N° d'ordre :

REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE

MINISTRE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR ET DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE

UNIVERSITE DE MOULOUD MAMMERI DE TIZI-OUZOU

FACULTE DES SCIENCES

DEPARTEMENT DE CHIMIE

MEMOIRE

Présentée pour obtenir le Grade de

MASTER

Filière : Chimie

Spécialité : Chimie pharmaceutique

Par

Melle SEBAOUI Ouiza **Melle BENMAHDJOUB Sara**

Thème

MISE AU POINT ET VALIDATION D'UNE METHODE DE DOSAGE DU PARACETAMOL DANS LES SUPPOSITOIRES 150,200 ET 300 mg PAR UV/VISIBLE

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

Mme AYATI Fadila	MCB-UMMTO	Présidente
Mr MAMOU Marzouk	MCB-UMMTO	Rapporteur
Mme BELMEHDI Lila	MCB-UMMTO	Co-Rapportrice
Mme KESSAL Fetta	MCB-UMMTO	Examinatrice
Melle TOUZOUIRT Saida	MCB-UMMTO	Examinatrice

REMERCIEMENTS

Tout d'abord, nous tenons à remercier le bon Dieu tout puissant de nous avoir donné la volonté, la patience, le courage pour accomplir ce travail.
Nos premiers remerciements vont à nos familles pour leurs contributions et soutien.

Nous exprimons notre profonde gratitude à M me AYATI.F qui a bien voulu présider le jury de ce travail.
Notre reconnaissance et profonde gratitude s'adresse à notre promoteur M r MAMOU.M
Nous adressons nos chaleureux remerciements à notre co-promotrice M me BELMEHDI.L pour son aide.

Nous sommes très heureuses de pouvoir exprimer notre profonde reconnaissance à M me KESSAL.F ET M lle TOUZOUIRT.S d'avoir accepter d'examiner notre travail.

Nous exprimons nos remerciements à l'ensemble du personnel de laboratoire analytique pour leurs aides et conseils : Mme BERKOUN ; Mme CHEBALA ; Mme FETHI. à M r LATRECHE K.

Nos sincères remerciements vont aussi à M me FERNANE.

Enfin, nous tenons à exprimer notre sympathie envers toute personne qui a contribué de près ou de loin à la réalisation de ce modeste travail.

Dédicace

C'est avec la plus grande émotion et la plus grande joie que je dédie Ce modeste travail à mes parents, sans qui je ne serai pas où j'en suis aujourd'hui,

- A mes frères et sœurs,

- A toute ma famille,

- A tous mes amis (es), particulièrement Karim Alger,

-A tous mes camarades d'études de département de chimie surtout ma binôme Sara et ma chérie Siham,

-A tous mes enseignants,

-A tous mes collèges de travail au niveau de laboratoire de la pharmacie galénique,

- A tous ceux et celles que j'aime et qui me sont chères.

Ouiza

DEDICACES

Je dédie ce modeste travail:

A mes très chers parents pour leurs dévouements, leurs amours, leurs sacrifices et leurs encouragements. Que ce travail soit, pour eux, un faible témoignage de ma profonde affection et tendresse.

A mes sœurs Et mes frères

A mon binôme d'honneur : Ouiza et mes très chères amies Sihem et Hadjer

A tous ceux qui m'aiment de près ou de loin.

Sara

SOMMAIRE

Introduction générale……..…1

Partie bibliographique

Chapitre I : Paracétamol

Introduction……..……2
1. Caractéristiques du Paracétamol…….……..…….…….…….……....2
1.1. Caractéristiques structurales……..…….……....2
1.2. Pharmacocinétique … ..……...…….……3
1.2.1. Absorption……..…….……..……..….3
1.2.2. Distribution ……...……4
1.2.3. Métabolisme……...…….……...…...4
1.2.4 Elimination…….……4
2. Mécanisme d'action……..…….……5
3. Association ……...…….……5
4. Toxicité ……..……...……6
Conclusion ……6

Chapitre II : Spectrophotométrie UV/VISIBLE

Introduction……7
1. Définition ……...7
2. Principes ...…….…….……...7
2.1. Absorption du rayonnement dans le domaine UV-VIS…….…….……7
2.2. Spectres obtenus, analyse qualitative ……...…….…….…….9
2.3. Analyse quantitative : lois de l'absorption moléculaire…….……...…….9
3. Instrumentation ……..…….…….…….……...10
3.1. Sources de rayonnement…….…….……..……..11
3.2. Cellules d'absorption……..…….……12
3.3. Détecteurs……..……..……..…12
3.4. Traitement des données…….…..…….……13

Conclusion …….……14

Chapitre III : Validation analytique

Introduction ……..……..15
1. Assurance de la qualité ……..….……...15
2. Validation…….…...……16
2.1. Définition de la validation …….……..……..16
2.2. Historique ……..……...16
2.3. Objectif ……..…….….……..17
3. Aspect règlementaire de la validation……17
4. Critère de la validation analytique…….…18
4.1. Conditions préalables à la validation ……...……19
4.2. Spécificité /Sélectivité ……...…….20
4.3. Linéarité…….…...…..20
4.4. Exactitude /Justesse ……..…….……..…20
4.5. Fidélité (ou précision)…… ……..……..……....…….…….20
- Répétabilité.……..……..…….…21
- Reproductibilité ……..……..…….….…21
- Fidélité intermédiaire ……...……..……..……..…….…22
4.6 Sensibilité …….……..….……22
4.7 Seuil de détection..…… …….…….……...22
4.8 Seuil de quantification ……..…….…….……..…….…22
4.9 Robustesse…….……....…….…….… 22
Conclusion……..……..22

Partie pratique

Introduction

1. Matériels et méthodes …….....…23

1.1. Matériels…….……...……....…..23

1.1.1. Matières premières et réactifs ……..… ……..……23

1.1.2. Appareillages et Equipement…….……..……..…24

1.1.3. Verreries ……...……..……..24

1.2. Méthodes …….…….…….…….....24

1.2.1. Préparations des solutions …….….….24

1.2.2. Mise au point de la méthode…….…….….…….…….25

1.2.2.1. Choix de la longueur d'onde …….…...…25

1.2.2.2. Détermination de la concentration de travail……25

1.2.2.3. Facteur de similarité ……....……..…..…...25

1.2.3. Validation de la méthode analytique……..….……26

1.2.3.1. Spécificité …….…….…….……...…26

1.2.3.2. Linéarité ……..……..……..…....26

1.2.3.2. Exactitude ……....….….……33

1.2.3.3. Fidélité (répétabilité, reproductibilité) ……...…..….….……35

2. Résultats et discussion ……...…….…....…38

2.1. Mise au point de la méthode ……..…….….……38

2.1.1. Choix de la longueur d'onde ……..…...38

2.1.2. Détermination de la concentration de travail ……...…...38

2.1.3. Facteur de similarité ……..…….....39

2.2. Validation de la méthode analytique…….....40

2.2.1. Spécificité …… ……...……...……40

2.2.2. Linéarité …….…….……41

2.2.2.1. Résultats sur standard ……...…….....41

2.2.2.2. Résultats sur la forme pharmaceutique reconstituée …….……44

2.2.2.3. Etude statistique…….……..……48

- Test de comparaison des pentes des droites D_1 et D_2 ……..…..…….48

- Test de comparaisons des ordonnés à l'origine des droites D_1 et D_2 …….....49

- Test des comparaisons des ordonnés à l'origine avec le zéro……..……..49

- Changement de variable…….....50

-Test d'homogénéité des variances sur standard……..……..…….…….51
-Test de l'existence d'une pente significative ……..……...……..….…52
-Test de validité de la droite de régression(D_1) ……..…..…..……..52
-Changement de variable…….……..……53
-Test d'homogénéité des variances sur FR…….……..…….54
-Test de l'existence d'une pente significative ……...……....……55
-Test de validité de la droite de régression …….……...…….…..…55
2.2.3. Exactitude …….……..…….……57
2.2.3.1. Données brutes sur standard et formes reconstituées…….……..57
2.2.3.2. Masse estimée et indexe……..……..58
2.2.3.3. Test d'homogénéité des variances ……...…58
2.2.3.4. Validité des moyennes …….……59
2.2.4. La Fidélité (répétabilité et reproductibilité) ……..….……60
2.2.4.1. Moyenne des groupes …….….63
2.2.4.2. Dispersion à l'intérieure des groupes de mesures ……..….63
2.2.4.3. Test d'homogénéité des variances à l'intérieur des groupes ……..….64
2.2.4.4. Variance de répétabilité ……..…….....64
2.2.4.5. Variance inter-groupes ……...…….....65
2.2.4.6. Variance de reproductibilité ……..…65
2.2.4.7. Coefficient de variation…….….66
Conclusion ……..….66

Conclusion générale……....67

Références bibliographiques

Annexes

Liste des figures

Figure 1 : Structure chimique du Paracétamol……..……..……2
Figure 2 : Domaine d'absorption UV/VIS…….…..……7
Figure 3 : Schéma des spectrophotomètres à simple faisceau……..…….....11
Figure 4 : Principe des spectrophotomètres à double faisceau……..……11
Figure 5 : Protocole expérimental sur standard……...27
Figure 6: Protocole expérimental sur forme pharmaceutique reconstituée…….....28
Figure 7: Stratégie statistique de la validation analytique……...…29
Figure 8 : Spectre d'absorption du paracétamol dans une solution de NaOH (0,1M) …….38
Figure 9: Courbe d'étalonnage sur standard…….....43
Figure 10: Courbe d'étalonnage sur forme pharmaceutique reconstituée……...…....46
Figure 11 : Courbe d'étalonnage sur PA et FR……...……..47

Liste des tableaux

Tableau 1 : Propriétés physicochimiques du Paracétamol……..…….....3

Tableau2 : Caractéristique du rayonnement UV/VIS……..…….…….....8

Tableau 3 : Caractéristique de la validation selon le type d'analyse …….……..…..19

Tableau 4 : Test de l'existence d'une pente significative…….....32

Tableau 5 : Test de validité de la droite de régression……..…..33

Tableau 6 : Test de validité des moyennes……..35

Tableau 7 : Les absorbances sur standard 1……..…….....39

Tableau 8 : Les absorbances sur standard 2……..…39

Tableau 9 : Résultats de la spécificité…….…….....40

Tableau 10: Données brutes de principe actif seul.…….……41

Tableau 11: Résumé des données brutes sur principe actif seul……..…....42

Tableau 12 : Données brutes de la forme pharmaceutique reconstituée……..…44

Tableau 13 : Résumé des données brutes de la forme pharmaceutique reconstituée……44

Tableau 14 : Résultats de l'estimation d'une droite de régression linéaire (PA et FR)…..….48

Tableau 15: Test de comparaison des pentes des droites D_1 et D_2 …….……48

Tableau 16 : Test de comparaison des ordonnés à l'origine des droites D_1 et D_2 ……..…….49

Tableau 17 : Test de comparaison de l'ordonné à l'origine avec le point zéro…….....….49

Tableau 18 : Changement de variable sur standard…….……...50

Tableau 19 : Test d'homogénéité des variances sur standard…….....51

Tableau 20 : Résultats du test de l'existence d'une pente significative sur standard….……52

Tableau 21 : Résultats du test de validité de la droite de régression sur standard…….....52

Tableau 22 : Changement de variable sur FR……...……...53

Tableau 23 : Test d'homogénéité des variances sur FR……...54

Tableau 24 : Résultats du test de l'existence d'une pente significative sur FR……..…55

Tableau 25 : Résultats du test de validité de la droite de régression sur standard……...55

Tableau 26 : Tableau récapitulatif de la linéarité……..…..….56

Tableau 27 : Données brutes de l'exactitude sur PA et FR……...…….....57

Tableau 28 : Résultats des masses estimées et de l'index de recouvrement……..….58

Tableau 29 : Résultats du test d'homogénéité des variances……..….58

Tableau 30 : Résultats du test de validité des moyennes ……59
Tableau 31 : Résultats de l'estimation de l'intervalle de confiance de recouvrement moyen ……59
Tableau 32 : Fidélité intermédiaire du premier jour 1**(J_1)** ……60
Tableau 33 : Fidélité intermédiaire du deuxième jour 2 **(J_2)** ……61
Tableau 34 : Fidélité intermédiaire du troisième jour 3 **(J_3)** ……62
Tableau 35 : Résultats de la moyenne des groupes……63
Tableau 36 : Variances à l'intérieure des groupes……63
Tableau 37 : Test de Cochran des variances à l'intérieur des groupes……64
Tableau 38 : Résultats de la Variance de répétabilité……64
Tableau 39 : Résultats de calcul de la Variance inter-groupes ……65
Tableau 40 : Résultats de la variance de reproductibilité ……65
Tableau 41 : Résultats de calcul des covariances……66

Liste des paramètres statistiques

$\mathbf{X_{ij}}$: valeur brute indépendante.

$\mathbf{Y_{ij}}$: valeur brute dépendante.

$\bar{X}$: moyenne des valeurs X_{ij} du groupe j.

$\bar{X}_j$ **:** moyenne des valeurs X_{ij} du groupe j.

$\bar{Y}_{ij}$: transform2e de y_{ij} .

$\bar{Y}_j$: moyenne des observations Y_{ij} dans chaque groupe j.

$\bar{\bar{X}}$: moyenne des valeurs $\bar{X}_j$ des k groupes.

$\bar{\bar{x}}$: moyenne générale des valeurs x_{ij} des k groupes.

$\bar{\bar{y}}$: moyenne générale des observations y_{ij} des k groupes.

$\mathbf{Y}$: moyenne des valeurs Y_j des k groupes.

$\mathbf{S}$: écart type estimé de n valeurs.

$\mathbf{S_a}$: écart type de l'ordonnée à l'origine.

$\mathbf{r}$: coefficient de corrélation.

$\mathbf{n_j}$: nombre d'observation du groupe j.

$\mathbf{m_j}$: moyenne de n_j valeurs du groupe j.

CV : coefficient de variation.

$\mathbf{S^2}$: variance.

$\mathbf{S^2_{max}}$: plus grande des variances.

N : nombre total d'observations Y_{ij} dans l'ensemble des k groupe.

$\mathbf{I_{RM}}$: intervalle de confiance du recouvrement moyen RM .

k : nombre de groupe.

t : test de Student.

C : test Cochran.

F : test de Fisher.

NDL : nombre de degrés de liberté.

$\mathbf{S_J}$: écart type à l'intérieure du groupe j.

$\mathbf{S_j^2}$: la variance des répétitions à l'intérieure du groupe.

$\mathbf{S_R^2}$: variance de de répétabilité.

$\mathbf{S_g^2}$: variance inter-groupes.

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

a : pente de la droite de régression.

Liste des abréviations

PA : principe actif.

FR : forme reconstituée.

f : facteur de similarité.

AINS : les anti-inflammatoires non stéroïdiens

COX : cyclo-oxygénase.

CFR : le Council on Foreign Relations.

EFPIA : European Federation of Pharmaceutical Industries and Associations.

SFSTP :la Societe Francaise des Sciences et Techniques Pharmaceutiques.

ICH : Conférence Internationale sur l'Harmonisation.

UV-VIS : Ultraviolet Visible.

USF :United States Pharmacopeia.

AMM : Autorisation de Mise sur le Marché.

Introduction générale

L'un des analgésiques les plus utilisés actuellement, le paracétamol est indiqué pour soulager tout type de douleurs, d'une simple douleur de dents jusqu'à la douleur provoquée par une fracture d'os.

Aussi appelé para-acétyl-amino-phénol, est la substance active de nombreuses spécialités médicamenteuses de la classe des antalgiques antipyrétiques non salicylés.

Il existe plusieurs méthodes d'analyse de paracétamol, les plus récentes inclus des techniques chromatographiques, électrochimiques et spectrophotométriques.

La validation de la méthode d'analyse est une question importante dans l'analyse pharmaceutique. Il confirme que la procédure analytique employée est adaptée et fiable pour son utilisation prévue.

Le contenu de notre mémoire élaboré et réparti en deux grandes parties, lesquelles sont scindées en chapitres :

La première comprend une partie bibliographique composée de trois chapitres :

Chapitre 1 Le paracétamol : Caractéristiques structurales, pharmacocinétique et indications.

Chapitre 2 La spectrophotométrie UV/VISIBLE : Définition, principe et instrumentation.

Chapitre 3 La validation analytique : Définition et critères.

La deuxième partie comprend la mise au point et la validation d'une méthode de dosage du paracétamol dans les suppositoires (150mg ; 200mg et 300mg) par spectrophotométrie UV Visible, en proposant à un protocole expérimental inspiré des documents de références tel que ICH, SFSTP.

Introduction

Le paracétamol est un médicament d'usage très répandu, qui entre dans la composition de très nombreuses spécialités pharmaceutiques telles que le Doliprane et l'Efferalgan.

Disponible sans ordonnance en pharmacie, il n'en reste pas moins un médicament dont la posologie doit être respectée sans quoi des répercutions graves sur la santé peuvent être occasionnées.

Le paracétamol a une activité analgésique et antipyrétique d'intensité comparable à celle de l'aspirine mais elle n'a pratiquement pas d'effet sur l'inflammation. Il n'a pas les effets secondaires de l'aspirine, il ne provoque pas de lésion de la muqueuse gastrique et n'interfère pas avec l'agrégation plaquettaire.

1. Caractéristiques du Paracétamol

Le paracétamol se présente sous forme d'une poudre cristalline blanche, inodore, de saveur amère.

1.1. Caractéristiques structurales

Le paracétamol est un dérivé phénolique, c'est le para-acétyl-amino-phénol. Sa structure comporte donc un cycle benzénique substitué par un groupement hydroxyle et un groupement acétamide en position *para* (Figure 1).

Le paracétamol ne comporte pas de carbone asymétrique et n'a pas de stéréo-isomères **[1]**.

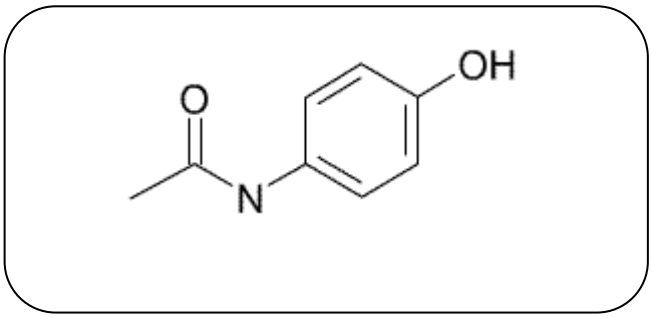


Figure 1 : Structure chimique du Paracétamol.

Tableau 1 : Propriétés physicochimiques du Paracétamol.

• Formule brute	$C_8H_9NO_2$
• Masse molaire	151,2 g/mol
• Point de fusion	168-172°C
• Absorption dans U.V	un maximum d'absorption dans l'U.V (éthanol) à 240 nm.
Solubilté	
• Alcool • Eau • Ether et chloroforme	facilement soluble assez soluble très peu soluble

1.2. Pharmacocinétique

1.2 .1. Absorption

Voie orale : Le paracétamol est rapidement et presque totalement résorbé au niveau de l'intestin grêle. Le pic plasmatique est obtenu en 15 minutes à 2 heures selon les formulations. Il existe un effet de premier passage hépatique peu marqué et sa biodisponibilité absolue par voie orale est voisine de 80 %. Un retard de vidange gastrique peut retarder sa résorption **[2]**.

Voie rectale : Le paracétamol est résorbé et sa biodisponibilité n'est que de 10 à 20 % inférieure à celle de la voie orale. Cette résorption est progressive et la courbe des concentrations en fonction du temps est voisine de celle observée avec un comprimé de paracétamol à libération prolongée **[2]**.

Voie injectable : L'administration du paracétamol en intraveineuse permet certe son passage direct dans la circulation, ce qui en fait d'ailleurs une voie privilégiée dans les cas d'urgence, mais en terme d'efficacité, celle-ci ne présente aucun avantage par rapport à la voie orale Lors d'une administration rectale, l'absorption du paracétamol est aléatoire et son délai

est plus long que celui d'une prise orale, d'ailleurs le pic plasmatique n'est obtenu qu'au bout de 2h avec une biodisponibilité réduite de 10 à 20% **[1]**.

1.2.2. Distribution

La distribution du paracétamol est rapide et uniforme dans la plupart des liquides organiques et tissus de l'organisme [**3]**.

1.2.3. Métabolisme

Le paracétamol est métabolisé au niveau du foie et suit deux voies métaboliques majeures. Il est éliminé dans les urines sous forme glycuronoconjuguée (60 à 80%) ou sous forme sulfoconjuguée (20 à 40%). Une petite fraction (moins de 4%) est transformée avec l'intervention du cytochrome P450 (catalyseur d'oxydation) en un métabolite formé par voie oxydative et supposé être hépatotoxique. Il est normalement détoxiqué par conjugaison avec le glutathion **[3]**.

1.2 .4. Elimination

Le paracétamol est complètement éliminé dans les 24 heures qui suivent son ingestion. Il est éliminé exclusivement dans les urines sous forme « inchangé » et sous forme de métabolites (dérivés conjugués) en lesquels il est transformé.

Son excrétion sous forme de dérivés conjugués (dérivé glucuronate, dérivé sulfonate) est la plus importante et représente 97% du paracétamol ingéré. Les 3% qui restent représentent la part qui revient à son excrétion sous forme inchangée.

La forme inchangée du paracétamol est filtrée au niveau glomérulaire (la filtration du sang par le glomérule du rein), quand aux formes conjuguées, elles sont rapidement excrétées au niveau tubulaire. Sous forme inchangée ou sous forme de métabolite, l'excrétion du paracétamol est indépendante du pH et du débit urinaires **[1]**.

2. Mécanisme d'action

Le mécanisme d'action complet du paracétamol reste inconnu, un siècle après sa découverte. Cependant, il a été démontré qu'il agit principalement au niveau du système nerveux central. Selon une étude de 2006, le paracétamol agirait en inhibant au niveau central la production de prostaglandines, impliquées dans les processus de la douleur et de la fièvre, par le biais d'une action inhibitrice sur l'enzyme prostaglandine H_2 synthase (PGHS), qui comporte notamment un site actif « cyclo-oxygénase » (ou COX), cible de la majorité des AINS, et un site « peroxydase » (ou POX), sur lequel agirait le paracétamol. Le paracétamol n'aurait pas d'action directe sur le COX-1 et le COX-2, les deux formes de COX sur lesquelles agissent les AINS comme l'aspirine ou l'ibuprofène. On soupçonne l'existence d'une nouvelle isoenzyme, le COX-3, sur laquelle agirait spécifiquement le paracétamol et qui expliquerait pourquoi le paracétamol réduit la fièvre et la douleur tout en étant dénué d'activité anti-inflammatoire et antiplaquettaire. Pour l'instant, cette hypothèse n'a pas été prouvée chez l'homme. D'autres mécanismes d'action ont été évoqués pour expliquer l'activité analgésique et antipyrétique du paracétamol **[4]**.

Une récente étude propose un nouveau mécanisme d'action. Le paracétamol pénètre dans le cerveau où il est métabolisé en p-aminophénol qui sous l'influence de la FAAH (fatty acid amide hydrolase) interagit avec l'acide arachidonique pour donner le métabolite actif, l'AM404. L'AM404 inhiberait la COX-1 et la COX-2 et serait, de plus un activateur du TRPV1, (Transient Receptor Potential Vanilloid-1), récepteur-canal cationique dont l'activation prolongée conduirait à une désensibilisation et à un effet antalgique **[5]**.

3. Association

Le paracétamol est utilisé en association avec d'autres substances actives pour profiter de ses propriétés antalgiques et antipyrétiques. L'un des problèmes des associations est l'accumulation des effets secondaires ; cependant, le paracétamol étant particulièrement bien toléré, il est spécifiquement intéressant dans le cadre des associations, et c'est pourquoi les laboratoires pharmaceutiques ont développé de très nombreuses formules comprenant du

paracétamol. Un dérivé lipidique, le palmitostéarate de glycérol atomisé est quelquefois ajouté aux mélanges pour masquer le goût du paracétamol **[6]**.

4. Toxicité

La dose toxique du paracétamol est hautement variable selon les individus. En une prise unique, elle est de l'ordre de 10 g ou 125 mg/kg chez l'adulte et de 100 à 150 mg/kg chez l'enfant. Certains ne parlent d'intoxication aiguë que pour des doses élevées supérieures à 200 milligrammes par kilogramme, soit plus de 14 grammes pour un homme de 70 kilogrammes. Il entraine une hépatite cytotoxique foudroyante **[7].**

Conclusion

Synthétisé autour des années 1900, commercialisé à partir de 1953, le paracétamol n'est donc pas un médicament récent; Il entre dans la composition de plusieurs spécialités pharmaceutiques et peut se présenter sous différentes formes ou conditionnements. C'est un médicament bien toléré mais attention aux intoxications volontaires ou accidentelles.

Introduction

La spectrophotométrie d'absorption dans l'ultraviolet et le visible (UV-VIS) est une technique d'un âge respectable encore très utilisée dans les laboratoires et dans l'industrie. Elle a bénéficié des progrès technologiques récents miniaturisation, fibres optiques, et des moyens de calcul apportés par l'outil informatique. De plus, c'est une technique bien adaptée aux moyens de contrôle et de validation qui permettent de produire des données de qualité reconnue et quantifiée.

2. Définition

La spectrophotométrie est l'étude des phénomènes résultant de l'interaction entre la lumière et la matière, cette interaction se traduit par :

- Soit une absorption de la lumière.
- Soit une émission de la lumière.

2. Principes

2.1. Absorption du rayonnement dans le domaine UV-VIS

Le principe de la spectrométrie d'absorption dans l'ultraviolet et le visible repose sur l'absorption du rayonnement électromagnétique par les molécules dans le domaine allant de 190 à 800 nm, ce qui correspond à l'ultraviolet (190-400 nm) et au visible (400-800 nm).

Certains spectrophotomètres couvrent aussi le proche infrarouge jusqu'à 2 500 nm par exemple. Ce domaine est illustré dans la figure 2**[8]**.

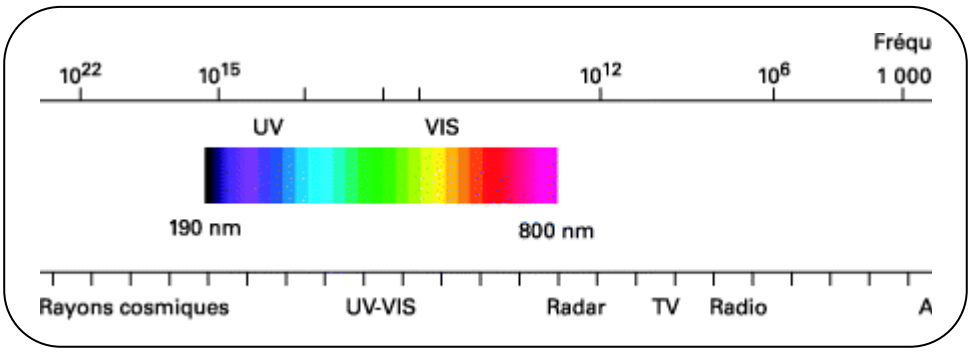


Figure 2 : Domaine d'absorption UV/VIS.

Dans cette application, on peut considérer le rayonnement UV-VIS comme une onde électromagnétique qui transporte une énergie E liée à sa fréquence ν par la relation :

$$\mathbf{E = h\nu = hc / \lambda}$$

Avec:

- **h** : constante de Planck ($h = 6{,}63 \cdot 10^{-34}$ J · s)
- **c** : vitesse de la lumière dans le milieu où se propage l'onde ($c = 3 \cdot 10^{8}$ m/s dans le vide)
- **λ** : longueur d'onde du rayonnement, exprimée habituellement en nanomètres (nm).

Tableau2 : Caractéristique du rayonnement UV/VIS.

UV/VISIBLE	
Longueur d'onde	190-800 nm
Fréquence	$1{,}6 \cdot 10^{15}$ Hz à $3{,}8 \cdot 10^{14}$ Hz
Energies	6,5 à 1,5 eV

On remarque que le domaine UV-VIS n'occupe qu'une faible partie du domaine d'existence des rayonnements, allant des rayons cosmiques aux ondes radios.

Les énergies des rayonnements UV-VIS correspondent aux énergies de transition électronique dans molécules : à température ambiante, la plupart des molécules sont dans leur état électronique et leur état de vibration fondamentale. Ces molécules vont donc pouvoir absorber des photons UV-VIS et changer leurs états énergétiques électroniques, accompagné par le changement de l'état de vibration et de rotation, ce qui explique la complexité des spectres d'absorption, même pour des molécules simples à l'état gazeux. On comprend aussi que le nombre de photons absorbés entraînant une diminution de l'intensité du rayonnement UV-VIS transmis par le milieu, cette diminution va dépendre du nombre de molécules traversées par le rayonnement. Ceci va se traduire par une loi d'absorption : la loi de Beer-Lambert **[8]**.

2.2. Spectres obtenus, analyse qualitative

Pour les nombreuses molécules gazeuses qui absorbent dans l'UV-VIS comme le monoxyde d'azote NO, le dioxyde de soufre SO_2, l'ammoniac NH_3, le chlore Cl_2, le sulfure d'hydrogène H_2S, le benzène C_6H_6 ... les spectres obtenus sont une véritable empreinte digitale de ces molécules, si le spectromètre a une résolution suffisante. On peut donc les identifier facilement.

Dans le cas des liquides et des solutions, les interactions moléculaires viennent masquer les structures fines observées pour les gaz : on ne retrouve alors que des bandes plus ou moins larges qui peuvent rendre plus douteuse l'identification des molécules, ce qui explique que la spectrophotométrie d'absorption dans l'ultraviolet et le visible est surtout une méthode d'analyse quantitative **[8]**.

2.3. Analyse quantitative : lois de l'absorption moléculaire

Loi de Beer et Lambert

L'UV/Visible est largement exploité en analyse quantitative, depuis longtemps dans le domaine du visible. Les mesures reposent sur la loi de Beer et Lambert qui relie dans certaines conditions, l'absorption de la lumière à la concentration d'un composé en solution.
L'origine de cette loi remonte aux travaux du mathématicien français Lambert qui avait, au XVIIIe siècle, défini les bases de la photométrie. Par la suite Beer, physicien allemand du XIXe siècle, a proposé une loi qui permet de calculer la quantité de lumière transmise après passage à travers une épaisseur donnée d'un composé en solution dans une matrice non absorbante.

Il en est résulté la *loi de Beer et Lambert* présentée ici sous sa forme actuelle :

$$\mathbf{A_\lambda = \varepsilon_\lambda\, l\, c}$$

Avec :

- A_λ : absorbance du milieu à la longueur d'onde λ, exprimée en nm dans l'UV-VIS
- ε_λ: coefficient spécifique d'absorbance molaire en l / mole. cm
- l : trajet optique de la cellule en cm
- c : concentration en mole / l des molécules qui absorbent à la longueur d'onde λ.

La *loi de Beer et Lambert* ne concerne que la fraction de la lumière absorbée, elle est vérifiée dans les conditions suivantes :

- La lumière utilisée doit être monochromatique ;
- Les concentrations doivent être relativement faibles ;
- La solution ne doit être ni fluorescente ni hétérogène ;
- Le soluté ne doit pas donner lieu à des transformations photochimiques ;
- Le soluté ne doit pas donner des associations variables avec le solvant.

Quand, pour un dosage, on se contente de mesurer l'absorbance à une seule longueur d'onde, on choisit, en général, celle qui correspond au maximum d'absorption.
L'absorbance A_λ est donc proportionnelle à la concentration **C** des molécules de l'espèce qui absorbe seule à cette longueur d'onde **λ**.

Il est alors possible de construire une droite d'étalonnage en utilisant plusieurs concentrations connues de la molécule à doser et en mesurant les absorbances correspondantes à la longueur d'onde λ. Cette droite d'étalonnage permet le calcul de ε_λ.

En plaçant dans la cellule un échantillon dont on veut connaître la concentration $C_{éch}$, l'absorbance mesurée $A_{\lambda éch}$ permet le calcul direct de $C_{éch}$. On préfère utiliser la droite d'étalonnage pour déterminer $C_{éch}$ **[9]**.

3. Instrumentation

On peut classer les appareils en deux catégories :

- ✓ les appareils à simple faisceau, eux-mêmes subdivisés en appareils à montage optique direct ou à montage optique inversé ;
- ✓ les appareils à double faisceau, à montage optique direct.

La figure 3 présente le schéma des appareils à simple faisceau, avec les deux montages existants **[10].**

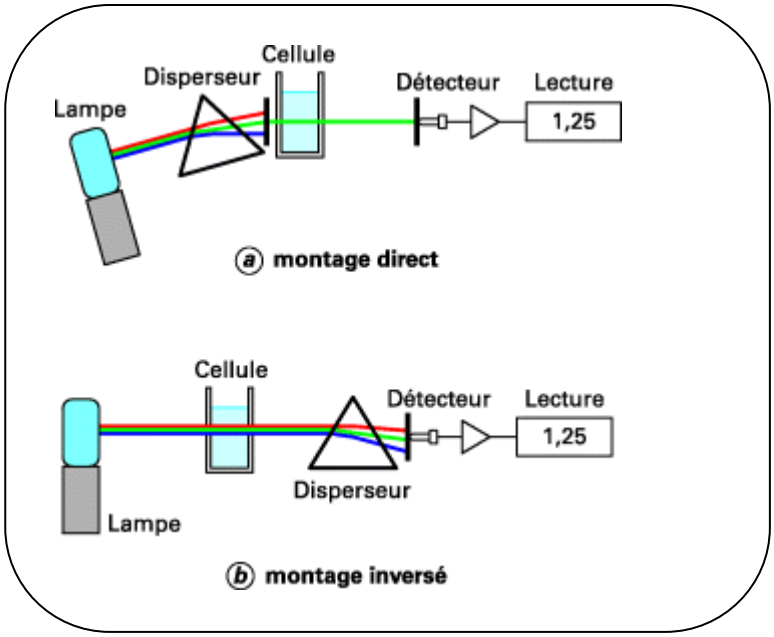


Figure 3 : Schéma des spectrophotomètres à simple faisceau

Le schéma de principe des spectrophotomètres à double faisceau est présenté figure 4 :

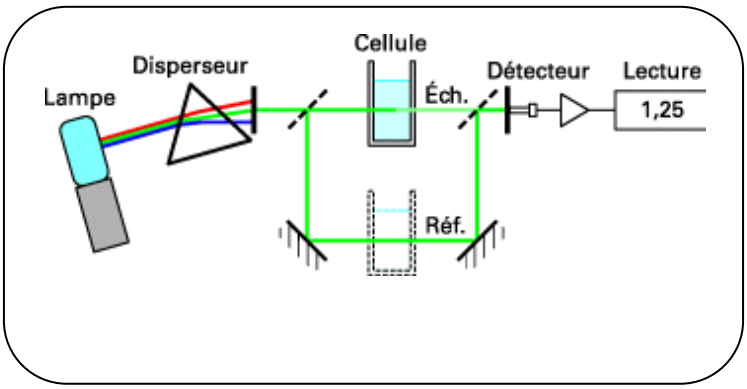


Figure 4 : Principe des spectrophotomètres à double faisceau.

3.1. Sources de rayonnement

Les sources de rayonnement sont constituées généralement de deux lampes pour couvrir tout le domaine UV-VIS.

Dans le domaine de l'ultraviolet, on utilise une lampe au deutérium qui émet un rayonnement continu, auquel se superposent deux raies de l'atome de deutérium.

Dans le visible, on utilise la lampe à filament de tungstène qui émet un spectre continu de type « corps noir ».

Dans certains cas, on peut n'utiliser qu'une seule lampe comme la lampe au xénon à haute pression, dont le spectre couvre tout le domaine UV-VIS

La lampe au deutérium est utilisée dans l'UV car l'intensité du rayonnement est très faible dans le visible. Le spectre émis est continu et diminue de l'UV au visible. Il présente deux raies à 486,0 et 656,1 nm qui peuvent permettre de vérifier le réglage des longueurs d'onde.

Dans le visible, on utilise la lampe à filament de tungstène dans une atmosphère contenant des halogènes. A la température de 2 850 K, le maximum d'intensité est situé vers 1 000 nm, donc dans le proche infrarouge **[11].**

3.2. Cellules d'absorption

Elles dépendent de l'état physique des échantillons. Il existe une très grande variété de cellules et de compartiments où s'installent ces cellules dont les trajets optiques peuvent aller de quelques micromètres (détecteurs de chromatographie liquide à haute pression), à quelques centaines de mètres (mesure des polluants atmosphériques en trajet ouvert).

Pour les solutions, on utilise le plus souvent des cellules parallélépipédiques (cuvettes) dont le trajet optique est généralement de l'ordre du centimètre.

Les matériaux utilisés pour les fenêtres sont soit du quartz fondu (transparent jusqu'à 200 nm), soit la silice fondue (permet de descendre jusqu'à 170 nm). Il existe des cellules à usage unique en matière plastique (transparentes jusqu'à 320 nm) et des cellules en verre (transparentes jusqu'à 340 nm) **[8]**.

3.3. Détecteurs

Le détecteur fournit une tension électrique proportionnelle ou inversement proportionnelle à l'intensité du rayonnement. Les détecteurs de type photodiode ou photomultiplicateur qui équipent les montages à optique directe sont placés derrière la fente de sortie du monochromateur. Ils reçoivent donc le rayonnement monochromatique, I_λ, isolé par le monochromateur. Les spectres sont obtenus par rotation du disperseur, et les différentes longueurs d'onde défilent devant le détecteur. Le système est dit à balayage. Dans les

appareils modernes, il ne faut plus que quelques secondes pour obtenir un spectre complet UV-VIS.

Pour les spectrophotomètres équipés de détecteurs « multi-longueurs d'onde », comme le sont les barrettes de photodiodes et les CCD (*Charge-Coupled Device*, ou dispositif à transfert de charge), le polychromateur disperse et projette directement le spectre sur les pixels. Il s'agit dans ce cas de montages de type inversé. Tous les éléments spectraux sont mesurés simultanément, et le système optique ne comporte plus aucune pièce mobile, ce qui apporte un certain nombre d'avantages:

- ✓ Acquisition rapide des spectres ;
- ✓ choix étendu de longueurs d'onde disponibles ;
- ✓ répétabilité des longueurs d'onde ;
- ✓ miniaturisation et portabilité des spectrophotomètres **[11].**

3.4. Traitement des données

Les spectrophotomètres actuels sont en général pilotés par des ordinateurs équipés de logiciels plus ou moins sophistiqués.

La spectrophotométrie est utilisée dans beaucoup de domaines : chimie, pharmacie, environnement, agroalimentaire, biologie etc., aussi bien au laboratoire que sur site industriel. Les possibilités apportées par l'analyse multi variable permettant l'analyse de plusieurs constituants, en limitant les phénomènes d'interférences spectrales ou physico-chimiques, ont ouvert de nouvelles utilisations, notamment pour l'analyse industrielle. Les constructeurs publient de nombreuses notes d'applications.

Dans l'industrie pharmaceutique, de nombreux tests de dissolution de médicaments sont réalisés par spectrophotométrie d'absorption UV-VIS. Il en est de même pour l'industrie agroalimentaire. Les procédures sont codifiées et décrites dans les sites des organismes comme Pharmacopeia **[8]**.

Conclusion

Encore très présente dans les laboratoires et dans l'industrie, la spectrophotométrie d'absorption moléculaire a bénéficié d'améliorations technologiques et de moyens de calcul puissants qui lui permettent d'étendre le champ de ses applications, surtout si on y inclut le domaine du proche infrarouge qui est souvent proposé comme une option dans les spectrophotomètres commerciaux.

C'est une technique bien documentée avec de nombreuses publications issues des constructeurs, des universités, des organismes, disponibles notamment sur Internet. La vérification des performances est aisée, avec des méthodes et des matériaux de référence certifiés. Sa mise en œuvre est assez simple et ne demande pas des utilitaires particuliers. Le prix d'achat des spectrophotomètres est raisonnable, ainsi que leur coût d'exploitation.

Introduction :

Le principe de la validation des procédures analytiques, aujourd'hui largement, répandu dans tous les domaines d'activités où des mesures sont réalisées. Le champ d'application de la validation analytique s'étend à toute procédure d'analyse utilisée dans le contrôle de la matière première, le développement galénique, le contrôle en cours de fabrication, le contrôle des produits intermédiaires et finis et les essais de stabilité de tous les produits pharmaceutiques. Dans le domaine pharmaceutique, son exigence est avant tout une pratique réglementaire.

La validation est fondée sur une analyse statistique basée sur un certain nombre de critères aboutissant à des méthodes analytiques permettant de donner des résultats fiables.

1. Assurance de la qualité

L'industrie pharmaceutique est un domaine réglementé, où la qualité du produit doit répondre aux exigences du dossier AMM et n'exposant les patients à aucun risque lié à des carences en matière de sécurité, de qualité ou d'efficacité.

Pour atteindre plus sûrement cet objectif, l'entreprise doit posséder un système d'assurance de la qualité bien conçu, correctement mis en oeuvre et effectivement contrôlé, système qui inclut le concept de bonnes pratiques de fabrication de contrôle de la qualité et de gestion du risque qualité. La validation analytique présente un outil très important dans la démarche du contrôle de la qualité **[12]**

L'assurance qualité est un ensemble d'activités permettant la mise en place de mécanismes d'évaluation de la qualité du médicament dont ces résultats analytiques. Le contrôle de la qualité est une mesure préventive qui assure le bon fonctionnement des méthodes d'analyse dans un laboratoire.

La qualité des données analytiques repose sur la validation des protocoles analytiques, un mode d'enregistrement des données fonctionnelles, un équipement et des instruments de laboratoire conformes aux procédures analytiques, un mode d'échantillonnage et de conservation des échantillons vérifié et des procédures de contrôle de qualité rigoureusement appliquées**[12]**.

2. Validation

2.1. Définition de la validation :

La validation d'une méthode est le procédé par lequel on confirme que la procédure analytique employée pour mener un test en particulier répond aux exigences de l'usage auquel elle est destinée. Les résultats de la validation de méthodes peuvent être utilisés pour juger la qualité, la fiabilité et la cohérence des résultats analytiques. Ce procédé fait partie intégrante de toute bonne pratique analytique **[13].**

2.2. Historique :

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 appliqué 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, dés 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)

Dès 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 aout 1989 sous la référence III /844/87-FR , FINAL, aout 1989 .

En 1992 la SFSTP (société française des sciences et techniques pharmaceutiques) publie, dans STP pharma pratiques, un guide pour la validation analytique. Cette proposition a connu un succès beaucoup plus vaste puisqu'il a servi de support pour le développement du logiciel AVA (Qualilab, Orléans).

Le sujet est ensuite repris par L'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 » **[14].**

2.3. Objectif

La validation des méthodes analytiques a pour principal objectif de s'assurer qu'une méthode analytique donnée fournit des résultats suffisamment fiables et reproductibles, compte tenu du but de l'analyse. Il faut donc définir correctement à la fois les conditions dans lesquelles la méthode sera utilisée et le but dans lequel elle sera employée. Ces principes s'appliquent à toutes les méthodes utilisées par un fabricant de produits pharmaceutiques, qu'elles soient ou non décrites dans une pharmacopée **[13].**

3. Aspect règlementaire de la validation :

Au niveau national : il n'existe pas de réglementation algérienne, dans l'industrie on a toujours recours à la réglementation internationale**.**

Au niveau international :

- Deux *guidelines ICH (International Conference on Harmonization)* ont été dédiés à la validation analytique : Q2: «Analytical Validation»
    - Q2A: «Text on Validation of AnalyticalProcedures: 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.

- ***SFSTP (Société Française des Sciences Techniques et Pharmaceutiques)*** présentent les recommandations réglementaires communément admises et appliquées dans l'industrie pharmaceutique nationale et une démarche statistique pour la validation d'une procédure analytique **[13].**

4. Critère de la validation analytique :

La validation d'une méthode analytique porte généralement sur les critères suivant :

- Spécificité
- Linéarité
- Exactitude
- Fidélité :
    - Répétabilité (intra-laboratoire)
    - Fidélité intermédiaire
    - Reproductibilité (inter-laboratoires)
- Seuil de détection
- Seuil de quantification
- Robustesse

Toutes ces caractéristiques ne sont pas applicables à toutes les méthodes d'essai ou à tous les produits à analyser. Cela dépend en grande partie du but de l'analyse.

La validation analytique d'une méthode entraîne celle de toutes les procédures qui s'y rapportent et de certains critères imposés par l'Agence du Médicament, définis au moyen de méthodes et de tests statistiques.

Tableau 3 : Caractéristiques de la validation selon le type d'analyse.

Type d'analyse **Caractéristiques**	**Identification**	**Impuretés** **Quantification limite**	**Teneur**	**Dosage** **- dissolution (mesure seulement)** **- teneur/activité**
Exactitude	-	+	-	+
Précision				
Répétabilité	-	+	-	+
Précis. interméd.	-	**+ (1)**	-	**+ (1)**
Spécificité (2)	+	+	+	+
Limite de détection	-	**- (3)**	+	-
Limite de dosage	-	+	-	-
Linéarité	-	+	-	+
Domaine d'utilisation	-	+	-	+

- : caractéristique qui n'est normalement pas évaluée

+ : caractéristique normalement évaluée

(1) Si la reproductibilité est évaluée, il n'est pas nécessaire de déterminer la précision intermédiaire.

(2) Si la méthode est insuffisamment spécifique, cette déficience peut être compensée par la Spécificité d'une ou de plusieurs autres épreuves complémentaires auxquelles l'échantillon est soumis.

(3) Parfois nécessaire **[15].**

4.1. Conditions préalables à la validation :

- ✓ Des équipements qualifiés dont les performances ont été vérifiées (Suitability of Instrument)
- ✓ Des substances de référence / des réactifs fiables (Suitability of Materials)
- ✓ Des opérateurs formés, qualifiés et habilités (Suitability of Analyst)
- ✓ Des procédures analytiques et un protocole approuvé un échantillon représentatif.

4.2. Spécificité /Sélectivité

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) **[15].**

4.3. Linéarité

La linéarité d'une procédure d'analyse est sa capacité (à l'intérieur d'un certain intervalle) d'obtenir des résultats directement proportionnels à la concentration (quantité) en substance à examiner dans l'échantillon **[14].**

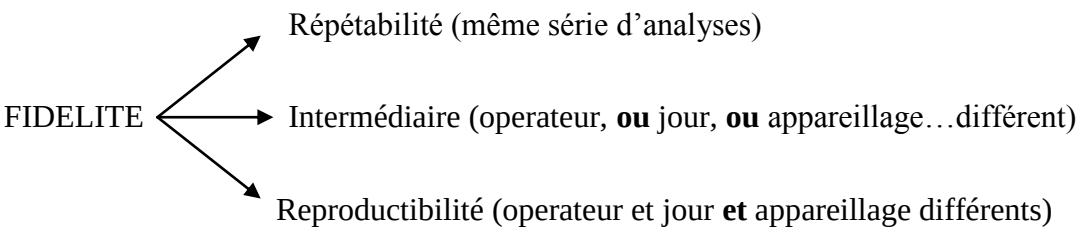
4.4. Exactitude /Justesse

L'exactitude exprime l'étroitesse de l'accord entre la valeur qui est acceptée soit comme une valeur conventionnellement vraie (standard interne de la firme) , soit comme une valeur de référence acceptée (standard international, par exemple standard d'une pharmacopée) et la valeur trouvée (valeur moyenne) obtenue en appliquant la procédure d'analyse un certain nombre de fois **[14].**

4.5. Fidélité (ou précision)

La fidélité de la procédure d'analyse exprime l'étroitesse de l'accord (degré de dispersion) entre une série de mesures provenant de multiples prises d'un même échantillon homogène dans des conditions prescrites **[14].**

La Fidélité représente l'ensemble des caractéristiques de dispersion.



Elle représente l'étroitesse de l'accord entre les résultats d'essais indépendants réalisés dans des conditions déterminées. Elle est mesurée par la dispersion des résultats individuels de part et d'autre de la moyenne et elle est généralement représentée par l'écart-type ou par le coefficient de variation (écart-type relatif) calculé après avoir appliqué la méthode complète de façon répétée à un certain nombre d'échantillons identiques prélevés sur le même lot homogène de produit à analyser.

Elle fournit une indication sur les erreurs dues au hasard : manipulateur, matériel, réactifs préparés etc… **[13].**

- **Répétabilité**

Toutes les opérations sont refaites dans des conditions minimales de variabilité Elle se rapporte à des essais, de la même grandeur, effectués dans des conditions aussi stables que possibles et à de courts intervalles. Cette mesure de la variation des résultats au sein d'un même laboratoire caractérise la précision obtenue lorsque la méthode est répétée par le même analyste dans les mêmes conditions (réactifs, matériel, réglage, laboratoire) dans un court intervalle de temps. La répétabilité d'une méthode est évaluée en procédant à des déterminations complètes et distinctes sur des échantillons identiques provenant du même lot homogène de produit. Cela permet d'évaluer la précision de la méthode dans les conditions opératoires normales. **[13].**

- **Reproductibilité**

Toutes les opérations sont refaites dans des conditions maximales de variabilité C'est la précision de la méthode lorsqu'elle est appliquée dans des conditions différentes - généralement dans des laboratoires différents - à des échantillons distincts, théoriquement identiques, prélevés sur le même lot homogène de produit à analyser. La comparaison des résultats obtenus par différents analystes, avec un matériel différent, ou à des dates

différentes, peut aussi fournir des informations précieuses à cet égard. Elle est généralement évaluée après la soumission du médicament. **[13].**

- **Fidélité intermédiaire**

Les variations étudiées sont en général un changement de jour(en phase clinique).

Ensuite, il est recommandé de changer d'analyste, d'équipement, de réactifs... **[13].**

4.6. Sensibilité

C'est la capacité de la méthode d'analyse d'enregistrer de faibles variations de la concentration. Variation minimale qu'il faut imposer à la grandeur X à déterminer (par exemple une concentration) pour obtenir une variation significative du signal mesuré y **[14]**.

4.7. Seuil de détection

C'est la plus petite quantité d'une substance à examiner dans un échantillon pouvant être détectée, mais non quantifiée comme une valeur exacte. Il est généralement un paramètre des essais limites **[14].**

4.8. Seuil de quantification

C'est la plus petite quantité d'une substance à examiner pouvant être dosée dans les conditions expérimentales décrites avec une fidélité et une exactitude définies **[13].**

4.9. Robustesse :

La robustesse d'une procédure d'analyse est sa capacité à rendre des résultats exacts en présence de faibles changements de conditions expérimentales susceptibles de se produire dans l'utilisation de cette procédure **[14]**.

Conclusion :

La validation intervient après les stades de Recherche et Développement du principe actif d'un médicament et la mise au point analytique. Une fois la validation effectuée, le dossier de demande d'Autorisation de Mise sur le Marché (AMM) du médicament en question peut être constitué en vue de son utilisation courante.

Conclusion générale

La validation analytique est un outil indispensable en industrie pharmaceutique, d'une part il fait partie du système d'assurance qualité qui a pour principale mission de veiller sur la qualité du médicament, d'autre part il est une exigence réglementaire.

Dans ce travail, nous avons mis au point une procédure d'analyse du paracétamol dans un produit fini en l'occurrence forme suppositoire, cette mise au point s'est articulée sur la connaissance des propriétés physico-chimiques des constituants du médicament et sur le principe analytique de la spectrophometrie d'absorption dans l'ultraviolet, connaissances acquises tout au long de notre cycle de formation.

La méthodologie de validation repose sur l'évaluation de certains critères en faisant appel à l'outil statistique pour le traitement de données, l'étude portait sur les critères ;

- **Spécificité :** ce paramètre montre une absence d'interférence de l'excipient dans la réponse de l'instrument vis-à-vis du principe actif.
- **Linéarité :** la méthode est linéaire dans le domaine de concentration de [40-60 µg/ml]. La corrélation entre les absorbances dues au principe actif et la concentration de ce dernier est très satisfaisante.
- **Exactitude** : La méthode est exacte avec un intervalle de confiance de [96.2%-104.6%]
- **Fidélité :** Les résultats obtenus à partir d'une série de mesure d'un échantillon homogène sont très étroits, le coefficient de variation de fidélité est de 1.8%, il est inférieur à la limite 2.0%.

Compte tenu des ces résultats satisfaisant, nous concluons que la méthode de dosage du paracétamol dans la forme suppositoire (100, 150 et 300 mg) mise au point au laboratoire de Chimie Analytique du Département de Pharmacie de Tizi Ouzou est valide au risque de 1%, elle peut être appliquée en routine pour le contrôle qualité « paramètre dosage » du paracétamol dans les suppositoires de 100, 150 et 300 mg.

ANNEXES

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 :

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

Une telle variable aléatoire est alors dite variable gaussienne.

On note habituellement cela de la manière suivante :

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

Blanc : essai réalisé en l'absence de matrice (blanc réactif) ou sur une matrice qui ne contient pas l'analyte (blanc matrice). Par extension, la réponse instrumentale en l'absence d'analyte est utilisée (blanc instrumental).

Etalonnage : ensemble des opérations établissant, dans des conditions spécifiées, la relation entre les valeurs de la grandeur indiquée par un appareil de mesure ou un système de mesure, ou les valeurs représentées par une mesure matérialisée ou par un matériau de référence, et les valeurs correspondantes de la grandeur réalisée par des étalons.

Matrice : milieu dans lequel se trouve l'analyte.

Méthode : ce terme recouvre l'ensemble des moyens mis en oeuvre dans le processus analytique (réactif(s), appareil, mode opératoire, mode de calibrage, mode de contrôle). Le terme de technique n'est pas utilisé en métrologie.

Echantillon : on appelle souvent "échantillon" la quantité de liquide biologique (ou autre matrice) soumis à l'analyse

Variance : paramètre statistique chiffrant la dispersion des individus autour de la moyenne. C'est la somme des carrés des écarts à la moyenne de n observations divisée par le nombre de degrés de liberté. L'écart-type est la racine carrée de la variance.

Ordonnée à l'origine (Intercept): endroit où la droite d'un graphique coupe l'axe des ordonnées.

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

Performance, critères de: paramètres caractérisant la procédure analytique (linéarité, fidélité, justesse, ...).

Risque α ou risque de première espèce : probabilité de rejeter une hypothèse vraie à l'issue d'un test statistique. Ce risque est fixé avant de réaliser un test (habituellement 5 ou 1 %). On l'appelle aussi seuil ou niveau d'un test.

Série : ensemble de mesures consécutives effectuées sans interruption et dont les résultats sont obtenus à partir d'une phase unique de calibrage.

Signal de mesure : grandeur qui représente le mesurande et qui lui est fonctionnellement liée.

Variance: paramètre statistique chiffrant la dispersion des individus autour de la moyenne. C'est la somme des carrés des écarts à la moyenne de n observations divisée par le nombre de degrés de liberté. L'écart-type est la racine carrée de la variance.

Critères d'acceptabilité (Performance standard) : critères selon lesquels les performances d'une technique sont jugées satisfaisantes dans les conditions d'emploi définies par l'utilisateur (ces critères s'appuient en particulier sur les concepts d'imprécision, d'inexactitude et d'erreur totale acceptable).

Domaine d'analyse : intervalle de concentrations (ou autres quantités) d'un analyte pour lequel la technique est applicable sans modification. Son évaluation nécessite l'établissement des limites de linéarité et (éventuellement) de la limite de détection de la technique. Synonyme : "domaine de mesurage, gamme de mesure, domaine d'application".

Analyte: composant, substance, matériau à mesurer dans un milieu.

Coefficient de corrélation : quotient de la covariance de deux caractères par le produit de leurs écarts-types.
Note : il exprime la relation éventuelle entre deux variables réputées indépendantes. Sa valeur doit être uniquement testée par rapport à zéro en fonction d'un risque a choisi. Il est habituellement sans intérêt dans les comparaisons de techniques.

Coefficient de variation : pour un caractère non négatif, rapport de l'écart-type à la moyenne.
Note : ce rapport peut être exprimé en pourcentage.
Le terme « écart-type relatif » est parfois utilisé à la place de « coefficient de variation », mais cet usage n'est pas recommandé.

Corrélation : liaison entre deux ou plusieurs variables aléatoires à l'intérieur d'une loi.
Note : la plupart des mesures statistiques de corrélation ne mesure que le degré de liaison linéaire.

Degré de liberté, (ddl) : en général, le nombre de termes de la somme moins le nombre de contraintes sur les termes de la somme.

Ecart : valeur moins sa valeur de référence.

Ecart-type de la moyenne, s.e.m ("Standard deviation of the mean") : paramètre statistique indiquant la dispersion des valeurs au niveau de la moyenne d'une série de mesures.

Ecart-type expérimental: racine carrée positive de la variance.

Ecart-type résiduel : paramètre permettant de chiffrer la dispersion des points autour de la droite de régression.

Erreur aléatoire : résultat d'un mesurage moins la moyenne d'un nombre infini de mesurages du même mesurande,effectués dans des conditions de répétabilité.

Notes :

1. L'erreur aléatoire est égale à l'erreur moins l'erreur systématique.
2. Comme on ne peut faire qu'un nombre fini de mesurages, il est seulement possible de déterminer une estimation de l'erreur aléatoire.

Erreur de justesse (d'un instrument de mesure): erreur systématique d'indication d'un instrument de mesure.

Note : l'erreur de justesse est normalement estimée en prenant la moyenne de l'erreur d'indication sur un nombre approprié d'observations répétées.

Erreur relative: rapport de l'erreur de mesure à une valeur vraie du mesurande

Note : étant donné qu'une valeur vraie ne peut pas être déterminée, dans la pratique on utilise une valeur conventionnellement vraie.

Erreur systématique : moyenne qui résulterait d'un nombre infini de mesurages du même mesurande, effectués dans les conditions de répétabilité, moins une valeur vraie du mesurande.

Notes :

1. L'erreur systématique est égale à l'erreur moins l'erreur aléatoire.
2. Comme la valeur vraie, l'erreur systématique et ses causes ne peuvent être connues complètement.
3. Pour un instrument de mesure, voir "erreur de justesse".

Erreur totale: somme algébrique de l'erreur due à l'inexactitude et de l'erreur due à l'imprécision. Ces deux erreurs se compensent ou s'additionnent, définissant ainsi deux bornes de variation de l'erreur totale.

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 échantillo ²ns 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.

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.

Prostaglandines : Ce sont des médiateurs chimiques qui possèdent divers effets physiologiques.

AINS : les anti-inflammatoires non stéroïdiens, souvent abrégés en AINS, sont des médicaments aux propriétés analgésiques, antipyrétiques et anti-inflammatoires. Ils réduisent la douleur, la fièvre et l'inflammation.

Un analgésique : est un médicament qui diminue ou supprime la douleur.

Un antipyrétique : est un médicament qui fait baisser la température.

Un anti-inflammatoire : est un médicament destiné à combattre une inflammation : infection, brûlure, allergie …

La pharmacocinétique : a pour but d'étudier le devenir d'un médicament dans l'organisme.

La détermination des paramètres pharmacocinétiques d'un médicament apporte les informations qui permettent de choisir les voies d'administration et d'adapter les posologies pour son utilisation future.

La biodisponibilité :se définit comme étant la **fraction** de la dose de médicament administré qui atteint la circulation générale **et** la **vitesse** à laquelle elle l'atteint.

Métabolisme : fait référence à la transformation, par une réaction enzymatique d'un médicament en un ou plusieurs autres composés actifs ou inactifs au plan pharmacologique.

Le carbone asymétrique : Un carbone portant quatre atomes ou groupes d'atomes différents est asymétrique (on le symbolise par un astérisque *). La molécule qui le contient ne peut posséder aucun élément de symétrie ; elle est donc chirale. Un carbone doublement ou triplement lié ne peut en aucun cas être asymétrique.

Deux isomères A et B de même formule développée plane mais qui diffèrent par la disposition des atomes dans l'espace, sont des **stéréo-isomères**.

Résumé:

La validation d'une méthode d'analyse est définie comme l'action de la soumettre à une étude statistique, fondée sur un protocole normalisé et/ou reconnu, et apportant la preuve que dans son domaine d'application, la méthode d'analyse satisfait à des critères de performance préétablis.

Dans notre étude, nous avons utilisé le guide SFSTP pour valider une méthode de dosage du paracétamol dans des suppositoires (150 ; 200,300 mg).

Après la mise au point de la méthode de dosage, La validation a été réalisée, des tests statistiques (Student, Fisher,Cochran) ont été utilisés afin de caractériser les paramètres étudiés (linéarité, l'exactitude, la fidélité). Nous avons obtenus une méthode spécifique, linéaire dans le domaine (40-60 µg/ml), exacte avec un intervalle de confiance de [96.2 -104.6] et fidèle avec un coefficient de variation de 1.8%.

Mots clé : paracétamol, UV Visible, validation, dosage, suppositoire.

ABSTRACT

Validation of an analytical method is defined as the act of submitting to a statistical study, based on a standardized and / or recognized protocol, and demonstrating that in its scope, the method of analysis meets pre-established performance criteria.

In our study, we used the guide SFSTP to validate a method for the determination of paracetamol in suppositories (150; 200.300 mg).

After the development of the assay method, validation was performed; statistical tests (Student, Fisher, and Cochran) were used to characterize the studied parameters (linearity, accuracy and fidelity). We obtained a specific method, linear in the field (40-60 µg/ml), with an exact confidence interval [96.2 -104.6] and faithful with a variation coefficient of 1.8%.

key words: paracetamol, UV Visible, validation, dosage, Suppository.