

N° d'ordre :
REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE
MINISTERE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR ET DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE

UNIVERSITE DE MOULOU D MAMMERI DE TIZI-OUZOU
FACULTE DES SCIENCES

DEPARTEMENT DE CHIMIE



MEMOIRE

Présenté pour obtenir le Grade de

MASTER

Filière : Chimie

Spécialité : Chimie pharmaceutique

Par

Mme BENALI Sihem

Thème

**VALIDATION D'UNE METHODE DE DOSAGE DE
L'ASPIRINE DANS LES COMPRIMES DE 500 mg**

Soutenu le : 11 juillet 2012, devant le jury composé de :

Mme	AYATI	Fadhila	MCB	UMMTO	Présidente
Mme	KESSAL	Feta	MCB	UMMTO	Examinatrice
Mme	TOUZOUIRT	Saïda	MCB	UMMTO	Examinatrice
Mme	BELMAHDI	Leila	MCB	UMMTO	Co-promotrice
Mr	MAMOU	Marzouk	MAHU	UMMTO	Promoteur

Remerciements

Je tiens à exprimer ma gratitude envers Dieu de m'avoir guidé dans la réalisation de ce travail.

Dr MAMOU
Promoteur

Je vous adresse mes remerciements les plus sincères pour m'avoir encadré, accepté dans votre laboratoire et d'avoir mis à ma disposition les moyens nécessaires
« Laboratoire de pharmacie analytique département de médecine université de Mouloud Mammeri de Tizi Ouzou ».

Mme L. BELMAHDI
Co-promotrice

Je vous prie madame de trouver ici l'expression de ma profonde gratitude pour m'avoir encadré, suivi et conseillé.

Je désire exprimer ma profonde et sincère reconnaissance pour les membres de jury qui ont acceptés d'examiner mon travail :
La présidente : **Mme F.AYATI, Mme F.KESSAL** et **Mme S.TOUZOUIRT** les autres membres de jury.

Je désire exprimer mes remerciements à **M^{me} FERNANE ; Mr M.HALOUANE ;** sans oublier l'ensemble du personnel du laboratoire analytique pour leurs aides et conseils : **Mme BERKOUN ; Mme CHEBALA ; Mme FETHI.**

Et enfin, Je tiens à remercier toute la promo **master II chimie pharmaceutique 2011 - 2012.**

Dédicace

J e dédie humblement ce modeste travail :

A ux êtres les plus chères au monde, mes parents à qui je dois ma reconnaissance et ma gratitude pour leur grand sacrifice et dévouements qu'ils ont fait pour mon éducation et mon instruction, que Dieu les garde et les protège

A mes deux anges A mina et O mia

A ma sœur L eila et mon frère M charred

A ma cousine H assina; son mari et ses enfants : A sma; H amid;

K hair-E ddine et la petite A ya

A toute ma famille

A mes amies : O uiza; S ara et Yasmine

A toute la famille A it S äid en particulier yema O uiza et vava

A hmed

*A mon mari qui n'a jamais cessé de croire en moi
S ource d'amour et de tendresse
S ans toi cette thèse n'aurait jamais vu le jour...*

S ihem

SOMMAIRE

Introduction générale.....	01
----------------------------	----

SYNTHESE BIBLIOGRAPHIQUE

CHAPITRE I : Aspirine

Introduction	02
1. Généralités	
1.1. Historique	03
1.2. Synthèse de l'aspirine.....	04
1.3. Propriétés physico-chimiques	05
2. Effets pharmacologiques de l'aspirine	
2.1. Effet anti-inflammatoire.....	05
2.2. Action antalgique	06
2.3. Effet antipyrétique	06
2.4. Effet hématologique	06
2.5. Effet gastro-intestinaux	06
2.6. Effets gynéco-obstétricaux	07
3. Pharmacocinétique	
3.1. Résorption dans l'estomac et dans l'intestin grêle.....	07
3.2. Distribution dans tout l'organisme	07
3.3. Métabolisme et élimination	08

4. Mode d'action de l'aspirine	08
5. Toxicologie	
5.1 Intoxication	
5.1.1. Fréquence	09
5.1.2. Clinique	09
5.2.Traitement.....	10
6. Indications	
6.1. Douleur, fièvre et inflammation	11
6.2. Maladies cardio-vasculaires	11
6.3. Réduction d'un risque de cancer.....	12
6.4. Fécondation.....	12
7. Contre indication.....	12
8. Aperçu bibliographique sur l'analyse de l'aspirine.....	13
Conclusion.....	14

CHAPITRE II : principes généraux de la validation

Introduction	15
1. Définition.....	15
2. But de la validation	16
3. Validation analytique	16
4. Historique.....	17
5. Aspect réglementaire	

5.1. Deux guidelines ICH.....	18
5.2. SFSTP.....	19
6. Critères de validation analytique.....	19
6.1. Spécificité	20
6.2. Linéarité	21
6.3. Exactitude.....	22
6.4. Fidélité.....	22
6.4.1. Répétabilité	22
6.4.2. Précision intermédiaire.....	22
6.4.3. Reproductibilité	22
6.5. Limite de détection LOD	23
6.6. Limite de dosage	23
6.7. Domaine d'utilisation	23
6.8. Robustesse	
6.8.1. Définition de la robustesse.....	23
6.8.2. Plan d'expérience.....	24
Conclusion.....	24

Partie expérimentale

Introduction.....	25
1. Matériels et méthodes	

1.1. Matériels	
1.1.1. Matières premières et réactifs	25
1.1.2. Appareillage Equipements.....	26
1.1.3. Verreries	26
1.2. Méthodes	
1.2.1. Préparation des solutions	26
1.2.1.1. Solutions de HCl et NaOH	26
1.2.1.2. Indicateurs colorés.....	27
1.2.1.3. Solutions du standard et de l'échantillon.....	28
1.2.2. Vérification des titres	30
1.2.3. Validation analytique	
1.2.3.1. Spécificité	32
1.2.3.2. Linéarité	32
1.2.3.2.1. Protocole	32
1.2.3.2.2. Analyse statistique	34
Ø Calcul de la pente	34
Ø Calcul de l'ordonnée à l'origine	34
Ø Calcul du coefficient de corrélation.....	34
Ø Test de comparaison de l'ordonnée à l'origine avec le zéro	35
Ø Changement de variable	35
Ø Test d'homogénéité des variances	35
Ø Test d'existence d'une pente significative	36
Ø Test de validité de la droite de régression	36
1.2.3.3. Exactitude	
1.2.3.3.1. Protocole.....	37

1.2.3.3.2. Analyse statistique	37
Ø Système de référence considéré : étalon 100%	37
Ø Vérification de l'homogénéité des variances liées	37
Ø Test de validité des moyennes	38
Ø Estimation du recouvrement moyen	38
 1.2.3.4. Fidélité	
1.2.3.4.1. Protocole	39
1.2.3.4.2. Analyse statistique	40
Ø Conditions de répétabilité	40
Ø Conditions de fidélité intermédiaire	40
Ø Système de référence considéré : étalon 100%.....	40
Ø Moyenne des groupes	40
Ø Dispersion à l'intérieur des groupes de mesures	41
Ø Test d'homogénéité des variances à l'intérieure des groupes (Test de Cochran).....	41
Ø Variance de répétabilité.....	41
Ø Variance intergroupes	42
Ø Variance de fidélité intermédiaire	42
Ø Coefficient de variation de répétabilité.....	42
Ø Coefficient de variation total	42
 2. RESULTATS ET DISCUSSION	
2.1. Spécificité.....	43
2.2. Linéarité	43
2.2.1. Données brutes	43
2.2.2. Courbe d'étalonnage.....	44
2.2.3. Test de comparaison de l'ordonnée à l'origine avec le zéro	46
2.2.4. Changement de variable	47
2.2.5. Test d'homogénéité des variances	48

2.2.6. Test d'existence d'une pente significative	49
2.2.7. Test de validité de la droite de régression	50
2.3. Exactitude	53
2.3.1. Système de référence considéré : étalon 100%	53
2.3.2. Vérification de l'homogénéité des variances liées (test de Cochran)	54
2.3.3. Test de validité des moyennes	54
2.3.4. Estimation du recouvrement moyen	56
2.4. Fidélité	57
2.4.1. Données brutes.....	57
2.4.2. Système de référence considéré : étalon 100%.....	59
2.4.2.1. Transformation des données brutes en quantités retrouvées	59
2.4.2.2. Détermination des pourcentages de recouvrement.....	59
2.4.3. Moyenne des groupes	60
2.4.4. Dispersion à l'intérieur des groupes de mesures.....	60
2.4.5. Test d'homogénéité des variances à l'intérieure des groupes (Test de Cochran)	60
2.4.6. Variance de répétabilité	61
2.4.7. Variance intergroupes	62
2.4.8. Variance totale	62
2.4.9. Coefficients de variations	63
Conclusion	63
Conclusion générale	64
Références bibliographiques	

Annexe

ABREVIATIONS

I. EN LETTRES LATINES

AAS : acide acétyle salicylique

AINS : anti inflammatoire non stéroïdien

AS : acide salicylique

CPG : chromatographie en phase gazeuse

CFR : Federal Code of Regulations

C_{commerciale} : concentration de HCl commerciale

C_{filie} : concentration de HCl voulu

C₁ = C_{HCl} : concentration de HCl calculé à partir de bicarbonate de sodium

C₂ = C_{NaOH} : concentration de NaOH calculée

Eq : équivalent

ICH : International Conference on Harmonization

LOD : limite de détection

m : masse introduite (pesée)

M : masse molaire

N_{eq} : nombre d'équivalent

N : nombre de milli mole de NaOH consommée

PA : Principe actif

PMA : Pharmaceutical Manufacturers Association

Q2 : Analytical Validation

Q2A : Text on Validation of Analytical Procedures

Q2B : Methodology

Q_{AAS} : quantité d'équivalent en AAS

Q_{NaOH} : quantité d'équivalent en NaOH

Q_{HCl} : quantité d'équivalent en HCl

SFSTP : Société Française des Sciences Techniques et Pharmaceutiques

V_{prélevé} : volume de HCl prélevé

V_{Préparé} : volume de HCl voulu

V_{HCl} = V₁ : volume de HCl prélevé

V_2 : volume de NaOH (chute de burette)

V_t : volume total introduit

II. LES PARAMETRES STATISTIQUES :

a : pente de la droite de régression.

b : ordonnée à l'origine de la droite de régression.

C : test Cochran.

CV : coefficient de variation.

F : test de Fisher.

IRM : intervalle de confiance du recouvrement moyen RM .

K : nombre de groupe.

m_j : moyenne de n_j valeurs du groupe j.

n_j : nombre d'observation du groupe j.

NDL ou DDL : nombre de degrés de liberté.

r : coefficient de corrélation.

S : écart type estimé de n valeurs.

S_b : écart type de l'ordonnée à l'origine.

S^2 : variance.

S_J : écart type à l'intérieure du groupe j.

S_j^2 : la variance des répétitions à l'intérieure du groupe.

S_R^2 : variance de de répétabilité.

S_g^2 : variance inter-groupes.

t : test de Student.

X_{ij} : valeur brute indépendante

Y_{ij} : valeur brute dépendante.

α : risque d'erreur

LISTE DES SCHEMAS

Schéma1 : La réaction de la synthèse de l'aspirine	04
Schéma2 : Stratégie statistique de la linéarité	21
Schéma3 : Etapes de préparation d'une solution standard.....	28
Schéma4 : Etapes de préparation d'une solution d'échantillon.....	29
Schéma5 : Etapes des essais réalisés de la linéarité	33
Schéma6 : Etapes des essais réalisés de la fidélité	39
Schéma7 : courbe d'étalonnage sur forme reconstitué	45

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1 : Propriétés physico-chimiques de l'aspirine.....	05
Tableau 2 : Tableau récapitulatif des critères de validation.....	19
Tableau 3 : Test d'existence d'une pente significative.....	36
Tableau 4 : Test de validité de la droite de régression	37
Tableau 5 : Test de validité des moyennes	38
Tableau 6 : Moyenne des groupes.....	40
Tableau 7 : Tableau des variances et des NDL.....	41
Tableau 8: Essais de spécificité	43
Tableau 9 : Donnés brutes pour la linéarité.....	43
Tableau 10 : Données pour la courbe d'étalonnage	44
Tableau 11 : Résultats tirés de la courbe.....	45
Tableau 12: Test de comparaison de l'ordonnée à l'origine avec le zéro.....	46
Tableau 13 : Résultats du changement de variable.....	47
Tableau 14 : Teste d'homogénéité des variances.....	48
Tableau 15 : Calculs intermédiaires pour le test d'existence d'une pente significatif.....	49
Tableau 16 : Test d'existence d'une pente significative	50
Tableau 17 : Calculs intermédiaires pour le test de validité de la droite de régression.....	50
Tableau 18: Test de validité de la droite de régression.....	51
Tableau 19: Tableau récapitulatif de la linéarité.....	52
Tableau 20: Données brutes pour l'exactitude	53
Tableau 21 : Test de l'homogénéité des variances liées.....	54

Tableau 22 : Calculs intermédiaires pour le test de validité des moyennes.....	55
Tableau 23 : Teste de validité des moyennes.....	55
Tableau 24 : Estimation du recouvrement moyen	56
Tableau 25 : Données brutes J1 fidélité.....	57
Tableau 26 : Données brutes J2 fidélité.....	58
Tableau 27 : Données brutes J3 fidélité.....	58
Tableau 28 : Les masses estimées.....	59
Tableau 29 : Les pourcentages de recouvrement.....	59
Tableau 30 : Moyenne des groupes	60
Tableau 31 : Dispersion à l'intérieur des groupes	60
Tableau 32 : Teste d'homogénéité des variances à l'intérieure des groupes.....	61
Tableau 33 : Variance de répétabilité	61
Tableau 34 : Variance intergroupes	62
Tableau 35 : Coefficients de variations	63

Introduction générale

L'acide acétylsalicylique, plus connu sous le nom d'aspirine, est la substance active de nombreux médicaments aux propriétés analgésiques, antipyrétiques et anti-inflammatoires. Il est aussi utilisé comme antiagrégant plaquettaire. C'est un anti-inflammatoire non stéroïdien.

De nombreuses méthodes ont été décrites pour le dosage de l'acide acétylsalicylique et de l'acide salicylique dans les médicaments. Pour pouvoir être utilisées, ces méthodes doivent être validées. Le but de la validation est de produire des résultats fiables et reproductibles.

L'objectif de notre étude concerne d'une part de minimiser les erreurs expérimentales, et d'autre part de valider la méthode de dosage titrimétrique d'aspirine dans des comprimés de 500mg décrite dans la pharmacopée britannique.

Notre mémoire sera divisé en deux parties distinctes :

Nous introduirons le sujet dans la première partie par une synthèse bibliographique qui permettra au lecteur de se familiariser avec la molécule d'aspirine, ses méthodes de dosages existantes en théorie et la possibilité de leurs validations. Les différents critères de la validation analytique seront largement (définis) commentés.

La deuxième partie comprend l'étude expérimentale qui consiste en une validation d'une méthode de dosage d'aspirine par titrimétrie en vérifiant les critères de la validation analytique conformément au protocole de la commission SFSTP. Le traitement des résultats a été effectué à l'aide du logiciel ORIGIN 6.0.

Introduction

1. Généralités

1.1. Historique

1.2. Synthèse de l'aspirine

1.3. Propriétés physico-chimiques

2. Effets pharmacologiques de l'aspirine

3. Pharmacocinétique

4. Mode d'action de l'aspirine

5. Toxicologie

6. Indications

7. Contre indication

8. Aperçu bibliographique sur l'analyse de l'aspirine

Conclusion

Introduction :

Les anti-inflammatoires, antalgiques et antipyrétiques forment une vaste famille de composés très hétérogène puisqu'ils sont constitués de substances aux structures chimiques très Diverses. Néanmoins, ces produits présentent des propriétés communes tant au point de vue de leurs actions thérapeutiques que de leurs effets indésirables. Le prototype de ces drogues, que nous prendrons comme substance de référence, est l'aspirine, qui avec les autres médicaments constitue la classe des anti-inflammatoires non stéroïdiens ou AINS.

L'aspirine est la compagne fidèle de l'homme souffrant, depuis le nourrisson jusqu'au vieillard rhumatisant. Elle est l'un des plus anciens médicaments utilisée et encore actuellement commercialisée sous plus d'une centaine de présentations commerciales : effervescente ou non ; enrobée ; tamponnée ; en comprimés ; suppositoires ou ampoules ; elle se présente seule ou associée à d'autres produits.

Au cours de ce chapitre, nous nous sommes principalement attachés à la molécule d'acide acétylsalicylique.

Dans une première partie, nous présenterons quelques généralités sur l'aspirine suivies d'une deuxième partie expliquant la pharmacocinétique de cette molécule, le mécanisme d'action, indications et contre indications. Une dernière partie sera consacrée à une synthèse bibliographique sur les méthodes d'analyses de l'AAS.

1. Généralités:

1.1. Historique :

A l'aube du troisième millénaire, l'aspirine ne cesse de nous étonner. Si l'histoire pharmaceutique de l'acide acétylsalicylique est relativement récente, l'utilisation de plantes qui secondairement s'avèreront contenir des salicylates remonte à l'Antiquité. Initialement utilisée sous forme de décoctions à base de feuilles ou d'écorce de saule par les Egyptiens et les Sumériens puis par Hippocrate, pour prévenir les douleurs de l'enfantement, et plus tard par le révérend Edward Stone (premier auteur à montrer scientifiquement son efficacité) pour traiter les fièvres, il fallut attendre le XIXe siècle pour découvrir le principe actif, et les caractéristiques de la salicine. Si Charles-Frédéric Gerhardt, chimiste français, fut le premier à obtenir l'acide acétylsalicylique, sans toutefois le reconnaître, c'est Félix Hoffmann qui redécouvrant la molécule et l'utilisant chez son père rhumatisant, laissa son nom à la postérité en tant que découvreur de l'aspirine permettant, du même coup, le développement international des laboratoires Bayer. Connue dans un premier temps pour ses propriétés antalgiques, anti-inflammatoires et antipyrétiques, l'acide acétylsalicylique fut secondairement employé comme anti-thrombotique, dont la compréhension du mécanisme d'action sur l'inhibition de la synthèse des prostaglandines valut à sir John Vane le prix Nobel de médecine en 1982. La découverte récente de deux formes de cyclo-oxygénase (COX-1 étant présente de manière constitutive alors que COX-2 n'est synthétisée que sous l'action de stimuli chimiques inflammatoires) ouvre de nouvelles voies de recherche thérapeutique, COX-2 devenant une véritable cible thérapeutique pour les molécules du futur. Après plus de deux siècles d'évaluation chez l'homme, l'aspirine est toujours d'actualité, ce d'autant qu'il n'est pas exclu que de nouvelles indications potentielles soient envisagées. [1]

1.2. Synthèse de l'aspirine :

Le principe actif de l'aspirine est une molécule qui ne se trouve pas dans la nature. Elle est obtenue après modification d'une espèce naturelle contenue dans **les fleurs de reine de près** ou dans **l'écorce de saule**.

Pour synthétiser l'acide acétylsalicylique à partir de l'acide salicylique, il faut que les conditions expérimentales soient scrupuleusement respectées.

Pour résumer la réaction de la synthèse :

Une réaction d'estérification est une réaction entre une fonction alcool (OH) et une fonction

acide  pour donner un ester et de l'eau. [2]

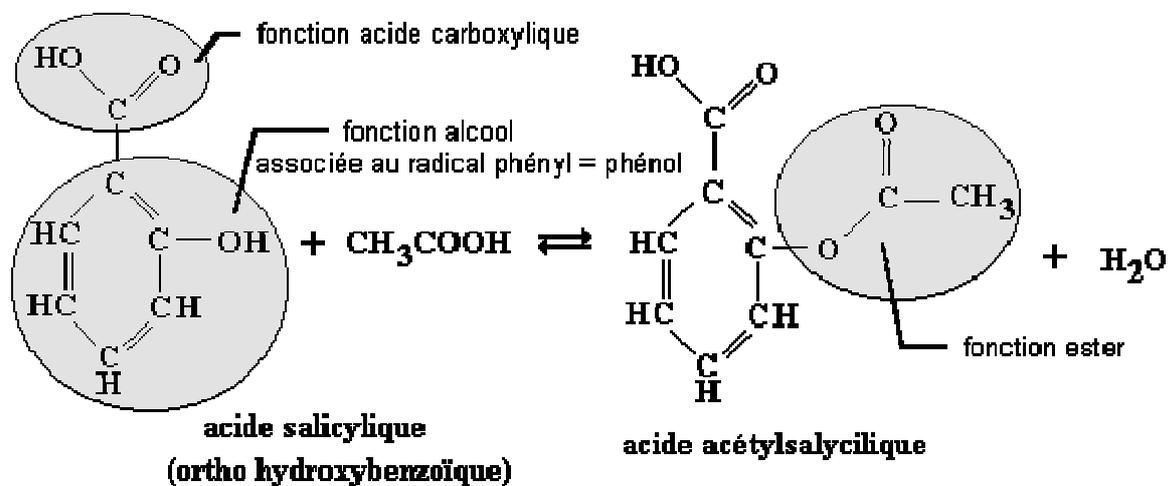


Schéma 1 : La réaction de la synthèse de l'aspirine[2]

1.3. Propriétés physico-chimiques :

Tableau 1 : Propriétés physico-chimiques de l'aspirine[2]

Formule brute	C ₉ H ₈ O ₄ : acide faible.
solubilité	2,5 g/l (eau, 15 °C), 4,6 g/l (eau, 25 °C), 10 g/l (eau, 37 °C), 1 g/10-15 ml d'éther, 200g/l d'éthanol à 25°C 1g/3.5ml d'acétone à 20°C 1g/17 ml de chloroforme à 25°C
pKa	3,5
Masse molaire	180,1574 ± 0,009 g/mol
Température de fusion	135°C
T° ébullition	Se décompose au-dessous du point d'ébullition à 140 °C
Masse volumique	1,4 g/cm ³
Point d'éclair	131,2 °C
Pression de vapeur saturante	0,0165 Pa à 25 °C

2. Effets pharmacologiques de l'aspirine :

2.1. Effet anti-inflammatoire :

Les effets anti-inflammatoires de l'aspirine sont connus depuis longtemps et impliquent de multiples processus : inhibition de la production de prostaglandines, réduction de la production d'anticorps ainsi que de la formation des complexes antigènes/anticorps et blocage de la libération d'histamine stimulée par les antigènes. Les salicylés ont aussi la propriété de réduire l'augmentation de la perméabilité capillaire et donc de l'œdème observé lors de tout processus inflammatoire. Mais, certains de ces effets ne sont observés que pour des doses fortes d'aspirine et la part respective de ces différents phénomènes dans les actions thérapeutiques de ce médicament constitue encore un sujet de recherche. [3]

2.2. Action antalgique

L'aspirine est un antalgique périphérique dont l'utilisation chronique ne provoque ni tolérance, ni dépendance contrairement aux analgésiques centraux opiacés. Cette action est d'autant plus importante qu'il existe un phénomène inflammatoire à l'origine du phénomène douloureux. L'aspirine est du coup moins efficace en l'absence d'inflammation. [3]

2.3. Effet antipyrétique

Cet effet est observé à dose thérapeutique. A dose forte, en cas d'intoxication, l'aspirine augmente la température centrale en accroissant la production de chaleur par les cellules. Cette action provient d'une réduction du rendement énergétique de ces cellules et peut conduire une déshydratation du fait de l'importante sudation ainsi produite. [3]

2.4. Effet hématologique

Du fait de l'acétylation irréversible de la cyclo-oxygénase plaquettaire, inhibant ainsi la production de TXA₂, l'ingestion d'une dose standard d'aspirine de 650 mg par un sujet sain, produit un doublement du temps de saignement pour une période de 4 à 7 jours. [3]

2.5. Effet gastro-intestinaux

Ces effets sont directement liés à l'inhibition de la cyclo-oxygénase et constituent donc des effets indésirables vrais de l'aspirine. En effet, ils sont complètement indissociables des activités thérapeutiques.

L'ingestion d'aspirine peut provoquer des douleurs épigastriques, des nausées et des vomissements. Elle est à l'origine de micro-ulcérations de la muqueuse gastrique mais peut aussi majorer un ulcère préexistant. Ces actions, associées aux effets antiagrégants plaquettaires, expliquent l'incidence élevée des saignements digestifs chez les patients traités de manière chronique par l'aspirine. [3]

2.6. Effets gynéco-obstétricaux

Comme dans le cas des effets gastro-intestinaux, les actions gynéco-obstétricales de l'aspirine peuvent être considérées comme d'authentiques effets indésirables.

L'aspirine peut augmenter le volume et la durée des menstruations. Elle réduit de manière très importante, comme les autres anti-inflammatoires, l'efficacité contraceptive des dispositifs intra-utérins. L'aspirine est contre-indiquée pendant le dernier trimestre de la grossesse en raison d'effets foetotoxiques (hypertension artérielle pulmonaire avec fermeture prématurée du canal artériel, insuffisance rénale). De plus, on a noté des allongements de la durée de la grossesse ainsi que des hémorragies lors de l'accouchement. En revanche, et bien que des effets tératogènes aient été observés chez l'animal, l'utilisation d'aspirine à doses faibles et pour des périodes courtes ne pose pas de problème en début de grossesse. [3]

3. Pharmacocinétique :

3.1. Résorption dans l'estomac et dans l'intestin grêle :

Dans l'estomac, le pH acide diminue l'ionisation et favorise l'absorption, mais dans le grêle, l'alcalinisation favorise une meilleure solubilisation et c'est à ce niveau que l'absorption est la plus importante. Le début de l'action survient en 30 min et le pic de concentration a lieu en 2h. L'absorption est retardée lorsque les comprimés sont à délitement entérique. La biodisponibilité est excellente. [4]

3.2. Distribution dans tout l'organisme :

L'AAS se distribue dans la plupart des tissus et organes ; il subit une hydrolyse en AS. Volume de distribution 0,15 l/kg (aux doses thérapeutiques).

Fixation aux protéines (albumine) importante : elle est de 80 à 90 %. [4]

3.3. Métabolisme et élimination :

L'aspirine est rapidement transformée en acide salicylique (15 min). Une faible part (10 à 30 %) est éliminée dans les urines telle quelle (l'alcalinisation des urines augmente la fraction ionisée et diminue la réabsorption tubulaire). Le reste est métabolisé par le foie : conjugaison avec la glycine pour former l'acide salicylurique ou glycuronoconjugaison. Une faible quantité est hydroxylée en acide gentisique. Ces mécanismes de conjugaison sont saturés lorsque la concentration en salicylés est importante. La demi-vie est normalement de 2h mais elle peut s'allonger considérablement (jusqu'à 40 h) lorsque la posologie augmente. Ce qui fait que les concentrations toxiques peuvent être rapidement atteintes. [4]

4. Mode d'action de l'aspirine :

Les effets thérapeutiques de l'aspirine proviennent de sa capacité à inhiber la synthèse des prostaglandines et de leurs dérivés. Cette inhibition a pour origine le blocage des diverses isoformes de cyclooxygénases (COX 1 et 2). Mais, ce blocage n'est pas effectué de la même manière par l'aspirine et par ses dérivés. En effet, l'acide acétylsalicylique produit un blocage irréversible de ces enzymes par acétylation de résidus sérine en position 530 pour la COX 1 et 516 pour la COX 2. Au contraire, l'acide salicylique, produit de la désacétylation hépatique de l'aspirine, est un inhibiteur réversible de ces enzymes. Ces mécanismes permettent de comprendre pourquoi les effets thérapeutiques varient en fonction des doses employées.

L'acide acétylsalicylique est résorbé et se retrouve tel quel dans la circulation portale. A ce niveau, il va acétyler la COX 1 des plaquettes sanguines et empêcher ainsi toute production de thromboxane A₂. Cette inhibition est irréversible et ne peut pas être contrecarrée par une nouvelle synthèse de cyclo-oxygénases par la plaquette puisque celle-ci est quasiment complètement dépourvue de capacité de synthèse protéique. Une dose unique d'aspirine va donc bloquer définitivement la production de TXA₂ pour toute la vie de la plaquette soit 8 à 10 jours. Cette action explique la persistance d'un effet antiagrégant de l'aspirine à distance de la dernière prise médicamenteuse et nécessite donc l'arrêt d'une thérapeutique par ce médicament 4 à 8 jours avant tout acte potentiellement hémorragique (intervention chirurgicale, extraction dentaire...).

Cet effet est obtenu pour des doses faibles d'environ 40 mg par jour. Néanmoins, à l'heure actuelle, en prévention secondaire de l'infarctus du myocarde, on recommande l'utilisation de doses quotidiennes allant de 160 à 325 mg, doses qui ont fait la preuve de leur efficacité.

En ce qui concerne les activités antalgiques, anti-inflammatoires et antipyrétiques de l'aspirine, il faut utiliser des doses quotidiennes supérieures aux doses anti-agrégantes puisque l'inhibition des cyclo-oxgénases sera réalisée par l'acide salicylique (AS), inhibiteur réversible de ces enzymes. L'inhibition sera donc dépendante des concentrations plasmatiques d'AS, l'effet disparaissant parallèlement à la décroissance de ces concentrations. Ainsi, les doses efficaces s'étendront de 1 à 3 grammes par jour. [3]

5. Toxicologie :

5.1 Intoxication :

5.1.1. Fréquence :

Les intoxications volontaires sont assez rares, de 8 à 12 % des intoxications médicamenteuses volontaires en fonction des pays. Elles sont pour la plupart bénignes moins de 5 % des intoxications volontaires aux salicylés sont des intoxications graves. L'étiologie est en général soupçonnée par l'interrogatoire du patient ou de la famille. Les intoxications accidentelles ne sont pas rares en particulier chez les enfants par erreur de conditionnement. On peut noter aussi la possibilité d'intoxication par usage important d'applications cutanées de pommade à base de salicylés. [4]

5.1.2. Clinique :

Le délai d'apparition des premiers signes est très variable en fonction de la forme galénique absorbée, de quelques dizaines de minutes à plusieurs heures.

-Hyperpnée : C'est le principal symptôme avec odeur acétonique de l'haleine. Ce symptôme est dû à la stimulation directe des centres respiratoires, il apparaît lorsque la salicylémie dépasse 350 mg/l.

-Troubles neurosensoriels : bourdonnements d'oreille, céphalées, vertiges, confusion. Chez l'adulte, les troubles de conscience se limitent à une somnolence, ils sont plus profonds chez les enfants et peuvent s'accompagner de convulsions.

-Hyperthermie avec sueurs abondantes et vasodilatation périphérique.

-Troubles digestifs quasi systématiques : nausées, vomissements, douleurs épigastriques.

-Troubles de l'équilibre acido-basique : ils sont constants, l'hyperventilation est d'abord responsable d'une alcalose respiratoire compensée par une fuite urinaire de bicarbonate. Cette phase est brève chez, l'enfant. A un stade ultérieur apparaît une acidose métabolique avec hyperlactacidémie, cétonurie et aminoacidurie. En cas d'intoxication massive, on peut voir apparaître une acidose mixte par épuisement respiratoire du malade.

-Perturbations hydroélectrolytiques : hypokaliémie, déshydratation extra cellulaire.

-Autres anomalies métaboliques : hyperglycémie ou hypoglycémie dans les intoxications sévères. Troubles de la coagulation liés essentiellement à l'effet antiagrégant plaquettaire ; hypoprothrombinémie modérée.

-Troubles hémodynamiques uniquement au stade tardif des intoxications sévères, ils sont secondaires à la déshydratation et à l'acidose. L'absorption d'une dose supérieure à 10 g chez l'adulte, à 100 mg/kg chez l'enfant peut être responsable d'une intoxication sévère. [4]

5.2. Traitement :

Traitement évacuateur gastrique indiqué chez tout intoxiqué hospitalisé moins de 6 heures après une prise massive. Administration systématique de charbon activé. Traitement symptomatique : réhydratation, rééquilibration hydro électrolytique. Alcalinisation des urines qui permet d'accélérer l'élimination urinaire. Épuration extra rénale si nécessaire. [4]

6. Indications :

6.1. Douleur, fièvre et inflammation :

L'aspirine est utilisée depuis plus de cent ans pour soulager la douleur, faire baisser la fièvre et le traitement de l'inflammation.

Dans le cas très précis des rhinites cependant, l'opportunité de son administration est discutée. [2]

6.2. Maladies cardio-vasculaires :

Comprimés d'aspirine, 325 mg

À petite dose (entre 75 et 300 mg/jour suivant les études), les propriétés antiagrégantes de l'aspirine préviennent efficacement la formation de caillots de sang dans les vaisseaux sans causer de dommages significatifs à l'organisme. Le bénéfice de cette prise a été prouvé en prévention secondaire c'est-à-dire, après un premier accident vasculaire et elle est largement préconisée dans ce cas. Le bénéfice excède significativement le risque majoré d'hémorragie dans ce cas. Son efficacité dans la prévention des accidents lors d'une artérite des membres inférieurs n'est cependant pas prouvée.

Son utilisation en prévention primaire (c'est-à-dire, avant même l'apparition d'une maladie vasculaire) reste plus discutée : l'efficacité semble être partielle (diminution des infarctus du myocarde mais tendance à l'augmentation des accidents vasculaires cérébraux de type hémorragique) et n'a été testée que sur des populations bien ciblées (médecins) ou femmes de plus de 45 ans avec une diminution modérée des accidents vasculaires cérébraux mais un effet sur la mortalité et la morbidité cardio-vasculaire non significatif. Des différences d'efficacité chez l'homme et la femme ont aussi été constatées. Les résultats sont plus mitigés pour d'autres études, bien qu'elles soient faites chez des personnes dites « à hauts risques ».

Malgré l'absence de preuves solides, les recommandations médicales préconisent l'emploi de l'aspirine en prévention primaire chez les patients dits « à hauts risques ». [2]

6.3. Réduction d'un risque de cancer :

Un grand nombre de données expérimentales ainsi que plusieurs études épidémiologiques rétrospectives récentes ont conclu que de petites doses d'aspirine en chimioprévention pouvaient diminuer le risque de contracter certains types de cancers. Les études expérimentales le montrent pour divers cancers tels ceux du colon, sein, prostate, bouche, gorge, œsophage, estomac, poumon (non à petites cellules). Les études épidémiologiques montrent que c'est la mortalité par cancers digestifs qui diminuerait le plus grâce à l'aspirine.

Une vingtaine d'études de cancérogenèse chez rats et souris étayent cet effet protecteur. Plusieurs essais cliniques montrent que de petites doses d'aspirine diminuent, modestement, la récurrence des polypes intestinaux et la survenue des cancers du côlon, essentiellement si ces derniers expriment l'enzyme cyclo-oxygénase de type 2 (ce qui représente environ 2/3 des dits cancers). Cependant les doses indiquées sont susceptibles de provoquer des saignements gastriques ou intestinaux et l'utilisation de l'aspirine n'est actuellement pas recommandée pour la prévention des cancers. [2]

6.4. Fécondation :

Selon une étude réalisée en 2004 à l'hôpital de Falun en Suède, la prise d'aspirine à 75mg/jour augmenterait l'efficacité de la fécondation in vitro en améliorant la vascularisation de l'utérus. [2]

7. Contre indication :

Les aspirines sont des médicaments à base d'acide acétylsalicylique. Ce sont d'excellents anti-fièvre et antidouleur. Toutefois, cela reste des médicaments qui nécessitent des précautions d'emploi et qui possèdent leurs indications et contre-indications.

Les Contre-indications à l'aspirine sont :

- Ulcère gastroduodéal ou gastrite en évolution.
- Allergie à l'aspirine.
- Traitement anticoagulant

- Traitement par les hypoglycémifiants Hémophilie .
- Troubles de la coagulation .
- Asthme .
- Goutte .
- Insuffisance rénale .
- Déficit en G6PD (maladie familiale).
- Les 3 premiers et derniers mois de grossesse.
- Les règles abondantes.
- Les saignements quelle qu'en soit l'origine. [5]

8. Aperçu bibliographique sur l'analyse de l'aspirine :

De nombreuses méthodes ont été décrites pour le dosage de l'acide acétylsalicylique et de l'acide salicylique dans les milieux biologiques et dans les médicaments.

ü Les méthodes colorimétriques basées sur la formation de complexes colorés avec l'ion ferrique sont mises à profit pour le dosage de l'AS. L'AAS ayant son hydroxyle bloqué par acétylation ne réagit pas dans ces conditions. Cette même réaction colorée est exploitée par différentes pharmacopées pour la détermination de l'essai limite de l'AS dans l'aspirine matière premier. [6]

ü La spectrophotométrie infrarouge préconisé par **Kister** et **Coll** permet d'estimer les taux de l'AAS, AS et de caféine dans les gélules, respectivement mesurés à 1765, 1670, 1705 cm^{-1} . [7]

ü Il faut cependant noter que ce sont des méthodes utilisant l'absorption ultraviolette qui sont le plus couramment utilisées pour analyser l'aspirine.

En 1975, il a été proposé un dosage spectrophotométrique direct du mélange Aspirine –Acide salicylique en adoptant la méthode de calcul basée sur la variance caractéristique minimale [8]

La technique officielle de la pharmacopée américaine concernant l'analyse des comprimés est basée sur la mesure de l'absorption de l'aspirine à 280 nm en milieu acétique .la même pharmacopée préconise une méthode longue pour doser l'AS à 306nm après une séparation sur chromatographie sur colonne ouverte.[9]

- ü La fluorimétrie est aussi utilisée.
- ü Du fait de leur spécificité et de leur sensibilité, les méthodes chromatographiques ont été largement utilisées. Chronologiquement, la chromatographie en phase gazeuse (CPG) a été employée avec un succès pour analyser les salicylés. Cependant, l'AAS et l'AS n'étant pas volatils, il est nécessaire de pratiquer une dérivation de ces produits pour pouvoir les analyser par CPG.[6]
- ü La titrimétrie est souvent employée, elle reste la méthode officielle dans l'essai quantitatif de l'aspirine pour la plupart des pharmacopées.

Conclusion :

L'aspirine est un médicament dont la rapidité d'action, le mode de fonctionnement et l'étendue des maux traités garantissent l'efficacité ont permis son succès auprès des patients. Des études sont menées afin de déterminer quelles autres applications on pourrait faire de ce médicament, notamment à propos des risques cardio-vasculaires et du cancer.

Cependant, l'automédication par aspirine, par ses effets sur l'estomac et sur le sang (antiagrégant plaquettaire, qui entraîne une diminution des capacités du sang à coaguler) en fait un médicament qui demande un maniement délicat et précis, qu'on remplace avantageusement par le paracétamol s'il s'agit de lutter contre des douleurs légères ou moyennes. Elle reste par contre particulièrement utile pour la prévention des risques cardio-vasculaires.

CHAPITRE II

Principes généraux de la validation

Introduction

- 1. Définition**
- 2. But de la validation**
- 3. Validation analytique**
- 4. Historique**
- 5. Aspect réglementaire**
- 6. Critères de validation analytique**

Conclusion

Introduction :

La validation, dans son terme général, est l'expression complète d'une séquence d'activités assurant une démonstration, avec un grand degré de certitude et preuves à l'appui, que les résultats escomptés sont atteints, de façon uniforme et continue et en conformité avec les principes de Bonnes Pratiques de Fabrication. Le terme de validation est utilisé pour les procédés de fabrication, de nettoyage, les systèmes informatisés et les méthodes analytiques.....

Dans les industries chimiques, pharmaceutiques, agroalimentaires et autres secteurs industriels ou la chimie analytique est omniprésente, la validation analytique est obligatoire pour tous produits manufacturés, elle n'est pas uniquement exigée par les autorités réglementaires (ICH) ou pour accéder à l'accréditation (ISO 17025), mais elle est aussi la phase ultime avant son utilisation dans la routine.

Afin d'illustrer comment cette validation pourra être réalisée réellement, ce 2^{ème} chapitre traite une synthèse bibliographique de la validation en industrie pharmaceutique ; et il sera divisé en trois parties :

La première partie est consacrée à une définition générale du terme validation et son objectif. Dans la deuxième partie, nous aborderons la validation analytique, son historique et l'aspect réglementaire.

Et enfin dans la troisième partie nous nous intéresserons aux critères de validation.

1. Définition:

La définition du terme « validation » est donnée dans le guide des bonnes pratiques de fabrication : « l'établissement de la preuve, en conformité avec les principes de bonnes pratiques de fabrication , que la mise en œuvre ou l'utilisation de tout processus, procédure, matériel, matière première, article de conditionnement, ou produit, activité ou système permet réellement d'atteindre les résultats escomptés » [10]

2. But de la validation :

L'industrie pharmaceutique utilise des matériels chers, des installations et des équipements sophistiqués et du personnel qualifié. L'utilisation efficace de ces ressources est nécessaire pour le succès continu de l'industrie : il ne serait pas possible d'utiliser les équipements sans savoir s'ils produiront le médicament ayant les qualités requises. Les industries pharmaceutiques sont donc concernées par la validation, pour l'assurance de la qualité, la réduction des coûts et les autorités réglementaires. De plus, une étude détaillée, un contrôle du procédé de fabrication et une validation sont nécessaires pour diminuer les échecs et augmenter la productivité. Le terme de validation est notamment utilisé pour les procédés de fabrication, de nettoyage, les systèmes informatisés et les méthodes analytiques. [11]

3. Validation analytique :

La méthode d'analyse est la manière dont une analyse est réalisée. Chaque étape doit être décrite en détail. Il faut décrire notamment, mais non exclusivement, la préparation de l'échantillon, de l'étalon de référence et des réactifs, l'utilisation des appareils, la production de la courbe d'étalonnage, l'application des formules de calcul, etc.[12]

La démarche à suivre ne se limite pas à la production de procédures dont le suivi assure la traçabilité totale des résultats, Elle intègre également la qualification de l'appareillage utilisé, son suivi et surtout la validation de la méthode de dosage qui permet de prouver que cette méthode répond bien aux besoins pour lesquels elle a été développée, avec la possibilité de la transférer dans un autre laboratoire.

Ceci impose une caractérisation précise des critères de la méthode : Sélectivité, spécificité, exactitude, répétabilité, reproductibilité, linéarité, seuils de quantification et de détection, et robustesse.[13]

Les méthodes doivent être validées ou revalidées

- avant leur utilisation en routine,
- quand le Contrôle Qualité indique qu'une méthode établie change avec le temps,

- pour démontrer l'équivalence entre deux méthodes (par exemple, une nouvelle méthode et une méthode standard).[11]
- en cas de modifications des conditions de validation de méthodes (par exemple, un instrument avec des caractéristiques différentes ou des échantillons avec une matrice différente). [14]

4. Historique:

* USP XXII et FDA

En 1985, une conférence rassemblant les industriels du médicament regroupés au sein d'une association .la PMA (Pharmaceutical Manufacturers Association, quality control section), et des représentants de la pharmacopée américaine, mis sur pied un processus d'élaboration de recommandations concernant la validation analytique.

En avril 1986, un texte intitulé « current concept for the validation of compendial essays » fut publié dans pharmaco-poeial forum, lequel texte fut discuté de l'automne 1987 jusqu'en avril 1988. Le besoin se fit alors d'inclure un chapitre sur la validation dans l'USP, de façon à préciser les règles régissant tout changement de procédure analytique appliquée à un médicament.

En juillet 1988, un texte fut publié dans pharmacopoeial forum, intitulé « <1225> validation of compendial assays-guidelines ». Ce texte étudie les propositions de révision des procédures analytiques mentionnées dans la pharmacopée. Ce même texte fut inclus dans l'USP XXII, supplément N°9. En juillet 1989, sous le titre « <1225> validation of compendial methods » et repris dans l'USP XXII pour application officielle à partir du 1 er janvier 1990.

Parallèlement, dès février 1987, les « guidelines for submitting samples and analytical data for methods evaluation » furent éditées au niveau du CFR (Federal Code of Regulations) sous la référence 21 CFR 10.90, pour aider les demandeurs d'autorisation de mise sur le marché dans la marche à suivre et la présentation des données rendues obligatoires (21CFR 314.50) [15]

***Note explicative CEE :**

Dés 1987, l'EFPIA a rassemblé les différents commentaires émanant des industriels européens de la pharmacie sur les révisions successives du projet de note explicative élaboré par le comité des spécialités pharmaceutiques de la commission de la CEE (groupe qualité des médicaments). Le texte final fut adopté en août 1989 sous la référence III /844/87-FR , FINAL, août 1989. [15]

En 1992 : SFSTP : « Guide de validation analytique - Rapport d'une commission SFSTP » publié, dans STP pharma pratiques, un guide pour la validation analytique :

1. Méthodologie : STP Pharma Pratiques 2 (4) 205-226 1992
2. Exemples d'application : 227-239 1992

Le sujet est ensuite repris par L'ICH (International Conference on Harmonisation) qui publie en 1994 un premier document sur les définitions, « Validation of analytical procedure : Terminology and definitions (Q2A) ». Cette publication est complétée en 1996 par une seconde publication (Q2B) expliquant comment on peut conduire une validation analytique « Validation of analytical procedure : Methodology » [16]

5. Aspect réglementaire:

Malgré la pluralité réglementaire pour la validation analytique, les prédominantes sont les suivantes :

5.1. Deux guidelines ICH (International Conference on Harmonization) :

Ils ont été dédiés à la validation analytique : Q2: «Analytical Validation»

- Q2A: «Text on Validation of Analytical Procedures » Présente une discussion sur les caractéristiques qui doivent être prises en compte au cours de la validation des méthodes analytiques.

- Q2B: «Methodology» Son but est de fournir des conseils et recommandations sur la manière d’appréhender les différentes caractéristiques de la validation pour chaque méthode analytique. En outre, le document fournit une indication sur les données qui devraient être présentées dans un dossier d’enregistrement. [17]

5.2. SFSTP (Société Française des Sciences Techniques et Pharmaceutiques) :

Ils présentent les recommandations réglementaires communément admises et appliquées dans l’industrie pharmaceutique nationale et une démarche statistique pour la validation d’une procédure analytique. [17]

6. Critères de validation analytique :

Les différents critères de validation analytique sont étudiés en fonction de type d’analyse à effectuer comme l’indique le tableau (2)

Tableau 2 : Tableau récapitulatif des critères de validation[12]

Critère	Type d’analyse			
	Impureté	Dosage	Quantification bio analyse	
	Identification	Essai limite		
Spécificité/ sélectivité	+	+	+	+
Linéarité	-	-	+	+
Fidélité	-	-	+	+
LLOQ	-	+	-	+
Exactitude	-	+	+	+
Robustesse	-	-	-	+

Les principaux critères de validation analytique sont brièvement expliqués ci-dessous :

6.1. Spécificité :

La spécificité est la propriété qui fait qu'une méthode d'analyse rend compte sans ambiguïté de la substance analysée en présence d'autres composantes normalement présentes. Ces dernières peuvent inclure des impuretés, des produits de dégradation, la matrice, etc.

Si une méthode d'analyse est insuffisamment spécifique, cette déficience peut être compensée par la spécificité de l'une ou de plusieurs des autres analyses complémentaires. Cette définition renvoie à plusieurs aspects :

- **Identification:** Il s'agit de vérifier l'identité de la substance analysée.
- **Pureté :** Il s'agit de vérifier si les analyses permettent de déterminer avec exactitude la teneur en impuretés de la substance analysée (recherche des substances apparentées, métaux lourds, résidus de solvants, etc.)
- **Dosage (teneur ou activité):** Il s'agit d'obtenir un résultat indiquant exactement la concentration ou l'activité de la substance analysée (teneur). [12]

6.2. Linéarité :

La linéarité d'une méthode d'analyse est sa capacité de donner des résultats qui sont directement (à l'intérieur de certaines limites) proportionnels à la concentration (quantité) de la substance analysée dans un échantillon. [12]

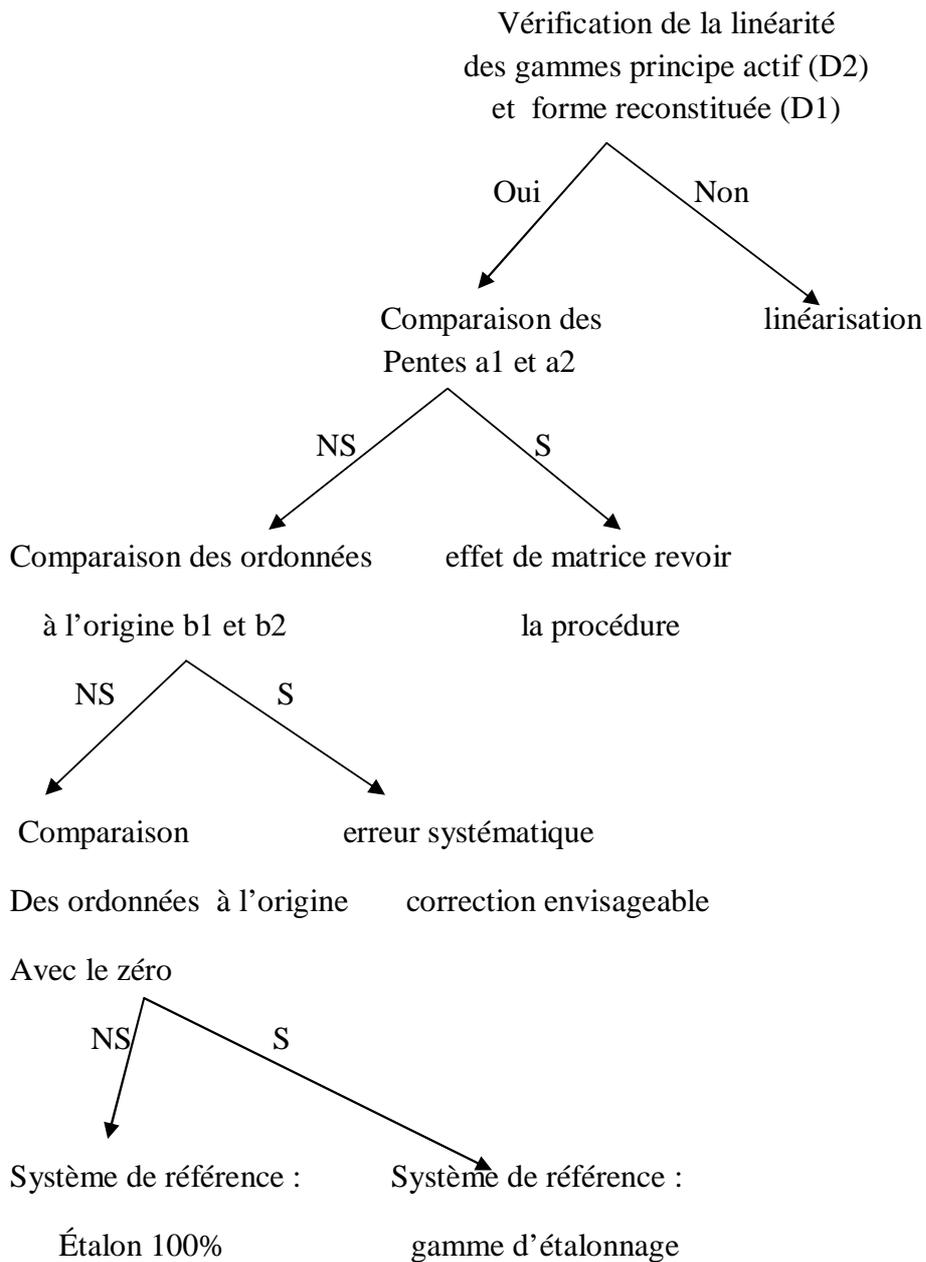


Schéma 2 : Stratégie statistique de la linéarité [15]

S : significatif

NS : non significatif

6.3. Exactitude :

L'exactitude correspond au degré de concordance entre la valeur de la méthode obtenue et la valeur de référence ou la valeur considérée comme véritable par convention. L'exactitude est aussi désignée l'authenticité. [12]

6.4. Fidélité (Précision) :

La précision d'une méthode correspond au degré d'accord (degré de dispersion) entre les résultats des mesures obtenues par l'analyse individuelle de plusieurs prélèvements d'un même échantillon homogène, prélevés dans des conditions prescrites. La précision peut s'évaluer à trois niveaux: répétabilité, précision intermédiaire et reproductibilité.

L'évaluation de la précision doit se faire au moyen d'échantillons homogènes et authentiques. S'il est impossible d'obtenir des échantillons homogènes, on peut utiliser des échantillons préparés artificiellement ou une solution d'échantillon.

La précision est généralement exprimée par la variance, l'écart-type ou le coefficient de variation d'un ensemble de mesures. [12]

6.4.1. Répétabilité :

La répétabilité est une expression de la précision de l'analyse lorsque celle-ci est reprise dans les mêmes conditions de réalisation, après un court intervalle de temps. La répétabilité est aussi désignée précision intra-analyse [12]

6.4.2. Précision intermédiaire :

La précision intermédiaire correspond aux variations survenant dans un même laboratoire : analyses effectuées des jours différents, par des personnes différentes, au moyen d'appareils différents, etc. [12]

6.4.3. Reproductibilité :

La reproductibilité correspond à la concordance entre laboratoires (travaux de collaboration visant généralement l'uniformisation de la méthodologie). [12]

6.5. Limite de détection LOD :

La limite de détection d'une méthode d'analyse individuelle correspond à la plus faible quantité de la substance analysée que la méthode permet de détecter, sans nécessairement fournir la valeur exacte [12]

6.6. Limite de dosage :

La limite de dosage d'une méthode d'analyse individuelle correspond à la plus faible quantité de la substance analysée que la méthode permet de doser avec un degré acceptable de précision et d'exactitude. La limite de dosage est un paramètre des analyses quantitatives des composés présents en faibles quantités dans les matrices d'échantillon; elle est plus particulièrement utilisée dans le dosage des impuretés et (ou) des produits de dégradation. [12]

6.7. Domaine d'utilisation :

Le domaine d'utilisation d'une méthode d'analyse est l'intervalle entre la concentration la plus élevée et la concentration la plus faible (quantités) de la substance analysée dont on a démontré qu'elles pouvaient être déterminées avec un degré acceptable de précision, d'exactitude et de linéarité. [12]

6.8. Robustesse :**6.8.1. Définition de la robustesse :**

La robustesse d'une méthode d'analyse est une mesure de sa capacité à supporter sans conséquences de petites variations apportées délibérément aux paramètres de la méthode; elle donne une idée de la fiabilité de la méthode aux conditions normales d'utilisation. [12]

Pour l'étude de la robustesse on a recourt aux plans d'expériences.

6.8.2. Plan d'expérience :

Cette méthode est utilisée pour obtenir le maximum d'information par l'utilisation d'un nombre minime d'expériences. Les plans d'expériences sont classés en trois catégories. Les deux premières catégories couvrent les facteurs indépendants, et la troisième catégorie est réservée aux facteurs dépendants.

- Les facteurs indépendants sont des facteurs où on peut choisir les niveaux comme on le désire. Le choix du niveau de facteur n'entraîne aucune contrainte sur le choix des niveaux des autres facteurs.
- Les facteurs dépendants sont des facteurs où les niveaux sont liés entre eux par une relation. Par exemple les proportions d'un mélange font toujours cent pour cent, si on modifie le pourcentage d'un constituant, le pourcentage d'au moins un autre constituant est également modifié. [18]

Conclusion :

La validation d'une méthode analytique est indispensable avant de pouvoir l'utiliser en analyse de routine, car elle permet d'assurer que le résultat obtenu lors d'une analyse est fiable et dans des limites acceptables. Ceci est très important pour garantir la qualité du produit fini, ainsi que le rejet d'un produit non-conforme en ce qui concerne sa teneur. Les différents critères de validation sont étudiés en fonction de l'applicabilité de la méthode. La finalité de la méthode doit donc être prise en compte lors de la validation.

Introduction

1. Matériels et méthodes

1.1. Matériels

1.1.1. Matières premières et réactifs

1.1.2. Appareillage Equipements

1.1.3. Verreries

1.2. Méthodes :

1.2.1. Préparation des solutions

1.2.2. Vérification des titres

1.2.3. Validation analytique

2. Résultats et discussion

2.1. Spécificité

2.2. Linéarité

2.3. Exactitude

2.4. Fidélité

Conclusion

Introduction :

Dans le cadre de cette étude expérimentale, notre démarche pour aboutir à l'objectif fixé est constituée de trois étapes principales :

- Appliquer la méthode de dosage titrimétrique d'acide acétylsalicylique dans des comprimés de 500mg décrite dans la pharmacopée britannique, une modification minimale sur un élément de la technique a été apportée afin de réduire les erreurs expérimentales : il consiste à utiliser 25 ml de solution de NaOH (à l'aide d'une pipette jaugée) au lieu de 30ml (addition de volume)
- Traduire le volume de réactif titrant en l'occurrence NaOH en nombre de mole (car le titre varie dans le temps pour une même solution préparée).
- Et enfin, valider la méthode de dosage en vérifiant les critères de la validation analytique conformément au protocole de la commission SFSTP.

1. Matériels et méthodes :

1.1. Matériels :

1.1.1. Matières premières et réactifs :

- Principe actif : Acide acétylsalicylique fournis par une entreprise pharmaceutique nationale
- Excipient : amidon de maïs fournis par une entreprise pharmaceutique nationale
- Hydroxyde de sodium (NaOH): SIGMA-ALDRICH ; Allemagne.
- Ethanol 96° : SIGMA-ALDRICH ; Allemagne.
- Bicarbonate de sodium (NaHCO_3).
- Acide chlorhydrique concentré (HCl) : densité=1.18 pureté =37%
- Méthyle orange.
- Phénolphtaléine.
- Eau distillée.

1.1.2. Appareillage et équipements:

- Balance analytique de précision (précision 10^{-5} g): KERN, Allemagne.
- Agitateur magnétique : STUART, UK.
- Agitateur type vortex : IKA, USA.

1.1.3. Verreries :

- Burette graduée de 25ml : précision 0.05 ml
- Spatule
- Verre de montre
- Bêchers
- Fioles jaugée de : 100 ml
- Erlenemeyer
- Pipette jaugé de 25 ml
- Pipette gradué de 50 ml
- Pro pipette
- Pissette d'eau distillée

1.2. Méthodes :

Avant de vérifier les critères de la validation analytique cités en partie théorique, on a préparé des solutions de HCl et de NaOH, puis vérifié leurs titres, préparer les indicateurs colorés et enfin préparer des solutions standards et échantillons.

1.2.1. Préparation des solutions :

1.2.1.1. Solutions de HCl et NaOH :

Les solutions de HCl 0.5 M et de NaOH 0.5M sont préparées comme suit :

- Solution de NaOH 0.5M : (masse molaire de NaOH= 40 g/mol)
Peser 20 g de NaOH et dissoudre dans 1l d'eau distillé.

Partie expérimentale

- Solution de HCl 0.5 M :

A partir des caractéristiques de la solution commerciale (pureté, densité), la solution de HCl 0.5M est préparée par dilution :

Ø Densité = 1.18 \longrightarrow 1l de la solution pèse 1180g

Ø Pureté = 37% : 100g de solution \longrightarrow 37g de HCl

1180g \longrightarrow m = 436.6 g de HCl (dans 1l de solution)

La concentration de la solution commerciale = 436.6 g/l

$$= 436.6/36.46 = 11.97 \text{ mol/l}$$

$$C_{\text{commerciale}} * V_{\text{prélevé}} = C_{\text{fille}} * V_{\text{Préparé}}$$

Avec : $C_{\text{commerciale}} = 12 \text{ mol/l}$

$$C_{\text{fille}} = 0.5 \text{ mol/l}$$

$$V_{\text{Préparé}} = 1000 \text{ ml}$$

Donc $V_{\text{prélevé}} = 42 \text{ ml}$

1.2.1.2. Indicateurs colorés : (technique de l'ingénieur p 305)

- Méthyle orange : 0.01% dans l'eau c.à.d. dissoudre 10mg de méthyle orange dans 100ml d'eau distillée.
- Phénolphtaléine : 0.05 % c.à.d. dissoudre 50mg de phénolphtaléine dans un mélange de 50ml d'éthanol et 50ml d'eau distillé.

1.2.1.3. Solutions du standard et de l'échantillon:

- Le standard c'est l'AAS dissout dans une solution de NaOH (0,5M) selon l'organigramme suivant :

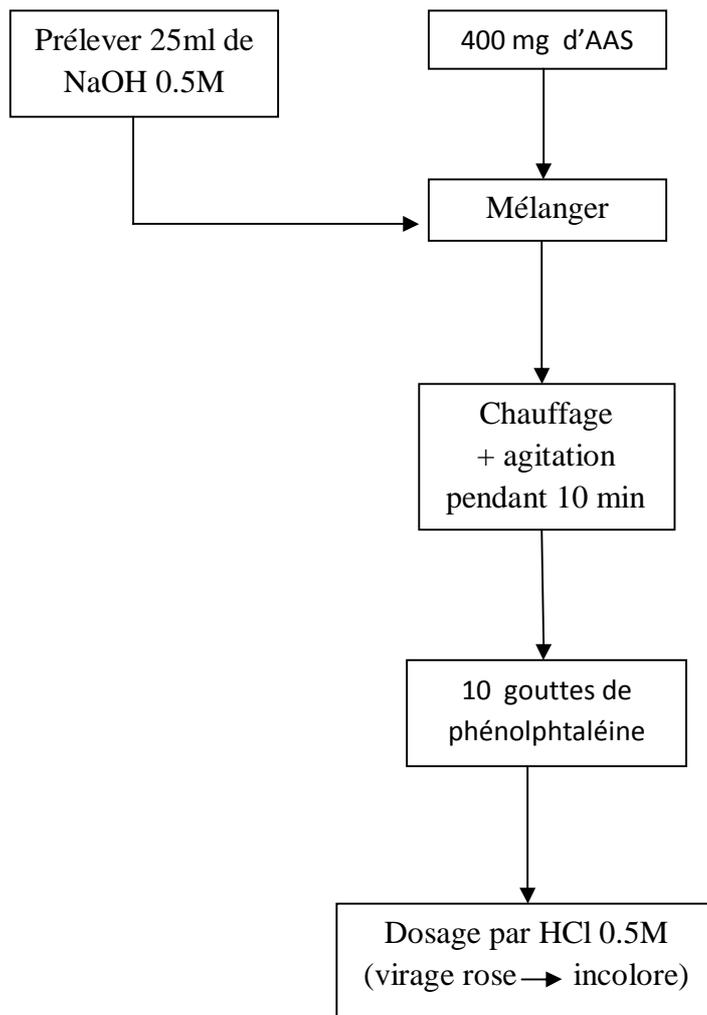


Schéma 3 : Etapes de préparation d'une solution standard

- Nous désintégrons (définirons) par le terme « forme pharmaceutique reconstitué » un mélange de tous les composants correspondant qualitativement et quantitativement à la forme pharmaceutique à étudier, excepté la substance à tester qui sera ajoutée en quantité variable suivant le critère étudié. Notre cas c'est AAS et l'amidon de mais comme le montre l'organigramme suivant :

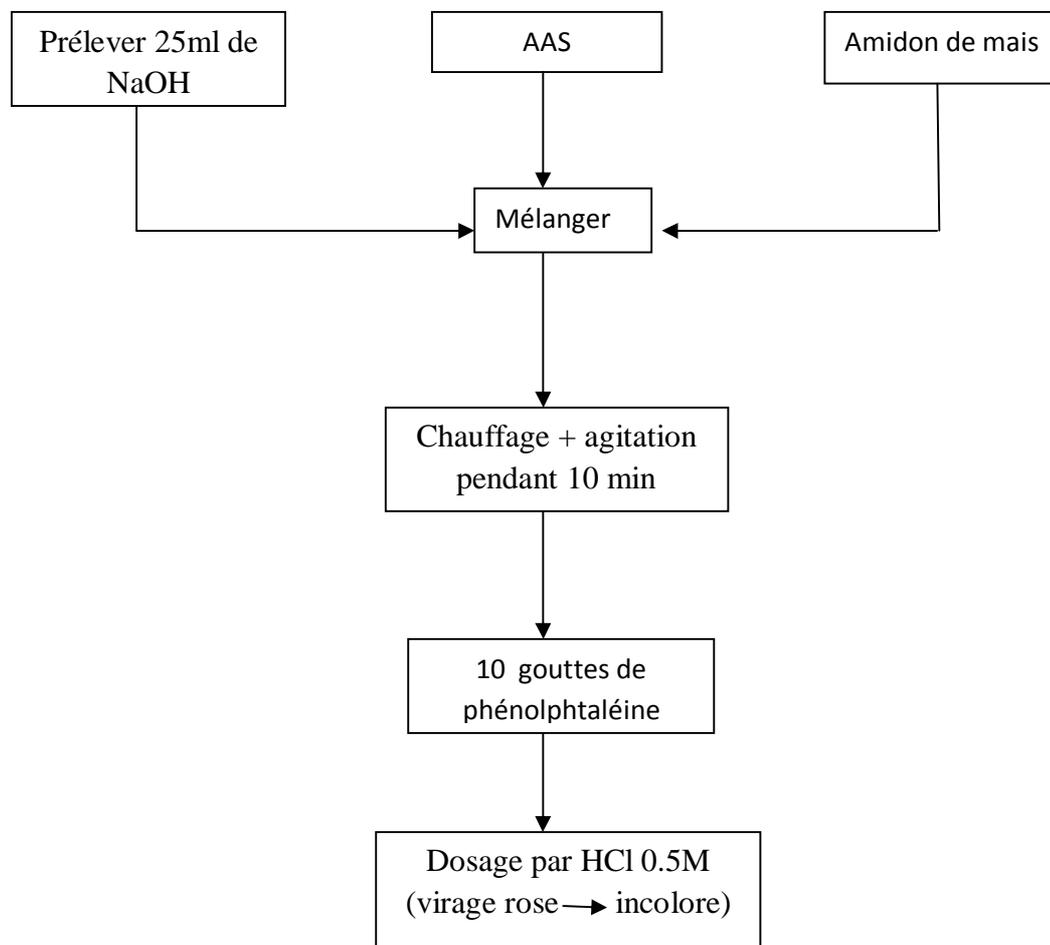
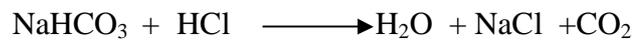


Schéma 4 : Etapes de préparation d'une solution d'échantillon

1.2.2. Vérification des titres :

A chaque début d'une séance du travail on a à vérifier le titre des solutions préparées auparavant.

- ∅ La solution de HCl est titrée par le bicarbonate de sodium NaHCO_3 (étalon basique) selon la réaction suivante :



$$C_1 = m/M \cdot V_{\text{HCl}}$$

$$M = 84 \text{ g/mol}$$

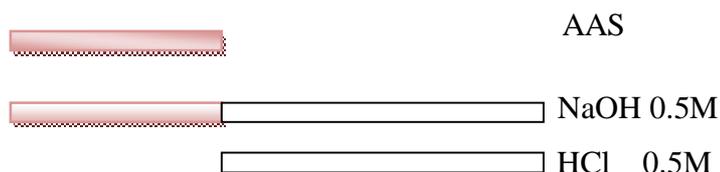
- Peser dans un erlenmeyer $m=500$ mg de bicarbonate de sodium
 - A l'aide d'une pipette on prélève 50 ml d'eau distillé
 - Ensuite on titre le mélange avec la solution de HCl 0.5 M en utilisant le méthyle orange comme indicateur coloré, lorsque le volume de virage est atteint (Incolore \rightarrow rose) on note le volume de titrant.
- ∅ La solution de NaOH 0.5 M par la solution de HCl 0.5 M selon la formule suivante :
- $$C_1 V_1 = C_2 V_2 \iff \alpha = V_1/V_2 = C_2/C_1$$
- On prélève 20 ml de HCl en présence de phénolphtaléine dans un erlenmeyer, on titre par NaOH préalablement titrée jusqu'au virage de l'indicateur de l'incolore vers le rose et on note le volume de titrant V_2 (ml).

Partie expérimentale

Ø Détermination de la pureté de la matière première :

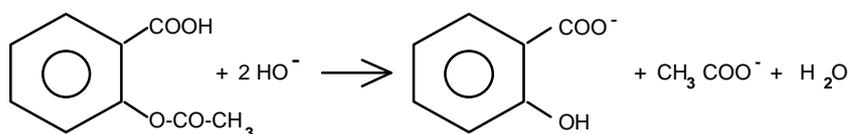
Elle est donnée selon la méthode décrite dans la pharmacopée européenne (voir annexe)

Pureté = masse calculée / masse introduite



$$\begin{aligned}\text{On a : } Q_{\text{AAS}} &= Q_{\text{NaOH}} - Q_{\text{HCl}} \\ &= C_{\text{NaOH}} * V_t - C_{\text{HCl}} * V_{\text{HCl}} \\ &= C_{\text{NaOH}} * (V_t - \alpha * V_{\text{HCl}}) \text{ en milli-équivalent}\end{aligned}$$

$$\text{Sachant que : } V_{\text{NaOH}} = V_t - \alpha * V_{\text{HCl}}$$



A partir de la réaction ci-dessus on peut dire :

$$\text{Equivalent : } eq = M/2 = 180.2/2 = 90.1$$

$$N_{\text{eq}} = m / eq \longrightarrow m = 90.1 * C_{\text{NaOH}} * (V_t - \alpha * V_{\text{HCl}})$$

Ø Calcul de nombre de moles :

Le nombre de moles de NaOH consommé sera donné par la formule suivante :

$$N = V_{\text{NaOH}} * C_{\text{NaOH}} \text{ (en milli mole)}$$

Partie expérimentale

1.2.3. Validation analytique :

1.2.3.1. Spécificité :

Elle a été réalisée sur la solution placebo (excipient : amidon de maïs) seule à l'exception du principe actif, dans le but de garantir que la réponse mesurée provient seulement de la substance analysée. Les résultats sont comparés à ceux obtenus avec le standard 100% et échantillon 100% dans l'étude de linéarité.

1.2.3.2. Linéarité :

1.2.3.2.1. Protocole :

Effectuer 3 séries indépendantes de 5 concentrations avec un intervalle de 10% (sur le PA seul et la forme pharmaceutique reconstituée) régulièrement espacées et positionnées autour de 100% la concentration théorique soit : 80% , 90% , 100 % ,110% ,120% et ce à raison d'une série par jour.

Réaliser, selon le protocole, deux gammes :

- Une gamme avec le principe actif seul (étalon), soit D_2 d'équation $y=a_2x+b_2$, la droite de régression linéaire correspondante.
- Une gamme avec la forme pharmaceutique reconstituée, soit D_1 d'équation $y=a_1x+b_1$, la droite de régression linéaire correspondante.

Ø Une gamme sur le standard :

Dans notre cas le système de référence est la correspondance fournie par la pharmacopée britannique dans le chapitre dosage de la monographie de l'AAS qui dit :

1ml de NaOH 0.5M \longrightarrow 45.05 mg d'AAS

Soit 0.5 m.mol de NaOH \longrightarrow 45.05 mg d'AAS

Partie expérimentale

Ø Une gamme sur la forme reconstituée :

L'ensemble des essais réalisés sur la forme pharmaceutique reconstituée sont présentés par le schéma suivant :

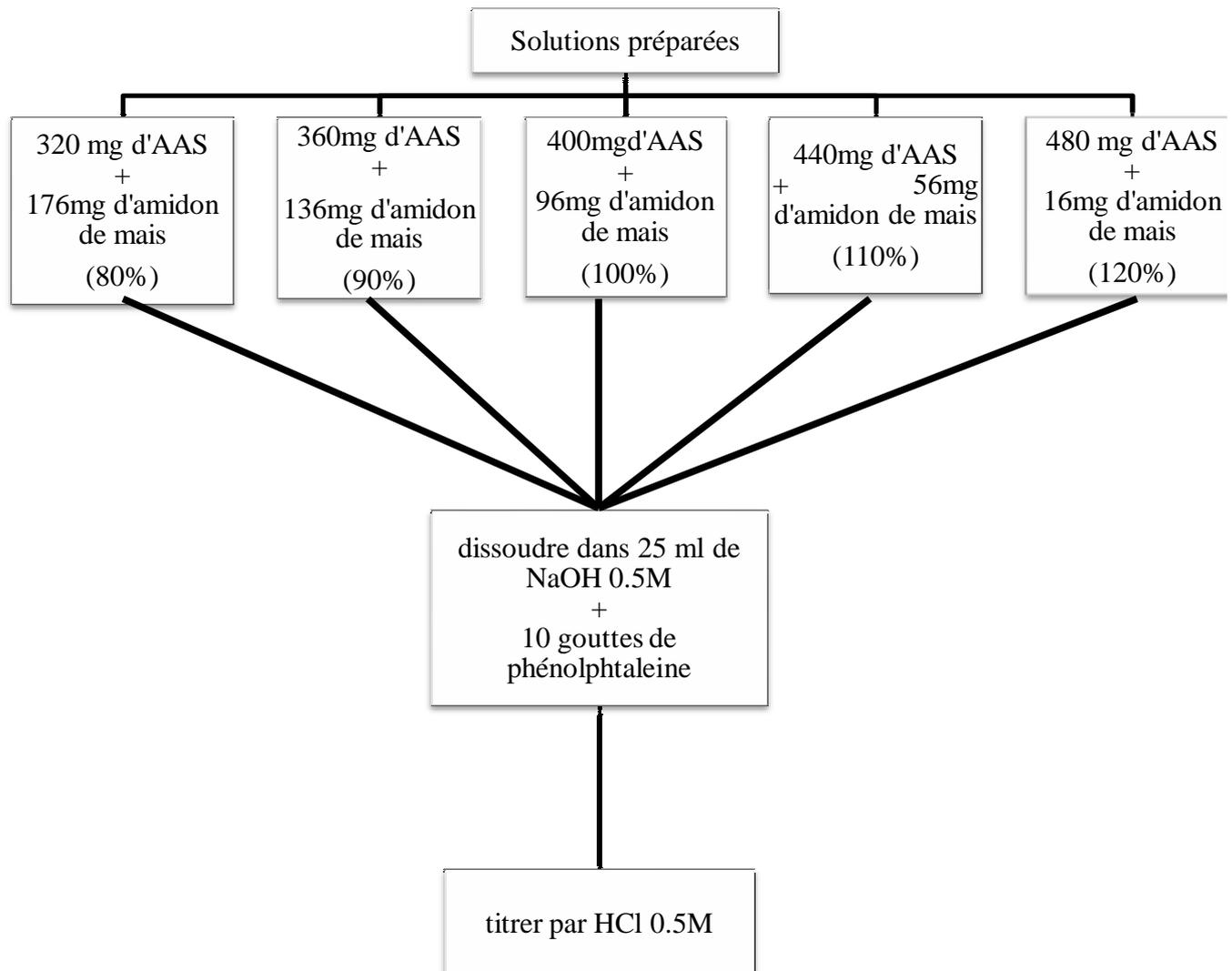


Schéma 5 : Etapes des essais réalisés pour l'étude de la linéarité

Partie expérimentale

1.2.3.2.2. Analyse statistique :

Ø Calcul de la pente :

L'estimation de a s'obtient en appliquant la méthode des moindres carrés : le but est de rendre minimale la somme des écarts entre les valeurs expérimentales y_{ij} et les valeurs estimées y'_{ij}

$$a = \frac{\sum_{j=1}^k \sum_{i=1}^{n_j} (x_{ij} - \bar{x})(y_{ij} - \bar{y})}{\sum_{j=1}^k \sum_{i=1}^{n_j} (x_{ij} - \bar{x})^2}$$

Soit a le coefficient de régression respective de la droite D .

Ø Calcul de l'ordonnée à l'origine :

Selon la méthode des moindres carrés, la droite de régression linéaire passe par le point de coordonné \bar{x} et \bar{y} , donc l'équation suivante est vérifiée :

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

Soient b l'ordonnée à l'origine de la droites D .

Ø Calcul du coefficient de corrélation :

Bien que les informations fournies par le coefficient de corrélation soient limitées .sa détermination est aisée soient :

- $S_{x_{ij}}$ et $S_{y_{ij}}$ les écarts types respectifs des variables x_{ij} et y_{ij}

- $S_{x_{ij}y_{ij}}$ la covariance des variables x_{ij} et y_{ij}

Calcul de la covariance :

$$S_{x_{ij}y_{ij}} = \frac{\sum_{j=1}^k \sum_{i=1}^{n_j} (x_{ij} - \bar{x})(y_{ij} - \bar{y})}{(N - 1)}$$

Calcul de coefficient de corrélation :

$$r = S_{x_{ij}y_{ij}} / (S_{x_{ij}} * S_{y_{ij}})$$

Partie expérimentale

Ø Test de comparaison de l'ordonnée à l'origine avec le zero :

Soit S_b l'écart type de l'ordonnée à l'origine on vérifie l'inégalité :

$$\frac{|b|}{S_b} < t(\alpha; N - 2)$$

Avec $t_{(\alpha, N-2)}$ lu dans la table de student .si celle-ci est vérifié, on peut affirmer que l'ordonnée à l'origine n'est pas significativement différente de 0 au seuil de probabilité de $p=1-\alpha$

Soit S_b l'écart type respectifs de l'ordonnée à l'origine de la droite D.

Ø Changement de variable :

L'étude statistique qui suit nécessite le changement de variables suivant :

$$\bar{X}_j = \sum_{i=1}^{n_j} x_{ij} / n_j$$

$$Y_{ij} = a.(\bar{X} - x_{ij}) + y_i$$

Ø Test d'homogénéité des variances :

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

Le critère à utiliser est :

$$C = S^2 \max / \sum_{j=1}^k S^2_j$$

S^2_j = variance du groupe j, $S^2 \max$ = variance la plus élevée des k groupe j.

Si l'inégalité suivante est vérifiée : $C < C(\alpha; k; n-1)$ l'ensemble des variances des différents groupes j peut être considéré comme homogène au risque α .

Partie expérimentale

Ø Test d'existence d'une pente significative :

Ce test consiste à comparer les variations dues à la régression et aux erreurs (expérimentales et d'ajustement)

$$F_1 = S^2_I / S^2_R > F(\alpha ; 1 : N-2)$$

Si F_1 est significatif, on conclut à l'existence d'une pente, donc à une dépendance linéaire au seuil de probabilité considéré.

Tableau 3 : Test d'existence d'une pente significative

Variations	DDL	Somme des carrés	variance
Variation totale	N-1	$\sum T^2 = \sum_{j=1}^k \sum_{i=1}^{n_j} (Y_{ij} - \bar{Y})^2$	
Variation due à la régression	1	$\sum I^2 = b^2 \sum_{j=1}^k n_j (\bar{X}_j - \bar{X})^2$	$S^2_i = \sum I^2$
Variation Résiduelle	N-2	$\sum R^2 = \sum T^2 - \sum I^2$	$S^2_R = \sum R^2 / (N-2)$

Ø Test de validité de la droite de régression :

Ce test permet de comparer les erreurs d'ajustement et expérimental (S^2_E) :

$$F_2 = S^2_L / S^2_E > F(\alpha ; k-2 : N-k)$$

Si F_2 n'est pas significatif, l'ajustement est considéré valide au seuil de probabilité considéré.

Tableau 4 : Test de validité de la droite de régression

Variations	DDL	Somme des carrés	Variance	F calculé
Erreur expérimentale	N-k	$\sum E^2 = \sum_{j=1}^k \sum_{i=1}^{n_j} (Y_{ij} - \bar{Y})^2$	$S_E^2 = \sum E^2 / (N-K)$	$F_2 = S_L^2 / S_E^2$
Erreur de la régression	k-2	$\sum L^2 = \sum R^2 - \sum E^2$	$S_L^2 = \sum L^2 / (K-2)$	

1.2.3.3. Exactitude

1.2.3.3.1. Protocole :

L'exactitude de la méthode a été évaluée en utilisant le protocole (les résultats) de la linéarité.

1.2.3.3.2. Analyse statistique :

Ø Système de référence considéré : étalon 100%

Soient x_{100} et y_{100} respectivement la pesée et l'observation correspondant à la solution de référence .effectuer le changement de variable suivant :

$$Y_{ij} = y_{ij} \cdot x_{100} / x_{ij} \cdot y_{100}$$

Cette méthode permet d'évaluer l'exactitude dans les conditions de dosage routinières.

Ø Vérification de l'homogénéité des variances liées :

Effectuer le test de Cochran en considérant les valeurs y_{ij} pour vérifier l'homogénéité des variances des différents groupes j. le critère à utiliser est

$$C = S^2 \max / \sum_{j=1}^k S_j^2$$

S_j^2 = variance du groupe j ; $S^2 \max$ = variance la plus élevée des k groupe j

Si l'inégalité suivante est vérifiée : $C < C(\alpha ; k ; n-1)$, l'ensemble des variance des différents groupes j peut être considéré comme homogène au risque α .

Partie expérimentale

Ø Test de validité des moyennes :

Ce test consiste à comparer les erreurs intergroupes et intra-groupes.

$$F_3 = S^2_C / S^2_E \times F(\alpha; k-1; N-k)$$

Si F_3 n'est pas significatif, on peut dire, au risque considéré que les variations entre les différents groupes sont dues aux erreurs expérimentales.

Tableau 5 : Test de validité des moyennes

variations	DDL	Somme des carrés	Variances	F calculé
Variation totale	N-1	$\sum T^2 = \sum_{j=1}^k \sum_{i=1}^{n_j} (Y_{ij} - \bar{Y})^2$	$S_T^2 = \sum T^2 / (N-1)$	
Variation intra-groupe	N-k	$\sum E^2 = \sum_{j=1}^k \sum_{i=1}^{n_j} Y_{ij} - \bar{Y}_j)^2$	$S_E^2 = \sum E^2 / (N-1)$	$F_3 = S^2_C / S^2_E$
Variation intergroupe	k-1	$\sum C^2 = \sum T^2 - \sum E^2$	$S_C^2 = \sum C^2 / (k-1)$	

Ø Estimation du recouvrement moyen :

Après avoir vérifié le test précédent, il est possible de calculer la valeur du recouvrement moyen et son intervalle de confiance :

$$\bar{Y} = \sum_{j=1}^k \left(\frac{1}{kn_j} \right) \sum_{i=1}^{n_j} Y_{ij}$$

$$IRm = \bar{Y} \pm t_{(\alpha; N-1)} S_T / N$$

Avec $t_{(\alpha; N-1)}$ lu dans la table de student

Partie expérimentale

1.2.3.4. Fidélité :

1.2.3.4.1. Protocole :

Effectuer 3 séries de 7 pesées de la concentration théorique (100%) sur la forme pharmaceutique reconstituée et ce à raison d'une série par jour.

L'ensemble des essais de fidélité réalisés sur la forme pharmaceutique reconstituée sont donnés par le schéma 6

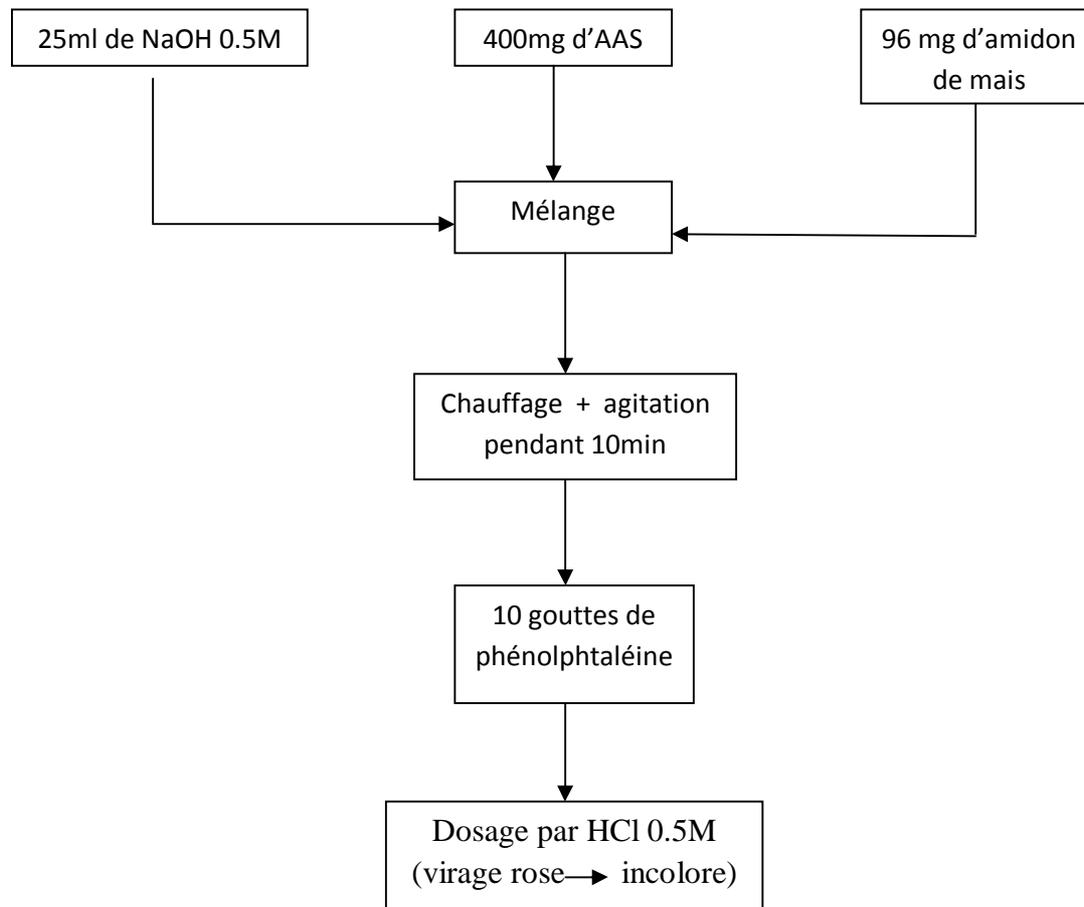


Schéma 6: Etapes des essais réalisés de la fidélité

Partie expérimentale

1.2.3.4.2. Analyse statistique :

Ø Conditions de répétabilité :

A l'intérieur de chaque groupe, les 7 essais répondent aux conditions de répétabilité, dans lesquelles les résultats d'essais indépendants les uns des autres sont obtenus avec la même méthode, sur un échantillon initial homogène soumis à l'essai dans le même laboratoire, par le opérateur utilisant le même équipement, dans un court intervalle du temps.

Ø Conditions de fidélité intermédiaire :

Les 3 groupes d'essais répondent aux conditions de fidélité intermédiaire, dans lesquelles les résultats d'essais sont obtenus avec la même méthode sur un échantillon initial homogène, soumis à l'essai dans différents laboratoires, et/ou par différents opérateur, et/ou utilisant un équipement différents, à des jours différents.

Ø Système de référence considéré : étalon 100%

- Transformation des données brutes en quantités retrouvées (masse estimée) :

$$X_{ij}=y_{ij}/a_2$$

a_2 est la pente de la droite de régression D_2 calculée précédemment.

- Détermination des pourcentages de recouvrement :

$$Y_{ij}=X_{ij} \cdot 100/x_{ij}$$

Ø Moyenne des groupes :

La moyenne m_j des n_j répétition à l'intérieure du groupe j est donnée par

$$m_j = \sum Y_{ij}/n_j.$$

Ce qui permet de dresser un tableau des moyennes des groupes.

Tableau 6 : Moyenne des groupes

Groupe 1	Groupe2	Groupe j	Groupe k
m_1	m_2	m_j	m_k
n_1 valeur	n_2 valeur	n_j valeur	n_k valeur

Partie expérimentale

Ø Dispersion à l'intérieur des groupes de mesures :

La variance de répétabilité à l'intérieure du groupe j est donnée par :

$$S_j^2 = \sum (Y_{ij} - m_j)^2 / n_j - 1$$

Nombre de degré de liberté $NDL_j = n_j - 1$. l'écart type à l'intérieure du groupe j est donné par S_j , ce qui permet de dresser un tableau des variances et des NDL à l'intérieure des groupes.

Tableau 7 : Tableau des variances et des NDL

	Groupes		
Groupe 1	Groupe 2	Groupe j	Groupe k
S_1^2	S_2^2	S_j^2	S_k^2
NDL_1	NDL_2	NDL_j	NDL_k

Ø Test d'homogénéité des variances à l'intérieure des groupes (Test de Cochran) :

Les éléments importants dans ce test sont :

- Ce test ne s'applique qu'aux échantillons tirés de populations normales ou voisines de la normale,
- Le critère à utiliser est :

$$C = S_j^2 \max / \sum S_j^2.$$

Ø Variance de répétabilité :

Lorsque tous les groupes ont le même nombre de mesures n :

$$S_r^2 = \sum (S_j^2) / k.$$

Nombre de degré de liberté = k (n-1).

Partie expérimentale

Ø Variance intergroupes :

Cas particulier où tous les groupes ont le même nombre de mesures n :

$$S_g^2 = (\sum (m_j - \bar{m})^2 / (k-1)) - (S_r^2 / n).$$

$$\bar{m} = \sum m_j / k$$

Ø Variance de fidélité intermédiaire :

Elle est donnée par : $SR^2 = S_r^2 + S_g^2$.

Il peut arriver que la valeur calculée pour S_g^2 soit négative. Ce cas peut se produire lorsque la variabilité intergroupe n'est pas significative vis-à-vis de la variance de répétabilité. Dans ce cas, on remplace par zéro la valeur négative trouvée.

Ø Coefficient de variation de répétabilité

$$cv = \frac{\sqrt{S_r^2}}{\bar{m}} * 100$$

Ø Coefficient de variation total

$$cv = \frac{\sqrt{S_g^2}}{\bar{m}} * 100$$

La condition est : $CV_r < 2.0\%$

Les résultats de l'expérimentation sont interprétés à l'aide du logiciel origine 6.0.

2. RESULTATS ET DISCUSSION :

On valide une procédure analytique par l'intermédiaire des critères suivant :

- ü Spécificité
- ü Linéarité
- ü Exactitude
- ü Fidélité

Partie expérimentale

2.1. Spécificité :

Tableau 8: Essais de spécificité

		masse d'AAS (mg)	nombre de m.mole de NaOH consommé
essai1	standard	400,01	4,4489
	échantillon	400,82	4,5455
	placebo	0	0
essai2	standard	400,29	4,4516
	échantillon	400,25	4,4516
	placebo	0	0

Le nombre de mole consommé de NaOH obtenues avec l'amidon de maïs seul, est nul donc la méthode de dosage est spécifique.

2.2. Linéarité :

2.2.1. Données brutes :

Les formules quantitatives des essais réalisés pour la linéarité sont résumées dans le tableau suivant :

Tableau 9 : Données brutes pour la linéarité

Concentration en %	Séries	α	Masse AAS (g)	C_{NaOH}	Volume HCl (ml)
80	J1	1.0275	0,32039	0.44523	16,50
	J2	1.0275	0,32070	0.44523	16,40
	J3	1.1050	0,32004	0.46748	15,90
90	J1	1.0275	0,36049	0.44523	15,30
	J2	1.0275	0,36027	0.44523	15,40
	J3	1.1050	0,36018	0.46748	14,90
100	J1	1.0300	0,40082	0.47089	14,90
	J2	1.0275	0,40026	0.44523	14,50
	J3	1.0275	0,40025	0.44523	14,60
110	J1	1.0300	0,44073	0.47089	14,00
	J2	1.1050	0,44004	0.46748	13,30
	J3	1.0275	0,44034	0.44523	13,50
120	J1	1.0300	0,48184	0.47089	13,20
	J2	1.0275	0,48001	0.44523	12,70
	J3	1.0275	0,48008	0.44523	12,80

Partie expérimentale

2.2.2. Courbe d'étalonnage:

Pour tracer la courbe d'étalonnage, toujours à l'aide du logiciel origin 6.0, on calcule le volume de NaOH correspondant au volume de HCl retenue et le nombre de mole de NaOH consommé en milli mole comme le récapitule le tableau suivant :

Tableau 10 : Données pour la courbe d'étalonnage

Concentration en %	Séries	Masse AAS (g)	Volume NaOH (ml)	Nombre de mole NaOH consommée
80	J1	0,32039	8,04625	3,58243
	J2	0,32070	8.14900	3,62818
	J3	0,32004	7.43050	3,47361
90	J1	0,36018	8.53550	3.99018
	J2	0,36049	9.27925	4,13140
	J3	0,36027	9.17650	4.08565
100	J1	0,40082	9,65300	4,54550
	J2	0,40026	10,10125	4,49738
	J3	0,40025	9,99850	4,45163
110	J1	0,44073	10,58000	4,98202
	J2	0,44004	10,30350	4,81668
	J3	0,44034	11,12875	4,95485
120	J1	0,48184	11,40400	5,37003
	J2	0,48001	11,95075	5,32083
	J3	0,48008	11,84800	5,27509

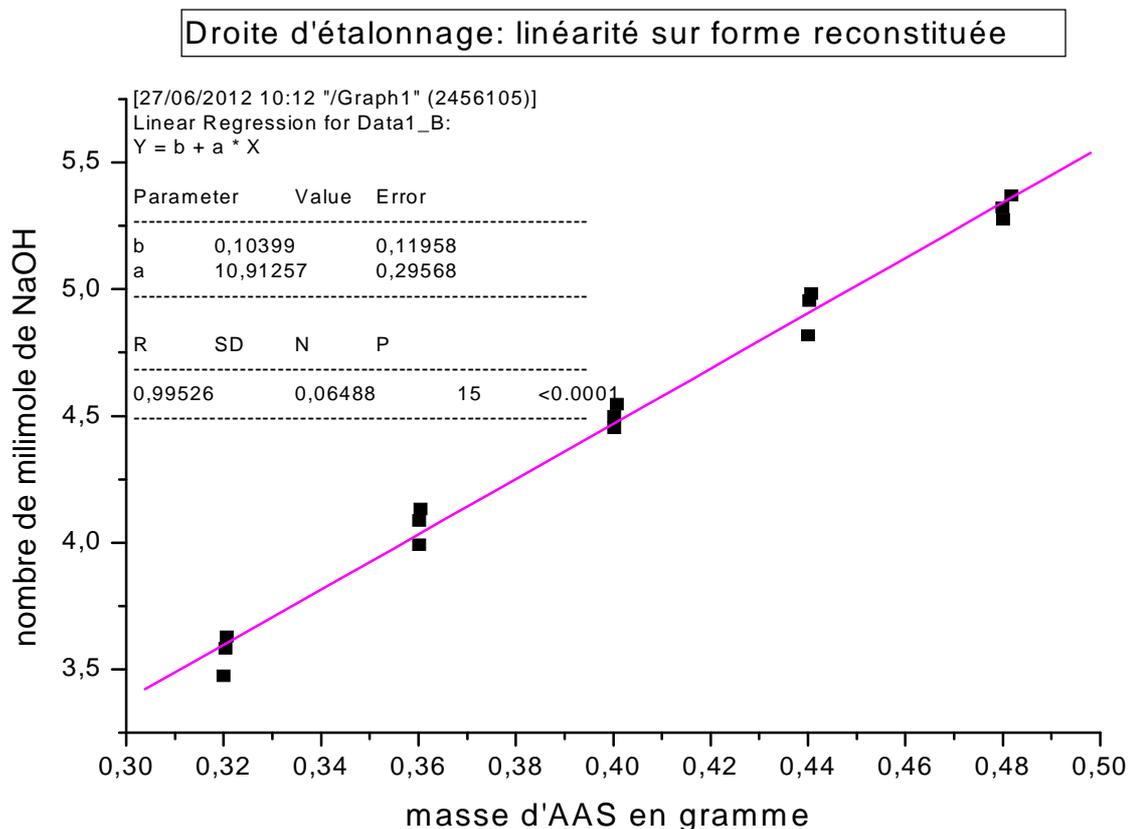


Schéma 7 : Courbe d'étalonnage sur forme reconstitué

La valeur de la pente, l'ordonnée à l'origine et le coefficient de corrélation sont tirés directement du graphe et regroupés dans le tableau suivant :

Tableau 11 : Résultats tirés de la courbe

	Sur la forme reconstituée	Erreur
La pente	10.91257	0.29568
L'ordonnée à l'origine	0.10399	0.11958
Coefficient de corrélation	0.99526	0.06488

Partie expérimentale

2.2.3. Test de comparaison de l'ordonnée à l'origine avec le zéro :

Soit S_b l'écart type de l'ordonnée à l'origine on vérifie l'inégalité :

$$|b|/S_b < t(0.05,13)$$

Tableau 12: Test de comparaison de l'ordonnée à l'origine avec le zéro

		t calculé	t théorique
Ordonnée à l'origine	0,10399	0,86	2,16
Ecart type	0,11958		

On peut affirmer que l'ordonnée à l'origine n'est pas significativement différente de 0 au seuil de 5%, cela nous permet de dire que notre système de référence sera l'étalon 100% (un point d'étalonnage)

Partie expérimentale

2.2.4. Changement de variable :

Après une application directe du changement de variable donné dans la première partie on aboutis au tableau (13)

Tableau 13 : Résultats du changement de variable

Concentration en %	Séries	Masse AAS (g)	Nombre de mole de NaOH consommé	\bar{X}_j	Y_{ij}
80	J1	0,32039	3,58243	0,32038	3,58232
	J2	0,32070	3,62818		3,62469
	J3	0,32004	3,47710		3,47732
90	J1	0,36018	3.99419	0,36031	3.99159
	J2	0,36049	4,13140		4,12944
	J3	0,36027	4.08565		4.08609
100	J1	0,40082	4,54550	0,40044	4,54136
	J2	0,40026	4,49738		4,49934
	J3	0,40025	4,45163		4,45370
110	J1	0,44073	4,98202	0,44037	4,97809
	J2	0,44004	4,82152		4,82028
	J3	0,44034	4,95485		4,95518
120	J1	0,48184	5,37003	0,48064	5,35694
	J2	0,48001	5,32083		5,32770
	J3	0,48008	5,27509		5,28119

Partie expérimentale

2.2.5. Test d'homogénéité des variances :

Le test de Cochran est appliqué aux variances des Y_{ij} calculé dans le tableau suivant :

Tableau 14 : Teste d'homogénéité des variances

Concentration en %	Séries	Y_{ij}	s_j^2	C calculé	C (0,05;5;2) cochran
80	J1	3,58232	0,00576	0,34	0,68
	J2	3,62469			
	J3	3,48081			
90	J1	3,99561	0,00497		
	J2	4,12944			
	J3	4,08609			
100	J1	4,54136	0,00192		
	J2	4,49934			
	J3	4,45370			
110	J1	4,97809	0,00727		
	J2	4,82512			
	J3	4,95518			
120	J1	5,35694	0,00146		
	J2	5,32770			
	J3	5,28119			

$C < C_{théorie}$ donc l'ensemble des variances intragroupes peut être considéré comme homogène au risque de 5%.

Partie expérimentale

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

Les variations sont calculées à l'aide des résultats données par le tableau (15).

Tableau 15 : Calculs intermédiaires pour le test d'existence d'une pente significatif

Concentration en %	Séries	Masse AAS (g)	$(Y_{ij}-Y^*)^2$	$3(\bar{X}_j - X^*)^2$
80	J1	0,32039	0,79452	0,01923
	J2	0,32070	0,72079	
	J3	0,32004	0,99274	
90	J1	0,36018	0,23241	0,00483
	J2	0,36049	0,11850	
	J3	0,36027	0,15023	
100	J1	0,40082	0,00458	0,00000
	J2	0,40026	0,00066	
	J3	0,40025	0,00040	
110	J1	0,44073	0,25443	0,00479
	J2	0,44004	0,12013	
	J3	0,44034	0,23184	
120	J1	0,48184	0,78015	0,01930
	J2	0,48001	0,72936	
	J3	0,48008	0,65208	

Avec $X^*=0.40043$

Et $Y^*=4.47368$

Donc on peut calculer les différentes variations et les résultats sont regroupés dans le tableau 14

Tableau 16 : Test d'existence d'une pente significative

variations	DDL	Variance	F calculé	F (0.05 ; 1 ; 13) Fisher
Variation totale	14	5.78280		4.67
Variation due à la régression	1	5.73293	d'où $F_1 = 1494.30495$	
Variation résiduelle	13	0.00384		

F_1 est significatif, on conclut à l'existence d'une pente, donc à une dépendance linéaire au seuil de probabilité de 5%.

2.2.7. Test de validité de la droite de régression :

Tableau 17 : Calculs intermédiaires pour le test de validité de la droite de régression

Concentration en %	Séries	Masse AAS (g)	\bar{Y}_j	$(y_{ij} - \bar{Y}_j)^2$
80	J1	0,32039	3,56144	0,00044
	J2	0,32070		0,00400
	J3	0,32004		0,00708
90	J1	0,36018	4,06904	0,00600
	J2	0,36049		0,00365
	J3	0,36027		0,00029
100	J1	0,40082	4,49813	0,00187
	J2	0,40026		0,00000
	J3	0,40025		0,00197
110	J1	0,44073	4,91785	0,00363
	J2	0,44004		0,00952
	J3	0,44034		0,00139
120	J1	0,48184	5,32195	0,00122
	J2	0,48001		0,00003
	J3	0,48008		0,00166

Partie expérimentale

Donc on peut calculer les erreurs expérimentale et de la régression comme le récapitule le tableau suivant :

Tableau 18: Test de validité de la droite de régression

variations	DDL	Variance	F calculé	F (0.05 ; 3 ; 10) Fisher
Erreur expérimentale	10	$S_E^2 = 0.00406$	D'où $F_2 = 0.597$	3.71
Erreur de la régression	3	$S_L^2 = 0.00242$		

F_2 n'est pas significatif, l'ajustement est considéré valide au seuil de probabilité de 5%

Partie expérimentale

Tableau 19: Tableau récapitulatif de l'étude statistique de la linéarité

	Sur la forme pharmaceutique reconstituée	Valeurs théorique au risque de 5%
Pentes de la droite d'ajustement	10.90737	
Ordonnées à l'origine des droites d'ajustement	0.10689	
Coefficient de corrélation	0.99543	
Test de comparaison des ordonnées à l'origine avec 0 (test de student)	0.91	2.16
Teste d'homogénéité des variances (test de cochran)	0.34	0.68
Test de l'existence d'une pente significative (test de fisher)	1554.1578	4.67
Test de validité des ajustements (test de fisher)	0.597	3.71

Tous les tests répondent aux critères d'acceptation donc la méthode est jugée linéaire

Partie expérimentale

2.3. Exactitude :

2.3.1. Système de référence considéré : étalon 100%

Les masses estimées correspondent aux résultats après calcul selon la formule suivant :

$$m = M \cdot C_{\text{NaOH}} \cdot V_{\text{NaOH}}$$

Tableau 20: Données brutes pour l'exactitude

Concentration en %	Séries	Masse AAS (mg)	Masse estimée	Index de recouvrement
80	J1	0,32039	322.78	100.75
	J2	0,32070	326.90	101.93
	J3	0,32004	312.97	97.79
90	J1	0,36018	359.51	99.82
	J2	0,36049	372.24	103.26
	J3	0,36027	368.12	102.18
100	J1	0,40082	409.55	102.18
	J2	0,40026	405.21	101.24
	J3	0,40025	401.09	100,21
110	J1	0,44073	448.88	101,85
	J2	0,44004	433.98	98.62
	J3	0,44034	446.43	101,38
120	J1	0,48184	483.84	100,42
	J2	0,48001	479.41	99,87
	J3	0,48008	475.29	99.00

Partie expérimentale

2.3.2. Vérification de l'homogénéité des variances liées (test de Cochran) :

Le test de Cochran est appliqué aux variances des index de recouvrement comme le récapitule le tableau suivant :

Tableau 21 : Test de l'homogénéité des variances liées

Concentration en %	Séries	Index de recouvrement	Variance	C calculée	C (0.05 ; 5 ; 2)
80	J1	100.75	4.547	0,37	0,68
	J2	101.93			
	J3	97.89			
90	J1	99.92	3.102		
	J2	103.26			
	J3	102.18			
100	J1	102.18	0.968		
	J2	101.24			
	J3	100,21			
110	J1	101,85	3.040		
	J2	98.72			
	J3	101,38			
120	J1	100,42	0,509		
	J2	99,87			
	J3	99.00			

$C < C_{\text{théorie}}$ donc l'ensemble des variances des différents groupes peut être considéré comme homogène au risque de 5%.

2.3.3. Test de validité des moyennes :

Les calculs intermédiaires suivants permettent de trouver les valeurs de différentes variations comme le montre le tableau 22

Partie expérimentale

Tableau 22 : Calculs intermédiaires pour le test de validité des moyennes

Concentration en %	Séries	Masse AAS (g)	Index de recouvrement	$(Y_{ij}-Y^*)^2$	\bar{Y}_j	$(Y_{ij}-\bar{Y}_j)^2$
80	J1	0,32039	100.75	0.00203	100.16	0.34230
	J2	0,32070	101.93	1.52015		3.14333
	J3	0,32004	97.79	8.45872		5,60926
90	J1	0,36018	99.82	0.78266	101.75	3.74299
	J2	0,36049	103.26	6.54964		2.27776
	J3	0,36027	102.18	2.18503		0.18334
100	J1	0,40082	102.18	2.18433	101.21	0,93693
	J2	0,40026	101.24	0.28909		0.00077
	J3	0,40025	100,21	0,23973		0.99923
110	J1	0,44073	101,85	1.32049	100.62	1.51075
	J2	0,44004	98.62	4.31182		3.98598
	J3	0,44034	101,38	0.46723		0.58300
120	J1	0,48184	100,42	0,08122	99.76	0,42903
	J2	0,48001	99,87	0.68165		0,01308
	J3	0,48008	99.00	2.88578		0,57571

Avec $Y^*=100.7$

Les variations sont calculées selon les formules données dans la partie analyse statistique et on trouve les résultats suivants :

Tableau 23 : Teste de validité des moyennes

Variations	DDL	Variances	F calculé	F (0.05 ; 4 ; 10) Fisher
Variation totale	14	$S_T^2=2.28283$	F3=0.78350	3.48
Variation intragroupe	10	$S_E^2=2.43335$		
Variation intergroupe	4	$S_c^2=1.90652$		

Partie expérimentale

F_3 n'est pas significatif, on peut dire au risque de 5%, que les variations entre les différents groupes sont dues aux erreurs expérimentales.

2.3.4. Estimation du recouvrement moyen :

Dans cette partie nous nous intéresserons au calcul de l'intervalle du recouvrement en utilisant l'index de recouvrement calculé auparavant :

Tableau 24 : Estimation du recouvrement moyen

Concentration en %	Sériés	Masse estimée	Index de recouvrement
80	J1	0,32039	100.75
	J2	0,32070	101.93
	J3	0,32004	97.79
90	J1	0,36018	99.82
	J2	0,36049	103.26
	J3	0,36027	102.18
100	J1	0,40082	102.18
	J2	0,40026	101.24
	J3	0,40025	100,21
110	J1	0,44073	101,85
	J2	0,44004	98.62
	J3	0,44034	101,38
120	J1	0,48184	100,42
	J2	0,48001	99,87
	J3	0,48008	99.00
		Moyenne	100.7
		Ecartype	1.51
		Limite inf	97.4
		Limite sup	104.0
		$t(\alpha=0,05;ddl=13)= 2,16$	

Partie expérimentale

L'intervalle de confiance du recouvrement moyen dans l'intervalle 80 à 120% est de :

Limite inférieure = 97.4%

Limite supérieure = 104.0%

La valeur de 100% est comprise dans l'intervalle de confiance. Donc la méthode est jugée exacte.

2.4. Fidélité :

2.4.1. Données brutes :

Les formules quantitatives des essais réalisés pour la fidélité sont résumés dans les tableaux suivant :

Tableau 25 : Données brutes J1 fidélité

Fidélité jour 01 (NaOH = 0,5021M ; HCl = 0,51591 M ; Pureté AAS = 99,8%)		
Echantillon 100%	Prise d'essai	Volume HCl
Ech 01	400,31	15,500
Ech 02	400,34	15,600
Ech 03	400,53	15,800
Ech 04	400,25	15,600
Ech 05	400,33	15,600
Ech 06	400,65	15,700
Ech 07	400,68	15,700

Tableau 26 : Données brutes J2 fidélité

Fidélité jour 02 (NaOH = 0,5021 M, HCl = 0,51591 M, Pureté AAS = 99,8%)		
Echantillon 100%	Prise d'essai	Volume HCl
Ech 01	400,8	15,900
Ech 02	400,3	15,600
Ech 03	400,69	15,700
Ech 04	400,08	15,400
Ech 05	400,67	15,700
Ech 06	400,96	15,900
Ech 07	400,09	15,600

Tableau 27 : Données brutes J3 fidélité

Fidélité jour 03 (NaOH = 0,47089 M, HCl = 0,48502 M, Pureté AAS = 99,8%)		
Echantillon 100%	Prise d'essai	Volume HCl
Ech 01	400,49	15,100
Ech 02	400,29	15,200
Ech 03	400,09	15,100
Ech 04	400,4	14,900
Ech 05	400,24	15,000
Ech 06	400,69	14,900
Ech 07	400,12	15,200

Partie expérimentale

2.4.2. Système de référence considéré : étalon 100%

2.4.2.1. Transformation des données brutes en quantités retrouvées :

Les masses estimées correspondent aux quantités retrouvées, sont regroupées dans le tableau ci-dessous :

Tableau 28 : Les masses estimées

Echantillon 100%	Masse estimée		
	J1	J2	J3
Ech 01	410,489	391,896	400,810
Ech 02	405,841	405,841	396.440
Ech 03	396,544	401,193	400,810
Ech 04	405,841	415,138	409.550
Ech 05	405,841	401,193	405,180
Ech 06	401,193	391,896	409.550
Ech 07	401,193	405,841	396.440

2.4.2.2. Détermination des pourcentages de recouvrement :

Tableau 29 : Les pourcentages de recouvrement

Echantillon 100%	FR		
	J1	J2	J3
Ech 01	102,54	97,78	100.08
Ech 02	101,37	101,38	99,04
Ech 03	99,00	100,13	100.18
Ech 04	101,40	103,76	102,29
Ech 05	101,38	100,13	101,23
Ech 06	100,14	97,74	102,21
Ech 07	100,13	101,44	99.08

Partie expérimentale

2.4.3. Moyenne des groupes :

La moyenne pour chaque journée est donnée dans le tableau suivant :

Tableau 30: Moyenne des groupes

Echantillon	FR		
	J1	J2	J3
Ech 01	102,54	97,78	100.08
Ech 02	101,37	101,38	99,04
Ech 03	99,00	100,13	100.18
Ech 04	101,40	103,76	102,29
Ech 05	101,38	100,13	101,23
Ech 06	100,14	97,74	102,21
Ech 07	100,13	101,44	99.08
moyenne	100,85	100,34	100,59

2.4.4. Dispersions à l'intérieur des groupes de mesures :

On calcule les variances pour chaque journée :

Tableau 31: Dispersion à l'intérieur des groupes

	J1	J2	J3
variance	1,36	4,57	1,84

2.4.5. Test d'homogénéité des variances à l'intérieure des groupes (Test de Cochran) :

Le test de cochran est appliqué à la dispersion à l'intérieur des groupes :

Tableau 32 : Teste d'homogénéité des variances à l'intérieure des groupes

$S_j^2 \text{max}$	4.57
ΣS_j^2	7.77
$C_{\text{calculé}}$	0.588
k (nb essais)	3
Nombre répétitions par essai	7
$C_{\text{théorique5\%}}(0.05 ; 3 ; 6)$	0.6771

$C_{\text{calculé}}$ est inférieur à la valeur critique de la table au seuil 5% ; le test de Cochran n'est pas significatif ; l'ensemble des variances peut être considéré comme homogène.

2.4.6. Variance de répétabilité :

Cette variance est la moyenne des variances des 3 jours :

Tableau 33 : Variance de répétabilité

	j1	j2	j 3
Variance S_j^2	1.36	4.57	1.84
S_r^2	2.59		

Partie expérimentale

2.4.7. Variance intergroupes :

Cette variance est calculée à l'aide de la formule donnée dans la partie analyse statistique afin de trouver les résultats suivants :

Tableau 34 : Variance intergroupes

M_j	(m_j-\bar{m})²
100,85	0.0676
100.34	0.0625
100.59	0.0000
$\bar{m} = 100.59$	$\sum (m_j - \bar{m})^2 / 2 =$ 0.06505
S_g^2	-0.305

Vu que S_g^2 négative. Ce cas peut se produire lorsque la variabilité intergroupe n'est pas significative vis-à-vis de la variance de répétabilité. Dans ce cas, on remplace par zéro la valeur négative trouvée

2.4.8. Variance totale :

Comme S_g^2 est nulle donc :

$$SR^2 = Sr^2 = 2.59$$

2.4.9. Coefficient de variation

Tableau 35 : Coefficients des variations

CV répétabilité	1.6% < 2.0%
CV inter groupe	0
CV fidélité intermédiaire	1.6% < 2.0%

les coefficients de variation de répétabilité et de fidélité intermédiaire répondent aux conditions exigées donc notre méthode présente une bonne fidélité.

CONCLUSION :

L'examen des différents tests développés dans cette partie expérimentale répondent aux normes exigés ; donc la méthode de dosage d'acide acétylsalicylique dans des comprimés de 500mg est valide au seuil de 5%

CONCLUSION GENERALE

La validation d'une méthode d'analyse en industrie pharmaceutique est une étape très importante pour assurer des résultats répondantes aux normes et aux exigences de l'assurance qualité.

A l'issu de l'étude réalisée dans le cadre de ce modeste travail et d'après les résultats obtenus on peut conclure que l'étude de la validation de la méthode de dosage de l'acide acétylsalicylique dans les comprimés 500mg nous à permis d'aboutir à :

- Ø Une spécificité de la méthode pour le dosage d'aspirine
- Ø Une linéarité de la méthode avec un coefficient de corrélation de 0.99526
- Ø La conformité des tests de student, cochran et fisher pour la forme pharmaceutique reconstituée.
- Ø L'exactitude de la méthode avec un intervalle de confiance de [97.4 ; 104.0]
- Ø Les tests de répétabilité et de fidélité intermédiaire ont donné les coefficients de variations qui répondent aux normes exigées :
CV répétabilité =1.6 %
CV fidélité intermédiaire =1.6%

Donc la méthode de dosage titrimétrique d'acide acétylsalicylique dans des comprimés de 500mg est valide au seuil de 5% et peut être utilisé pour le contrôle en routine.

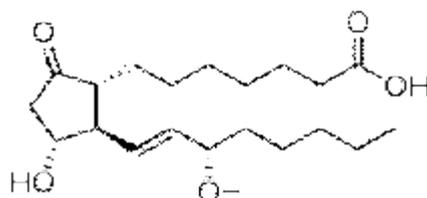
ANNEXE

Décoction : La décoction est une méthode d'extraction des principes actifs par dissolution dans l'eau bouillante, ce qui suppose que ces substances ne soient pas thermolabiles. Elle s'applique généralement aux parties les plus dures des plantes : racines, graines, écorce, bois.

Thrombotique : un anti thrombotique agent est un médicament qui réduit la formation de thrombus

Thrombus : ou caillot de sang, est le produit final de la coagulation du sang

Prostaglandines : Les prostaglandines sont des métabolites de l'acide arachidonique, obtenues à partir de phospholipides membranaires par action de phospholipases (plusieurs sous-types existants). Molécules liposolubles destinées à la sécrétion dans le milieu extracellulaire, elles jouent des rôles importants dans les organismes vivants.



Structure chimique de la prostaglandine E₁ (PGE₁).

cyclo-oxygénase : La cyclo-oxygénase (COX) est une enzyme qui permet la formation de prostaglandines à partir de l'acide arachidonique. Son action est inhibée par les anti-inflammatoires non stéroïdiens (AINS) comme l'aspirine.

COX-1 : Les COX-1 font partie d'une famille d'enzymes constitutives de l'organisme, qui se trouvent dans une immense majorité des cellules, et impliquées dans de nombreux mécanismes. Leur activité est indirectement liée à la production des thromboxanes

COX-2 : Les COX-2 font partie d'une famille d'enzymes inductives par de multiples facteurs pro-inflammatoires (cytokines, interférons ...). L'activité enzymatique de type "COX-2" est exprimée dans les cellules endothéliales vasculaires, rénales et même au niveau du système nerveux central

Fleurs de reine de près : La Reine-des-prés, *Filipendula ulmaria* (Linnaeus 1753)

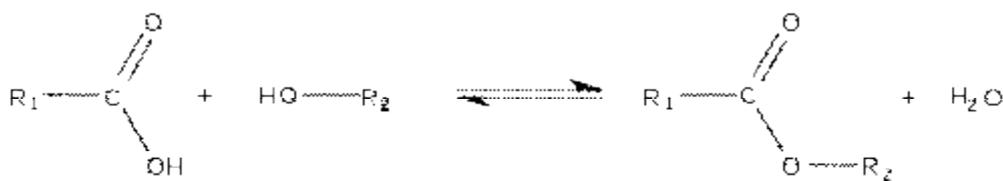
Maximowicz 1879, anciennement appelée ulmaire, est une plante herbacée vivace de la famille des Rosacées, originaire de l'Europe. C'est une plante mellifère.



L'écorce de saule. Le saule (*Salix*) est un genre d'arbres, d'arbustes, d'arbrisseaux de la famille des Salicacées (*Salicaceae*). Il comprend 350 espèces environ, réparties à travers le monde, principalement dans les zones fraîches et humides des régions tempérées et froides de l'hémisphère nord.



Réaction d'estérification : L'estérification est une réaction de chimie organique au cours de laquelle un groupe fonctionnel ester -COO- est obtenu par condensation d'un groupe acide carboxylique -COOH et d'un groupe alcool -OH.

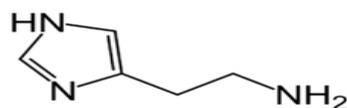


Point d'éclair : Un liquide, en soi et d'un point de vue purement physique, n'est pas inflammable. C'est le mélange des vapeurs du liquide dans l'air qui peut former un mélange gazeux inflammable.

Point d'éclair est donc défini comme la température la plus basse à laquelle un corps combustible émet suffisamment de vapeurs pour former, avec l'air ambiant, un mélange gazeux qui s'enflamme sous l'effet d'une source d'énergie calorifique telle qu'une flamme pilote, mais pas suffisamment pour que la combustion s'entretienne d'elle-même (pour ceci, il faut atteindre le point d'inflammation). Si l'inflammation ne nécessite pas de flamme pilote, on parle alors d'auto-inflammation.

Pression de vapeur saturante : La pression de vapeur saturante ou tension de vapeur est la pression à laquelle la phase gazeuse d'une substance est en équilibre avec sa phase liquide ou solide. Elle dépend exclusivement de la température.

Histamine : L'histamine est une molécule de signalisation du système immunitaire, de la peau, de l'estomac et du cerveau des vertébrés



Antalgique périphérique : les antalgiques périphériques, qui agissent à l'endroit de la douleur on parle d'antalgiques de palier 1.

Analgésiques centraux opiacés : les antalgiques centraux (opiacés proches de la morphine) agissent le système nerveux central : moelle épinière et cerveau. Ils appartiennent au palier 2

L'acétylation irréversible : L'acétylation est une réaction qui introduit un groupe fonctionnel acétyle ($-\text{CO}-\text{CH}_3$) dans un composé organique



L'acide salicylique subit une acétylation pour former l'aspirine

TXA2 : Prostaglandine Thromboxane alpha-2, Vasoconstriction (augmentation de la pression artérielle), agrégation plaquettaire, déclenche coagulation. Antagoniste des prostacyclines.

Micro-ulcérations : L'ulcération est une lésion élémentaire en pathologie dermatologique, caractérisée par une perte de substance dermique

Tératogènes : Les tératogènes sont des agents pharmacologiques qui lors de leur utilisation provoquent le développement de masses cellulaires anormales au cours de la croissance fœtale, provoquant des défauts physiques sur le fœtus.

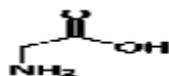
Biodisponibilité : La biodisponibilité est la mesure de la vitesse d'absorption et de la quantité de médicament absorbée.

Hydrolyse : L'hydrolyse d'une substance est sa décomposition par l'eau grâce aux ions H_3O^+ et HO^- provenant de la dissociation de l'eau. De façon schématisée, la réaction d'hydrolyse d'un ester est : $\text{R1-COO-R2} + \text{H}_2\text{O} \leftrightarrow \text{R2-OH (alcool)} + \text{R1-COOH (acide)}$

La réaction inverse est l'estérification.

Albumine : Les albumines (du latin *albus*, blanc) sont des protéines solubles dans l'eau pure, moins dans l'eau salée. Leur masse molaire est d'environ 65 000 g/mol, elles sont composées d'environ 580 acides aminés et ne contiennent pas de glucides.

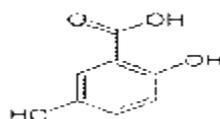
Glycine : La glycine, jadis appelée *glycocolle* ou *acide aminoacétique*, est un acide α -aminé neutre. C'est le plus simple des acides aminés (le plus petit), et le seul à ne pas avoir de pouvoir rotatoire puisque son carbone en position alpha n'est pas substitué de façon asymétrique.



La glycine

glycuroconjugaison: La glucurono-conjugaison est l'addition de composés hydrophiles à un toxique ou produit de dégradation hydrophobe pour permettre sa solubilisation et ainsi son élimination dans les urines.

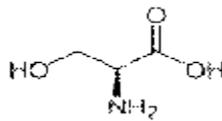
Acidegentisique : L'acide gentisique ou Acide gentianique ou acide 2,5 dihydroxybenzoïque ou Acide hydroxy-5 salicylique est un composé organique aromatique



Isoforme : Les isoformes d'une protéine sont les différentes formes qu'elle prend lorsqu'elle est issue de gènes différents, ou du même gène par épissage alternatif.

Enzymes : Une enzyme est une protéine qui joue un rôle de catalyseur biologique (ou *biocatalyseur*), c'est-à-dire de composé qui facilite une réaction biochimique sans en modifier les produits.

Sérine : C'est un acide aminé aliphatique hydroxylé, dont le nom en nomenclature systématique est acide 2-amino-3hydroxypropanoïque. Il est présent dans la plupart des protéines et c'est l'un des 20 acides aminés naturels les plus courants sur terre



L'infarctus du myocarde : L'infarctus du myocarde (IDM étant une abréviation courante) est une nécrose (mort de cellules) d'une partie du muscle cardiaque

Alcalose respiratoire : L'alcalose respiratoire, ou ventilatoire, est un trouble de l'équilibre acido-basique défini par une hausse du pH dans le secteur extracellulaire plasmatique jusqu'à >7,45, alors qu'il se situe normalement entre 7,38 et 7,42 (son contraire acidose métabolique)

Hyperlactacidémie : augmentation anormale de la production d'acide lactique

Cétonurie : Le terme cétonurie désigne la présence anormale de corps cétoniques dans les urines.

On parle également de cétonurie pour désigner l'élimination urinaire trop importante de corps cétoniques tels que (liste non exhaustive) :

- L'acétone
- L'acide acétoacétique
- L'acide bêtahydroxybutyrique

Aminoacidurie : Présence d'acides aminés libres dans l'urine

Acidose mixte :

- Ü L'**acidose métabolique** est un trouble de l'équilibre acido-basique défini par une baisse du pH dans le secteur extracellulaire plasmatique.
- Ü L'**acidose respiratoire** est un trouble de la régulation du pH sanguin.

Hypokaliémie : L'**hypokaliémie** est définie par une concentration plasmatique de potassium inférieure à 3,5 milli moles par litre. Il s'agit donc d'un désordre hydro-électrolytique pouvant menacer le pronostic vital par la survenue de troubles du rythme cardiaque, également observés dans l'hyperkaliémie

Hypoprothrombinémie modérée : c'est une maladie rare qui touche la synthèse des plaquettes sanguines

Hémodynamiques : est l'étude des propriétés du flux sanguin

Rhinites : Une rhinite est le terme médical décrivant l'irritation et l'inflammation (aiguë ou chronique) des muqueuses de la cavité nasale.

Morbidité : En épidémiologie, le taux de morbidité est le rapport qui mesure l'incidence et la prévalence d'une certaine maladie

Chimio-prévention : La **chimio-prévention** (chemoprevention en anglais) est une technique de prophylaxie consistant à administrer à une personne des médicaments, vitamines, minéraux ou autres produits pour diminuer son risque de développer une maladie donnée, souvent un cancer.

Prophylaxie : Une prophylaxie désigne le processus actif ou passif ayant pour but de prévenir l'apparition ou la propagation d'une maladie.

Déficit en G6PD : déficit en glucose 6 phosphate déshydrogénase

Le favisme ou déficit en glucose-6-phosphate déshydrogénase, ou déficit en G6PD, est le déficit enzymatique le plus répandu dans le monde, se caractérisant par une destruction des globules rouges

Fluorimétrie : La fluorimétrie est une méthode de dosage utilisant la propriété de certaines molécules d'être fluorescente. On mesure la fluorescence qui est proportionnelle à la concentration.

Fluorescente : Une molécule fluorescente possède la propriété d'absorber un rayonnement lumineux incident (excitation) et de restituer rapidement (quelques nanosecondes) l'énergie absorbée sous forme d'émission de lumière (fluorescence)

Colorimétriques : Le colorimètre est un appareillage qui permet de mesurer la couleur de la surface d'un objet en la définissant par des coordonnées dans un espace colorimétrique.

Spectrophotométrie infrarouge : La spectroscopie infrarouge (parfois désignée comme spectroscopie IR) est une classe de spectroscopie qui traite de la région infrarouge du spectre électromagnétique. Elle recouvre une large gamme de techniques, la plus commune étant un type de spectroscopie d'absorption. Comme pour toutes les techniques de spectroscopie, elle peut être employée pour l'identification de composés ou pour déterminer la composition d'un échantillon. Les tables de corrélation de spectroscopie infrarouge sont largement présentes dans la littérature scientifique.

Spectrophotométrie uv : La spectrophotométrie est une méthode analytique quantitative qui consiste à mesurer l'absorbance ou la densité optique d'une substance chimique donnée, généralement en solution. Plus l'échantillon est concentré, plus il absorbe la lumière dans les limites de proportionnalité énoncées par la loi de Beer-Lambert.

La densité optique des échantillons est déterminée par un spectrophotomètre préalablement étalonné sur la longueur d'onde d'absorption de la substance à étudier.



CPG (La chromatographie en phase gazeuse): est comme toutes les techniques de chromatographie, une technique qui permet de séparer des molécules d'un mélange éventuellement très complexe de nature très diverses. Elle s'applique principalement aux composés gazeux ou susceptibles d'être vaporisés par chauffage sans décomposition. Elle est de plus en plus utilisée dans les principaux domaines de la chimie.

La titrimétrie : La titrimétrie est une forme d'analyse volumétrique qui consiste à déduire la quantité d'une composante chimique d'un mélange par la quantité de réactif (titrant) nécessaire pour la faire réagir en entier.

Les lois statistiques :

La loi normale :

En théorie des probabilités, on dit qu'une variable aléatoire réelle X suit une loi normale (ou loi normale gaussienne, loi de Laplace-Gauss) d'espérance μ et d'écart type σ strictement positif (donc de variance σ^2) si cette variable aléatoire réelle X admet pour densité de probabilité la fonction $p(x)$ définie, pour tout nombre réel x , par :

$$p(x) = \frac{1}{\sigma\sqrt{2\pi}} e^{-\frac{1}{2}\left(\frac{x-\mu}{\sigma}\right)^2}$$

Une telle variable aléatoire est alors dite variable gaussienne.

On note habituellement cela de la manière suivante :

$$X \sim \mathcal{N}(\mu, \sigma^2)$$

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.

Test de Cochran : Le test de Cochran a pour objet la vérification de l'homogénéité des variances concernant plusieurs populations.

Loi de Fisher : Découverte en 1925 par *Ronald Aymler Fisher* (1890-1962), la loi de Fisher est une loi d'échantillonnage. Le symbole **F** a été donné par Snedecor à la variable de Fisher en 1934. Elle trouve son application dans les tests de comparaison de variances et dans des tests associés à l'analyse de la variance et à la régression simple et multiple.

Logiciel ORIGIN6.0 :

Origin 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.

Caractéristiques de l'Amidon de maïs

Synonymes	amidon de maïs, starch, maize starch, maydis amyllum,
Formule chimique	$[C_6 H_{10} O_5]_n$; n= 300-1000
Caractères organoleptiques	poudre d'un blanc mat à faiblement jaunâtre, très fine, insipide, qui crisse sous la pression des doigts, pratiquement inodore et insipide.
Solubilité	pratiquement insoluble dans l'eau froide et dans l'alcool. La présence de grains ayant des fentes ou des irrégularités sur leur bord est exceptionnelle
Rôles	Diluant, désintégrant, liant
Densité	1.478 g/cm ³
Stabilité	stable hors humidité.
Point de gonflement	65°C
Point de gélatinisation	73°C
Viscosité	13.1 cp à 25°C.

Références bibliographiques

- [1] **H.Levesque, O.Lafont** ; l'aspirine à travers les siècles : rappel historique ; éditions scientifiques et médicales ; Elsevier SAS.rev Med interne 2000 ; 21 suppl 1 :8-17
- [2] Wikipidia : acide acétyle salicylique
- [3] **L. Monassier** ; faculté de médecine de Strasbourg, module de pharmacologie clinique ; anti inflammatoires non stéroïdiens ; 2005-2006
- [4] **Biofarma** ; « dosage des médicaments tome II » cahier des médicaments N°18 biologie médicale 2000
- [5] <http://www.docteurclic.com/encyclopedie/aspirines.aspx>
- [6] **Menouer Mokhtar** ; « comportement analytique d'acide acétylsalicylique en chromatographie .application au contrôle physico-chimique des médicaments » thèse de doctorat en sciences médicales université d'Alger, institut de pharmacie.
- [7] **G.Kister ;M.Ribes ; J.Chanal ;A.Catterine** ; Ann.Pharm.Fr, 1976,34,215-222
- [8] **F. Bouabdallah**, thèse doctorat d'état .pharmacie .université d'Alger 1975
- [9] The United States pharmacopeia XIX edition
- [10] Agence française de sécurité sanitaire des produits de santé ; bonnes pratiques de Fabrication, bulletin officiel N°2011/8 bis
- [11] **Merriane RAYNAND** ; validation du procédé de fabrication dans l'industrie Pharmaceutique, appliquée aux formes solides orales ; université de LIMOGES, faculté de Pharmacie 2011
- [12] ICH Harmonised Tripartite Guideline, 2000
- [13] **Olivier Nicolas ; Christine Farenc ; Françoise Bressole** ; A strategy of validation of bioanalytical methods to support pharmacokinetic and toxicological studies ; annales de toxicologie analytique VOL XVI N°2 ; 2004
- [14] **Ludwig Huber** ; validation and qualification in analytical laboratories.
- [15] **J.Caporal- Gautier, J.M.Nivet; P.Algranti ;M.Guilloteau ; M.Histe ; M.Lallier ; J.J.N'Guyen-Huu et R.Russotto** ; guide de validation analytique rapport d'une Commission SFSTP I. Méthodologie ; 205-226-1992
- [16] **VIAL GEROME** ; définition de la validation de méthode et outils associés ; laboratoire Environnement de chimie analytique de l'ESPCI ; paris 2006.
- [17] ADN www.adneurope.com
- [18] **Jaques Gaupy** ; plan d'expérience pour surface de réponse ; série génie industriel.

Résumé

Lors de l'analyse de l'aspirine, il est important d'utiliser une méthode analytique correctement validée pour obtenir des résultats fiables qui pourront être ainsi interprétés de façon satisfaisante.

Dans ce mémoire les différentes étapes de la validation d'une méthode de dosage d'aspirine dans des comprimés de 500mg par titrimétrie sont développées ; leurs buts étant de démontrer la fiabilité des résultats.

L'analyse statistique à l'aide du logiciel origin 6.0 nous a permis de conclure :

La spécificité de la méthode, la linéarité dans le domaine (80% - 120%), La conformité des tests de Student, Cochran et Fisher, l'exactitude avec un intervalle de confiance de [97.4 ; 104.0], et enfin le coefficient de variation répond aux normes exigées $CV=1.6 < 2.0\%$

D'où la méthode est valide au seuil de 5%

Mots clé : Aspirine, Titrimétrie ; validation, dosage ; comprimé.

Abstract

During the analysis of aspirin, it is essential to use well defined and fully validated analytical methods to obtain reliable results that can be satisfactorily interpreted. In this memory the various criteria for the validation of an assay of aspirin in tablets of 500mg titrimetrically are developed, their goals being to demonstrate the reliability of results.

Statistical analysis using the logiciel 6.0 allows us to conclude:

The selectivity of the method, linearity in the field (320 mg à 480mg), Compliance Student's test, Cochran and Fisher, the accuracy with a confidence interval [97.4, 104.0], and finally the coefficient of variation meets the standards required $CV = 1.6 < 2.0\%$ Hence the method is valid at the 5%

Key –words: aspirin, titrimetrically, validation, assay, tablets.