

الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية

REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE

Ministère de l'Enseignement
Supérieur et de la Recherche
Scientifique
Université Mouloud MAMMERI
de Tizi Ouzou
FACULTE DE MEDECINE
Département de pharmacie



وزارة التعليم العالي والبحث العلمي
جامعة مولود معمري بتيزي وزو
كلية الطب
قسم الصيدلة

† • ☉ ΛΛ • ∩ξ† ∟∶ ∩∶ Λ • † ∟Η∶ ∟∟∶ ∟

N° d'ordre :

MEMOIRE DE FIN D'ETUDES

En vue de l'obtention du diplôme de Docteur en Pharmacie

Intitulé :

MISE AU POINT ET VALIDATION D'UNE MÉTHODE DE DOSAGE D'UN
PRINCIPE ACTIF DANS UN PRODUIT FINI : AMLODIPINE BÉSYLATE
PAR HPLC

Présenté et soutenu publiquement I :

23 Juillet 2025

Réalisé et présenté par : BENYAHIA Liliane & BOUBEKEUR Massilia

Encadré par :

Dr TOUBAL Lamia

Co-encadré par :

Dr AIT TALEB Boualem

Devant le jury composé de :

<u>Noms et Prénoms</u>	<u>Grade</u>	<u>Qualité</u>	<u>Établissement</u>
Pr. MAMOU Marzouk	Professeur HU	Président	UMMTO
Dr. BEN SI SAID Hassan	MAHU	Examineur	UMMTO
Mr . TIGHARSI Omar	Directeur de laboratoire de contrôle qualité	Examineur	CYTOLAB
Dr. TOUBAL Lamia	MAHU	Promotrice	UMMTO
Dr. AIT TALEB Boualem	Résident	Co-promoteur	CHU . TO

Résumé :

Introduction : Mettre en avant l'importance du contrôle qualité dans l'industrie pharmaceutique pour garantir l'efficacité et la sécurité des médicaments. L'étude se concentre sur l'amlodipine bésilate, un inhibiteur calcique utilisé dans le traitement de l'hypertension et de l'angor. Réalisée au laboratoire CYTOLAB, elle vise à mettre au point et valider une méthode de dosage simultané de l'amlodipine bésilate et de son impureté A par HPLC, conformément aux recommandations SFSTP (1992) et ICH Q2(R1).

Matériels et méthodes : décrit la mise en œuvre expérimentale d'une méthode de dosage de l'amlodipine bésilate et de son impureté A par chromatographie liquide à haute performance (HPLC). L'étude a été réalisée au laboratoire de contrôle qualité de CYTOLAB, à Azazga. Le dispositif utilisé est un système HPLC SHIMADZU LC20 muni d'une colonne C18 (3,9 mm × 15 cm, 5 µm) et d'un détecteur UV à 237 nm. La phase mobile est composée d'un mélange méthanol/acétonitrile/tampon (35:15:50, pH 3,0), préparé à l'aide de triéthylamine et d'acide phosphorique.

Les solutions étalons, placebos et échantillons ont été élaborées à différentes concentrations (60 % à 140 %) pour vérifier la linéarité, la spécificité, la fidélité, l'exactitude, la robustesse et les limites de détection et de quantification. Les essais ont été réalisés sur plusieurs jours afin d'évaluer la reproductibilité selon les critères du guide SFSTP (1992) et des recommandations ICH Q2(R1).

Résultats et Discussion : Les analyses démontrent une excellente spécificité sans interférence de matrice, une linéarité remarquable ($R^2 = 0,9997$ à $0,9999$) entre 60 % et 140 %, et une exactitude avec un taux moyen de récupération de 100,06 %. La fidélité présente des coefficients de variation inférieurs à 0,5 %, indiquant une excellente répétabilité. Les limites de détection et de quantification sont de 1,37 µg/mL et 4,16 µg/mL. La robustesse est confirmée vis-à-vis du débit et de

la longueur d'onde, garantissant la stabilité et la fiabilité de la méthode pour un usage de routine.

Conclusion : La méthode HPLC développée pour le dosage de l'amlodipine bésilate et de l'impureté A dans les gélules à 5 mg est jugée spécifique, linéaire, exacte, fidèle et robuste. Elle satisfait pleinement aux critères de validation internationaux et peut être utilisée en routine dans le contrôle qualité pharmaceutique, assurant la conformité et la sécurité du produit fini.

Mots-clés :

HPLC (High Performance Liquid Chromatography) – Technique analytique utilisée pour la détermination quantitative et qualitative des principes actifs pharmaceutiques, notamment l'amlodipine bésilate. Termes associés : chromatographie, méthode de dosage, analyse quantitative.

API (Active Pharmaceutical Ingredient) – Composant pharmacologiquement actif responsable de l'effet thérapeutique d'un médicament ; dans cette étude, il s'agit de l'amlodipine bésilate. Termes associés : substance active, dosage, amlodipine.

USP (United States Pharmacopeia) – Référence pharmacopéique américaine établissant les spécifications de qualité pour les méthodes analytiques et pharmaceutiques. Liée à : pharmacopée, normes analytiques, contrôle qualité.

SFSTP (Société Française des Sciences et Techniques Pharmaceutiques) – Organisme fournissant des lignes directrices pour la validation méthodologique et analytique en recherche pharmaceutique. Liée à : validation de méthode, référence analytique, normalisation.

ICH Q2(R1) (International Council for Harmonisation – Validation of Analytical Procedures) – Directive internationale définissant les exigences de validation des méthodes

analytiques afin d'assurer leur fiabilité et leur conformité réglementaire.

LOD (Limit of Detection) – Plus faible concentration d'un analyte détectable par la méthode analytique, reflétant la sensibilité et le seuil de détection.

LOQ (Limit of Quantification) – Plus faible concentration quantifiable avec une exactitude et une précision acceptables ; liée à la limite de quantification et à la sensibilité analytique.

CV (Coefficient of Variation) – Paramètre statistique exprimant la précision et la reproductibilité des résultats analytiques, garantissant la fiabilité de la méthode.

UV (Ultraviolet) – Mode de détection utilisé en HPLC basé sur l'absorbance des composés dans le spectre ultraviolet ; associé à la spectroscopie et à la détection optique.

R² (Coefficient de Détermination) – Valeur statistique représentant la relation linéaire entre la concentration de l'analyte et la réponse analytique ; liée à la corrélation et à la linéarité.

TEA (Triéthylamine) – Agent tampon utilisé pour ajuster le pH de la phase mobile lors de l'analyse chromatographique.

FR (Forme Reconstituée) – Échantillon représentant la forme pharmaceutique finale utilisé pour la validation.

FDA (Food and Drug Administration) – Autorité réglementaire américaine chargée d'assurer la qualité, l'efficacité et la sécurité des médicaments selon les normes pharmaceutiques.

ANSM (Agence Nationale de Sécurité du Médicament et des Produits de Santé) – Organisme français chargé de la régulation, de l'assurance qualité et de l'autorisation de mise sur le marché des médicaments.

OMS (Organisation Mondiale de la Santé) – Institution internationale fournissant des normes et directives mondiales pour la qualité, la sécurité et la santé publique pharmaceutique.

Abstract :

Introduction: This study highlights the importance of quality control in the pharmaceutical industry to ensure the efficacy and safety of medicines. The research focuses on amlodipine besylate, a calcium channel blocker used in the treatment of hypertension and angina. Conducted at the CYTOLAB laboratory, the study aims to develop and validate a simultaneous assay method for amlodipine besylate and its impurity A using High-Performance Liquid Chromatography (HPLC), in accordance with SFSTP (1992) and ICH Q2(R1) guidelines.

Materials and Methods: This section describes the experimental implementation of the assay method for amlodipine besylate and its impurity A by HPLC. The study was carried out in the CYTOLAB Quality Control Laboratory located in Azazga. The equipment used was a SHIMADZU LC20 HPLC system equipped with a C18 column (3.9 mm × 15 cm, 5 μm) and a UV detector at 237 nm. The mobile phase consisted of a methanol/acetonitrile/buffer mixture (35:15:50, pH 3.0), prepared using triethylamine and phosphoric acid. Standard, placebo, and sample solutions were prepared at concentrations ranging from 60% to 140% to verify linearity, specificity, precision, accuracy, robustness, and the limits of detection and quantification. The experiments were performed over several days to assess reproducibility, following SFSTP (1992) and ICH Q2(R1) validation criteria.

Results and Discussion: The analyses demonstrated excellent specificity with no matrix interference, as well as outstanding linearity (R² = 0.9997–0.9999) across the 60%–140% concentration range. The method showed high

accuracy, with a mean recovery rate of 100.06%, and precision, with coefficients of variation below 0.5%, indicating excellent repeatability. The limits of detection (LOD) and quantification (LOQ) were 1.37 µg/mL and 4.16 µg/mL, respectively. Robustness was confirmed with respect to variations in flow rate and detection wavelength, ensuring the method's stability and reliability for routine use.

Conclusion: The developed HPLC method for the assay of amlodipine besylate and impurity A in 5 mg capsules proved to be specific, linear, accurate, precise, and robust. It fully meets international validation standards and can be routinely applied in pharmaceutical quality control, ensuring the compliance and safety of the finished product.

Keywords:

HPLC (High Performance Liquid Chromatography) – Analytical technique used for quantitative and qualitative determination of active pharmaceutical ingredients, including amlodipine besylate. Related terms: chromatography, assay method, quantitative analysis.

API (Active Pharmaceutical Ingredient) – The pharmacologically active component responsible for a drug's therapeutic action; in this study, amlodipine besylate. Associated terms: active substance, dosage, amlodipine.

USP (United States Pharmacopeia) – American reference standard establishing quality specifications for analytical and pharmaceutical procedures. Associated with pharmacopoeia, analytical standards, and quality control.

SFSTP (French Society for Pharmaceutical Sciences and Techniques) – Organization providing methodological and analytical validation guidelines within pharmaceutical research. Related to method validation, analytical reference, and standardization.

ICH Q2(R1) (International Council for Harmonisation – Validation of Analytical

Procedures) – International guideline defining requirements for validation of analytical methods to ensure reliability and regulatory compliance.

LOD (Limit of Detection) – Lowest analyte concentration detectable by the analytical method, indicating sensitivity and detection threshold.

LOQ (Limit of Quantification) – Minimum analyte concentration that can be quantified with acceptable accuracy and precision; linked to quantification limit and analytical sensitivity.

CV (Coefficient of Variation) – Statistical parameter expressing precision and reproducibility of analytical results; reflects method reliability.

UV (Ultraviolet) – Detection mode in HPLC based on compound absorbance in the UV spectrum; associated with spectroscopy and optical detection.

R² (Coefficient of Determination) – Statistical value representing the linear relationship between analyte concentration and analytical response; relevant to correlation and linearity.

TEA (Triethylamine) – Buffering agent used to control pH in the mobile phase during chromatographic analysis.

FR (Reconstituted Form) – Test sample representing the finished pharmaceutical dosage form used for validation.

FDA (Food and Drug Administration) – U.S. regulatory authority responsible for ensuring drug quality, efficacy, and safety through compliance with pharmaceutical standards.

ANSM (French National Agency for Medicines and Health Products Safety) – French body overseeing medicine regulation, quality assurance, and market authorization.

WHO (World Health Organization) – International institution providing global standards and guidelines for pharmaceutical quality, safety, and public health.

Introduction

Les médicaments jouent un rôle fondamental dans la prise en charge des maladies chroniques et dans l'amélioration de la qualité de vie des populations. Leur efficacité thérapeutique, leur sécurité et leur stabilité dépendent directement de la qualité pharmaceutiques des formes administrées. Cette qualité repose sur des exigences strictes imposées par les autorités de santé, dans un cadre réglementaire de plus en plus rigoureux. Avec l'évolution constante des connaissances scientifiques et des technologies analytiques, les exigences ont évolué d'un simple contrôle-qualité vers une démarche globale d'assurance qualité, englobant désormais la maîtrise des risques à chaque étape du cycle de vie du médicament, de sa fabrication à sa mise sur le marché [1,2].

En industrie pharmaceutique, la gestion des risques liés à la contamination croisée, aux écarts de qualité et aux variations analytiques constitue un enjeu majeur. Ces risques peuvent altérer l'intégrité d'un produit fini, notamment lors des étapes de fabrication, de conditionnement ou de stockage. La prévention de ces incidents passe par la mise en œuvre de méthodes de contrôle robustes et validées, répondant aux normes nationales et internationales [3]. Parmi ces méthodes, la validation analytique est une étape clé. Elle a pour but de démontrer scientifiquement qu'une méthode d'analyse est adaptée à son usage, fiable, reproductible et précise dans des conditions définies [4].

Dans ce contexte, l'Amlodipine bésylate, sel benzènesulfonate de l'amlodipine, représente une molécule essentielle dans la prise en charge de pathologies cardiovasculaires fréquentes telles que l'hypertension artérielle, l'angor stable chronique ou encore l'angor vasospastique [5]. Cet inhibiteur calcique de la famille des dihydropyridines agit en bloquant les canaux calciques de type L des muscles lisses vasculaires, induisant une vasodilatation et une baisse de la pression artérielle. Son administration sous forme de sel bésylate améliore sa solubilité, sa stabilité chimique et son profil galénique. Sa masse moléculaire est de 567,1 g/mol, et sa formule brute est $C_{20}H_{25}ClN_2O_5 \cdot C_6H_6O_3S$ [6]. Elle est commercialisée en gélules dosées à 5 mg.

Notre travail a été réalisé au sein du laboratoire de contrôle qualité de l'établissement pharmaceutique **CYTOLAB**, situé à **Azazga (Tizi Ouzou)**. Il s'inscrit dans une démarche de validation analytique rigoureuse visant à garantir la conformité réglementaire et la maîtrise des risques analytiques. L'objectif est de mettre au point et valider une **méthode de dosage simultané** de l'Amlodipine bésylate et de l'impureté A ($\leq 0,1\%$) par **chromatographie liquide à haute performance (HPLC)** avec détection UV, conformément à la monographie **USP <711>**.

Cette validation est conduite selon les recommandations des guides **SFSTP (1992)**, en évaluant des critères essentiels tels que la spécificité, la linéarité, la fidélité, l'exactitude, les limites de détection et de quantification, ainsi que la robustesse [7]. À travers cette démarche, nous cherchons à démontrer que la méthode analytique développée est parfaitement adaptée à un usage en routine dans le contrôle qualité du produit fini. La validation repose sur **l'interprétation combinée des résultats expérimentaux obtenus** pour chaque critère, conformément à l'approche classique de la SFSTP 1992.

I. MATÉRIELS ET METHODES

1. MATÉRIELS :

1.1. Appareillage :

Tableau 01 : Matériel du laboratoire de contrôle qualité.

Désignation		Spécification	Usage
Appareil HPLC (SHIMADZU LC20)	Pompe	LC 20 AT	Analyse des solutions et obtention des chromatogrammes
	Injecteur automatique	SIL 20 A	
	Contrôleur	CBM- 20	
	Compartiment de la colonne	CTO-20 A	
	Colonne	C18	
	Détecteur	Détecteur UV-Visible	
	Logiciel d'exploitation	LC-solution	
Purificateur de l'eau		Human power I	Purification de l'eau
Pompe à vide		SARTORIUS	Filtration de la phase mobile et le placebo
Bain ultrasons : Sonicateur		EMAG modèle Emmi-D280	Dégazage et dissolution
Agitateur magnétique		Nahita	Homogénéisation de la phase mobile
Balance de précision		SARTORIUS modèle Entris	Pesée
Balance analytique		SARTORIUS PRACTUM 124-1S	Pesée des excipients
pH-mètre		Metrohm 913	Ajustement le PH de la phase mobile

1.2. Verrerie et autres :

La verrerie utilisée est résumée dans le tableau suivant :

Tableau 02: Verreries et matériels divers utilisés

Verreries	Autres
Fioles jaugées 20ml, 50ml, 100ml, 250 ml, Béchers Eprouvette : 1000ml Pipettes jaugées : 5ml. pipettes graduées 1ml. Entonnoirs Vials Verre de montre Erlenmeyer	Micro pipette : 1ml Micro pipette Pissette d'eau Spatules Papier filtre

1.3. Matières premières et Réactifs :

Dans le tableau ci-après sont mentionnées les matières premières et les différents réactifs utilisés dans notre travail.

Tableau 03: Matières premières utilisées et Réactifs utilisés.

Catégorie		Composant	Rôle/Fonction
Matières premières		Amlodipine Bésylate	Principe actif à analyser (substance d'intérêt).
		Composé apparenté A de l'Amlodipine	Impureté ou composé apparenté (contrôle de pureté).
		Gélule d'Amlodipine	Formulation pharmaceutique à tester (source de l'analyte).
Réactifs utilisés	Phase Mobile	Méthanol	Solvant organique de la phase mobile (améliore la résolution).
		Acétonitrile	Solvant organique (réduit le temps de rétention).
		Buffer (pH 3.0)	Phase aqueuse tamponnée (stabilise le pH pour une séparation reproductible).
	Phase Mobile	Diluant final pour la préparation des solutions (standard et échantillon).	

2. MÉTHODE : Dosage de l'Amlodipine Bésilate et de l'Impureté A par HPLC-UV selon le guide SFSTP (1992)

Plusieurs essais ont été réalisés afin d'optimiser les conditions analytiques. Des modifications ont été apportées aux paramètres expérimentaux dans le but d'améliorer les performances de la méthode, en accord avec les critères définis par la SFSTP (1992) : spécificité, fidélité, exactitude, linéarité et robustesse.

Tableau04 : Conditions chromatographiques optimisées

Paramètre	Condition
Colonne	Type : C18 (octadécylsilane greffé, ODS) Dimensions : 3,9 mm x 15 cm Taille des particules : 5 µm Marque/Modèle : Non spécifié (colonne USP L1 ou équivalent) Phase stationnaire Gel de silice octadécylsilyl (C18)
Détection	UV à 237 nm (avec détecteur à barrette de diodes 200-400 nm pour l'identification)
Débit	1,0 mL/min
Volume d'injection	50 µL
Temps d'analyse	Au moins 3 fois le temps de rétention de l'amlodipine
Phase mobile	Méthanol/acétonitrile/tampon (35:15:50)
Mode d'éluion	Isocratique
Température	Non spécifiée (ambiante supposée)

2.1. Préparation des solutions :

2.1.1. Phase mobile / Diluant :

1. Procédure :

- Dans une fiole jaugée de 1000 mL, ajouter **900 mL d'eau purifiée**.

- Ajouter **7,0 mL de triéthylamine (TEA)**.
- Ajuster le pH à **3,0 ± 0,1** avec de l'**acide phosphorique** (ajouter goutte à goutte sous agitation).
- Compléter jusqu'au trait de jauge avec de l'eau purifiée et homogénéiser.

2. Mélange Final de la Phase Mobile

- Dans un bécher ou une fiole propre, mélanger :
 - **350 mL de méthanol**
 - **150 mL d'acétonitrile**
 - **500 mL de la solution tampon préparée**
- **Filtrer** le mélange sous vide à travers une membrane **0,45 µm** (nylon ou PTFE) pour éliminer les particules.
- **Dégazer** la phase mobile par :
 - Sonication pendant **10-15 min**, OU
 - Bullage avec de l'**hélium** ou de l'**azote** pendant **20 min**.

2.1.2. Protocole de préparation de la solution PLACEBO

Dans une fiole de 200 ml introduire 14.75g d'excipients puis ajuster au trait de jauge avec le diluant, agiter puis filtrer.

2.1.3. Protocole de préparation du STANDARD D'ETALONNAGE

2.1.3.1. Protocole de préparation de la solution mère en Amlodipine bésylate

Niveau	60%	80%	100%	120%	140%
Masse (mg)	16.5	22	27.5	33	38.5
Concentration (mg/ml)	0.165	0.22	0.275	0.33	0.385
Protocole	Dans une fiole de 100 ml : -Introduire la masse de l'amlodipine bésylate correspondante à chaque niveau de concentration -Dissoudre et compléter au trait de jauge avec le diluant et agiter par Retournement				

2.1.3.2. Protocole de préparation de la solution mère en Amlodipine Related Compound A

Niveau	Solution stock	
Masse (mg)	10	
Concentration (mg/ml)	0.5	
Protocole	Dans une fiole de 20 ml : -Introduire la masse du Composé apparenté A de l'Amlodipine -Dissoudre et compléter au trait de jauge avec le diluant et agiter par retournement	

Niveau	60%	80%	100%	120%	140%
Fiole	100	50	20	50	100
Volume de solution stock à prélever (ml)	3	2	1	3	7
Concentration (mg/ml)	0.015	0.02	0.025	0.03	0.035

2.1.3.2. Protocole de préparation de la solution mère en Amlodipine Related Compound A

Niveau	Solution stock				
Masse (mg)	10				
Concentration (mg/ml)	0.5				
Protocole	Dans une fiole de 20 ml : -Introduire la masse du Composé apparenté A de l'Amlodipine -Dissoudre et compléter au trait de jauge avec le diluant et agiter par retournement				
Niveau	60%	80%	100%	120%	140%
Fiole	100	50	20	50	100
Volume de solution stock à prélever (ml)	3	2	1	3	7
Concentration (mg/ml)	0.015	0.02	0.025	0.03	0.035

2.1.3.3. Protocole de préparation de la solution STANDARD

(Solution mère en Amlodipine bésylate et en Composé apparenté A de l'Amlodipine)

Niveau	60%	80%	100%	120%	140%
Fiole (ml)	50				
Volume solution Amlodipine bésylate (ml)	5	5	5	5	5
Volume solution du composé apparenté A de l'Amlodipine (ml)	5	5	5	5	5
Concentration en Amlodipine bésylate (mg/ml)	0.0165	0.022	0.0275	0.033	0.385
Concentration en composé apparenté A de l'Amlodipine (mg/ml)	0.0015				
				0.002	0.0025
					0.003
					0.0035

2.1.4. Protocole de préparation de la FORME RECONSTITUEE :

Niveau	60 %	80 %	100 %	120 %	140 %					
Fiole (ml)	100									
Masse en Amlodipine bésylate (mg)	16.5					22	27.5	33	38.5	
Volume solution Placebo (ml)	5									
Protocole	Dans une fiole de 50ml -Introduire le volume correspondant en solution mère d'Amlodipine bésylate chargé en excipients -Introduire le volume correspondant de la solution diluée du Composé apparenté A de l'Amlodipine									
Volume solution d'Amlodipine bésylate (ml)	5					5	5	5	5	
Volume solution en composé apparenté A de l'Amlodipine (ml)	5					5	5	5	5	
Concentration en Amlodipine bésylate (mg/ml)	0.0165					0.022	0.0275	0.033	0.385	
Concentration en composé apparenté A de l'Amlodipine (mg/ml)	0.0015					0.002	0.0025	0.003	0.0035	

II. Validation selon le Guide SFSTP (1992)

a.Principe et Objectifs :

La validation des méthodes analytiques représente un processus essentiel pour assurer la fiabilité des résultats, comme l'attestent les organismes réglementaires et scientifiques [8,9].

La validation d'une nouvelle méthode chromatographique doit inclure une étude comparative avec une méthode de référence validée. Cette approche permet de :

- Vérifier l'exactitude et la fiabilité de la nouvelle méthode
- Identifier d'éventuels biais systématiques
- Déterminer sa plage d'applicabilité optimale

Conditions optimales pour effectuer une comparaison conforme aux exigences de validation (SFSTP, 1992) :

- Utilisation des mêmes échantillons réels pour les deux méthodes ;
- Couverture d'une plage de concentrations identique par les deux méthodes, afin d'assurer une comparaison représentative ;
- Réalisation des analyses dans des conditions expérimentales strictement comparables, c'est-à-dire le même jour, par le même opérateur, et idéalement sur le même équipement.

b. Critères de validation :

1.Fonction de réponse selon le Guide SFSTP (1992)

La fonction de réponse est un élément clé de la validation des méthodes analytiques, notamment dans le cadre des études de linéarité, d'exactitude et de fidélité.

1.1. Définition et critères de sélection :

- **Choix de la fonction de réponse :**
 - Seules les fonctions comprises dans l'intervalle de tolérance sont retenues.
 - La fonction la plus simple est privilégiée (ex. : linéaire simple ou passant par zéro).
 - Le modèle doit présenter une linéarité avec un coefficient de détermination $R^2 \geq 0,99$.
- **Objectif :**
 - Établir une relation entre la réponse analytique (signal) et les standards d'étalonnage (SE) après collecte des données expérimentales.
 -

1 .2. Étapes de validation de la fonction de réponse :

2.1. Linéarité :

Protocole :

- Utiliser 5 concentrations minimum (ex. : 60 %, 80 %, 100 %, 120 %, 140 % de la concentration théorique).

- Effectuer l'étude sur trois séries indépendantes ,réalisées sur trois jours différents (1 série /jour) ,Afin d'évaluer la reproductibilité inter-journalière

L'évaluation doit être réalisée à la fois sur :

- la forme pharmaceutique reconstituée,
- le principe actif seul (substance de référence / matière première).
 - **Validation statistique :**
 - Calculer la droite de régression $y = bx + a$ par la méthode des moindres carrés.
 - Vérifier que les ordonnées à l'origine (a) ne sont pas significativement différentes de zéro (test de Student) .
 - Comparer les pentes (b) et les ordonnées à l'origine des droites de régression entre la forme pharmaceutique et le principe actif seul.

2.2. Exactitude :

- **Systèmes de référence :**
 - **Gammes d'étalonnage centrées sur 100 % (60 %, 80 %, 100 %, 120 %, 140 %):** Utilisées si les ordonnées à l'origine sont non significatives.
 - **Droite de régression (D_2) :** Utilisé si les ordonnées à l'origine sont significatives.
- **Calcul :**
 - Transformer les données brutes en **pourcentages de recouvrement**.
 - Vérifier l'homogénéité des variances (test de Cochran) et la validité des moyennes (test de Fisher).

2.3. Fidélité

- **Protocole :**
 - Réaliser 3 séries de 6 essais à 100% de la concentration théorique, sur la **forme pharmaceutique reconstituée**.
 - Conditions : Répétabilité (même jour / opérateur) et reproductibilité (jours/laboratoires différents).
- **Calcul :**
 - Coefficients de variation (CV) de répétabilité et de reproductibilité.
 - Élimination des valeurs aberrantes (test de Dixon).

2.4. Robustesse

Définition : Capacité de la méthode à rester exacte malgré des variations mineures des paramètres opératoires (ex. : pH, débit).

Méthode : Plans factoriels pour tester les interactions entre paramètres.

3) .Prédictions Inverses selon le Guide SFSTP (1992)

Contexte :

Les prédictions inverses permettent de calculer une concentration inconnue (x) à partir d'une mesure analytique (y), en utilisant un modèle de régression calibré. Cette méthode est essentielle pour les dosages en pharmacie.

Formules de Prédiction Inverse :

Tableau05 : Modèles de fonction de réponse – Formules et conditions d'application

Modèle	Formule de calcul de la concentration	Conditions
Droite passant par l'origine	$x_{cal} = \frac{y}{\beta}$ β : Pente de la droite de régression.	Aucune transformation préalable.
Droite de régression simple (modèle avec ordonnée à l'origine)	$x_{cal} = \frac{y - \alpha}{\beta}$ α : ordonnée à l'origine	Vérifier l'homogénéité des variances.

Conditions spécifiques

- **Alignement des données** : Si les observations (y_{ijk}) ont été préalablement alignées (ex. : centrage/réduction), utiliser les valeurs alignées (y_{ijk.c}) dans les formules.
- **Transformation des données** : Si une transformation (logarithmique, racine carrée, etc.) a été appliquée à y, appliquer la **transformation inverse** sur x_{cal} après le calcul.

2. Spécificité–Sélectivité selon le Guide SFSTP (1992)

2.1. Définition

La **spécificité** d'une procédure analytique est sa capacité à :

- **Identifier** de manière univoque une substance cible (principe actif, impureté, produit de dégradation) dans un échantillon complexe (ex. : matrice pharmaceutique).
- **Réaliser un Dosage quantitatif** sans interférence d'autres composants (excipients, impuretés, produits de dégradation).

2.2. Cadre Réglementaire

Le guide SFSTP de 1992, aligné sur les exigences européennes, définit la spécificité comme un critère fondamental pour

Tableau 06 : Spécificité selon le domaine d'application

Domaine d'Application	Exigence de Spécificité	Méthode de Vérification Typique
Identification	Garantir que le signal correspond uniquement à la substance cible	<ul style="list-style-type: none"> • Comparaison spectrale (IR, UV-MS) • Temps de rétention (HPLC/GC)

Essais de pureté	Détecter toutes les impuretés sans interférence avec le principe actif	<ul style="list-style-type: none"> • Résolution chromatographique $\geq 1,5$ • Détecteur spécifique (DAD, MS)
Dosages quantitatifs	S'assurer que le signal mesuré provient exclusivement de l'analyte, sans biais matriciel	<ul style="list-style-type: none"> • Test de recouvrement (80 % - 120 %) • Comparaison pentes de calibration (standard vs matrice)

2.3. Protocole Expérimental

Solutions à analyser :

1. **Diluant** (solvant seul).
2. **Placebo** (matrice sans principe actif).
3. **Standard à 100 %** (concentration théorique).
4. **Échantillon à 100 %** (forme pharmaceutique reconstituée).

Critères de validation :

- **Chromatogrammes comparés :**
 - Standard et échantillon doivent présenter des pics au même temps de rétention, avec des surfaces comparables.
 - Diluant et placebo ne doivent pas montrer de pics aux temps de rétention du principe actif.

2.4. Cas d'Application

- **Principe actif pur :**
 - Vérification de l'absence d'interférences avec des substances chimiquement proches.
- **Produit fini :**
 - Évaluation des interférences liées aux excipients ou produits de dégradation.

2.5. Méthodes Statistiques

- **Tests d'homogénéité** (ex. : test de Cochran) pour valider la reproductibilité
- **Comparaison des droites de régression** (linéarité) entre standard et échantillon.

3. Linéarité Totale selon le Guide SFSTP (1992)

Définition:

La linéarité d'une méthode analytique évalue sa capacité à fournir des résultats proportionnels à la concentration de l'analyte dans l'échantillon, sur un intervalle de dosage défini. Elle est vérifiée par une relation directe entre les concentrations introduites (valeurs théoriques) et les réponses mesurées (signaux analytiques).

4. Exactitude selon le Guide SFSTP (1992)

4.1. Définition :

L'exactitude correspond au processus d'estimation des paramètres d'une méthode analytique (moyenne, variance, intervalles de confiance) à partir des données expérimentales, dans le but d'évaluer la performance globale de la méthode.

Outils statistiques utilisés :

- **Méthode des moindres carrés** (droite de régression)
- **Estimateurs ponctuels** : moyenne, écart-type
- **Intervalles de confiance** : lois de Student et de Fisher

4.2 Validation de l'exactitude

1. Vérification de l'homogénéité des variances (test de Cochran)
2. Test de la significativité de la pente (test de Fisher)
3. Validation de l'ordonnée à l'origine (test de Student)
4. Calcul des intervalles de confiance des paramètres
5. Vérification du recouvrement moyen entre valeurs théoriques et mesurées

5. Fidélité selon le Guide SFSTP (1992)

5.1. Définition

La fidélité d'une méthode analytique exprime la proximité entre les résultats obtenus à partir de mesures répétées sur un même échantillon homogène, dans des conditions définies. Elle reflète la variabilité aléatoire (erreurs expérimentales) et se décompose en :

- **Répétabilité** : conditions identiques (même opérateur, même équipement, court intervalle de temps)
- **Reproductibilité** : conditions modifiées (différents jours, opérateurs, équipements ou laboratoires)

5.2 Estimation statistique

Les variances sont utilisées pour quantifier la fidélité :

- **Variance de répétabilité (S_r^2)** : variabilité intra-série
- **Variance de reproductibilité (S_R^2)** : somme des variances intra- et inter-séries

5.3 Plan d'expérience

- **Répétabilité** : au moins 6 essais dans un même groupe
- **Reproductibilité** : mesures sur plusieurs jours ou laboratoires (exemple : 3 séries indépendantes)
- **Conditions minimales** : 3 groupes ($k \geq 3$) avec 6 répétitions chacun ($n \geq 6$)

5.4 Validation des hypothèses statistiques

- **Normalité des données** : test de Shapiro-Wilk
- **Homogénéité des variances** : test de Cochran ou de Bartlett
- **Détection des valeurs aberrantes** : test de Dixon ou de Grubbs

5.5 Cohérence avec l'exactitude

Les variances de fidélité (**SR²**) et d'exactitude (**SE²**) doivent être comparées via un test de Fisher afin de vérifier leur compatibilité.

5.6 Applications

- **Contrôle qualité** : validation des méthodes analytiques en milieu pharmaceutique
- **Conformité réglementaire** : exigences des pharmacopées (USP), normes européennes (CEE), ISO 5725

Synthèse visuelle

Tableau 07 : Estimation de la fidélité – Paramètres clés et interprétation

Paramètre	Formule	Interprétation
Fidélité intra-laboratoire (Répétabilité)	$\hat{\sigma}_{Rep}^2 = \hat{\sigma}_{wj}^2$	Variabilité en conditions identiques (intra-groupe)
Fidélité inter-laboratoire (Reproductibilité)	$\hat{\sigma}_{FI}^2 = \hat{\sigma}_{wj}^2 + \hat{\sigma}_{Bj}^2$	Variabilité incluant les changements de conditions (intra + intergroupe)
CV Répétabilité	$100 \times \hat{\sigma}_{wj} \bar{X}_j$	Pourcentage de variabilité relative en conditions fixes
CV Fidélité	$100 \times \frac{\hat{\sigma}_{FI}}{\bar{X}_j}$	Pourcentage de variabilité relative en conditions variables

6. Limites de Quantification (LLOQ et ULOQ) selon le Guide SFSTP (1992)

6.1. Définition :

- **LLOQ (Lower Limit of Quantification)** : plus faible concentration de l'analyte pouvant être quantifiée avec une exactitude et une fidélité acceptables.
- **ULOQ (Upper Limit of Quantification)** : plus haute concentration au-delà de laquelle la réponse n'est plus linéaire ou les performances analytiques ne sont plus garantis

6.2 Détermination expérimentale :

- **Seuil de quantification (SQ)** :

$$SQ = 10 \times S_{blanc} \text{ (écart type du bruit de fond)}$$

- **Validation du seuil** :

Analyse de **6 échantillons préparés à la concentration du SQ**, puis vérification de

- **Fidélité (répétabilité)** : Coefficient de variation (**CV**) $\leq 5 \%$
- **Exactitude** : Recouvrement moyen entre **95 % et 105 %**

7. Robustesse Totale selon les documents SFSTP (1992)

7.1. Définition :

La **robustesse** d'une méthode analytique représente sa capacité à conserver ses performances (exactitude et fidélité) en dépit de **variations mineures** et intentionnelles des paramètres opératoires, tels que :

- **pH,**
- **température,**
- **débit,**
- **composition de la phase mobile,** etc.

7.2 Étude expérimentale – Plans Factoriels

- **Identification des paramètres critiques :**
Réalisée par étude préliminaire ou revue de la méthode.
- **Plan d'expérience recommandé :**
Exemple de **plan factoriel 2³** pour tester 3 paramètres à 2 niveaux chacun.
Cela permet :
 - D'estimer les **effets principaux**
 - D'évaluer les **interactions** éventuelles entre les facteurs

8. Stabilité selon le Guide SFSTP (1992)

8.1 Définition et objectifs

La stabilité d'une méthode analytique évalue sa **capacité à fournir des résultats fiables dans le temps**, malgré les conditions variables de stockage ou de préparation. Elle est particulièrement critique pour :

- **Éviter la dégradation** des analytes (échantillons sensibles, matrices biologiques),
- **Assurer la reproductibilité** sur plusieurs jours ou séries analytiques,
- **Garantir la fiabilité des résultats** en cas de délai entre prélèvement et analyse.

8.2 Méthodologie d'évaluation de la stabilité

8.2.1 Stabilité des solutions

- Préparation de solutions standards et d'échantillons à différentes concentrations.
- Stockage dans des conditions variables (lumière, température, humidité).
- Analyses à intervalles réguliers.
- Suivi de la **cinétique de dégradation** via la diminution de l'aire du pic chromatographique.
- Acceptabilité : **perte ≤ 10 %**.

8.2.2 Stabilité des réactifs

- Étude de l'impact du vieillissement sur la réponse analytique.
- **Dégradation forcée (stress testing)** : exposition à des conditions extrêmes (lumière, chaleur, oxydation) pour anticiper les dégradations possibles.

8.2.3 Stabilité de l'équipement

- Vérification de la **reproductibilité à long terme** (même appareil, même méthode).
- Analyse comparative des réponses obtenues sur plusieurs jours.

Conditions de Stockage :

Tableau 08 : Critères d'acceptabilité de la stabilité

Aspect étudié	Critère de performance	Valeur acceptable
Stabilité des solutions	Recouvrement moyen (%)	95 % - 105 %
Stabilité des réactifs	CV de répétabilité (%)	< 5 %
Stabilité de l'équipement	CV de reproductibilité (%)	< 10 %

IV. RÉSULTATS

2.1. Résultats :

2.1.1. Spécificité

La spécificité de la méthode a été étudiée par une approche statistique en comparant par un test t de student les pentes de la droite sur standard et celle sur la forme pharmaceutique reconstituée au risque α de 5%.

Les résultats sont présentés dans le tableau suivant

Tableau N 09: Résultats de l'étude de la spécificité

Comparaison des pentes a_1 et a_2 : METHODE SPECIFIQUE	t calculé	0,319
	$t^\circ (0,05, 26)$	2,056
	Condition	$t \text{ calculé} < t^\circ (0,05, 26)$
	Résultat	VRAI

2.1.2. Linéarité

Les données brutes de l'étude du paramètre linéarité sont présentées dans le tableau ci-dessous.

Tableau N° 10: Données brutes de l'étude de paramètre linéarité (gammes standard et forme pharmaceutique reconstituée)

% théorique	Masse PA introduite en mg	Aire du pic de l'amlodipine	% théorique	Masse PA introduite en mg	Aire du pic de l'amlodipine
60,00	16,50	1585933	60,00	16,54	1586022
	16,53	1592977		16,53	1587560
	16,47	1585791		16,56	1588434
80,00	22,01	2123355	80,00	22,02	2130797
	22,00	2121996		22,07	2130104
	22,00	2117346		22,05	2123810
100,00	27,51	2640696	100,00	27,54	2662687
	27,50	2666776		27,50	2652555
	27,51	2649162		27,51	2651821
120,00	33,00	3173396	120,00	33,05	3199976
	33,01	3185701		33,02	3184598
	33,00	3171500		33,00	3193582
140,00	38,50	3738219	140,00	38,56	3750891
	38,48	3754032		38,60	3748694
	38,48	3747324		38,51	3742366

Les droites de régression linéaires : aire de l'amlodipine en fonction de la masse du PA introduite sont présentées dans la figure ci-après ;

Figure N 01: Droite de régression linéaire sur PA

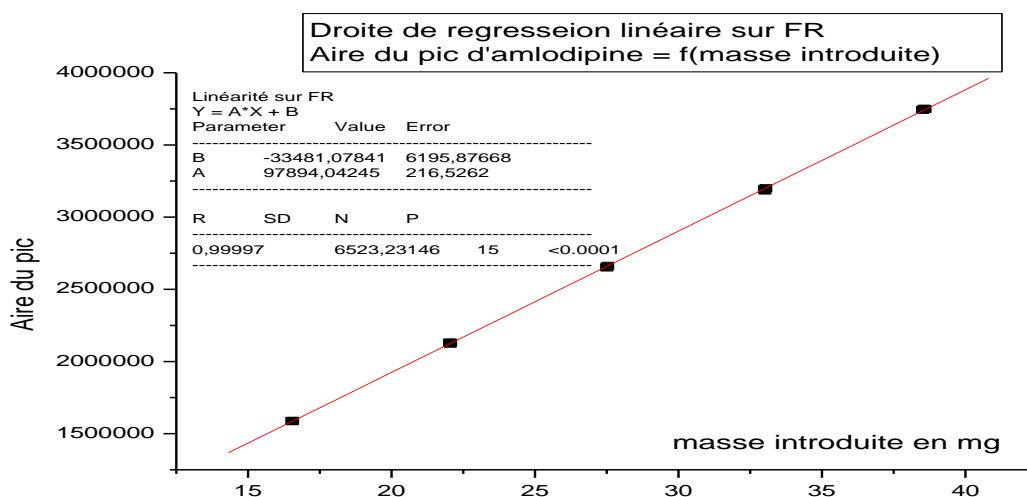


Figure N 02 : Droite de régression linéaire sur PA

Les droites obtenues pour les deux gammes sont exprimées comme suit

A. Droite de régression linéaire obtenue pour la gamme standard (PA seul)

$$y = 97\,517,74998x - 28\,172,98801$$

coefficient de détermination $R^2 = 0,9997$

B. Droite de régression linéaire obtenue pour la gamme Forme Pharmaceutique reconstituée

$$y = 97\,728,8703x - 30\,597,0006$$

coefficient de Détermination $R^2 = 0,9999$

Résultats de l'étude statistique de la linéarité

A. Comparaison des pentes a_1 et a_2 avec 0

Les résultats de comparaison des pentes des deux droites sur PA et FR sont présentés dans le tableau ci-dessous

Tableau N 11 : Résultats de la comparaison des pentes a_1 et a_2 avec 0

Pente droite standard : $a_1 =$	97728,87032	Pente droite FR : $a_2 =$	97894,04245		
Erreur pente $s_{a1} =$	469,5847336	Erreur pente $s_{a2} =$	216,5261981		
Comparaison de la pente a_1 avec 0	t calculé	208,118	Comparaison de la pente a_2 avec 0	t calculé	452,112
	$t^\circ(0,05, 13)$	2,160		$t^\circ(0,05, 13)$	2,160
	Condition	t calculé > t°		Condition	t calculé > t°
	Résultat	VRAI		Résultat	VRAI

B. Comparaison des ordonnées à l'origine b_1 et b_2

Les résultats de comparaison des ordonnées à l'origine des deux droites sur PA et FR sont présentés dans le tableau ci-dessous

Tableau N 12 : Résultats de la comparaison des ordonnées à l'origine b_1 et b_2

Comparaison des ordonnées à l'origine b_1 et b_2 : ABSENCE D'ERREURS SYSTEMATIQUES	t calculé	0,195
	$t^\circ(0,05, 26)$	2,056
	Condition	t calculé < $t^\circ(0,05, 26)$
	Résultat	VRAI

C. Comparaison des ordonnées à l'origine b_1 et b_2 avec 0

Les résultats de comparaison des ordonnées à l'origine des deux droites sur PA et FR avec 0 sont présentés dans le tableau ci-dessous

Tableau N 13: Résultats de la comparaison des ordonnées à l'origine b_1 et b_2

Ordonnées à l'origine standard : $b_1 =$	-30597,00058		Ordonnées à l'origine FR : $b_2 =$	-33481,07841	
Erreur pente $s_{b1} =$	13419,70583	Erreur pente $s_{b2} =$	6195,876683		
Comparaison de la pente b_1 avec 0	t calculé	2.280	Comparaison de la pente b_2 avec 0	t calculé	5,404
	$t^\circ (0,05, 13)$	2,160		$t^\circ (0,05, 13)$	2,160
	Condition	$t \text{ calculé} > t^\circ$		Condition	$t \text{ calculé} > t^\circ$
	Résultat	FAUX		Résultat	FAUX

2.1.3. Exactitude

Les résultats des indices de recouvrement pour le paramètre exactitude sont présentés dans le tableau ci-dessous

Tableau N° 14 : résultats des indices de recouvrement pour le critère exactitude

Linéarité sur gamme standard **Linéarité sur FR** **Index de recouvrement**

% théorique	Masse introduite (Concentration)	Aire du pic (absorbance)	Masse introduite (Concentration)	Aire du pic (absorbance)	
60	16,5	1585933,0000	16,54	1586022	100,01
	16,53	1592977,0000	16,53	1587560	100,17
	16,47	1585791,0000	16,56	1588434	100,04
80	22,01	2123355,0000	22,02	2130797	100,44
	22	2121996,0000	22,07	2130104	100,18
	22	2117346,0000	22,05	2123810	99,98
100	27,51	2640696,0000	27,54	2662687	100,07
	27,5	2666776,0000	27,50	2652555	99,84
	27,51	2649162,0000	27,51	2651821	99,77
120	33	3173396,0000	33,05	3199976	100,02
	33,01	3185701,0000	33,02	3184598	99,63
	33	3171500,0000	33,00	3193582	99,97
140	38,5	3738219,0000	38,56	3750891	100,35
	38,48	3754032,0000	38,60	3748694	100,18
	38,48	3747324,0000	38,51	3742366	100,25

Calcul de l'index de recouvrement moyen IRM $IRM = \frac{\sum IR}{N} = 100,06\%$

Calcul de l'intervalle de confiance de l'index de recouvrement $IC = IRM \mp \frac{t^\circ \sigma_{ech}}{N}$

IC = [99,94% - 100,18%]

2.1.4. Fidélité :

Les données brutes pour l'étude du paramètre de fidélité, série 1, 2 et 3 sont présentés dans les tableaux suivants

Tableau N° 15: Données brutes de l'étude de la fidélité – Série 1

Fidélité : SERIE 1			
N	Masse standard en mg		27,50
	Aire du pic de standard		2657230
	Masse introduite en mg	Aire du pic	% de recouvrement
1	27,50	2678361	100,795
2	27,51	2682719	100,923
3	27,50	2662845	100,211
4	27,50	2668857	100,438
5	27,51	2664992	100,256
6	27,51	2662088	100,146

Tableau N° 16 : Données brutes de l'étude de la fidélité – Série 2

Fidélité : SERIE 2			
N	Masse standard en mg		27,50
	Aire du pic de standard		2661245
	Masse introduite en mg	Aire du pic	% de recouvrement
1	27,50	2684523	100,875
2	27,51	2685245	100,865
3	27,49	2698158	101,424
4	27,51	2688491	100,987
5	27,50	2677918	100,627
6	27,50	2679481	100,685

Tableau N° 17 : Données brutes de l'étude de la fidélité – Série 3

Fidélité : SERIE 3			
N	Masse standard en mg		27,50
	Aire du pic de standard		2654771
	Masse introduite en mg	Aire du pic	% de recouvrement
1	27,50	2666655	100,448
2	27,51	2690851	101,322
3	27,50	2669592	100,558
4	27,50	2676247	100,809
5	27,49	2676219	100,845
6	27,50	2688224	101,260

Les résultats obtenus pour les paramètres de la fidélité et les coefficients de variation sont présentés dans le tableau ci-dessous

Tableau N° 18 : Résultats du paramètre fidélité

Nombre de groupes K	3
Nombre de mesure / groupe	6
T1 = $\sum n_j m_j$	1812,551
T2 = $\sum n_j m_j^2$	182522,582
T3 = $\sum SS_j^2$	0,314
T4 = $S(m_j - m')^2 / k - 1$	0,062
Variance de Répétabilité : $S^2_r = T3/K$	0,105
Variance inter groupe $S^2_g = T3 - S^2_r / 6$	0,045
Variance inter groupe $S^2_g = T3 - S^2_r / 7$	0,045
Variance de Fidélité $S^2_R = S^2_r + S^2_g$	0,149
CV Répétabilité 100 S_r / m'	0,3
CV de fidélité 100 S_r / m'	0,4

2.1.5. Limite de détection et limite de quantification :

Les données brutes, concentrations et hauteurs du pic de l'amlopidine sont présentés dans le tableau ci-dessous.

Tableau N° 19 : Données brutes de l'étude de la LOD/LOQ

% théorique	Masse (mg)	Concentration en $\mu\text{g/ml}$	HAUTEUR du pic Amlodipine
60,00	16,53	16,53	84702
	16,50	16,50	86646
	16,50	16,50	87205
80,00	22,01	22,01	112712
	22,00	22,00	115183
	22,01	22,01	115973
100,00	27,51	27,51	139882
	27,50	27,50	143959
	27,51	27,51	144024
120,00	33,02	33,02	167566
	33,01	33,01	171177
	33,00	33,00	172360
140,00	38,51	38,51	194869
	38,50	38,50	200601
	38,50	38,50	202237

La droite de régression linéaire Hauteur en fonction de la concentration est présentée dans la figure ci-dessous :

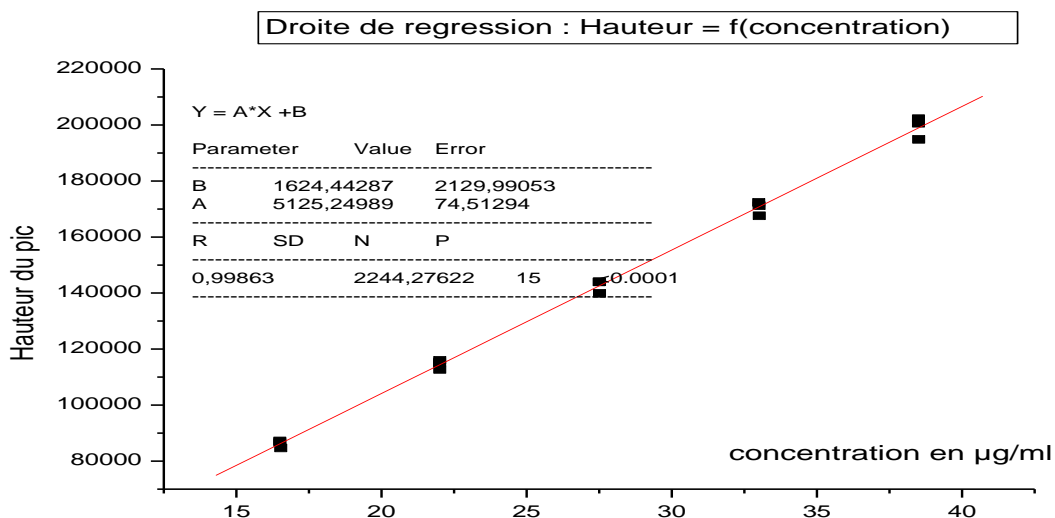


Figure N° 03: Droite de régression Hauteur du pic de l'amlodipine en fonction de la concentration

Les limites de détection (LOD) et de quantification (LOQ) sont calculées comme suit ;

$$LOD = \frac{3.3\sigma_B}{A} = 3.3 \frac{2129.99053}{5125.24989} = 1.37 \mu\text{g/ml}$$

$$LOQ = \frac{10\sigma_B}{A} = 10 \frac{2129.99053}{5125.24989} = 4.16 \mu\text{g/ml}$$

2.1.6. Robustesse :

Les données brutes de l'étude du paramètre robustesse sont présentés dans le tableau ci-dessous :

Tableau N° 20 : Données brutes de l'étude de la robustesse

Masse pour une teneur théorique de 27,50 mg 100%

N° de l'essai	A (teneur en %)	B (Débit de la phase mobile)	C (longueur d'onde)
1	80%	0,8	235
2	120%	0,8	235
3	80%	1,2	235
4	120%	1,2	235
5	80%	0,8	239
6	120%	0,8	239
7	80%	1,2	239
8	120%	1,2	239

Masse introduite - Échantillon				Masse - Standard				Teneur introduite (%)	Aire échantillon		Aire standard	Masse estimée	Réponse (Teneur en %)
22,00				27,50				80,00	2491849	3099327	22,11	80,40	
33,00	27,50	120,00	374038	3099327	33,19	120,68							

22,00		27,50		80,00	1665852	2074559	22,08	80,30	33,00	27,50	120,00	2493558	2074559	33,05	120,20
22,00	27,50			80,00	2557614	3186025	22,08	80,28							
33,00	27,50	120,00	374038	3099327	33,19	120,68									

22,00	27,50	80,00	171645	2132702	22,13	80,48
-------	-------	-------	--------	---------	-------	-------

33,00	27,50	120,00	2560594	2132702	33,02	120,06	
						Écart type	

	t°(0,05,7)	2,36
--	-------------------	-------------

Les résultats de l'étude de la robustesse de la méthode (intervalle de confiance des effets des paramètres et de leurs interactions) sont présentés dans le tableau suivant :

Tableau N° 21 : Résultats de l'étude de la robustesse

		Essai			Facteurs			Interactions			
A	B	C	AB	AC	BC	ABC					
1	-80,40	-80,40	-80,40	80,40	80,40	80,40	-80,40				
2	120,68	-120,68	-120,68	-120,68	-120,68	120,68	120,68				
3	-80,30	80,30	-80,30	-80,30	80,30	-80,30	80,30				
4	120,20	120,20	-120,20	120,20	-120,20	-120,20	-120,20				
5	-80,28	-80,28	80,28	80,28	-80,28	-80,28	80,28				
6	120,03	-120,03	120,03	-120,03	120,03	-120,03	-120,03				
7	-80,48	80,48	80,48	-80,48	-80,48	80,48	-80,48				
8	120,06	120,06	120,06	120,06	120,06	120,06	120,06				
		Somme			159,51	-0,34	-0,73	-0,56	-0,85	0,83	0,21
		Effet			19,94	-0,04	-0,09	-0,07	-0,11	0,10	0,03
Intervalle de confiance	Limite inférieur	2,12	-17,86	-17,91	-17,89	-17,93	-17,72	-17,79			
	Limite supérieur	37,76	17,78	17,73	17,75	17,72	17,92	17,85			

2.2. Discussion :

2.2.1 Spécificité :

Le test t de student appliqué à la comparaison des pentes des droites standard (STD) et celle de la forme pharmaceutique reconstituée (FR) a donné une valeur de t calculée de 0.319 inférieure à la valeur seuil de 2,056 lue sur la table de student pour un risque α de 5% et un degré de liberté de 26.

Les deux pentes sont donc comparables au risque de 5 % et la méthode est jugée spécifique.

2.2.2. Linéarité :

- Les droites de régression linéaire des deux droites sur standard et sur la forme pharmaceutique reconstituée a donné des coefficients de détermination respectivement $R^2 = 0,9997$ et $R^2 = 0,9999$. Ce qui indique que la régression corrèle plus de 99% de réponses estimées aux réponses expérimentales.
- La comparaison des pentes des deux droites STD et FR par un test de student a donné deux valeurs respectivement de $t_{cal-a_1}=208,118$ et $t_{cal-a_2}= 452,112$ supérieures à la valeur seuil de 2.160 lue sur la table de student pour un risque α de 5% et un degré de liberté de 13. Ce qui signifie que les deux pentes a_1 et a_2 sont significatives au risque de 5% a donné une valeur de t calculée de 0.195 inférieure à la valeur seuil de 2,056 lue sur la table de student pour un risque α de 5% et un degré de liberté de 26. Ce qui signifie de l'absence des erreurs systématiques.
- La comparaison des ordonnées à l'origine des deux droites STD et FR par un test de student a donné deux valeurs respectivement de $t_{cal-b_1}=2,280$ et $a_2= 5,404$ supérieures à la valeur seuil de 2.160 lue sur la table de student pour un risque α de 5% et un degré de liberté de 13.. Ce qui signifie qu'en analyse de routine il est recommandé de préparer une gamme d'étalonnage pour la quantification des échantillons.

2.2.3. Exactitude :

Le test d'ANOVA appliqué aux index de recouvrement des concentrations estimées de la FR a montré une homogénéité des variances avec un test de Cochran concluant et une validité des moyennes. L'index de recouvrement moyen IRM est de 100,06% et un intervalle de confiance de **99,94% à 100,18%** incluant la valeur de référence de 100%. **La méthode est jugée exacte.**

2.2.4. Fidélité :

Le test d'ANOVA appliqué aux facteurs de recouvrement des concentrations estimées des échantillons 100% des trois séries de la fidélité a montré une homogénéité des variances avec un test de Cochran concluant et une validité des moyennes. Les coefficients de variation de répétabilité et de fidélité intermédiaire sont respectivement de 0,3% et 0,4% inférieures à la norme de 2,0%. **La méthode est jugée fidèle.**

2.2.5. Limites de détection et de quantification

Les valeurs de la LOD et de la LOQ sont respectivement égales à 1.37 $\mu\text{g/ml}$ et 4,16 $\mu\text{g/ml}$ correspondant à des concentrations relatives de 4,98% et de 15,1% relevant des faibles concentrations

2.2.6. Robustesse :

Les intervalles de confiances calculées pour les trois facteurs étudiés en occurrence :

- Le paramètre A : Teneur, intervalle de confiance de 2.12 – 37,76. Cet intervalle ne contient pas la valeur cible de 0. La méthode est jugée non robuste pour le paramètre teneur. Chose prévisible car la méthode est déjà jugée linéaire.

- Les paramètres B (débit de la phase mobile) et C (longueur de détection) ont donné des intervalles de confiance respectivement de -17,89 – 17,78 et 17,91 – 17,73. Ces deux intervalles contiennent la valeur cible 0, ce qui signifie que la méthode est robuste pour les variations délibérées des deux paramètres débit de la phase mobile et longueur d'onde de détection.
- Les interactions des facteurs AB, AC, BC et ABC ont toutes donné des intervalles de confiance contenant la valeur cible 0. Ce qui signifie que la méthode est robuste pour ces interactions.

La méthode de dosage de l'Amlodipine bésilate dans le produit fini comprimé est jugée spécifique, linéaire dans l'intervalle de 60 à 140%, exacte, fidèle, une LOD de 1,37µg/ml, une LOQ de 4,16µg/ml et robuste pour les paramètres débit de la phase mobile dans un intervalle de 0,8 – 1,2 ml/mn et la longueur d'onde dans l'intervalle d'onde de 235 – 239 nm.

La méthode est jugée valide.

V.CONCLUSION

La présente étude a été conduite au sein du laboratoire de contrôle qualité de l'établissement pharmaceutique **CYTOLAB**, localisé à Azazga, dans la région de Tizi Ouzou.




Dans un premier temps, après une série d'analyses, nous avons mis au point une méthode de **dosage simultané de l'amlodipine bésilate et de l'impureté A par HPLC**, appliquée à **une nouvelle forme pharmaceutique en gélule** dosée à 5 mg d'amlodipine bésilate.

La méthode a été validée conformément aux recommandations de la commission **SFSTP (1992)**, reposant sur l'évaluation séparée des paramètres analytiques.

- La méthode a démontré une **spécificité** satisfaisante pour le dosage de l'Amlodipine bésilate et de l'impureté A.
- Les **coefficients de variation** obtenus pour la **répétabilité et la fidélité intermédiaire** sont inférieures aux normes acceptées, attestant de la **fidélité** de la méthode.
- La méthode est **exacte**, avec un **taux de récupération moyen de 100.06%** , confirmant sa fiabilité pour le dosage de la substance active.
- Elle présente une **linéarité satisfaisante** dans un intervalle de dosage de **60 % à 140 %** pour les deux composés.
- Enfin, la méthode s'est révélée robuste vis-à-vis des variations délibérées de deux paramètres : **le débit de la phase mobile et la longueur d'onde de détection.**

La méthode de dosage simultané par HPLC de l'Amlodipine bésilate et de l'impureté A, dans des gélules dosées à 5 mg, est considérée comme **valide** dans **un intervalle de 60 % à 140 %**, répondant ainsi aux exigences de qualité analytique

Références bibliographiques (Sources scientifiques et pharmacologiques) :

1. **PubChem**. Amlodipine besylate [Internet]. Bethesda (MD): National Library of Medicine; 2024 [cited 2024 Jul 10]
2. USP <711> Dissolution
3. United States Pharmacopeia and National Formulary (USP-NF). USP <711> Dissolution. Rockville, MD: United States Pharmacopeial Convention.
4. USP Official Monograph (accès via abonnement, mais référencé dans la littérature scientifique sur Google Scholar).
5. ICH Q2(R1) – Validation of Analytical Procedures: Text and Methodology
6. International Council for Harmonisation of Technical Requirements for Pharmaceuticals for Human Use (ICH).
7. Source officielle : ICH Guideline Q2(R1)
8. SFSTP (1992) – Validation of analytical methods
9. Hubert, P., Chiap, P., Crommen, J., Boulanger, B., Chapuzet, E., Mercier, N., ... & Valat, L. (1999). The SFSTP guide on the validation of analytical methods for pharmaceuticals. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 21(5), 723–753.
10.  PubMed PMID: 10704196
11. Application of USP <711> Dissolution & validation
12. Singhvi, I., & Goyal, A. (2007). A novel approach for simultaneous UV-spectrophotometric estimation of amlodipine besylate and atorvastatin calcium in tablet dosage form. *Indian Journal of Pharmaceutical Sciences*, 69(1), 110.
13.  PubMed Central (PMC)
14.  Reformulation avec sources
15. Cette étude s'inscrit dans une démarche de validation analytique rigoureuse visant à garantir la conformité réglementaire et la maîtrise des risques analytiques.
16. **DrugBank Online**. Amlodipine besylate (DB00381, DBSALT001143) [Internet]. Alberta (CA): DrugBank; 2024 [cited 2024 Jul 10].
17. **U.S. Food and Drug Administration (FDA)**. Norvasc® (amlodipine besylate) tablets label [Internet]. Silver Spring (MD): FDA; 2011 [updated 2011; cited 2024 Jul 10].
18. **World Health Organization (WHO)**. International Pharmacopoeia: Amlodipine besylate [Internet]. Geneva: WHO; 2024 [cited 2024 Jul 10]

19. **International Council for Harmonisation (ICH)**. Validation of Analytical Procedures: Text and Methodology Q2(R1) [Internet]. Geneva: ICH; 2005 [cited 2024 Jul 10].
20. **U.S. Food and Drug Administration (FDA)**. Analytical Procedures and Methods Validation for Drugs and Biologics [Internet]. Silver Spring (MD): FDA; 2015 [cited 2024 Jul 10].
21. **National Center for Biotechnology Information (NCBI)**. Calcium Channel Blockers [Internet]. In: StatPearls [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2024 [updated 2024 Jan; cited 2024 Jul 10]. Available from: **American Heart Association (AHA)**. 2023 AHA/ACC Guideline for the Management of Hypertension [Internet]. Dallas (TX): AHA; 2023 [cited 2024 Jul 10]. **Huber L. Validation and Qualification in Analytical Laboratories**. New York: CRC Press; 2007.

Annexe – Glossaire des abréviations et notations

- **Analyte** : Entité physique ou chimique objet de la procédure d'analyse.
- **ANSM** : Agence Nationale de Sécurité du Médicament et des Produits de Santé.
- **Blanc analyte** : Essai réalisé sur une matrice ne contenant pas l'analyte.
- **Blanc réactif** : Essai réalisé sans matrice, uniquement avec les réactifs.
- **BPP** : Bonnes Pratiques de Préparation.
- **Bruit de fond** : Signal parasite d'arrière-plan pouvant affecter la mesure.
- **Capabilité** : Aptitude d'un procédé à satisfaire les exigences spécifiées.
- **CHU** : Centre Hospitalo-Universitaire.
- **Coefficient de corrélation (R)** : Mesure de la force de la relation linéaire entre deux variables (valeurs de -1 à +1).
- **Coefficient de détermination (R²)** : Mesure de la qualité d'ajustement d'une régression linéaire (valeurs de 0 à 1).
- **Coefficient de variation (CV)** : Rapport de l'écart-type à la moyenne, exprimé en pourcentage.
- **COFRAC** : Comité Français d'Accréditation.
- **Courbe d'étalonnage** : Courbe représentant la relation entre la réponse analytique et la concentration de l'analyte.
- **CSP** : Code de la Santé Publique.
- **DAD** : *Diode Array Detector*, détecteur UV à réseau de diodes utilisé en chromatographie.
- **Écart-type (σ)** : Mesure de la dispersion des valeurs autour de la moyenne.
- **Échantillon d'étalonnage** : Échantillon de concentration connue, utilisé pour établir une courbe d'étalonnage.
- **Échantillon de validation** : Échantillon reconstitué à des concentrations définies pour vérifier les performances de la méthode.
- **Étalon** : Substance de référence utilisée comme standard pour la quantification.
- **Étalonnage** : Procédure visant à établir la relation entre la réponse d'un instrument et les valeurs connues d'un étalon.
- **Étalon interne** : Substance de référence ajoutée à l'échantillon avant l'analyse pour corriger les variations analytiques.
- **FI (Fidélité intermédiaire)** : Fidélité mesurée dans des conditions variables maîtrisées (ex. : plusieurs jours ou opérateurs).
- **HPLC** : *High Performance Liquid Chromatography*, ou chromatographie liquide haute performance.
- **ICH** : *International Council for Harmonisation*, organisme d'harmonisation des normes pharmaceutiques internationales.
- **Impureté A** : Composé apparenté de l'amlodipine, défini dans les pharmacopées.
- **IUPAC** : *International Union of Pure and Applied Chemistry*, organisation internationale de chimie.
- **LD** : Limite de Détection.
- **LQ** : Limite de Quantification.
- **MS** : *Mass Spectrometry*, ou spectrométrie de masse.
- **OCC** : *Operating Characteristic Curves*, ou courbes de performance utilisées dans le contrôle qualité.
- **OMS** : Organisation Mondiale de la Santé.
- **P** : Proportion.
- **PA** : Principe Actif (ex. : amlodipine bésilate).
- **SCE** : Somme des Carrés des Écarts.
- **SFSTP** : Société Française des Sciences et Techniques Pharmaceutiques.
- $\hat{\sigma}_{wj}^2$: Variance intra-groupe, utilisée pour mesurer la répétabilité.
- $\hat{\sigma}^2_{Bj}$: Variance inter-groupe, utilisée pour mesurer la reproductibilité.
- \bar{X}_j : Moyenne des mesures obtenues pour un groupe donné.