcd	Bisoprolol 1	STD	0.000	0	0	0.000
SERIE 2 S E 80-2.lcd	Bisoprolol 1	STD	0.000	0	0	0.000
SERIE 2 S V 80-1.lcd	Bisoprolol 1	STD	0.000	0	0	0.000
SERIE 2 S V 80-2.lcd	Bisoprolol 1	STD	0.000	0	0	0.000
SERIE 2 S V 80-3.lcd	Bisoprolol 1	STD	0.000	0	0	0.000
SERIE 2 S E 90-1.lcd	Bisoprolol 1	STD	0.000	0	0	0.000
SERIE 2 S E 90-2.lcd	Bisoprolol 1	STD	0.000	0	0	0.000
SERIE 2 S V 90 -1.lcd	Bisoprolol 1	STD	0.000	0	0	0.000
SERIE 2 S V 90 -2.lcd	Bisoprolol 1	STD	0.000	0	0	0.000
SERIE 2 S V 90 -3.lcd	Bisoprolol 1	STD	0.000	0	0	0.000
SERIE 2 S E 100 -1.lcd	Bisoprolol 1	STD	0.000	0	0	0.000
SERIE 2 S E 100 -2.lcd	Bisoprolol 1	STD	0.000	0	0	0.000
SERIE 2 S V 100 -1.lcd	Bisoprolol 1	STD	0.000	0	0	0.000
SERIE 2 S V 100 -2.lcd	Bisoprolol 1	STD	0.000	0	0	0.000
SERIE 2 S E 110 -1.lcd	Bisoprolol 1	STD	0.000	0	0	0.000
SERIE 2 S V 100 -3.lcd	Bisoprolol 1	STD	0.000	0	0	0.000
SERIE 2 S E 110 -2.lcd	Bisoprolol 1	STD	0.000	0	0	0.000
SERIE 2 S V 110 -1.lcd	Bisoprolol 1	STD	0.000	0	0	0.000
SERIE 2 S V 110 -2.lcd	Bisoprolol 1	STD	0.000	0	0	0.000
SERIE 2 S V 110 -3.lcd	Bisoprolol 1	STD	0.000	0	0	0.000
SERIE 2 S E 120 -1.lcd	Bisoprolol 1	STD	0.000	0	0	0.000
SERIE 2 S E 120 -2.lcd	Bisoprolol 1	STD	0.000	0	0	0.000
SERIE 2 S V 120 -1.lcd	Bisoprolol 1	STD	0.000	0	0	0.000
SERIE 2 S V 120 -2.lcd	Bisoprolol 1	STD	0.000	0	0	0.000
SERIE 2 S V 120 -3.lcd	Bisoprolol 1	STD	0.000	0	0	0.000
Average			0.000	0	0	0.000
%RSD			0.000	0.000	0.000	0.000
Maximum			0.000	0	0	0.000
Minimum			0.000	0	0	0.000
Standard Deviation			0.000	0	0	0.000

ID#3 Compound Name: EI

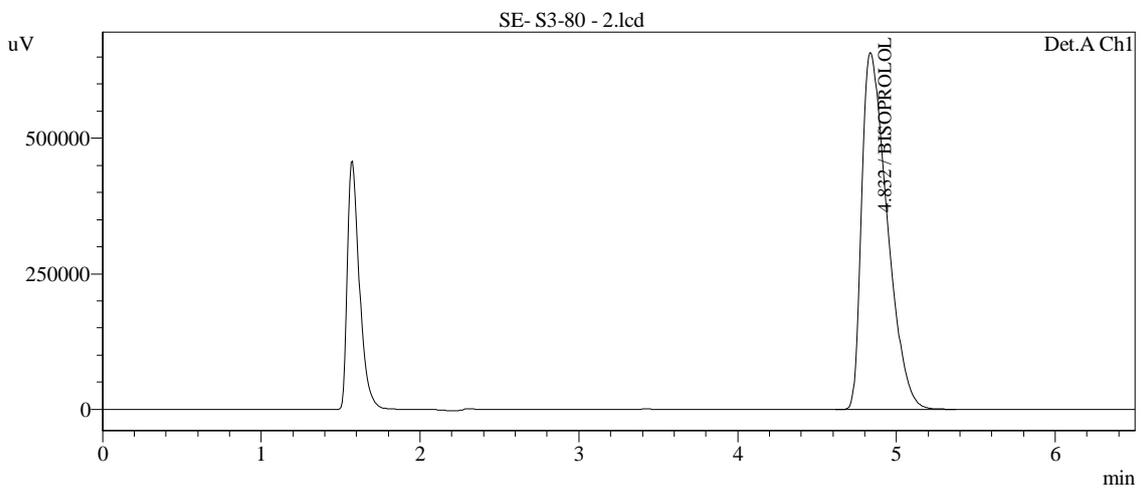
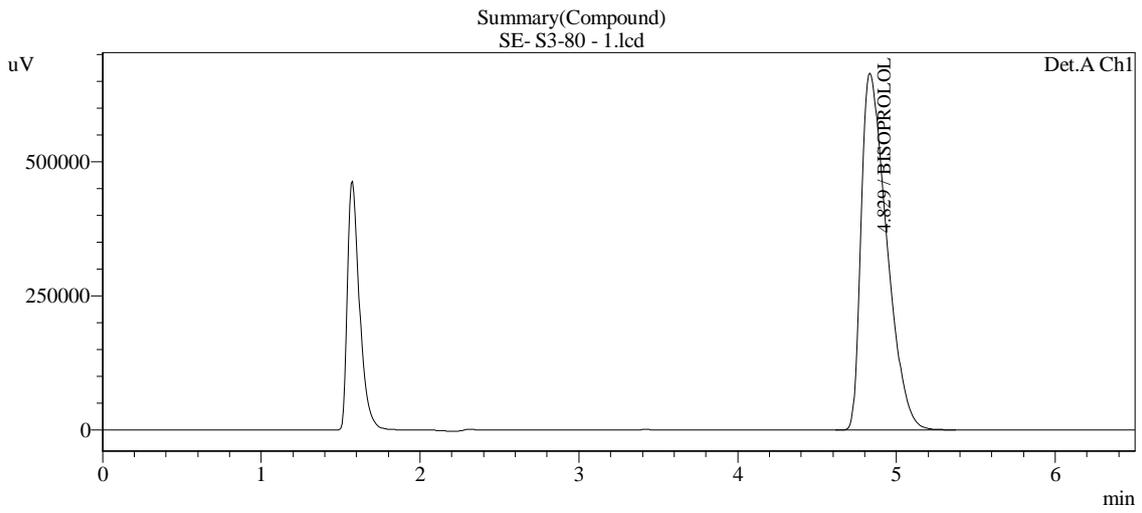
Title	Sample Name	Sample ID	Ret. Time	Area	Height	Conc.
SERIE 2 S E 80-1.lcd	Bisoprolol 1	STD	0.000	0	0	0.000
SERIE 2 S E 80-2.lcd	Bisoprolol 1	STD	0.000	0	0	0.000
SERIE 2 S V 80-1.lcd	Bisoprolol 1	STD	0.000	0	0	0.000
SERIE 2 S V 80-2.lcd	Bisoprolol 1	STD	0.000	0	0	0.000
SERIE 2 S V 80-3.lcd	Bisoprolol 1	STD	0.000	0	0	0.000
SERIE 2 S E 90-1.lcd	Bisoprolol 1	STD	0.000	0	0	0.000
SERIE 2 S E 90-2.lcd	Bisoprolol 1	STD	0.000	0	0	0.000
SERIE 2 S V 90 -1.lcd	Bisoprolol 1	STD	0.000	0	0	0.000

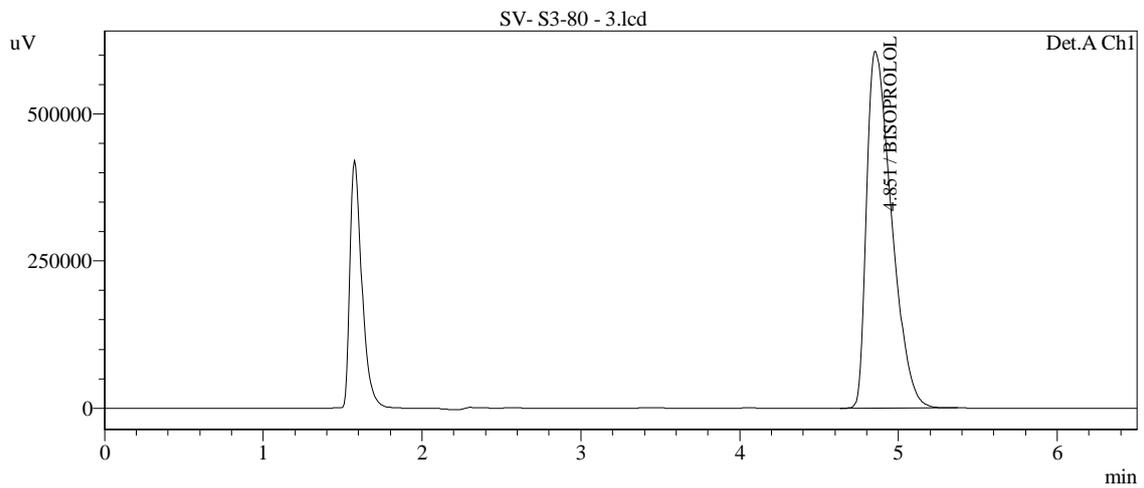
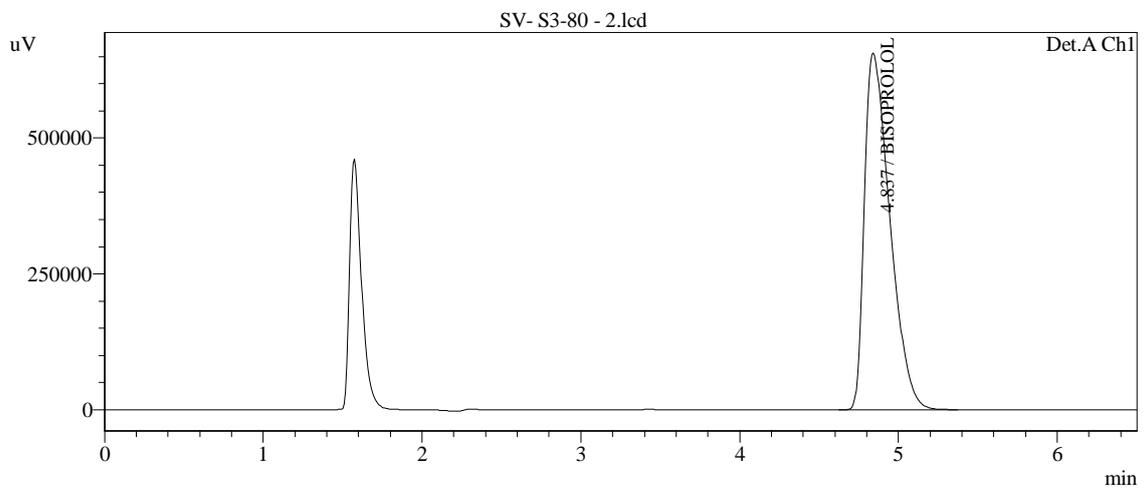
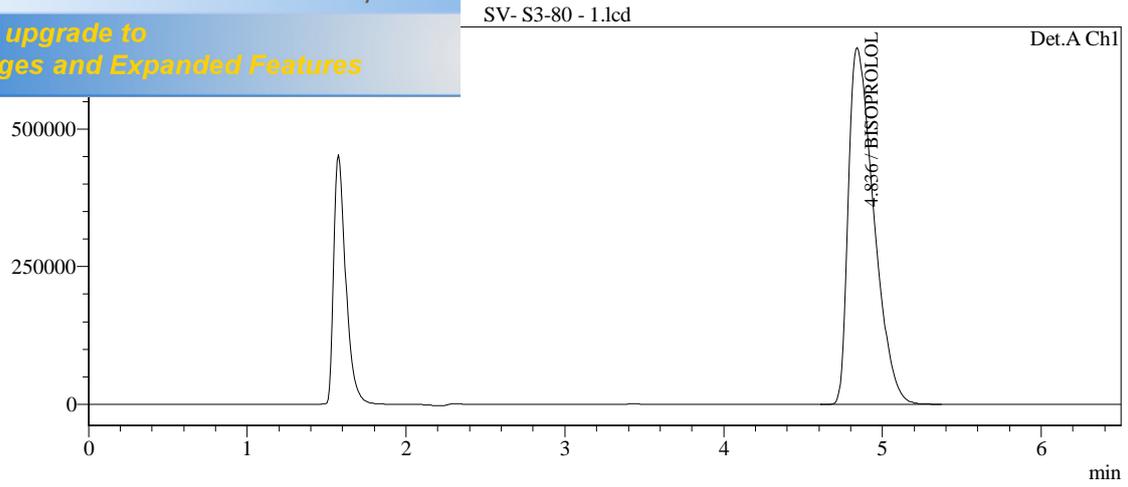
[Click Here to upgrade to
Unlimited Pages and Expanded Features](#)

Sample ID	Ret. Time	Area	Height	Conc.	
	0.000	0	0	0.000	
	0.000	0	0	0.000	
	0.000	0	0	0.000	
SERIE 2 S E 100 -2.lcd	Bisoprolol 1	STD	0.000	0	0.000
SERIE 2 S V 100 -1.lcd	Bisoprolol 1	STD	0.000	0	0.000
SERIE 2 S V 100 -2.lcd	Bisoprolol 1	STD	0.000	0	0.000
SERIE 2 S E 110 -1.lcd	Bisoprolol 1	STD	0.000	0	0.000
SERIE 2 S V 100 -3.lcd	Bisoprolol 1	STD	0.000	0	0.000
SERIE 2 S E 110 -2.lcd	Bisoprolol 1	STD	0.000	0	0.000
SERIE 2 S V 110 -1.lcd	Bisoprolol 1	STD	0.000	0	0.000
SERIE 2 S V 110 -2.lcd	Bisoprolol 1	STD	0.000	0	0.000
SERIE 2 S V 110 -3.lcd	Bisoprolol 1	STD	0.000	0	0.000
SERIE 2 S E 120 -1.lcd	Bisoprolol 1	STD	0.000	0	0.000
SERIE 2 S E 120 -2.lcd	Bisoprolol 1	STD	0.000	0	0.000
SERIE 2 S V 120 -1.lcd	Bisoprolol 1	STD	0.000	0	0.000
SERIE 2 S V 120 -2.lcd	Bisoprolol 1	STD	0.000	0	0.000
SERIE 2 S V 120 -3.lcd	Bisoprolol 1	STD	0.000	0	0.000
Average			0.000	0	0.000
%RSD			0.000	0.000	0.000
Maximum			0.000	0	0.000
Minimum			0.000	0	0.000
Standard Deviation			0.000	0	0.000

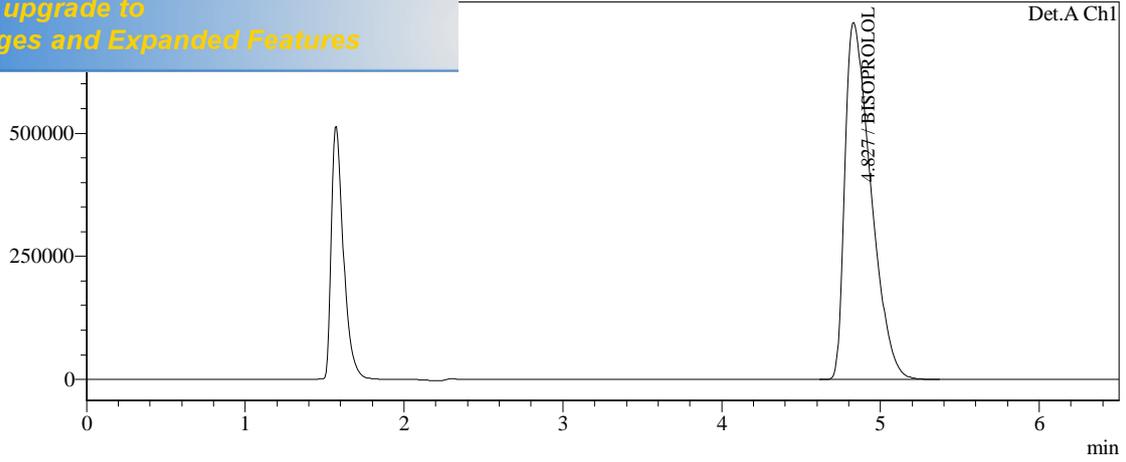
Sample Information

Sample Name : bisoprolo12
Sample ID : STD
Tray# : 11
Vial# : 1
Injection Volume : 20 uL
Data Filename : SE- S3-80 - 1.lcd
Method Filename : Bisoprolol3-3.lcm
Batch Filename : BISOPROLOL3lcb
Report Filename : Default.lcr
Date Acquired : 12/08/2017 01:34:21
Data Processed : 12/08/2017 04:30:21

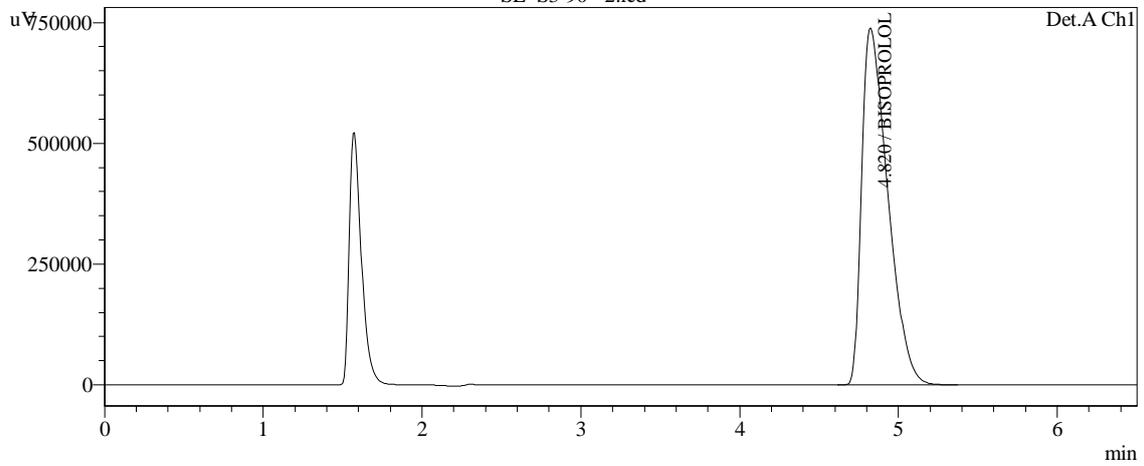




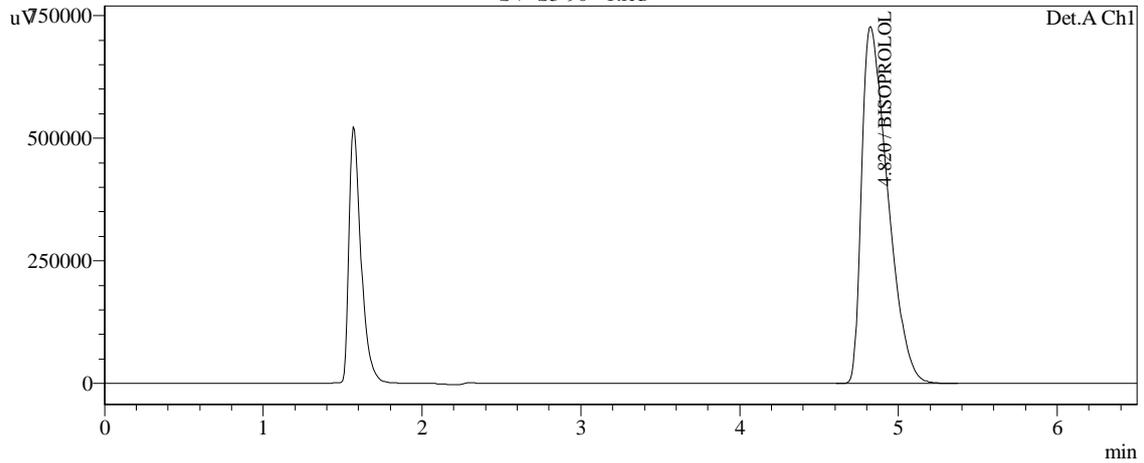
SE- S3-90 - 1.lcd



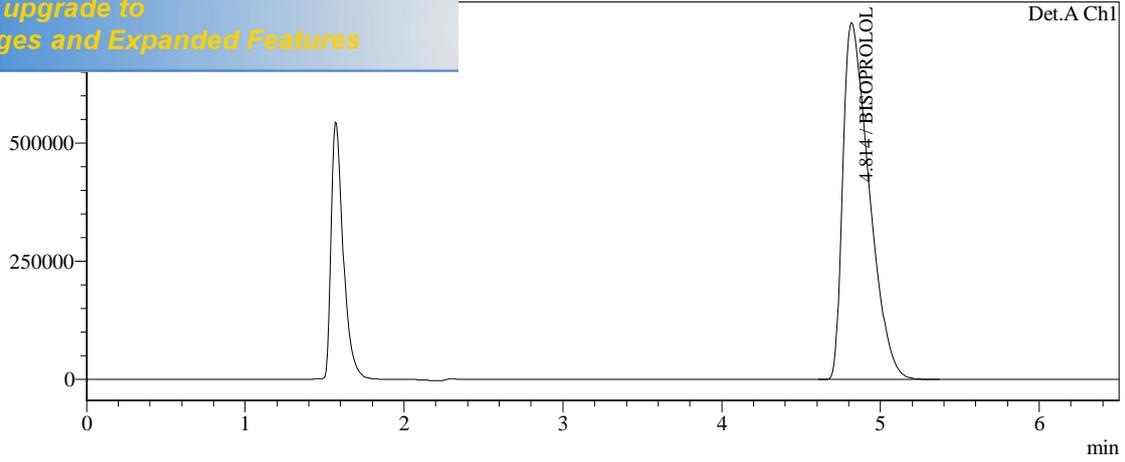
SE- S3-90 - 2.lcd



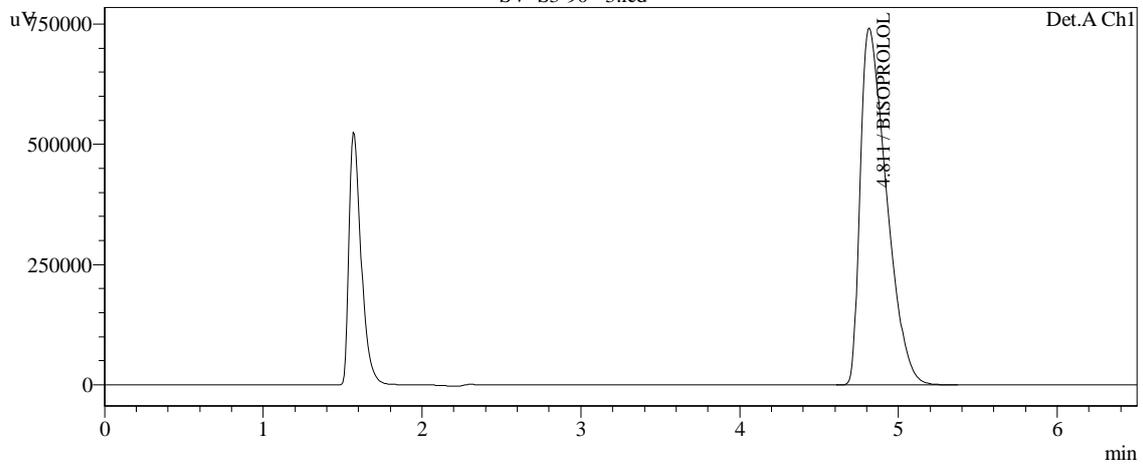
SV- S3-90 - 1.lcd



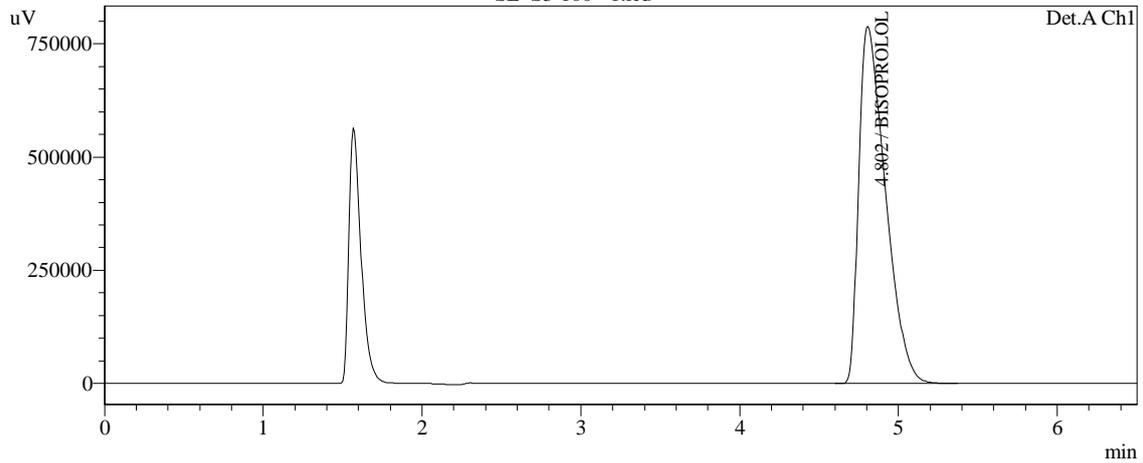
SV- S3-90 - 2.lcd



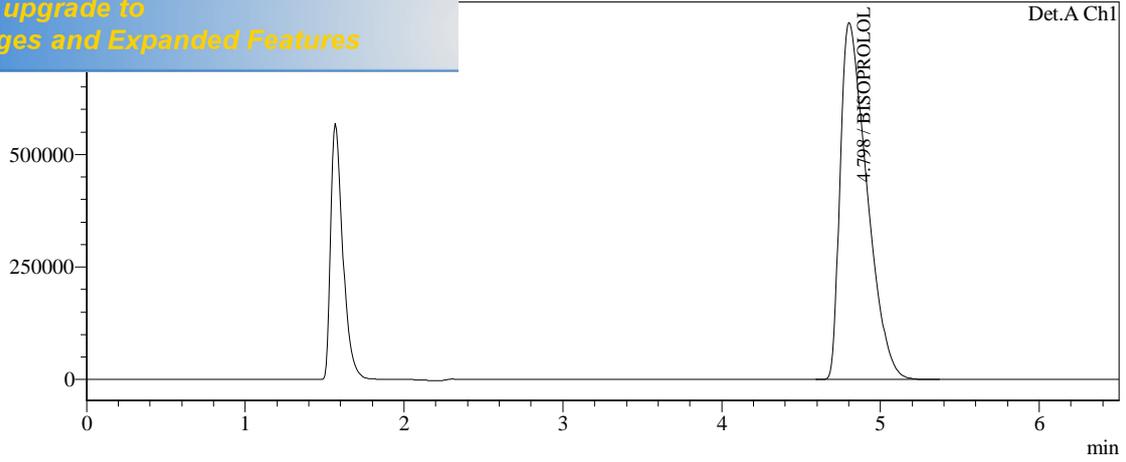
SV- S3-90 - 3.lcd



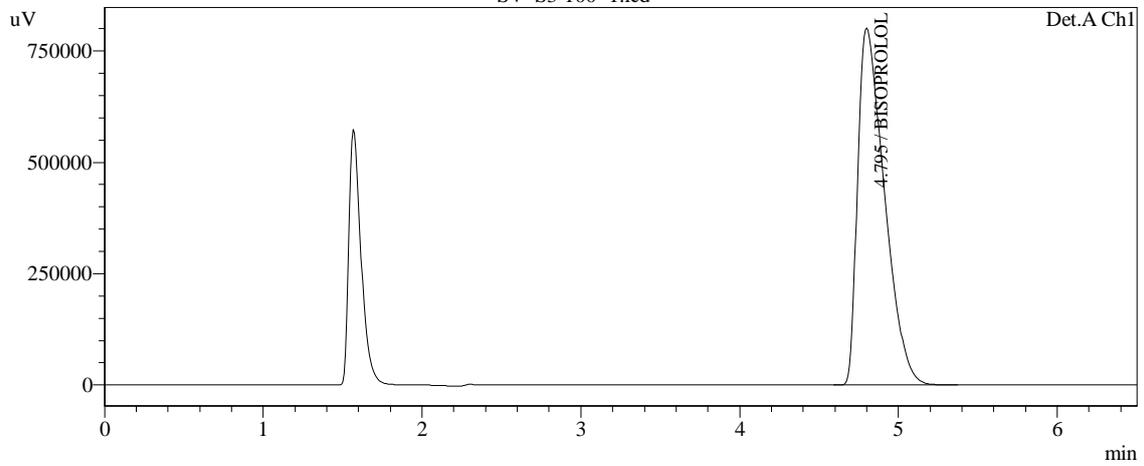
SE- S3-100 - 1.lcd



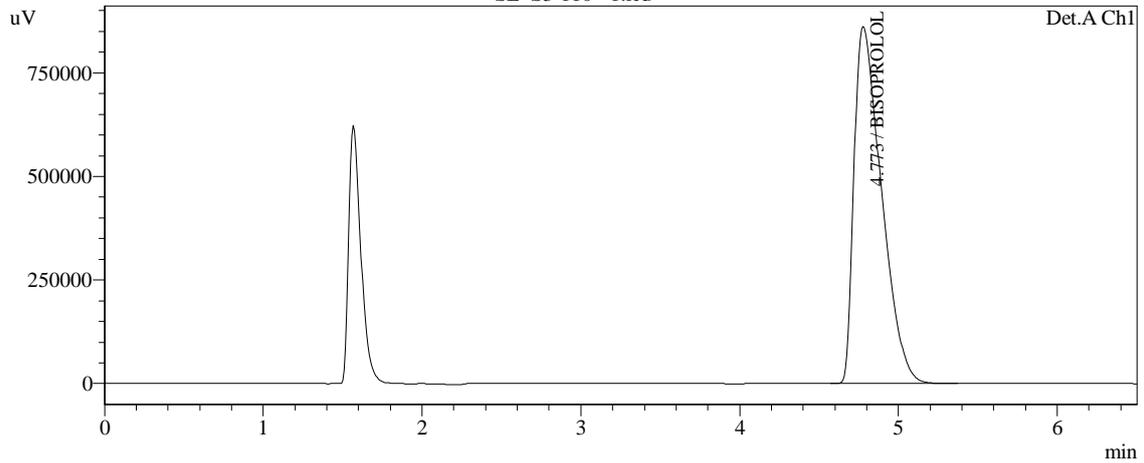
SE- S3-100 - 2.lcd

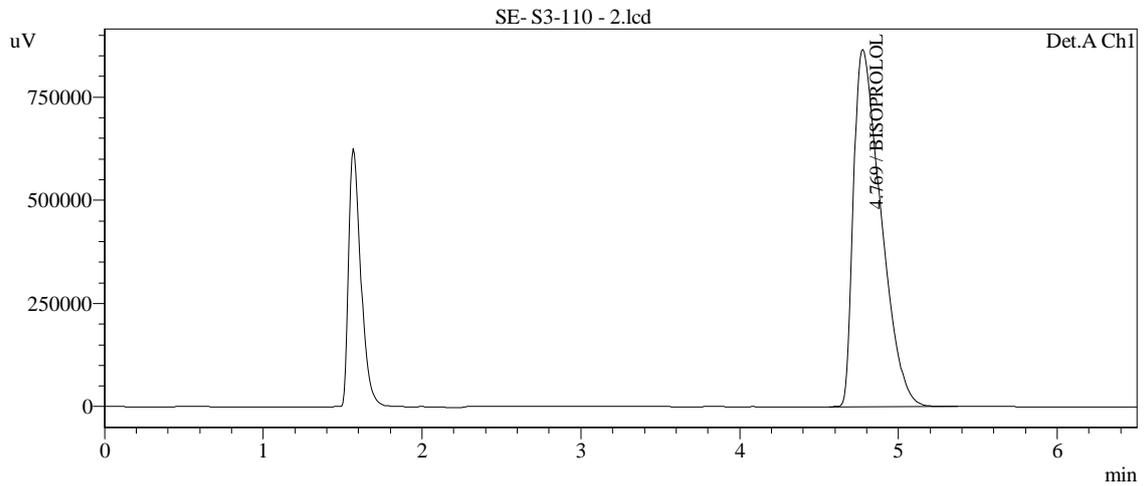
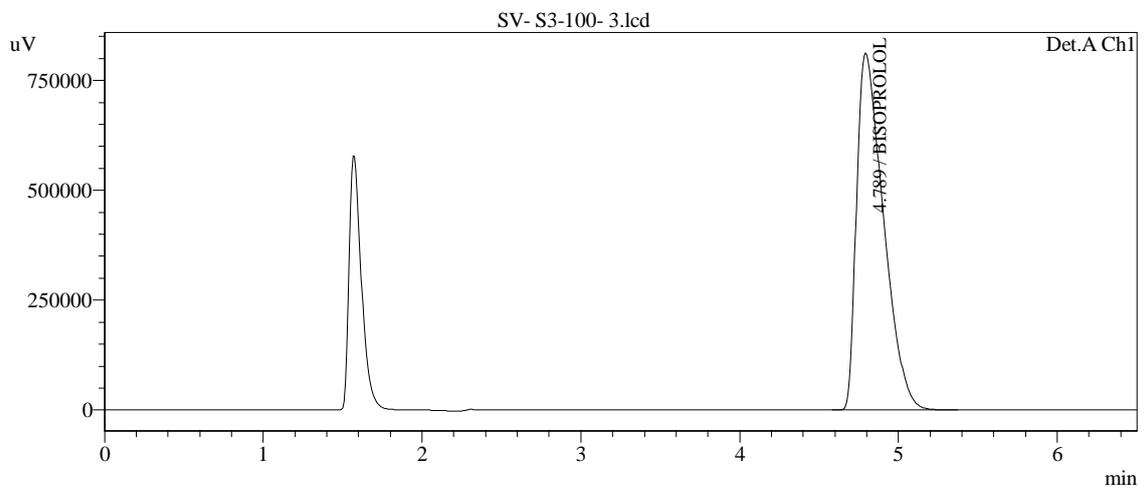
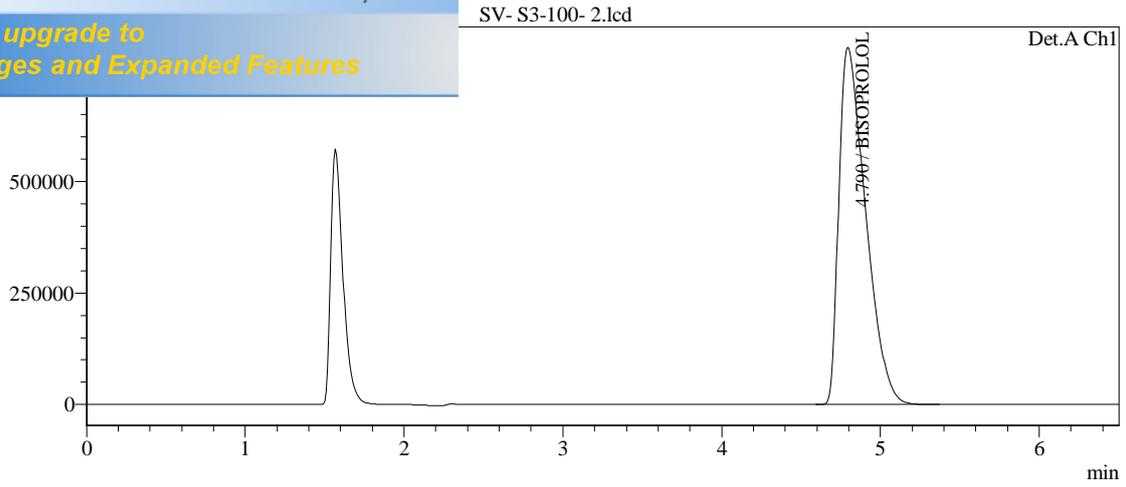


SV- S3-100- 1.lcd

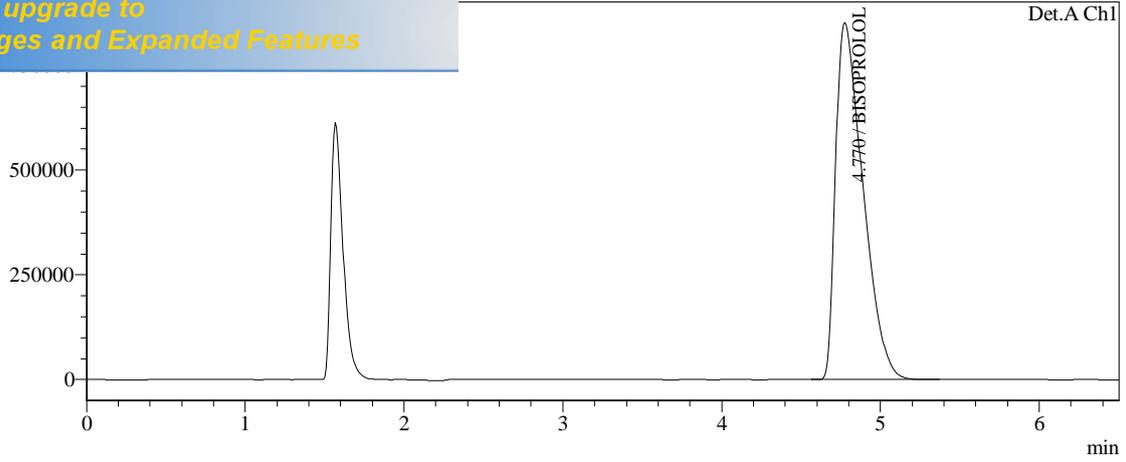


SE- S3-110 - 1.lcd

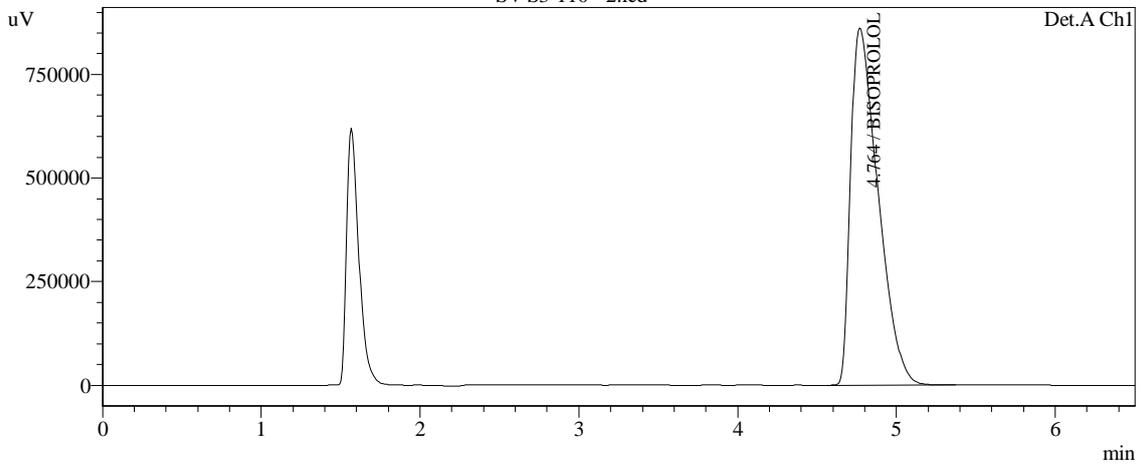




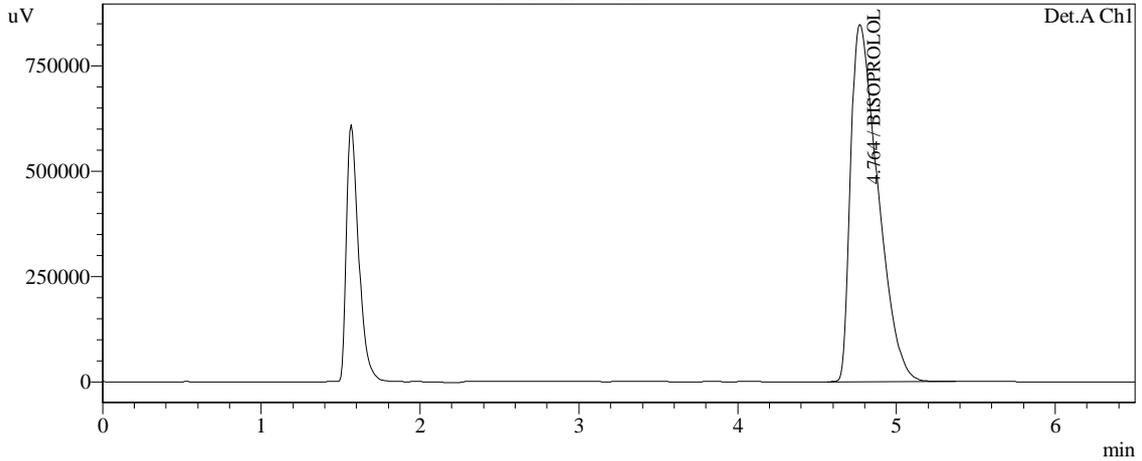
SV S3-110 - 1.lcd



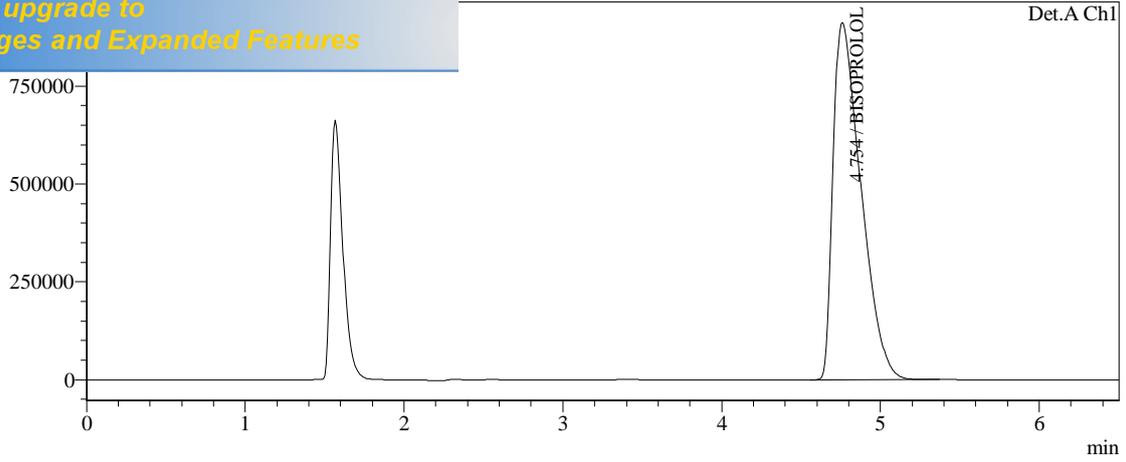
SV S3-110 - 2.lcd



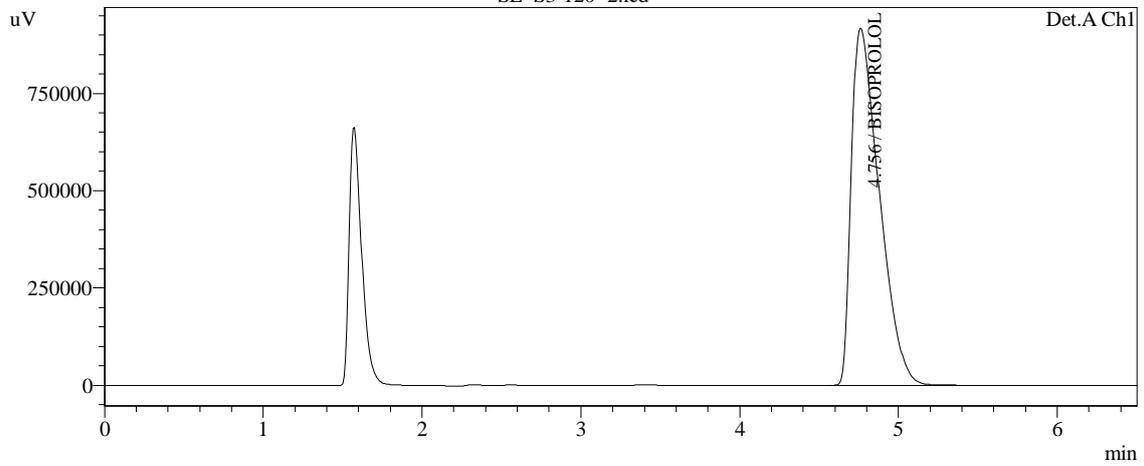
SV S3-110 - 3.lcd



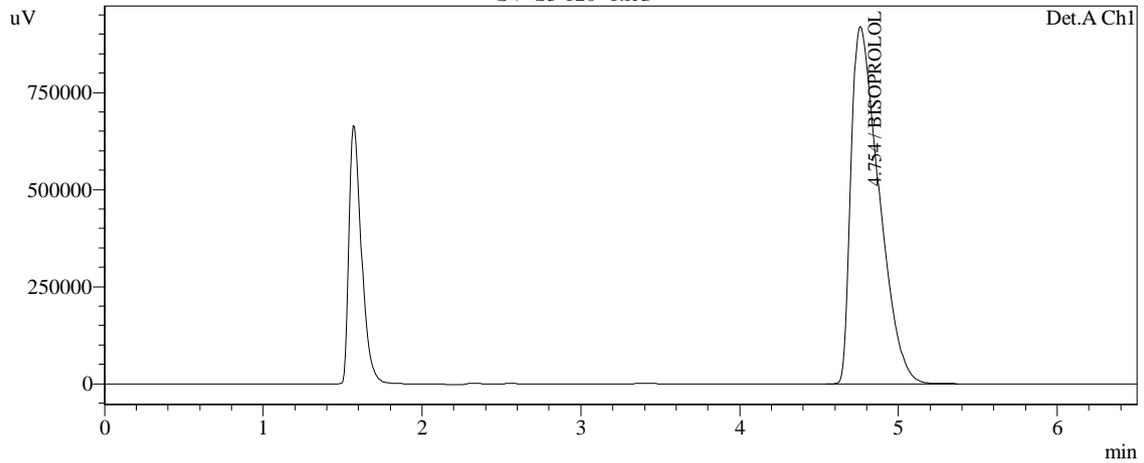
SE- S3-120- 1.lcd

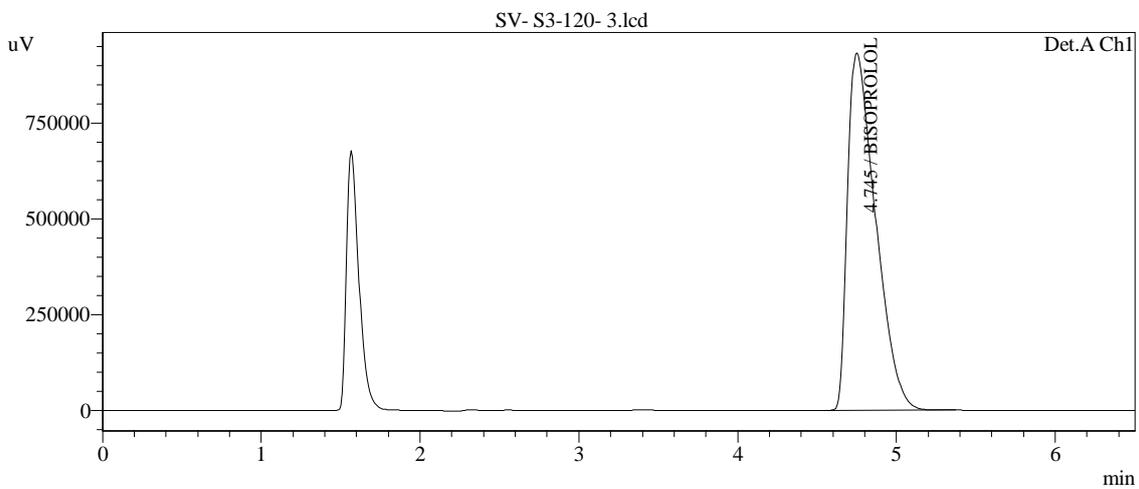
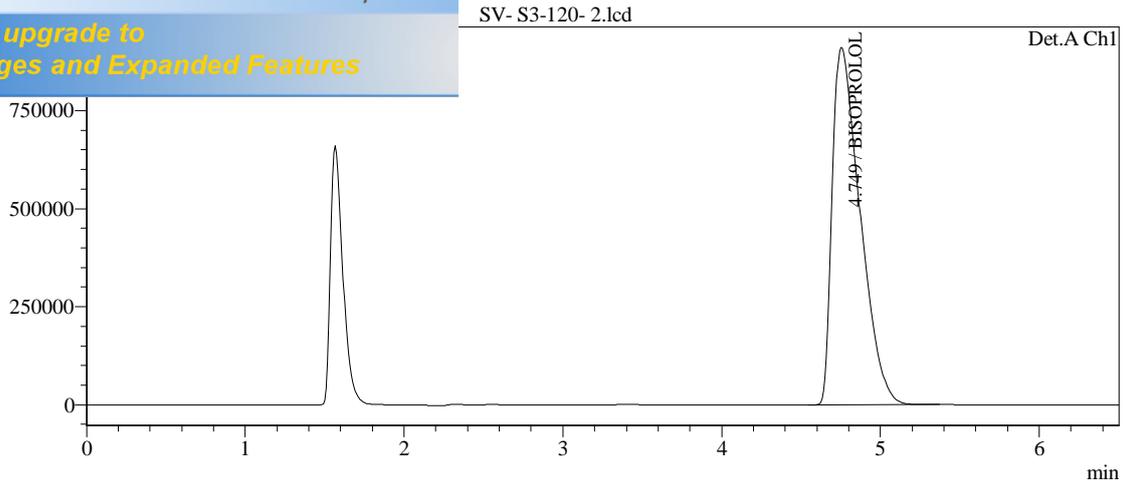


SE- S3-120- 2.lcd



SV- S3-120- 1.lcd





<< Detector A >>

ID#1 Compound Name: BISOPROLOL

Title	Sample Name	Sample ID	Ret. Time	Area	Height	Conc.
SE- S3-80 - 1.lcd	bisoprolol2	STD	4.829	7446688	666309	0.000
SE- S3-80 - 2.lcd	bisoprolol2	STD	4.832	7336505	658202	0.000
SV- S3-80 - 1.lcd	bisoprolol2	STD	4.836	7197484	648278	0.000
SV- S3-80 - 2.lcd	bisoprolol2	STD	4.837	7326770	656973	0.000
SV- S3-80 - 3.lcd	bisoprolol2	STD	4.851	6634089	606444	0.000
SE- S3-90 - 1.lcd	bisoprolol2	STD	4.827	8265417	725421	0.000
SE- S3-90 - 2.lcd	bisoprolol2	STD	4.820	8446298	739293	0.000
SV- S3-90 - 1.lcd	bisoprolol2	STD	4.820	8309795	728260	0.000
SV- S3-90 - 2.lcd	bisoprolol2	STD	4.814	8696998	755486	0.000
SV- S3-90 - 3.lcd	bisoprolol2	STD	4.811	8512669	742656	0.000
SE- S3-100 - 1.lcd	bisoprolol2	STD	4.802	9186045	788735	0.000
SE- S3-100 - 2.lcd	bisoprolol2	STD	4.798	9257962	793834	0.000
SV- S3-100- 1.lcd	bisoprolol2	STD	4.795	9378156	802222	0.000
SE- S3-110 - 1.lcd	bisoprolol2	STD	4.773	10339116	862628	0.000
SV- S3-100- 2.lcd	bisoprolol2	STD	4.790	9365586	800854	0.000
SV- S3-100- 3.lcd	bisoprolol2	STD	4.789	9543962	813036	0.000
SE- S3-110 - 2.lcd	bisoprolol2	STD	4.769	10373942	865744	0.000
SV S3-110 - 1.lcd	bisoprolol2	STD	4.770	10171394	852838	0.000
SV S3-110 - 2.lcd	bisoprolol2	STD	4.764	10324648	862678	0.000
SV S3-110 - 3.lcd	bisoprolol2	STD	4.764	10138357	849540	0.000
SE- S3-120- 1.lcd	bisoprolol2	STD	4.754	11115638	913068	0.000
SE- S3-120- 2.lcd	bisoprolol2	STD	4.756	11217733	918637	0.000
SV- S3-120- 1.lcd	bisoprolol2	STD	4.754	11243171	920613	0.000
SV- S3-120- 2.lcd	bisoprolol2	STD	4.749	11106506	911472	0.000
SV- S3-120- 3.lcd	bisoprolol2	STD	4.745	11448149	933851	0.000
Average			4.794	9295323	792683	0.000
%RSD			0.676	15.517	12.262	0.000
Maximum			4.851	11448149	933851	0.000
Minimum			4.745	6634089	606444	0.000
Standard Deviation			0.032	1442394	97201	0.000

Sample ID	Ret. Time	Area	Height	Conc.	
	0.000	0	0	0.000	
SE- S3-80 - 2.lcd	bisoprolol2	STD	0.000	0	0.000
SV- S3-80 - 1.lcd	bisoprolol2	STD	0.000	0	0.000
SV- S3-80 - 2.lcd	bisoprolol2	STD	0.000	0	0.000
SV- S3-80 - 3.lcd	bisoprolol2	STD	0.000	0	0.000
SE- S3-90 - 1.lcd	bisoprolol2	STD	0.000	0	0.000
SE- S3-90 - 2.lcd	bisoprolol2	STD	0.000	0	0.000
SV- S3-90 - 1.lcd	bisoprolol2	STD	0.000	0	0.000
SV- S3-90 - 2.lcd	bisoprolol2	STD	0.000	0	0.000
SV- S3-90 - 3.lcd	bisoprolol2	STD	0.000	0	0.000
SE- S3-100 - 1.lcd	bisoprolol2	STD	0.000	0	0.000
SE- S3-100 - 2.lcd	bisoprolol2	STD	0.000	0	0.000
SV- S3-100- 1.lcd	bisoprolol2	STD	0.000	0	0.000
SE- S3-110 - 1.lcd	bisoprolol2	STD	0.000	0	0.000
SV- S3-100- 2.lcd	bisoprolol2	STD	0.000	0	0.000
SV- S3-100- 3.lcd	bisoprolol2	STD	0.000	0	0.000
SE- S3-110 - 2.lcd	bisoprolol2	STD	0.000	0	0.000
SV S3-110 - 1.lcd	bisoprolol2	STD	0.000	0	0.000
SV S3-110 - 2.lcd	bisoprolol2	STD	0.000	0	0.000
SV S3-110 - 3.lcd	bisoprolol2	STD	0.000	0	0.000
SE- S3-120- 1.lcd	bisoprolol2	STD	0.000	0	0.000
SE- S3-120- 2.lcd	bisoprolol2	STD	0.000	0	0.000
SV- S3-120- 1.lcd	bisoprolol2	STD	0.000	0	0.000
SV- S3-120- 2.lcd	bisoprolol2	STD	0.000	0	0.000
SV- S3-120- 3.lcd	bisoprolol2	STD	0.000	0	0.000
Average			0.000	0	0.000
%RSD			0.000	0.000	0.000
Maximum			0.000	0	0.000
Minimum			0.000	0	0.000
Standard Deviation			0.000	0	0.000

ID#2 Compound Name: PHE

Title	Sample Name	Sample ID	Ret. Time	Area	Height	Conc.
SE- S3-80 - 1.lcd	bisoprolol2	STD	0.000	0	0	0.000
SE- S3-80 - 2.lcd	bisoprolol2	STD	0.000	0	0	0.000
SV- S3-80 - 1.lcd	bisoprolol2	STD	0.000	0	0	0.000
SV- S3-80 - 2.lcd	bisoprolol2	STD	0.000	0	0	0.000
SV- S3-80 - 3.lcd	bisoprolol2	STD	0.000	0	0	0.000
SE- S3-90 - 1.lcd	bisoprolol2	STD	0.000	0	0	0.000
SE- S3-90 - 2.lcd	bisoprolol2	STD	0.000	0	0	0.000
SV- S3-90 - 1.lcd	bisoprolol2	STD	0.000	0	0	0.000
SV- S3-90 - 2.lcd	bisoprolol2	STD	0.000	0	0	0.000
SV- S3-90 - 3.lcd	bisoprolol2	STD	0.000	0	0	0.000
SE- S3-100 - 1.lcd	bisoprolol2	STD	0.000	0	0	0.000
SE- S3-100 - 2.lcd	bisoprolol2	STD	0.000	0	0	0.000
SV- S3-100- 1.lcd	bisoprolol2	STD	0.000	0	0	0.000
SE- S3-110 - 1.lcd	bisoprolol2	STD	0.000	0	0	0.000
SV- S3-100- 2.lcd	bisoprolol2	STD	0.000	0	0	0.000
SV- S3-100- 3.lcd	bisoprolol2	STD	0.000	0	0	0.000
SE- S3-110 - 2.lcd	bisoprolol2	STD	0.000	0	0	0.000
SV S3-110 - 1.lcd	bisoprolol2	STD	0.000	0	0	0.000
SV S3-110 - 2.lcd	bisoprolol2	STD	0.000	0	0	0.000
SV S3-110 - 3.lcd	bisoprolol2	STD	0.000	0	0	0.000
SE- S3-120- 1.lcd	bisoprolol2	STD	0.000	0	0	0.000
SE- S3-120- 2.lcd	bisoprolol2	STD	0.000	0	0	0.000
SV- S3-120- 1.lcd	bisoprolol2	STD	0.000	0	0	0.000
SV- S3-120- 2.lcd	bisoprolol2	STD	0.000	0	0	0.000
SV- S3-120- 3.lcd	bisoprolol2	STD	0.000	0	0	0.000
Average			0.000	0	0	0.000
%RSD			0.000	0.000	0.000	0.000
Maximum			0.000	0	0	0.000
Minimum			0.000	0	0	0.000
Standard Deviation			0.000	0	0	0.000

ID#3 Compound Name: EI

Title	Sample Name	Sample ID	Ret. Time	Area	Height	Conc.
SE- S3-80 - 1.lcd	bisoprolol2	STD	0.000	0	0	0.000
SE- S3-80 - 2.lcd	bisoprolol2	STD	0.000	0	0	0.000
SV- S3-80 - 1.lcd	bisoprolol2	STD	0.000	0	0	0.000
SV- S3-80 - 2.lcd	bisoprolol2	STD	0.000	0	0	0.000
SV- S3-80 - 3.lcd	bisoprolol2	STD	0.000	0	0	0.000
SE- S3-90 - 1.lcd	bisoprolol2	STD	0.000	0	0	0.000
SE- S3-90 - 2.lcd	bisoprolol2	STD	0.000	0	0	0.000
SV- S3-90 - 1.lcd	bisoprolol2	STD	0.000	0	0	0.000



PDF
Complete

Your complimentary
use period has ended.
Thank you for using
PDF Complete.

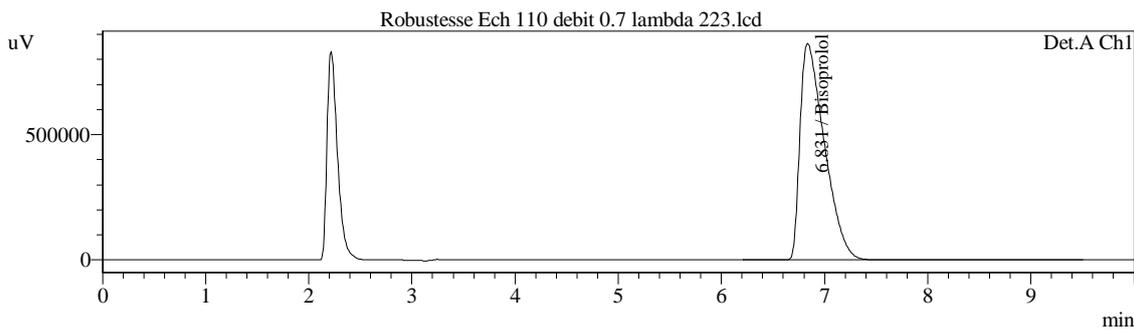
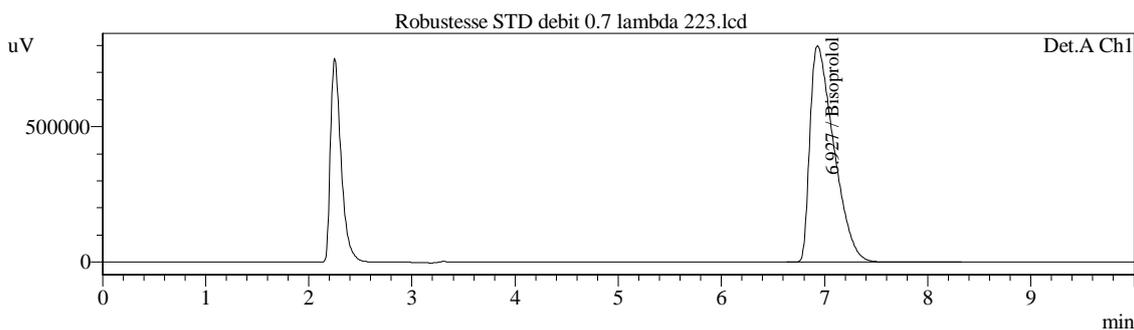
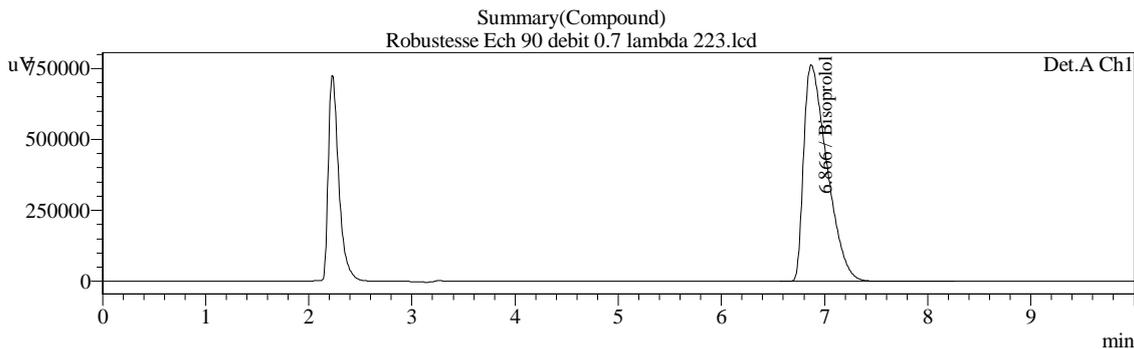
[Click Here to upgrade to
Unlimited Pages and Expanded Features](#)

Sample ID	Ret. Time	Area	Height	Conc.		
	0.000	0	0	0.000		
	0.000	0	0	0.000		
	0.000	0	0	0.000		
SE- S3-100 - 2.lcd	bisoprolol2	STD	0.000	0	0	0.000
SV- S3-100- 1.lcd	bisoprolol2	STD	0.000	0	0	0.000
SE- S3-110 - 1.lcd	bisoprolol2	STD	0.000	0	0	0.000
SV- S3-100- 2.lcd	bisoprolol2	STD	0.000	0	0	0.000
SV- S3-100- 3.lcd	bisoprolol2	STD	0.000	0	0	0.000
SE- S3-110 - 2.lcd	bisoprolol2	STD	0.000	0	0	0.000
SV S3-110 - 1.lcd	bisoprolol2	STD	0.000	0	0	0.000
SV S3-110 - 2.lcd	bisoprolol2	STD	0.000	0	0	0.000
SV S3-110 - 3.lcd	bisoprolol2	STD	0.000	0	0	0.000
SE- S3-120- 1.lcd	bisoprolol2	STD	0.000	0	0	0.000
SE- S3-120- 2.lcd	bisoprolol2	STD	0.000	0	0	0.000
SV- S3-120- 1.lcd	bisoprolol2	STD	0.000	0	0	0.000
SV- S3-120- 2.lcd	bisoprolol2	STD	0.000	0	0	0.000
SV- S3-120- 3.lcd	bisoprolol2	STD	0.000	0	0	0.000
Average			0.000	0	0	0.000
%RSD			0.000	0.000	0.000	0.000
Maximum			0.000	0	0	0.000
Minimum			0.000	0	0	0.000
Standard Deviation			0.000	0	0	0.000

Robustesse

Sample Information

Sample Name : Bisoprolol
 Sample ID : STD
 Tray# : 1
 Vial# : 11
 Injection Volume : 20 uL
 Data Filename : Robustesse STD debit 0.7 lambda 223.lcd
 Method Filename : Robustesse debit 0.7 lambda 223.lcm
 Batch Filename : BISOPROLOL SERE REFAITE.lcb
 Report Filename : Default.lcr
 Date Acquired : 12/08/2017 06:52:40
 Data Processed : 12/08/2017 08:50:29



<< Detector A >>

ID#1 Compound Name: Bisoprolol

Title	Sample Name	Sample ID	Ret. Time	Area	Height	Conc.
Robustesse Ech 90 debit 0.7	Bisoprolol	Echantillon	6.866	12013205	762351	0.000
Robustesse STD debit 0.7 lar	Bisoprolol	STD	6.927	12876492	798753	0.000
Robustesse Ech 110 debit 0.7	Bisoprolol	Echantillon	6.831	14218575	863801	0.000
Average			6.874	13036090	808302	0.000
%RSD			0.709	8.525	6.358	0.000
Maximum			6.927	14218575	863801	0.000
Minimum			6.831	12013205	762351	0.000
Standard Deviation			0.049	1111314	51395	0.000

<< Detector B >>

[Click Here to upgrade to
Unlimited Pages and Expanded Features](#)

	le ID	Ret. Time	Area	Height	Conc.
	lon	0.000	0	0	0.000
		0.000	0	0	0.000
Robustesse Ech 110 debit 0.7	Bisoprolol	Echantillon	0.000	0	0.000
Average			0.000	0	0.000
%RSD			0.000	0.000	0.000
Maximum			0.000	0	0.000
Minimum			0.000	0	0.000
Standard Deviation			0.000	0	0.000

ID#2 Compound Name: PHE

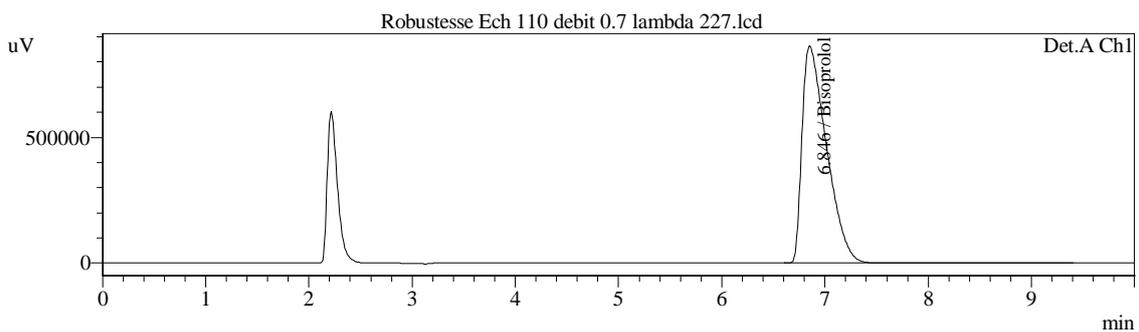
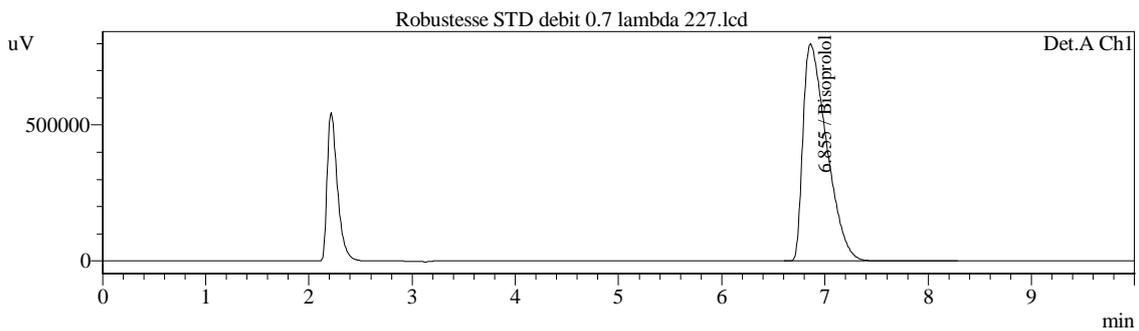
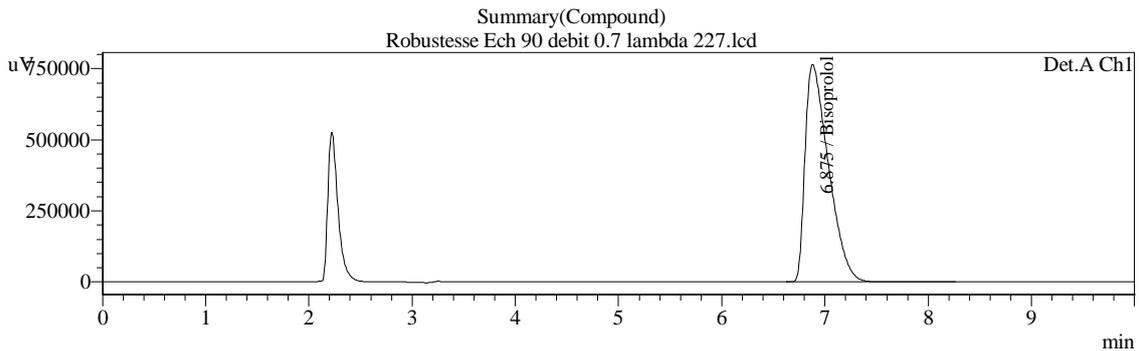
Title	Sample Name	Sample ID	Ret. Time	Area	Height	Conc.
Robustesse Ech 90 debit 0.7	Bisoprolol	Echantillon	0.000	0	0	0.000
Robustesse STD debit 0.7 lar	Bisoprolol	STD	0.000	0	0	0.000
Robustesse Ech 110 debit 0.7	Bisoprolol	Echantillon	0.000	0	0	0.000
Average			0.000	0	0	0.000
%RSD			0.000	0.000	0.000	0.000
Maximum			0.000	0	0	0.000
Minimum			0.000	0	0	0.000
Standard Deviation			0.000	0	0	0.000

ID#3 Compound Name: EI

Title	Sample Name	Sample ID	Ret. Time	Area	Height	Conc.
Robustesse Ech 90 debit 0.7	Bisoprolol	Echantillon	0.000	0	0	0.000
Robustesse STD debit 0.7 lar	Bisoprolol	STD	0.000	0	0	0.000
Robustesse Ech 110 debit 0.7	Bisoprolol	Echantillon	0.000	0	0	0.000
Average			0.000	0	0	0.000
%RSD			0.000	0.000	0.000	0.000
Maximum			0.000	0	0	0.000
Minimum			0.000	0	0	0.000
Standard Deviation			0.000	0	0	0.000

Sample Information

Sample Name : Bisoprolol
 Sample ID : STD
 Tray# : 1
 Vial# : 11
 Injection Volume : 20 uL
 Data Filename : Robustesse STD debit 0.7 lambda 227.lcd
 Method Filename : Robustesse debit 0.7 lambda 227.lcm
 Batch Filename : BISOPROLOL SERE REFAITE.lcb
 Report Filename : Default.lcr
 Date Acquired : 12/08/2017 07:23:59
 Data Processed : 12/08/2017 14:04:33



<< Detector A >>

ID#1 Compound Name: Bisoprolol

Title	Sample Name	Sample ID	Ret. Time	Area	Height	Conc.
Robustesse Ech 90 debit 0.7 l	Bisoprolol	Echantillon	6.875	12069419	763260	0.000
Robustesse STD debit 0.7 lar	Bisoprolol	STD	6.855	12768642	797899	0.000
Robustesse Ech 110 debit 0.7	Bisoprolol	Echantillon	6.846	14270099	863501	0.000
Average			6.859	13036053	808220	0.000
%RSD			0.216	8.626	6.299	0.000
Maximum			6.875	14270099	863501	0.000
Minimum			6.846	12069419	763260	0.000
Standard Deviation			0.015	1124447	50911	0.000

<< Detector B >>

[Click Here to upgrade to
Unlimited Pages and Expanded Features](#)

	le ID	Ret. Time	Area	Height	Conc.
	lon	0.000	0	0	0.000
		0.000	0	0	0.000
Robustesse Ech 110 debit 0.7	Bisoprolol	Echantillon	0.000	0	0.000
Average			0.000	0	0.000
%RSD			0.000	0.000	0.000
Maximum			0.000	0	0.000
Minimum			0.000	0	0.000
Standard Deviation			0.000	0	0.000

ID#2 Compound Name: PHE

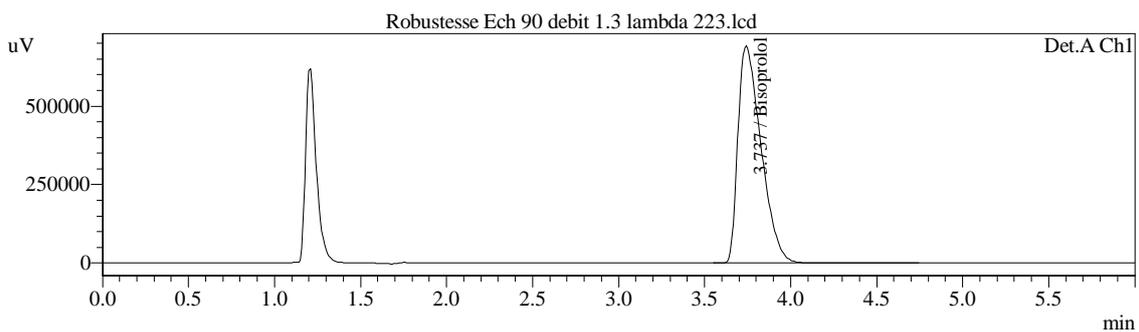
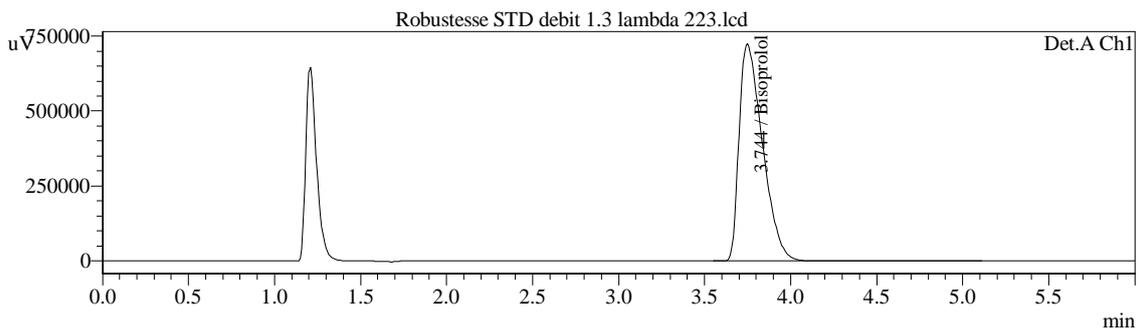
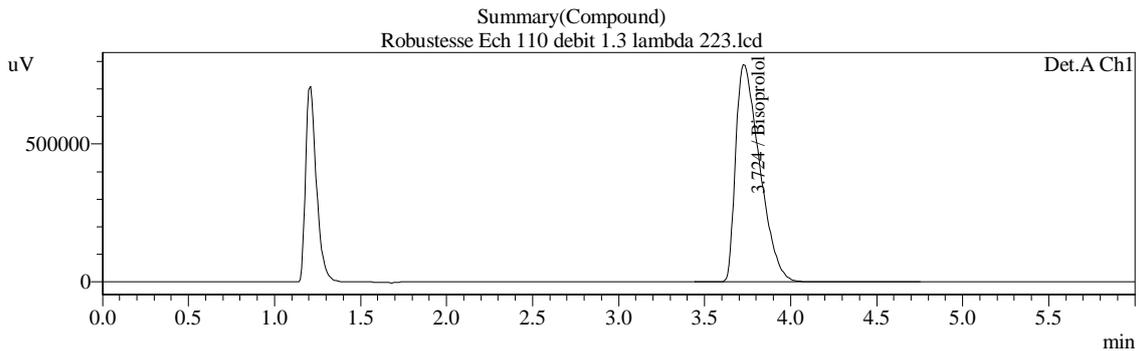
Title	Sample Name	Sample ID	Ret. Time	Area	Height	Conc.
Robustesse Ech 90 debit 0.7	Bisoprolol	Echantillon	0.000	0	0	0.000
Robustesse STD debit 0.7 lar	Bisoprolol	STD	0.000	0	0	0.000
Robustesse Ech 110 debit 0.7	Bisoprolol	Echantillon	0.000	0	0	0.000
Average			0.000	0	0	0.000
%RSD			0.000	0.000	0.000	0.000
Maximum			0.000	0	0	0.000
Minimum			0.000	0	0	0.000
Standard Deviation			0.000	0	0	0.000

ID#3 Compound Name: EI

Title	Sample Name	Sample ID	Ret. Time	Area	Height	Conc.
Robustesse Ech 90 debit 0.7	Bisoprolol	Echantillon	0.000	0	0	0.000
Robustesse STD debit 0.7 lar	Bisoprolol	STD	0.000	0	0	0.000
Robustesse Ech 110 debit 0.7	Bisoprolol	Echantillon	0.000	0	0	0.000
Average			0.000	0	0	0.000
%RSD			0.000	0.000	0.000	0.000
Maximum			0.000	0	0	0.000
Minimum			0.000	0	0	0.000
Standard Deviation			0.000	0	0	0.000

Sample Information

Sample Name : Bisoprolol
 Sample ID : STD
 Tray# : 1
 Vial# : 11
 Injection Volume : 20 uL
 Data Filename : Robustesse STD debit 0.7 lambda 227.lcd
 Method Filename : Robustesse debit 0.7 lambda 227.lcm
 Batch Filename : BISOPROLOL SERE REFAITE.lcb
 Report Filename : Default.lcr
 Date Acquired : 12/08/2017 07:23:59
 Data Processed : 12/08/2017 14:04:33



<< Detector A >>

ID#1 Compound Name: Bisoprolol

Title	Sample Name	Sample ID	Ret. Time	Area	Height	Conc.
Robustesse Ech 110 debit 1.3	Bisoprolol	Echantillon	3.724	7638978	786645	0.000
Robustesse STD debit 1.3 lar	Bisoprolol	STD	3.744	6832010	723866	0.000
Robustesse Ech 90 debit 1.3 l	Bisoprolol	Echantillon	3.737	6451755	691418	0.000
Average			3.735	6974248	733976	0.000
%RSD			0.266	8.693	6.596	0.000
Maximum			3.744	7638978	786645	0.000
Minimum			3.724	6451755	691418	0.000
Standard Deviation			0.010	606257	48412	0.000

<< Detector B >>

[Click Here to upgrade to
Unlimited Pages and Expanded Features](#)

Sample ID	Ret. Time	Area	Height	Conc.	
lon	0.000	0	0	0.000	
	0.000	0	0	0.000	
Robustesse Ech 90 debit 1.3 l	Bisoprolol	Echantillon	0.000	0	0.000
Average			0.000	0	0.000
%RSD			0.000	0.000	0.000
Maximum			0.000	0	0.000
Minimum			0.000	0	0.000
Standard Deviation			0.000	0	0.000

ID#2 Compound Name: PHE

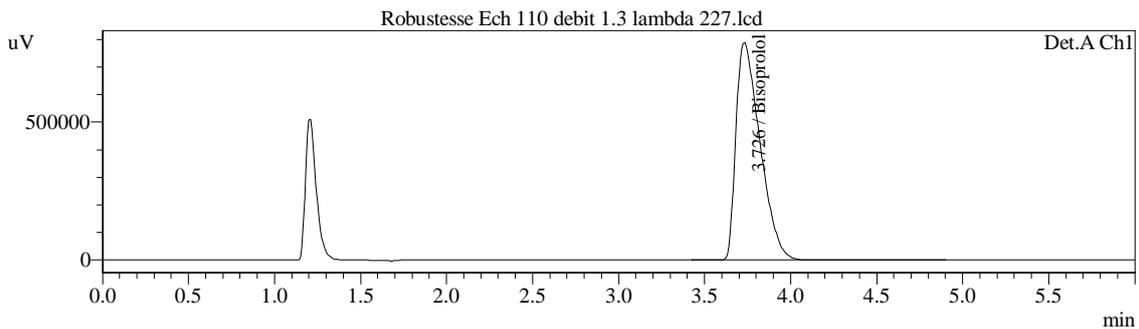
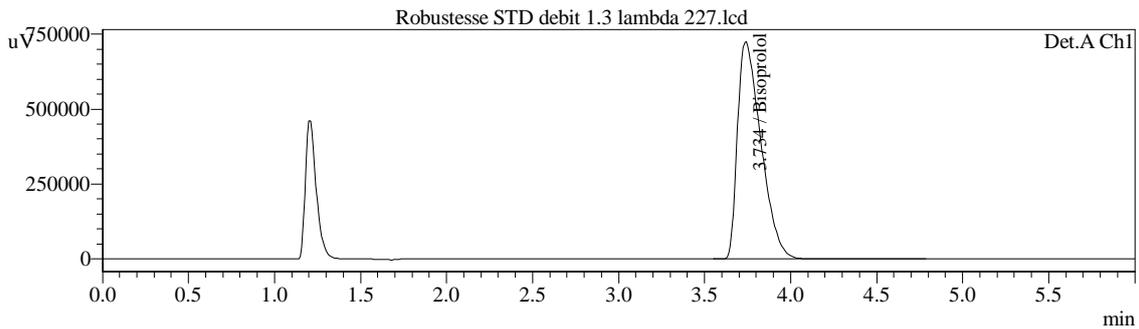
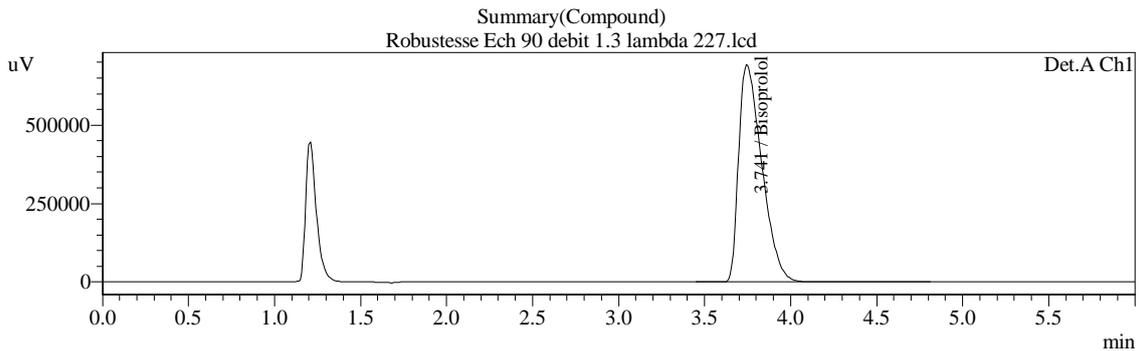
Title	Sample Name	Sample ID	Ret. Time	Area	Height	Conc.
Robustesse Ech 110 debit 1.3 l	Bisoprolol	Echantillon	0.000	0	0	0.000
Robustesse STD debit 1.3 lar	Bisoprolol	STD	0.000	0	0	0.000
Robustesse Ech 90 debit 1.3 l	Bisoprolol	Echantillon	0.000	0	0	0.000
Average			0.000	0	0	0.000
%RSD			0.000	0.000	0.000	0.000
Maximum			0.000	0	0	0.000
Minimum			0.000	0	0	0.000
Standard Deviation			0.000	0	0	0.000

ID#3 Compound Name: EI

Title	Sample Name	Sample ID	Ret. Time	Area	Height	Conc.
Robustesse Ech 110 debit 1.3 l	Bisoprolol	Echantillon	0.000	0	0	0.000
Robustesse STD debit 1.3 lar	Bisoprolol	STD	0.000	0	0	0.000
Robustesse Ech 90 debit 1.3 l	Bisoprolol	Echantillon	0.000	0	0	0.000
Average			0.000	0	0	0.000
%RSD			0.000	0.000	0.000	0.000
Maximum			0.000	0	0	0.000
Minimum			0.000	0	0	0.000
Standard Deviation			0.000	0	0	0.000

Sample Information

Sample Name : Bisoprolol
 Sample ID : STD
 Tray# : 1
 Vial# : 11
 Injection Volume : 20 uL
 Data Filename : Robustesse STD debit 0.7 lambda 227.lcd
 Method Filename : Robustesse debit 0.7 lambda 227.lcm
 Batch Filename : BISOPROLOL SERE REFAITE.lcb
 Report Filename : Default.lcr
 Date Acquired : 12/08/2017 07:23:59
 Data Processed : 12/08/2017 14:04:33



<< Detector A >>

ID#1 Compound Name: Bisoprolol

Title	Sample Name	Sample ID	Ret. Time	Area	Height	Conc.
Robustesse Ech 90 debit 1.3 l	Bisoprolol	Echantillon	3.741	6483754	691679	0.000
Robustesse STD debit 1.3 lar	Bisoprolol	STD	3.734	6863574	723698	0.000
Robustesse Ech 110 debit 1.3	Bisoprolol	Echantillon	3.726	7667540	786342	0.000
Average			3.734	7004956	733907	0.000
%RSD			0.205	8.629	6.561	0.000
Maximum			3.741	7667540	786342	0.000
Minimum			3.726	6483754	691679	0.000
Standard Deviation			0.008	604425	48150	0.000

<< Detector B >>

[Click Here to upgrade to
Unlimited Pages and Expanded Features](#)

	le ID	Ret. Time	Area	Height	Conc.
	lon	0.000	0	0	0.000
		0.000	0	0	0.000
Robustesse Ech 110 debit 1.3	Bisoprolol	Echantillon	0.000	0	0.000
Average			0.000	0	0.000
%RSD			0.000	0.000	0.000
Maximum			0.000	0	0.000
Minimum			0.000	0	0.000
Standard Deviation			0.000	0	0.000

ID#2 Compound Name: PHE

Title	Sample Name	Sample ID	Ret. Time	Area	Height	Conc.
Robustesse Ech 90 debit 1.3	Bisoprolol	Echantillon	0.000	0	0	0.000
Robustesse STD debit 1.3 lar	Bisoprolol	STD	0.000	0	0	0.000
Robustesse Ech 110 debit 1.3	Bisoprolol	Echantillon	0.000	0	0	0.000
Average			0.000	0	0	0.000
%RSD			0.000	0.000	0.000	0.000
Maximum			0.000	0	0	0.000
Minimum			0.000	0	0	0.000
Standard Deviation			0.000	0	0	0.000

ID#3 Compound Name: EI

Title	Sample Name	Sample ID	Ret. Time	Area	Height	Conc.
Robustesse Ech 90 debit 1.3	Bisoprolol	Echantillon	0.000	0	0	0.000
Robustesse STD debit 1.3 lar	Bisoprolol	STD	0.000	0	0	0.000
Robustesse Ech 110 debit 1.3	Bisoprolol	Echantillon	0.000	0	0	0.000
Average			0.000	0	0	0.000
%RSD			0.000	0.000	0.000	0.000
Maximum			0.000	0	0	0.000
Minimum			0.000	0	0	0.000
Standard Deviation			0.000	0	0	0.000

Résumé

Les laboratoires pharmaceutiques sont tenus de prouver que les méthodes utilisées lors du contrôle de la qualité des médicaments sont parfaitement valides et fiables, en procédant à leur validation.

L'utilisation du profil d'exactitude couplé à l'intervalle de tolérance comme outil de décision de validation est une méthode développée par une commission de la SFSTP parue en 2003 et en 2006 dans les guides STP Pharma Pratiques. Cet outil de décision permet de prévoir avec quelle garantie une proportion donnée des résultats futurs obtenus avec la méthode seront compris dans des limites d'acceptabilité fixées au préalable.

Ce mémoire propose une application pratique de la procédure publiée par la SFSTP en 2003 et 2006 utilisant le profil d'exactitude, à la mise au point et à la validation analytique de la méthode de dosage du fumarate de bisoprolol par HPLC dans des comprimés de 5mg.

La méthode d'analyse proposée s'est révélée spécifique, linéaire, sensible, exacte dans l'intervalle [195,4 ; 305,7] µg/ml avec un risque d'avoir au maximum de 5% des futures mesures en dehors des limites d'acceptations fixées à [-5, +5] %. La méthode peut être utilisée pour l'analyse de contrôle de qualité de routine.

Mots clefs : Bisoprolol fumarate, comprimés, validation analytique, HPLC, Profil d'exactitude.

Abstract

Pharmaceutical laboratories are required to prove that the methods used to check the quality of the medicines are valid and reliable by validating them.

The use of the accuracy profile coupled with the tolerance interval as a validation decision tool is a method developed by a SFSTP commission published in 2003 and 2006 in the STP Pharma Practices guides. This decision tool makes it possible to predict with what guarantee a given proportion of the future results obtained with the method will be within pre-determined acceptability limits.

This paper proposes a practical application of the procedure published by the SFSTP in 2003 and 2006 using the accuracy profile, the development and the analytical validation of the method of assaying bisoprolol fumarate by HPLC in 5mg tablets.

The proposed method of analysis was specific, linear, sensitive, and exact in the interval [195.4; 305.7] µg / ml with a risk of having a maximum of 5% of future measurements outside the acceptance limits set at [-5, +5]%. The method can be used for routine quality control analysis.

Keywords: Bisoprolol fumarate, tablets, analytical validation, HPLC, Accuracy profile.