



République Algérienne Démocratique Et Populaire

Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique

Université Abbes Laghrou–Khenchela-

Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie

Département des Sciences de la Nature et de la Vie

Memoire Présenté Pour l'obtention du Diplôme de MASTER

Filière : Biologie Moléculaire et Cellulaire

Option : Biochimie appliquée

Thème

**Etude de validation statistique d'une méthode de dosage
spectrale du médicament Bromhénine chlorhydrate**

Présenté par : BEN AMARA Nadhira

Soutenance le : 18 juin 2017

Jury de soutenance

Président : Dr. Bouazza Lyas

MCB Université Abbes Laghrou- Khenchela-

Encadreur : Dr. Boufennara Souhil

MCB Université Abbes Laghrou- Khenchela-

Examineur: Mr. Habibatni Sofiéne

MAA Université Abbes Laghrou- Khenchela-

Promotion : 2016/2017



Remerciements

Avant tout, je remercie Allah qui m'a donné patience, force et volonté, et il m'a aidé à réaliser ce modeste travail.

Je tiens à remercier notre encadreur

Dr. BOUFENNERA Souhil

Pour ses précieux conseils et ses directives. Son aide était essentielle afin de réaliser ce travail.

J'envoie mes vifs remerciements à :

Dr. BOUAZZA Lyas

MCB Université Abess Laghrour- Khenchela-

Mr. HABIBATNI Sofiéne

MAA Université Abess Laghrour- Khenchela-

Pour leur collaboration, et d'avoir accepté de juger notre travail.

Dédicaces

Je dédie ce modeste travail

*A mes chers et respectueux parents « Lazhar & Sabah » que je remercierai éternellement
pour leur amour et leur appui inconditionnel durant toutes ces années.*

A ma chère sœur Wafia.

A mes frères Labidi & Haroun & Abed el mouhaimen.

A mon fiancé Ibrahim.

A mes chères amies

A tout ceux et toutes celles qui mon encouragé et m'ont souhaité du bien de prés ou de loin.

Et témoignage de ma profonde affection.

Sans oublier mes camarades de la promotion :

2^{ème} année Master biochimie appliquée

(2016-2017).

Sommaire

Liste des figures	I
Liste des tableaux	II
Liste des abréviations	III

Introduction

Synthèse bibliographique

I-Généralités sur les médicaments	06
I-1- Définition	06
I-2- les compositions	06
I -3- Les catégories de médicaments	06
I-4-Origines des médicaments	07
I-5- Classification	07
I-6- Voies d'administration des médicaments	08
II- Spectrophotomètre UV visible	10
II-1- Définition	10
II-2- But	10
II-3- Appareillage	10
II-4- Principe	11
II-4- Echantillonnage	11
II-5- Manipulation	12
II-6- Loi de BEER LAMBERT	12
II-7- Conditions de validité de la loi de Beer-Lambert	13
II-8- Applications	13
III-1- Qu'est-ce que la validation analytique d'un médicament ?	16

III-2- But de validation statistique pour un médicament	16
III-3- Validation de la méthode de dosage d'un médicament	17
III-3-1- Spécificité	18
III-3-2- Linéarité	18
III-3-3- Exactitude	19
III-3-4- Reproductibilité	20
III-3-5- Précision	20
Matériels et méthodes	22
IV- Matériels et méthodes	22
IV-1-Echantillonnage	22
IV-2- Matériel	22
IV-3- Produits et Réactifs	22
IV-4- Méthodes	23
IV-4-1- Linéarité	23
IV-4-2- Reproductibilité	24
IV-4-3- Exactitude	27
IV-4-3- Spécificité	29
IV-4-4- Précision	31
Résultats et discussion	34
V- Résultats et discussion	34
V-1- Linéarité	34
V-2- Reproductibilité	38
V-3- Exactitude	41
V-4- Spécificité	47
V-5-Précision	49
Conclusion	52
Références bibliographique	54

Liste des figures

Fig. 1- Spectrophotomètre UV visible

Fig. 2- Schéma de principe du spectrophotomètre UV-visible mono faisceau

Fig. 3- Bromhénine chlorhydrate

Fig. 4- Préparation d'une solution mère

Fig. 5- Préparation d'une série de dilution

Fig. 6- Préparation des 6 prises d'essai

Fig. 7- Les 6 prises d'essai

Fig. 8- Les 3 séries de mesures (90 p. cent et 100 p. cent et 110 p. cent)

Fig. 9- Un reconstitué avec Bromhénine seul

Fig. 10- Un reconstitué contenant Bromhénine et tous les excipients du produit fini

Fig. 11- Préparation d'un échantillon avec tous les composants et excipients

Fig. 12- Droite de linéarité

Fig. 13- Droite de Reproductibilité

Fig. 14- Droite d'Exactitude

Liste de tableaux

Tableau 1. Résultats de mesure d'absorption d'une série de dilution

Tableau 2. Résultats de mesure de concentration d'une série de dilution

Tableau 3. Résultats de mesure d'absorption des 6 prises d'essai

Tableau 4. Résultats de calcul de la masse prise et la concentration théorique et la concentration réelle

Tableau 5. Résultats de calcul de teneur en pourcentage et en masse

Tableau 6. Résultats de mesure d'absorption des 3 séries

Tableau 7. Résultats de calcul de teneur en pourcentage et en masse (série01)

Tableau 8. Résultats de calcul de teneur en pourcentage et en masse (série 02)

Tableau 9. Résultats de calcul de teneur en pourcentage et en masse (série 03)

Tableau 10. Résultats de calcul de la masse prise et la concentration de solution mère et de solution fille (série 01)

Tableau 11 Résultats de calcul de la masse prise et la concentration de solution mère et de solution fille (série 02)

Tableau 12. Résultats de calcul de la masse prise et la concentration de solution mère et de solution fille (série 03)

Tableau 13. Résultats de calcul de la concentration réelle et la concentration théorique et les titres en pourcentage et en masse (Bromhénine seul)

Tableau 14. Résultats de calcul de la masse prise et la concentration mère et fille (Bromhénine +excipients)

Tableau 15. Résultats de calcul de la concentration et l'absorbance

Liste des abréviations

AFNOR	Association Française de Normalisation
ANSM	Agence nationale du médicament et des produits de santé
C	Concentration
CV	Coefficient de variation
g	Gramme
H₂SO₄	Acide sulfurique
mg	Millemètre gramme
ml	Millemètre litre
N	Normalité
P. CENT	Pourcentage
PA	Principe actif
R²	Coefficient de corrélation
T%	Titre en pourcentage
UV	Ultraviolet
VAR	Variance

Résumé

Lors de l'élaboration de nouveaux médicaments, les chercheurs doivent développer pour chaque médicament un dossier technique. Ainsi, 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 manuscrit les différentes étapes de la validation sont étudiées; leurs buts étant de démontrer la fiabilité des résultats pour le principe actif. A cet effet, les problèmes liés à la qualification de l'équipement analytique et au prétraitement de l'échantillon (effet matrice) seront abordés. Les critères de validation choisis comprennent la **spécificité, l'exactitude, la linéarité, la reproductibilité, la précision.**

Dans ce travail, les différentes étapes de la validation d'une méthode de dosage en bio analyse sont décrites. Ce guide redéfinit les objectifs et les critères de la validation tout en permettant une approche pratique. Cette procédure de validation concerne essentiellement une méthode spectrale qui est particulièrement bien adaptée au dosage des médicaments.

Au terme de cette étude, la méthode est linéaire dans une gamme de concentration bien définie. Les coefficients de corrélation (R^2) des équations de régression sont supérieurs à 0,97. La précision de la méthode est démontrée par les valeurs des coefficients de variance inférieurs à 2%. Aucune interférence des excipients ou des produits de dégradation d'une formulation pharmaceutique n'a été observée. Selon les résultats de la validation, la méthode proposée est simple, spécifique, linéaire, précise, exacte et peut être appliquée à l'analyse du médicament Bromhénine avec un excellent taux de recouvrement.

Mots clés:

Validation, méthode analytique, Exactitude, Spécificité, linéarité, reproductibilité, précision.

Abstract

When developing new drugs, researchers must develop a technical dossier for each drug. Thus, it is important to use a validated analytical method to obtain reliable results that can be interpreted satisfactorily. In this manuscript the different stages of validation are studied; Their aims being to demonstrate the reliability of the results for the active ingredient. To this end, problems related to the qualification of the analytical equipment and the pretreatment of the sample (matrix effect) will be addressed. Validation criteria chosen include **specificity, accuracy, linearity, reproducibility, accuracy.**

In this work, the various steps of the validation of an assay method in bio analysis are described. This guide redefines the objectives and criteria of validation while allowing a practical approach. This validation procedure essentially concerns a spectral method which is particularly well adapted to the dosage of drugs.

At the end of this study, the method is linear in a well defined concentration range. The correlation coefficients (R^2) of the regression equations are greater than 0.97. The accuracy of the method is demonstrated by the values of the coefficients of variance of less than 2%. No interference with excipients or degradation products of a pharmaceutical formulation has been observed. According to the results of the validation, the proposed method is simple, specific, linear, precise, accurate and can be applied to the analysis of the drug Bromhexine with an excellent recovery rate.

Keywords:

Validation, analytical method, Accuracy, Specificity, linearity, reproducibility, accuracy.

ملخص

عند تطوير عقاقير جديدة، يجب على الباحثين تطوير لكل دواء ملف فني. وبالتالي فمن المهم استخدام المنهج التحليلي للتحقق بشكل صحيح للحصول على نتائج موثوقة التي يمكن أن تفسر على أنها مرض. في هذه المخطوطة يتم دراسة مختلف مراحل التحقق من صحة أهدافهم للتدليل على مصداقية نتائج العنصر النشط. ولهذه الغاية، سيتم مناقشة المشاكل المتعلقة بتأهيل معدات التحليل ومعالجة العينة (تأثير المصفوفة) وتشمل معايير التحقق من صحة اختيار التحديد والدقة والخطية والتكرارية.

في هذا العمل وصف الخطوات المختلفة للتأكد من صحة طريقة الفحص في التحليل العضوي. هذا الدليل هو إعادة تحديد الأهداف ومعايير التحقق من صحة الطريقة مع توفير نهج عملي.

وبعد هذه الدراسة، فإن هذه الطريقة خطية واضحة المعالم ومعاملات الارتباط أكبر من 0.97 ومعاملات التباين أقل من 2%. لم يلاحظ أي تدخل أو تدهور لتركيبية دوائية من المنتجات. الطريقة المقترحة بسيطة ومحددة، وخطية ودقيقة ويمكن تطبيقها على تحليل الدواء مع معدل استرداد ممتاز.

كلمات البحث

التحقق من الصحة والمنهج التحليلي والدقة والتحديد والخطية والتكرار.



Introduction

Introduction

Les méthodes d'analyse sont souvent décrites comme des procédures immuables et figées. C'est un peu l'impression que donnent les manuels et les autres recueils de normes techniques.

Comme tout procédé de production, quelques méthodes d'analyse naissent et évoluent et meurent. Pour comprendre clairement le rôle et la place de la validation dans la vie d'une méthode d'analyse, il est intéressant de décrire son cycle de vie depuis le moment où elle est choisie jusqu'au moment où on l'abandonne (**Rozet, 2008**).

Les domaines d'application des méthodes d'analyse sont très divers, allant du contrôle des médicaments, de la bio analyse dans le cadre des études cliniques et des études de bioéquivalence jusqu'aux études environnementales et agro-alimentaires.

Quelle que soit la méthode d'analyser utilisée et quel que soit le domaine d'application, chaque laboratoire doit être en mesure de produire des résultats fiables lors de l'exécution de l'analyse pour un client ou pour des fins réglementaires (**Feinberg, 2009**).

D'abord, il faut sélectionner la technique analytique, c'est-à-dire choisir parmi les diverses méthodes physico-chimiques publiées dans la littérature ou maîtrisées par le laboratoire celle qui doit permettre de déterminer le ou les analytes représentatifs du problème analytique à traiter. Cette démarche repose entièrement sur le savoir-faire et l'expertise de l'analyste (**Marini, 2005**).

Le choix de la méthode est le point de départ véritable de la validation. Il résulte d'un compromis entre les possibilités instrumentales du laboratoire, le coût d'une mesure et les performances requises (**Duarte, 2005**).

L'objectif de la validation est de démontrer que la méthode employée permet d'atteindre des objectifs techniques définis à l'avance. (**Goupy, 1996**) donne une définition de la validation :

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

La validation des méthodes analytiques constitue une étape essentielle dans le processus intégral de démonstration de la fiabilité des résultats analytiques qui seront générés par ces méthodes dans leurs utilisations quotidiennes (**Albert, 2006**).

L'interprétation et l'évaluation des résultats d'analyse au cours de cette étape clé doivent être fondées sur des bases statistiques.

L'objectif principal de cette étude est de vérifier ces différents critères ou méthodes de validation puis de statuer sur la fiabilité des décisions prises par chaque paramètre au moyen des résultats obtenus à partir des méthodes d'analyse quantitative validées selon ces différentes approches (**Boulanger, 2003**).

Les analyses de cette étude ont été effectuées au niveau de laboratoire pédagogique de biologie moléculaire et cellulaire (Université Abbès Laghrour–Khenchela).

Dans ce travail, nous avons choisi de porter étude sur un médicament appelé Bromhénine chlorhydrate, dosé à 0,2 % (m/v). La méthode analytique choisie est une méthode spectrale qui absorbe dans l'ultra-violet. Les critères de la validation étudiés sont :

- **La précision.**
- **La linéarité.**
- **La reproductibilité.**
- **La spécificité.**
- **L'exactitude.**

Au terme de chaque paramètre, des analyses statistiques sont réalisées afin de prouver et valider le paramètre en question.

Pour atteindre cet objectif, le but des méthodes d'analyse quantitative et de leur validation devrait être rappelé et une étude comparative des différents paramètres existants sera faite.

En effet, certaines lacunes dans les schémas de validation existants fournis par les différents documents réglementaires, sont identifiées, ce qui laisse place à un écart entre les critères de validation et l'utilisation prévue de la méthode. En outre, des recommandations concernant l'utilisation de chacun de ces critères ont été présentées en accord avec l'objectif de la méthode analytique et de celui de la validation analytique qui est de prédire la fiabilité future des résultats de routine (**Hartmann, 1999**).



Chapitre 01 : Synthèse bibliographique

I-Généralités sur les médicaments :

I. Généralités sur les médicaments

I.1. Définition

Toute substance ou composition présentée comme possédant des propriétés curatives ou préventives à l'égard des maladies humaines ou animales, ainsi que toute substance ou composition pouvant être utilisée chez l'homme ou chez l'animal, ou pouvant leur être administrée en vue d'établir un diagnostic médical ou de restaurer, corriger ou modifier leurs fonctions physiologiques en exerçant une action pharmacologique, immunologique ou métabolique (**Art L5111-1**).

I.2. les compositions

Le médicament contient :

- **Un principe actif** : substance d'origine chimique ou naturelle caractérisée par un mécanisme d'action curatif ou préventif précis dans l'organisme.
- **Des excipients** : substances d'origine chimique ou naturelle qui facilitent l'utilisation du médicament mais ne présentent pas d'effet curatif ou préventif (**ANSM 2000**).

I.3. Les catégories de médicaments

Il existe plusieurs catégories de médicaments, parmi lesquelles figurent notamment :

- **Les spécialités pharmaceutiques** : qui sont les médicaments fabriquées industriellement et exploités par les entreprises pharmaceutiques, pour avoir délivrées aux patients.
- **Les préparations magistrales, hospitalières ou officinales** : qui sont le plus souvent réalisées par une pharmacie pour les besoins spécifiques d'un ou plusieurs patients.

Ces préparations et spécialités pharmaceutiques peuvent se présenter sous différentes formes pharmaceutiques :

- **Comprimé**
- **Solution buvable**
- **Solution injectable**

Elles sont accompagnées d'une notice d'utilisation et d'un étiquetage spécifique afin de donner les informations nécessaires à leur utilisation dans les conditions les plus adaptées possibles (**Art L5111-1**).

I.4. Origines des médicaments

Les médicaments peuvent être obtenus de sources très diverses :

- **Origine végétale :**

C'est la source la plus ancienne, mais qui reste d'actualité. Il est classique de distinguer parmi les produits végétaux :

- **Les alcaloïdes :** tels que la quinine.

- **Les gommes.**

- **Les glycosides :** ils contiennent des sucres dans leurs structures chimiques, tels que la digitoxine.

- **Origine animale :**

- **Extraits de sang humain** tel que le fibrinogène.

- **Hormones polypeptidiques extractives** tel que l'insuline.

- **Enzymes :** tels que la trypsine, chymotrypsine et les kinases.

- **Origine synthétique :**

La plupart des médicaments actuellement commercialisés sont d'origine synthétique, obtenus par :

- **Synthèse totale.**

- **Hémi-synthèses :** tels que certaines pénicillines.

- **Origine biogénétique :**

Les méthodes de génie génétiques sont les dernières venues parmi les méthodes d'obtention des médicaments : elles permettent de fabriquer par les cellules vivantes - procaryotes ou eucaryotes - des substances naturelles polypeptidiques présentant toutes les caractéristiques de leur modèle humain (Moulin et Coqurel, 2002).

I.5. Classification

Il existe plus d'une dizaine de milliers de médicaments. Chaque médicament est utilisé dans un but précis et par des spécialités médicales différentes.

Les classifications utilisées en médecine. Il y a de nombreuses façons de classer les médicaments.

Classement en fonction :



De leur principe actif



De leur nom chimique



Du mode d'absorption



Du mode thérapeutique



Du type de préparation



Des familles thérapeutiques

I.6. Voies d'administration des médicaments

Il existe plusieurs voies d'administration, mais, selon la voie utilisée, les PA n'ont pas le même devenir dans l'organisme et subissent des modifications métaboliques plus ou moins importantes, ce qui peut altérer leur activité pharmacologique, surtout en ce qui concerne le début, l'intensité et la durée de leur action.

Les principales voies d'administration sont :

- **Voie orale**
- **Voie parentérale**
- **Voies transmuqueuses** : buccale, perlinguale, oculaire, nasale, pulmonaire ...etc.
- **Voie cutanée (Aiache et al, 1995).**



I-Spectrophotomètre UV visible :

II- Spectrophotomètre UV visible

II-1- Définition

Un spectrophotomètre est un appareil qui permet de mesurer l'absorbance d'une solution à une longueur d'onde donnée ou sur une région donnée du spectre. Selon la loi de Beer-Lambert, l'absorbance d'une solution est proportionnelle à la concentration des substances en solution, à condition de se placer à la longueur d'onde à laquelle la substance absorbe les rayons lumineux. La densité optique des échantillons est déterminée par un spectrophotomètre préalablement étalonné sur la longueur d'onde d'absorption de la substance à étudier (**Gwenola Burgot, 2006**).

II-2- But

Pour déterminer en partie la nature chimique de l'échantillon analysé, de déterminer son absorption ou (transmittance) en fonction de sa concentration, et de déterminer ou prévoir la couleur de l'échantillon (**Héloïse Gay & Gabriel Moreau**).



Fig. 1- Spectrophotomètre UV visible.

II-3- Appareillage

Le spectrophotomètre UV-visible (UV : ultraviolet) comprend :

- Une source ou des sources de lumière : lumière blanche pour la mesure dans le spectre visible UV.
- Un monochromateur formé d'un réseau diffractant la lumière de la source. Il permet de sélectionner la longueur d'onde de la lumière qui traversera la solution à doser.
- Une fente de largeur fixe ou variable pour régler la bande passante.

- Un porte-cuvette pouvant permettre le maintien à température souhaitée de la solution à analyser, cette température est maintenue par un circuit d'eau ou un effet Peltier. Ce maintien à température fixée est très utile dans les mesures de cinétique enzymatique, en effet, la vitesse de réaction dépend de la température.
- Une cuvette transparente dans laquelle on place la solution à étudier. Suivant la qualité et la quantité d'échantillon, il existe différentes cuvettes, généralement en plastique (spectre visible, UV proche) ou en quartz (UV, mais cuvettes très chères) (Louis Burgot, 2006).

II-4- Principe

Lorsqu'une lumière d'intensité I_0 passe à travers une solution, une partie de celle-ci est absorbée par le(s) soluté(s). L'intensité I de la lumière transmise est donc inférieure à I_0 . On définit l'absorbance de la solution comme :

$$A = \log\left(\frac{I_0}{I}\right).$$

On parle aussi de transmittance définie par la relation :

$$T = \frac{I}{I_0} \quad \text{C'est-à-dire que } A = -\log T.$$

L'absorbance est une valeur positive, sans unité. Elle est d'autant plus grande que l'intensité transmise est faible.

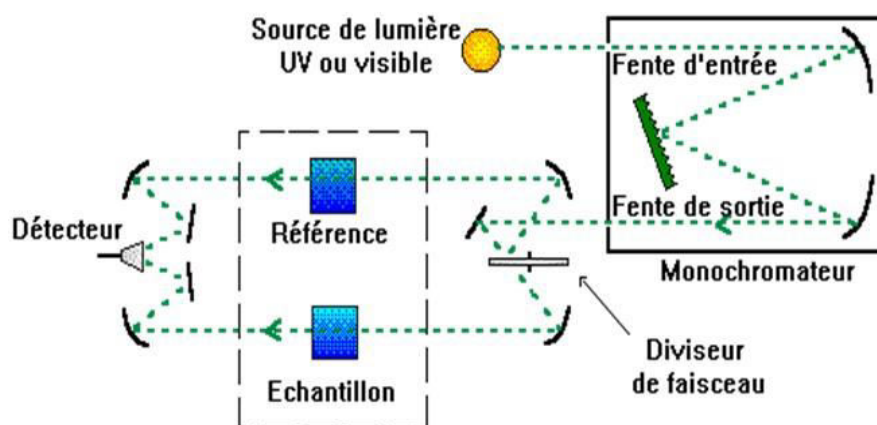


Fig. 2- Schéma de principe du spectrophotomètre UV-visible mono faisceau.

II-4- Echantillonnage

Composés étudiés en divers états physiques :

- Gazeux.
- Liquide.

- Solide.

L'étude se fait en solution diluée.

II-4-1- Solvant :

Solvant doit :

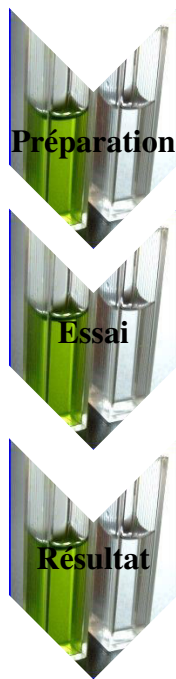
- Dissoudre le produit.
- Etre transparent dans la région d'étude.

II-4-2- Cellule :

Solution placé dans une cellule ou cuve :

- Différentes épaisseurs.
- En quartz pour le domaine UV visible.
- En verre pour le domaine visible.

II-5- Manipulation :



- Faire le blan de la machine avec la cuve.
- Remplir la cuve et la placer dans l'appareil.

- Démarrer l'analyse pour obtenir le pectre d'absorption ou de transmittance.

- Observer le spectre d'absorption ou de transmittance en fonction de la longueur d'onde.
- Déterminer la concentration de l'échantillon grâce à la loi de Beer Lambert.

II-6- Loi de BEER LAMBERT

La relation de Beer-Lambert décrit que, à une longueur d'onde λ donnée, l'absorbance d'une solution est proportionnelle à sa concentration, et à la longueur du trajet optique (distance sur laquelle la lumière traverse la solution).

Alors, pour une solution limpide contenant une seule substance absorbante :

$$A_{\lambda} = \epsilon_{\lambda} l c$$

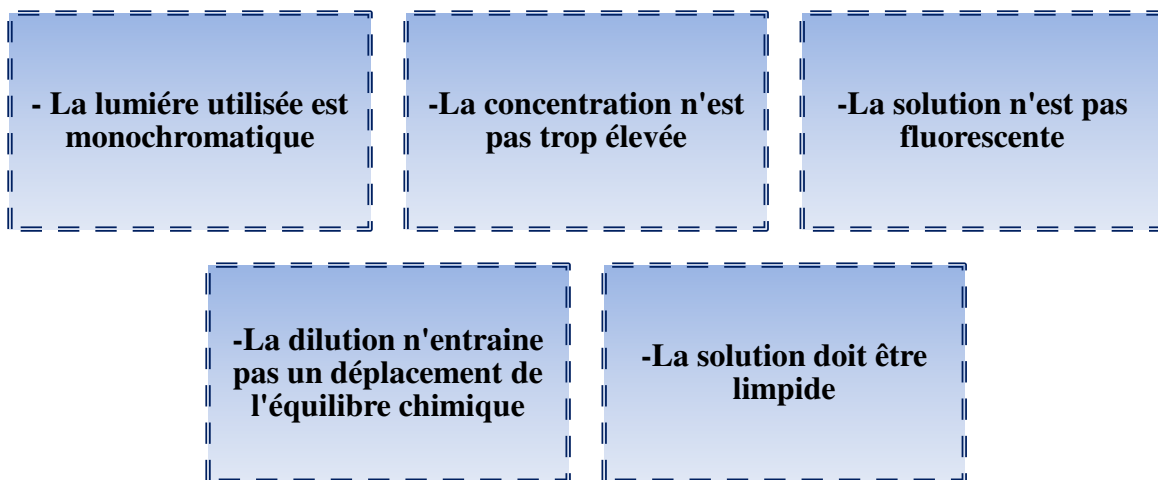
* A_λ : est l'absorbance ou la densité optique (sans unité) de la solution pour une longueur d'onde λ

* c : (en mol.m^{-3}) est la concentration de la substance absorbante

* l : (en cm) est la longueur du trajet optique

* ϵ_λ : (en $\text{m}^3.\text{mol}^{-1}.\text{cm}^{-1}$) est le coefficient d'extinction molaire de la substance absorbante en solution (**Berberan-Santos M.N.1990**).

II-7- Conditions de validité de la loi de Beer-Lambert



II-8- Applications

La spectrométrie s'utilise principalement dans deux cas:

- Analyse qualitative.
- Analyse quantitative.

Ces mesures ont des applications dans divers domaines :

-En laboratoire :

Afin d'établir un tracé quantitatif d'un spectre d'absorption ou de réflexion en fonction de la longueur d'onde.

-En analyse industrielle :

Soit pour déterminer la composition d'un échantillon, soit pour mesurer des paramètres (couleur, turbidité, ...).

-En pharmacie

Dosage des molécules actives dans une préparation pharmaceutique.

Dosage de fer dans un médicament.

III- Validation de la méthode de dosage d'un médicament :

III-1- Qu'est-ce que la validation analytique d'un médicament ?

Le contrôle analytique d'un médicament ou de certains de ses constituants est indispensable pour garantir que le médicament en question restera sûr et efficace pendant toute sa durée de validité proposée, c'est-à-dire pendant les phases de stockage, de distribution et d'utilisation. Ce contrôle doit autant que possible être effectué selon des spécifications élaborées et validées lors de la mise au point du produit. Ainsi, on aura l'assurance que les spécifications de qualité sont applicables non seulement à la préparation pharmaceutique qui a servi à établir les caractéristiques biologiques des principes actifs, mais aussi aux formes galéniques mises sur le marché. A partir du moment où l'évaluation biomédicale du produit est terminée, les spécifications constituent la seule base d'acceptabilité de tous les lots ultérieurs (**Baixas-Noguères, 1987**).

La validation des méthodes analytiques a pour principal objectif de s'assurer qu'une méthode analytique donnée donnera des résultats suffisamment fiables et reproductibles, compte tenu du but de l'analyse. Il faut donc définir correctement à la fois les conditions dans lesquelles la méthode sera utilisée et le but dans lequel elle sera employée. Ces principes s'appliquent à toutes les méthodes utilisées par un fabricant de produits pharmaceutiques, qu'elles soient ou non décrites dans une pharmacopée (**Vidal-Carou, 2001**).

Le principe de la validation des procédures analytiques quantitatives est, 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 (**Thiam M, 2000**).

III-2- But de validation statistique pour un médicament

La validation d'une méthode de chimie analytique passe par l'estimation de l'erreur de justesse, ou biais systématique, et de l'erreur aléatoire, qu'il faut combiner pour vérifier si la méthode remplit les objectifs qui lui ont été assignés. La construction d'un modèle statistique permet d'évaluer quantitativement ces notions, qui peuvent être visualisées graphiquement, suivant la méthode du profil d'exactitude et de se donner les moyens de contrôler le maintien dans le temps des performances de la chaîne de mesure, par la construction des cartes de contrôle (**Mariné-Foat, 2001**).

Dans la pratique courante, après l'étape d'optimisation, il devient de plus en plus évident et essentiel de démontrer au moyen de la validation qu'une méthode optimisée correspond à l'usage attendu tout en fournissant, par ailleurs, des résultats fiables. Pour valider la méthode de dosage optimisée dans ce travail, nous avons appliqué la stratégie basée sur le profil d'exactitude récemment introduite et décrite dans la littérature. D'un point de vue statistique, cette stratégie de validation répond aux besoins des analystes quant à la prise de décision en rapport avec les résultats fournis et en considérant des limites d'acceptation prédéfinies ainsi que le risque relatif à l'usage futur de la méthode. De ce fait, l'utilisation du profil d'exactitude se trouve être en accord avec l'objectif d'une méthode qui peut être résumé en sa capacité à quantifier le plus exactement possible chacune des quantités inconnues devant être déterminées par le laboratoire (**Etienne M, 2005**).

En réalité, ce qui est attendu d'une procédure analytique lorsqu'un analyste l'applique est que la différence observée entre le résultat d'une mesure et la « vraie valeur » de l'échantillon (qui demeure toujours inconnue) soit inférieure à la limite d'acceptation prédéfinie. De plus, l'analyste devra fournir la garantie quant à l'usage futur de la méthode. Au moyen du critère de l'erreur totale sur laquelle se base cette stratégie de validation, l'analyste peut envisager de contrôler le risque du consommateur indispensable d'un point de vue garantie et confiance. En effet, des critères idéaux d'acceptation devraient assurer qu'une proportion élevée des résultats futurs sera comprise dans des limites acceptables avec un degré de confiance élevé. Le risque du consommateur est défini comme étant le risque d'accepter des résultats mauvais et par contre le risque du producteur est celui de rejeter des résultats corrects (**Ruiz-Capillas, 1999**).

III-3- Validation de la méthode de dosage d'un médicament

La méthode de dosage par spectrophotomètre UV-Vis d'un médicament a été validée en étudiant successivement les paramètres suivants :

- Spécificité
- Linéarité
- Exactitude
- Reproductibilité
- Précision

III-3-1- Spécificité

On démontre que la méthode est spécifique si elle est capable de déterminer quantitativement un analyte sans interférences avec d'autres composants, impuretés ou composants de dégradation.

La spécificité est la capacité à établir l'existence de la substance à analyser en présence d'autres composants présents. Il s'agit de démontrer que la substance analysée au sein de la matrice est bien l'analyte recherché. La spécificité se fonde sur une absence d'interférences. Elle sera estimée par la méthode des ajouts dosés en calculant le pourcentage de recouvrement (**Monique Mayor, 2003**).

Concrètement, la méthode est testée sur les autres produits présents dans le médicament afin de vérifier leur non interférence.

Il y a également la possibilité d'effectuer une étude de dégradation forcée où plusieurs conditions sont testées pour faire apparaître des produits de dégradation (**Buhrman, 1996**).

III-3-2- Linéarité

La linéarité est la capacité que possède la méthode analytique d'obtenir des résultats proportionnels à la concentration en analyte.

La linéarité de la méthode a été calculée à partir d'une gamme de concentration dont l'étendue est de 80 p. cent à 120 p. cent de la teneur théorique en médicament.

La gamme est constituée du principe actif et des excipients traités de la même manière que les essais à examiner.

Intervalle de linéarité fonction de :

- Analyte (impureté, principe actif, conservateur,...).
- Application (formulation, test de dissolution,...).

Vérifiée : examen de la courbe, analyse de variance.

Exprimée : Équation de la droite avec intervalle de confiance sur pente, ordonnée à l'origine. L'étude de la linéarité revient à une étude de régression. La méthode de la régression consiste à étudier à travers la gamme d'étalonnage. La relation concentration / réponse est exprimée par une courbe d'étalonnage (**Brors, 1990**) dont l'équation est :

$$y = ax + b.$$

Elle doit être complétée par le calcul du coefficient de corrélation « R^2 » et un facteur de réponse. En fait, la détermination du coefficient de corrélation « R^2 » permet de vérifier si la représentation concentration-réponse correspond à une droite (Nijhuis, 1999).

Son calcul est vraiment intéressant que pour vérifier l'existence d'un lien entre la concentration et la réponse. Pour définir de façon absolue la linéarité, le facteur de réponse est l'outil par excellence et il est exprimé par le rapport réponse/concentration (Desilva, 2003).

Si la relation concentration/réponse dans une zone déterminée est une droite, le facteur de réponse sera constant quelles que soient les valeurs des couples concentration/réponse.

A partir des résultats des facteurs de réponse calculés, on détermine la moyenne, l'écart type et le coefficient de variation (CV). Une faible valeur de ce coefficient permet d'affirmer avec quasi certitude que la représentation concentration-réponse est une droite (Yeung, 1992).

III-3-3- Exactitude

Étroitesse obtenue entre la valeur trouvée et la valeur acceptée, peut être considérée soit comme valeur conventionnellement vraie soit comme valeur de référence (AFNOR, 1998).

On peut définir l'exactitude comme suit :

Exactitude = erreur systématique (biais) d'une valeur obtenue / valeur considérée comme exacte (John Wiley & Sons, 2004).

L'exactitude de la méthode a été étudiée sur 3 séries de mesures (90 p. cent, 100 p. cent et 110 p. cent de la quantité théorique) par le calcul du recouvrement moyen obtenu par rapport entre une quantité connue et la quantité retrouvée, calculé à l'aide de la droite de régression du principe actif seul.

L'exactitude d'une procédure analytique exprime l'étroitesse de l'accord entre la valeur acceptée comme conventionnellement vraie, ou comme valeur de référence et la valeur trouvée. Elle est parfois appelée exactitude (Hamel, 1998).

Les guides de validation recommandent d'évaluer l'exactitude sur un minimum de neuf déterminations avec au moins trois niveaux de concentration, pour exemple trois concentrations seront répétées trois fois (Jemal, 2003).

L'étude statistique des résultats va permettre de vérifier l'exactitude de la méthode. Pour cela, on calcule le taux de recouvrement (r) qui représente le rapport entre la concentration estimée par le modèle mathématique et la teneur théorique réelle. Il permet d'apprécier l'exactitude de la méthode pour chaque principe actif (Findlay, 2000).

III-3-4- Reproductibilité

La reproductibilité à un niveau donné correspond à l'étroitesse de l'accord entre les résultats individuels obtenus sur le même échantillon soumis à l'essai dans des laboratoires différents et dans les conditions suivantes : analyste différent, appareil différent, jour différent ou même jour (**Thanh X. Bui, 1990**).

L'essai de La reproductibilité consiste à effectuer l'analyse d'un même échantillon pour le même analyte. En pratique, cet essai sera réalisé au cours d'une même série. L'exploitation des résultats consiste à calculer la moyenne, l'écart-type et le coefficient de variation(CV) des valeurs expérimentales. Le CV représentera La reproductibilité de la méthode en % (**Dams, 2003**).

Le coefficient de variation donne l'homogénéité des données, si le coefficient de variation est inférieur à 5%, on considère que les données sont homogènes et inversement, si le coefficient de variation est supérieur à 5%, on dit que les données sont hétérogènes (**Shabir, 2003**).

III-3-5- Précision

A l'aide de ce paramètre, on étudie la variabilité due uniquement à l'instrument et on la détermine en analysant répétitivement un même échantillon de manière consécutive.

Pour ce faire, on prépare un échantillon au laboratoire avec tous les composants et excipients de produit fini. Une fois l'échantillon préparé, on procède comme il est indiqué dans le traitement de l'échantillon.

L'évaluation de la précision nécessite un nombre suffisant de mesures répliquées sur des matériaux appropriés. Les matériaux doivent être représentatifs des échantillons d'essai en termes de concentration de matrice et d'analyte, d'homogénéité et de stabilité (**Iglesias, 1990**).

Les répliques doivent être indépendantes, c'est-à-dire que l'ensemble du processus de mesure, y compris les étapes de préparation des échantillons, devrait être répété. Le nombre minimum de réplifications spécifiées varie selon les différentes lignes directrices de validation (**Shah, 1996**).

La précision est généralement exprimée par l'écart-type, la variance ou le coefficient de variation (CV).



Chapitre 02 : Matériels et méthodes

IV- Matériels et méthodes

IV-1-Echantillonnage

Les analyses sont effectuées pour le principe actif qui est le Bromhexine chlorhydrate. On lit sur la notice, la composition suivante:

-BROMHEXINE (Principe actif)0,2 g.
-Q.S.P.....100 ml.

Les analyses sont effectuées au niveau de laboratoire de recherche de biologie moléculaire et cellulaire (Universite Abbes Laghrour–Khenchela).



Fig. 3- Bromhexine chlorhydrate.

IV-2- Matériel

- **Verreries usuelles** : (béchers, fioles, pipettes graduées, tube à essais, Ente noire,...etc.)
- **Appareillages** :
 - Agitateur magnétique
 - Balance électronique

IV-3- Produits et Réactifs

- Acide sulfurique (0.1N)

- Eau distillée
- Témoin bromhénine chlorhydrate (poudre).

IV-4- Méthodes

IV-4-1- Linéarité

Mode opératoire

- Transférer 400 mg de l'étalon (témoin) Bromhénine chlorhydrate dans une fiole de 1000 ml avec environ 700 ml de la solution H_2SO_4 0,1N.
- Agiter très bien jusqu'à dissolution.
- amener au volume d'un litre avec la solution H_2SO_4 0,1N (solution mère).

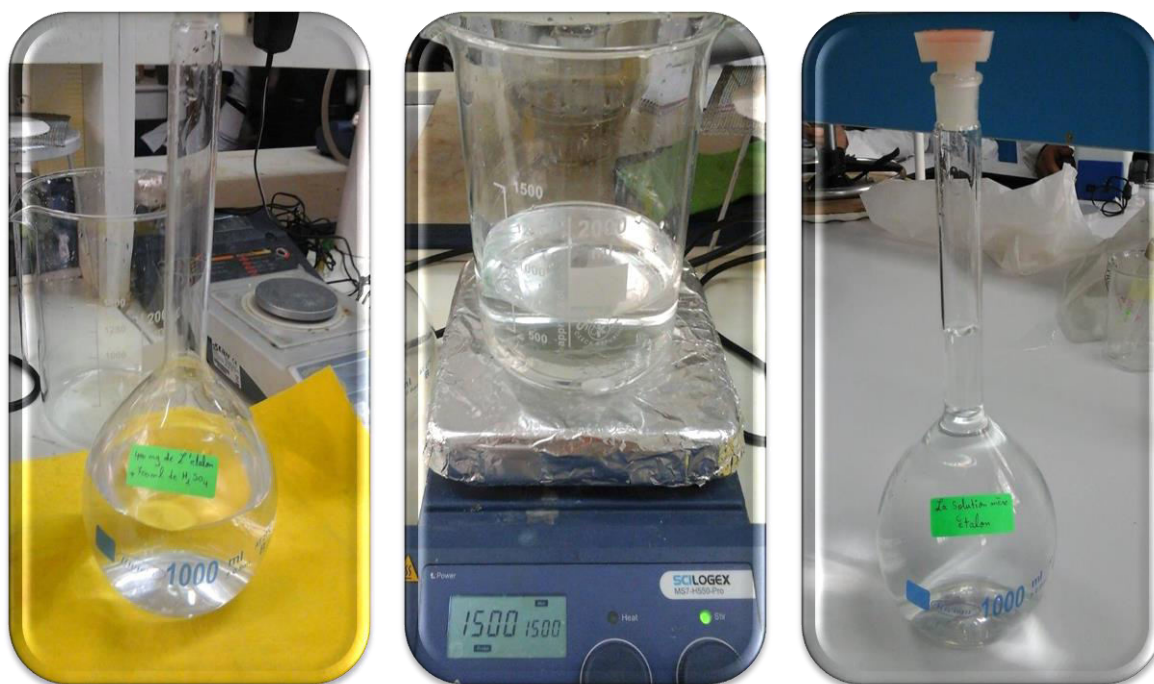


Fig. 4- Préparation d'une solution mère.

- Réaliser une série de dilution selon le tableau suivant :

Solution mère (ml)	10	12.5	15	17.5	20
Solution H_2SO_4 ajoutée 0,1N (ml)	40	37.5	35	32.5	30

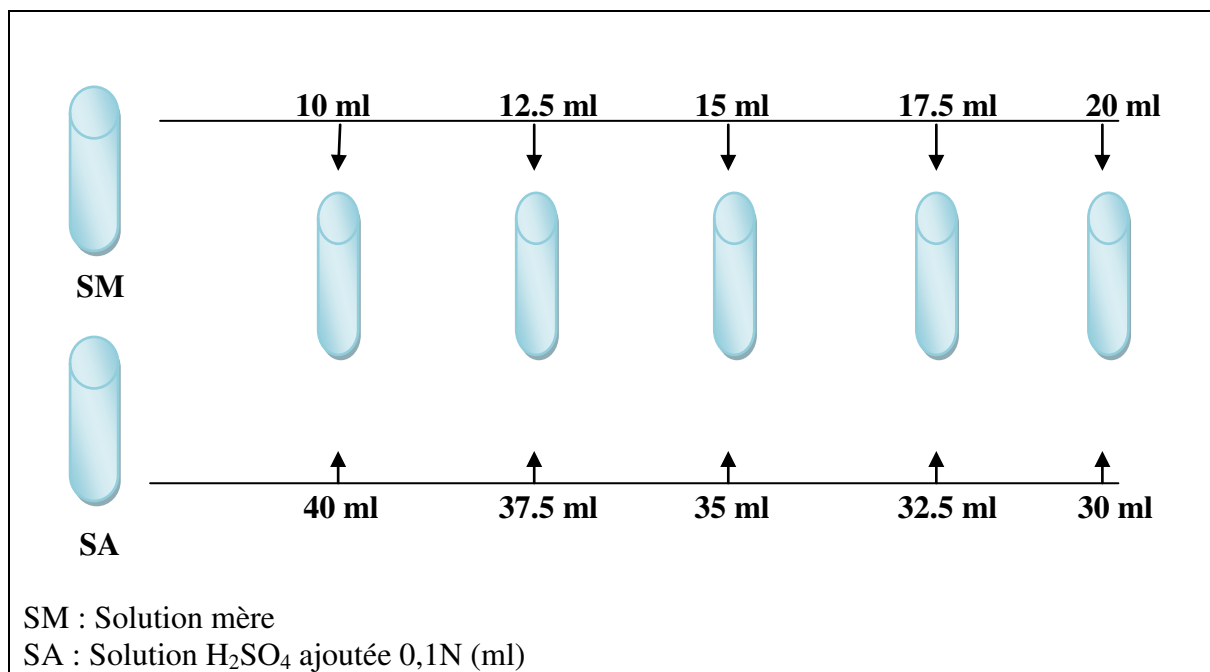


Fig. 5- Préparation d'une série de dilution.

- Effectuer les lectures des solutions au spectrophotomètre à 311 nm. Noter pour chaque solution trois absorbances.

IV-4-2- Reproductibilité

Mode opératoire

L'étude a été réalisée sur 6 prises d'essai différentes, voisines de 10.5 g de sirop :

- 1- Prélever 10.5 g de sirop et compléter à 50 ml dans une fiole jaugée de 50 ml avec une solution H₂SO₄ 0,1N.
- 2- Prélever 10.58 g de sirop et compléter à 50 ml dans une fiole jaugée de 50 ml avec une solution H₂SO₄ 0,1N.
- 3- Prélever 10.68 g de sirop et compléter à 50 ml dans une fiole jaugée de 50 ml avec une solution H₂SO₄ 0,1N.
- 4- Prélever 10.70 g de sirop et compléter à 50 ml dans une fiole jaugée de 50 ml avec une solution H₂SO₄ 0,1N.
- 5- Prélever 10.86 g de sirop et compléter à 50 ml dans une fiole jaugée de 50 ml avec une solution H₂SO₄ 0,1N.
- 6- Prélever 10.90 g de sirop et compléter à 50 ml dans une fiole jaugée de 50 ml avec une solution H₂SO₄ 0,1N.

- Introduire 10 ml de chaque solution dans une deuxième fiole de 50 ml et compléter à 50 ml avec la solution H_2SO_4 0,1N.
- Effectuer la lecture des solutions au spectre photomètre à 311 nm. Noter bien les absorbances.

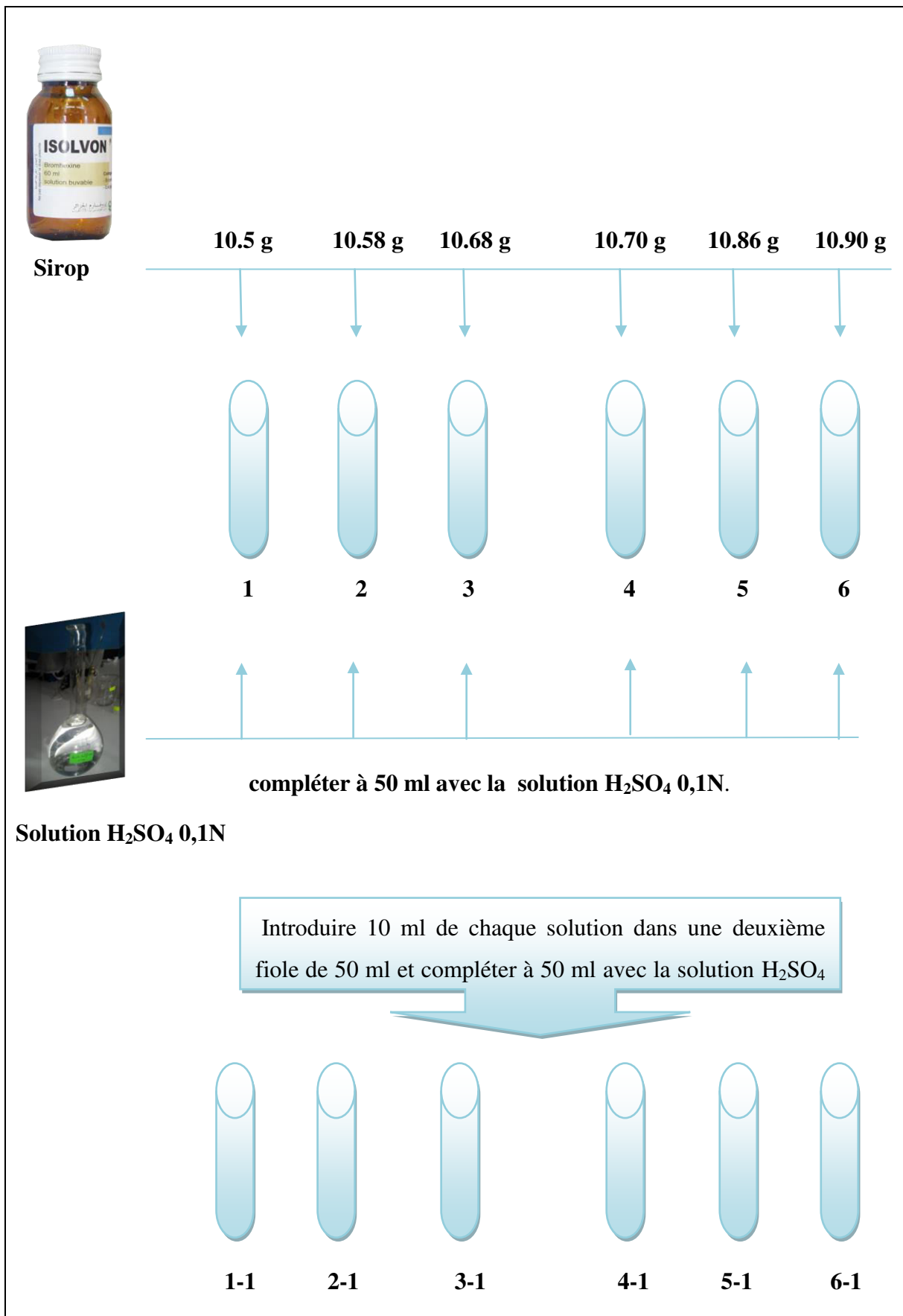


Fig. 6- Préparation des 6 prises d'essai.

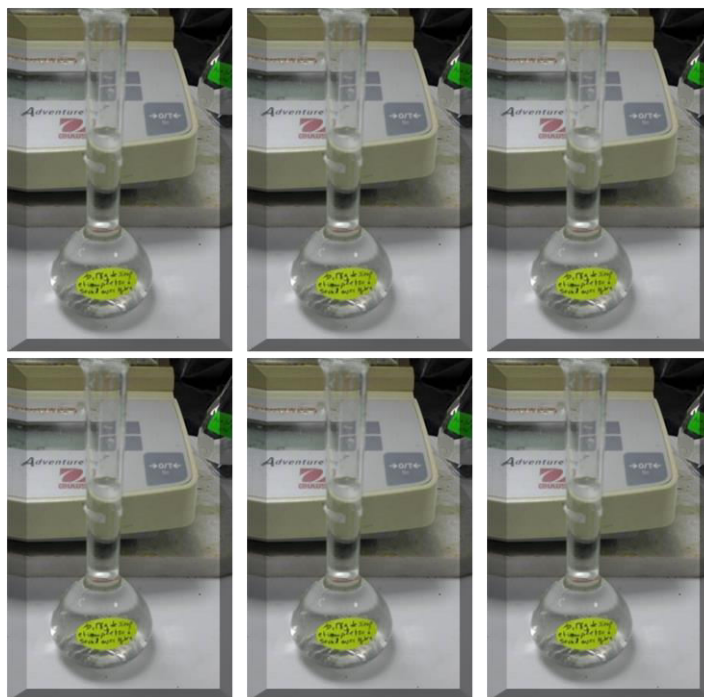


Fig. 7- Les 6 prises d'essai.

IV-4-3- Exactitude

Mode opératoire

L'exactitude de la méthode a été étudiée sur 3 séries de mesures (90 p. cent et 100 p. cent et 110 p. cent) de la quantité théorique.

-1 ère série : (90 p. cent)

-Prélever 09 ml de sirop et compléter à 50 ml dans une fiole jaugée de 50 ml avec une solution H_2SO_4 0,1N.

-Introduire 10 ml de cette solution dans une deuxième fiole de 50 ml et compléter à 50 ml avec la solution H_2SO_4 0,1N. (Effectuer 3 répétitions).

-2 ème série : (100 p. cent)

- Prélever 10 ml de sirop et compléter à 50 ml dans une fiole jaugée de 50 ml avec une solution H_2SO_4 0,1N.

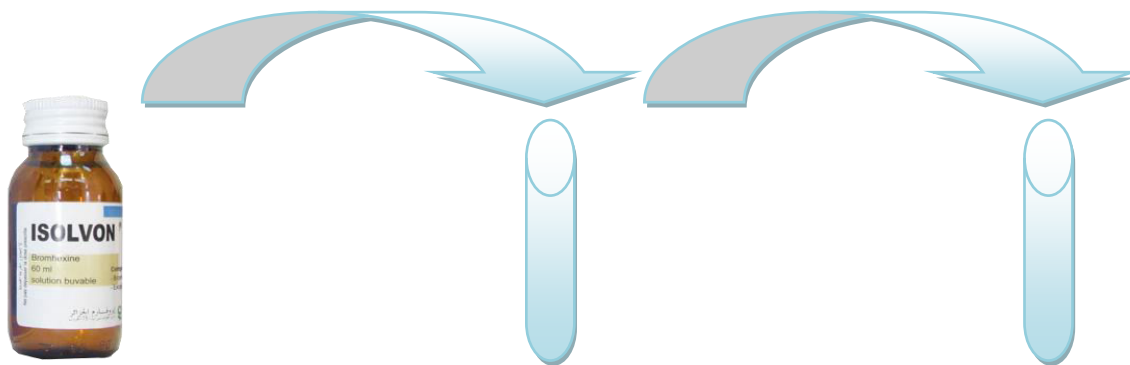
- Introduire 10 ml de cette solution dans une deuxième fiole de 50 ml et compléter à 50 ml avec la solution H_2SO_4 0,1N. (Effectuer 3 répétitions).

-3ème série : (110 p. cent)

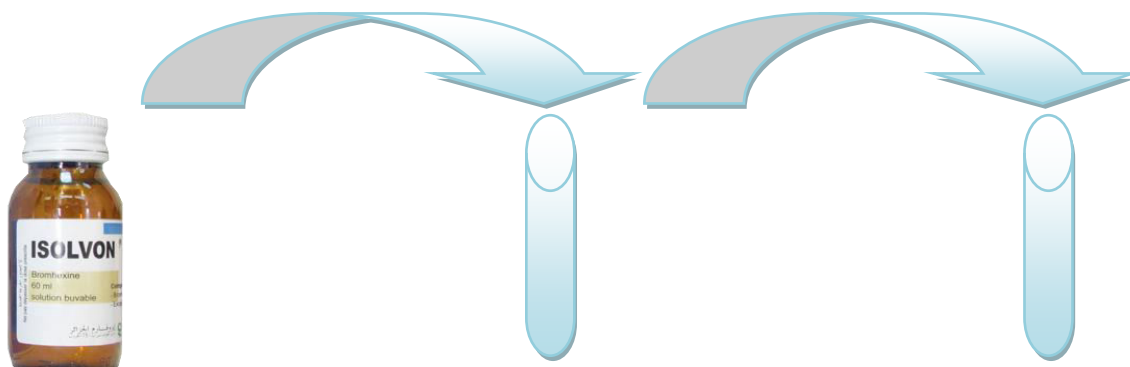
- Prélever 11 ml de sirop et compléter à 50 ml dans une fiole jaugée de 50 ml avec une solution H_2SO_4 0,1N.
- Introduire 10 ml de cette solution dans une deuxième fiole de 50 ml et compléter à 50 ml avec la solution H_2SO_4 0,1N. (Effectuer 3 répétitions).
- Effectuer la lecture des solutions au spectre photomètre à 311 nm. Noter bien les absorbances.

-1 ère série : (90 p. cent)

- Prélever 09 ml de sirop et compléter à 50 ml avec une solution H_2SO_4 0,1N.
- Introduire 10 ml de cette solution et compléter à 50 ml avec une solution H_2SO_4 0,1 N.

**-2 ème série : (100 p. cent)**

- Prélever 10 ml de sirop et compléter à 50 ml avec une solution H_2SO_4 0,1 N.
- Introduire 10 ml de cette solution et compléter à 50 ml avec une solution H_2SO_4 0,1 N.



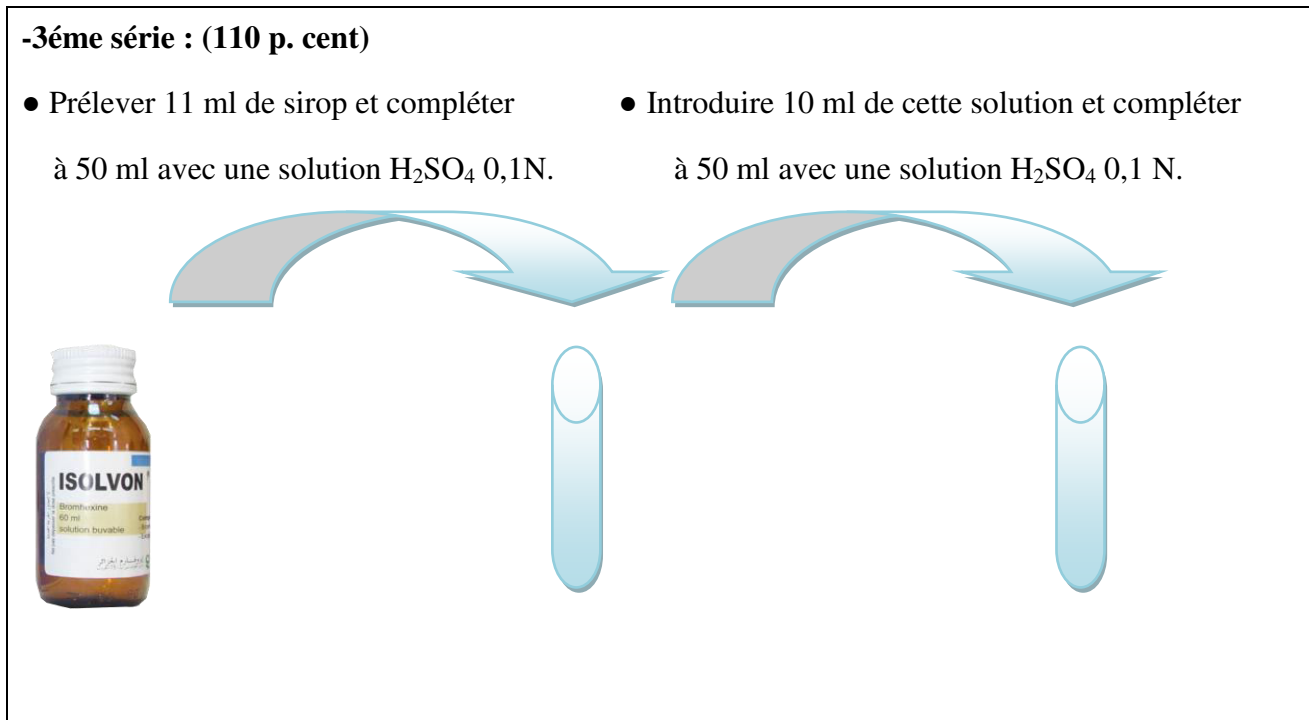


Fig. 8- Les 3 séries de mesures (90 p. cent et 100 p. cent et 110 p. cent).

IV-4-3- Spécificité

Mode opératoire

La spécificité de la méthode a été évaluée par l'étude d'un reconstitué avec Bromhénine seul, par rapport à un reconstitué contenant Bromhénine et tous les excipients, traités de la même manière.

- Bromhénine seul :

- Transférer 40 mg de l'étalon Bromhénine chlorhydrate dans une fiole de 100 ml avec environ 70 ml de la solution H₂SO₄ 0,1N.
- Agiter jusqu'à dissolution et amener au volume avec le même solvant.
- Diluer 10 ml de cette solution et compléter à 50 ml avec H₂SO₄ 0,1N. (Effectuer 3 répétitions).
- Effectuer la lecture des solutions au spectre photomètre à 311 nm. Noter bien les absorbances.

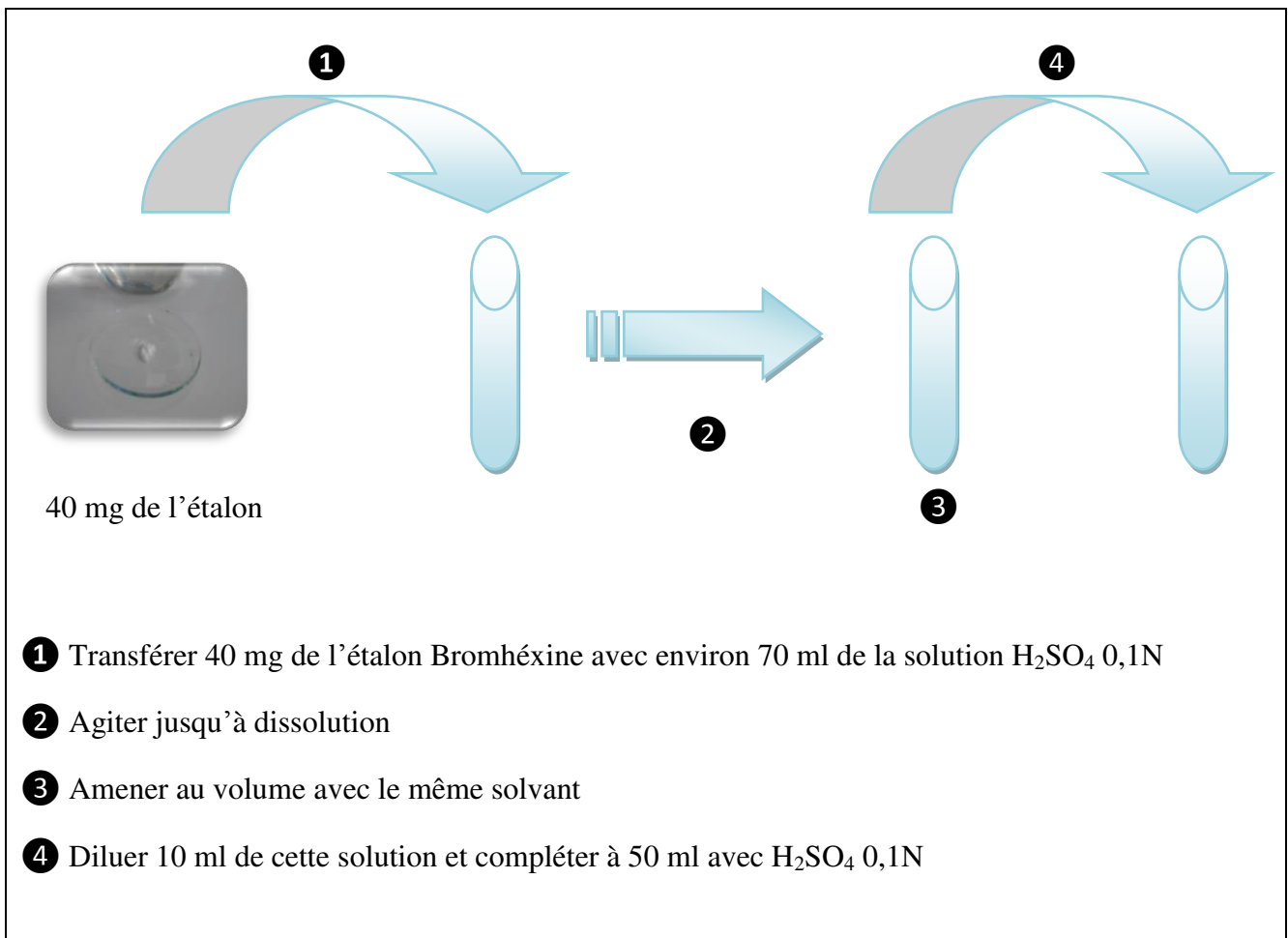


Fig. 9- Un reconstitué avec Bromh xine seul.

- Bromh xine et tous les excipients du produit fini :

- Prélever 10 ml de sirop et compléter à 50 ml dans une fiole jaugée de 50 ml avec une solution H₂SO₄ 0,1N.
- Introduire 10 ml de cette solution dans une deuxième fiole de 50 ml et compléter à 50 ml avec la solution H₂SO₄ 0,1N. (Effectuer 3 répétitions).
- Effectuer la lecture des solutions au spectre photomètre à 311 nm. Noter bien les absorbances.

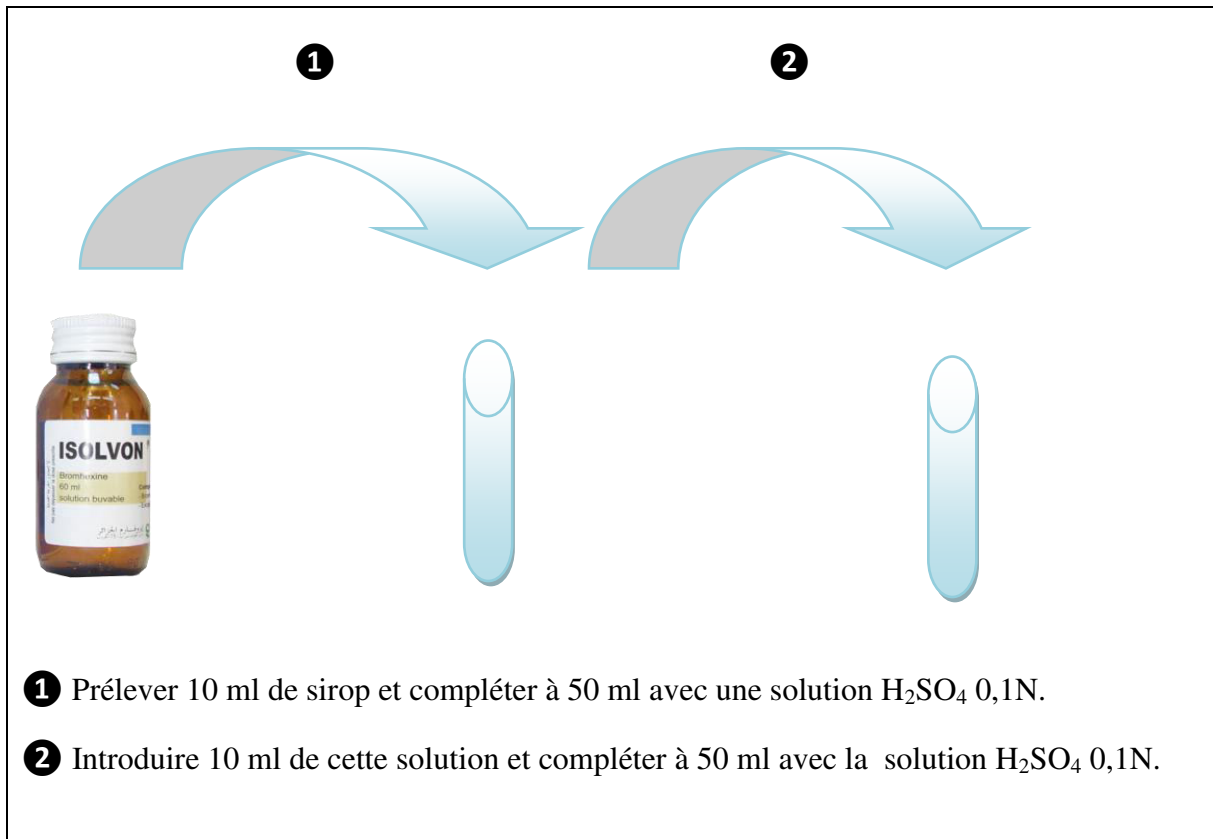


Fig. 10- Un reconstitué contenant Bromh xine et tous les excipients du produit fini.

IV-4-4- Précision

Mode opératoire

On prépare un échantillon au laboratoire avec tous les composants et excipients du produit fini :

- Transférer 60 mg de l'étalon Bromh xine chlorhydrate dans une fiole de 100 ml avec environ 70 ml de l'eau distillée.
- Agiter jusqu'à dissolution et amener au volume avec le même solvant.
- Introduire 10 ml de cette solution dans une deuxième fiole de 50 ml et compléter à 50 ml avec la solution H_2SO_4 0,1N. (Effectuer 3 répétitions).
- Effectuer la lecture des solutions au spectre photomètre à 311 nm. Noter bien les absorbances.

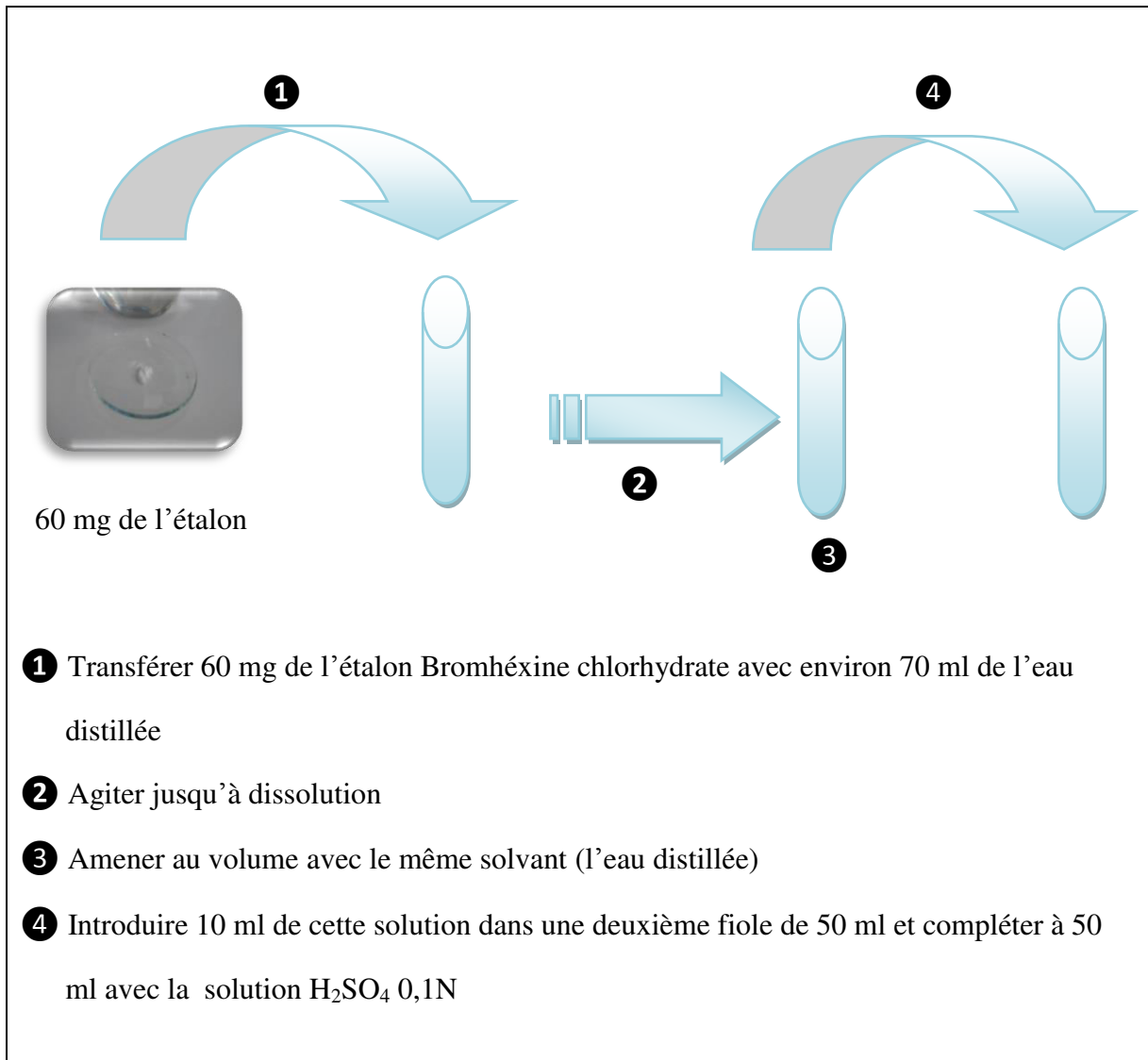


Fig. 11- Préparation d'un échantillon avec tous les composants et excipients du produit fini.



Chapitre 03 : Résultats et discussions

V- Résultats et discussion

V-1- Linéarité

Tableau 1. Résultats de mesure d'absorption d'une série de dilution.

Solution mère (ml)	10	12.5	15	17.5	20
Solution H₂SO₄ ajoutée 0,1N (ml)	40	37.5	35	32.5	30
Absorbance	0.568	0.705	0.842	0.994	1.118

Tableau 2. Résultats de mesure de concentration d'une série de dilution.

Absorbance	0.568	0.705	0.842	0.994	1.118
Concentration Solution fille (mg/ml)	0.08	0.1	0.12	0.14	0.16

- **La droite d'étalonnage :**

Une régression linéaire effectuée sur les absorbances obtenues en fonction des concentrations abouties à une droite passant sensiblement par l'origine et d'équation :

$$Y=0.1439X-0.0016.$$

- **Représentation graphique**

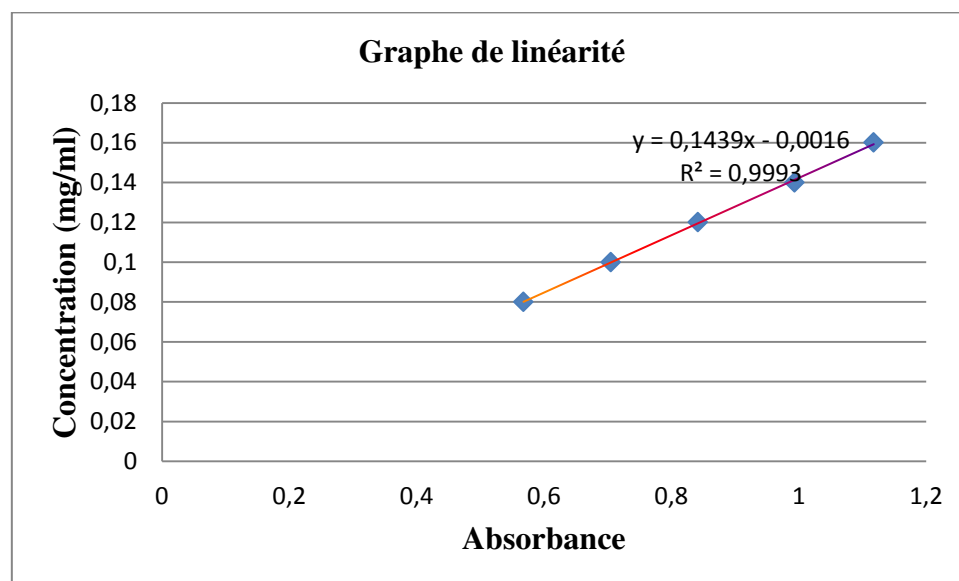


Fig. 12- Droite de linéarité.

- **Analyse statistique**

X	Y	XY	X²	Y²
0.568	0.08	0.04544	0.322624	0.0064
0.705	0.1	0.0705	0.497025	0.01
0.842	0.12	0.10104	0.708964	0.0144
0.994	0.14	0.13916	0.988036	0.0196
1.118	0.16	0.17888	1.249924	0.0256
0.8454	0.12	0.107004	0.7533146	0.0152

1-Le coefficient de corrélation (R²)

$$R^2 = \frac{\overline{XY} - \bar{X} \bar{Y}}{\sqrt{(\overline{X^2} - \bar{X}^2)(\overline{Y^2} - \bar{Y}^2)}}$$

X : Valeur d'absorbance.

Y : Valeur de concentration.

\bar{X} : Moyenne d'absorbance.

\bar{Y} : Moyenne de concentration.

Alors :

$$R^2 = 0.9993.$$

2-Test de linéarité

$$a = 0.1439$$

$$b = 0.0016$$

$$c = 0.9993$$

$$S_B^2 = \frac{\sum(Y - \bar{Y})^2(1 - R^2)n}{(n - 2)[n \sum X^2 - (\sum X)^2]}$$

$$\sqrt{S_B^2} = 0.000012096$$

$$S_B \text{ rel} = \frac{\sqrt{S_B^2}}{b} * 100$$

$$S_B \text{ rel} = (0.000012096/0.0016) * 100 = 0.756 < 2\% .$$

3-La variance

$$Var = \frac{1}{n} \sum (X^2 - \bar{X}^2)$$

$$Var = \frac{1}{5} (3.05187184)$$

$$Var = 0.61037.$$

4- L'écart type

$$\Delta = \sqrt{\text{var}(x)}$$

$$\Delta = \sqrt{0.61037} = 0.78126$$

5-Moyenne de teneur

On été calculées pour chaque lecture les dosages. Les dosages sont exprimées en %, on été déterminées à partir de l'expression :

$$\begin{array}{l} 100\% \longrightarrow C \text{ théorique} \\ T\% \longrightarrow C \text{ réelle} \end{array}$$

D'après la loi de Beer-Lambert :

$$A_{réelle} = \varepsilon \cdot L \cdot C_{réelle} \quad (1)$$

$$A_{témoin} = \varepsilon \cdot L \cdot C_{témoin} \quad (2)$$

$$\frac{(1)}{(2)} = \frac{A_{réelle}}{A_{témoin}} + \frac{C_{réelle}}{C_{témoin}}$$

$$\text{Donc : } C_{réelle} = C_{témoin} \frac{A_{essai}}{A_{témoin}}$$

$$C_{réelle} = 0.08 \frac{A_{essai}}{A_{témoin}}$$

Calcul de la concentration théorique :

$$X \longrightarrow 10 \text{ ml}$$

$$0.2 \text{ g} \longrightarrow 100 \text{ ml sirop}$$

$$X = 0.02 \text{ g.}$$

$$C_{théorique} = \frac{0.02}{50} * \frac{10}{50}$$

$$\text{Donc : } C_{théorique} = 0.08 \text{ mg/ml.}$$

$$T\% = \frac{C_{réelle}}{C_{théorique}} * 100$$

$$T\% = 100.50\%.$$

6-Le coefficient de variation

$$Cv = \frac{\text{écart type}}{\text{moyenne de teneur}} * 100$$

$$Cv = \frac{0.78126}{100.50} * 100$$

$$Cv = 0.77 \%$$

7-La déviation standard

$$S = \sqrt{\frac{1}{n-1} \sum (X - \bar{X})^2}$$

$$S = \sqrt{\frac{1}{4} (4.227 - 0.8454)^2}$$

$$S = 1.69.$$

8 –Test de student

On le calcule si la valeur moyenne trouvée et la valeur considérée ne diffèrent pas significativement pour un degré de probabilité déterminé (p=0.05).

$$t_{\text{exp}} = \frac{|m - X|}{S}$$

X : est la valeur moyenne obtenue

m : est le 1 er valeur d'absorbance

S : est la déviation standard

$$\text{Donc : } t_{\text{exp}} = \frac{|0.568-0.8454|}{1.6908} = 0.16$$

$$t_{\text{tab}}=0.5636.$$

Alors que : $t_{\text{exp}} < t_{\text{tab}}$.

- Ces résultats indiquent que **la méthode est linéaire** et que la droite passe statistiquement par zéro, et affectée d'un coefficient de corrélation très satisfaisant ($R^2 = 0.9993$).
- On considère que la méthode est exacte car on trouve une valeur de t_{exp} inférieure à t_{tab} pour un risque choisi de 0.06.

V-2- Reproductibilité

Tableau 3. Résultats de mesure d'absorption des 6 prises d'essai.

Poids sirop (ml)	10.5	10.58	10.68	10.70	10.86	10.90
Absorbance	0.497	0.501	0.518	0.536	0.564	0.570

- **La droite d'étalonnage :**

Une régression linéaire effectuée sur les absorbances obtenues en fonction des concentrations abouties à une droite passant sensiblement par l'origine et d'équation :

$$Y=0.0309x+0.0552$$

- **Représentation graphique**

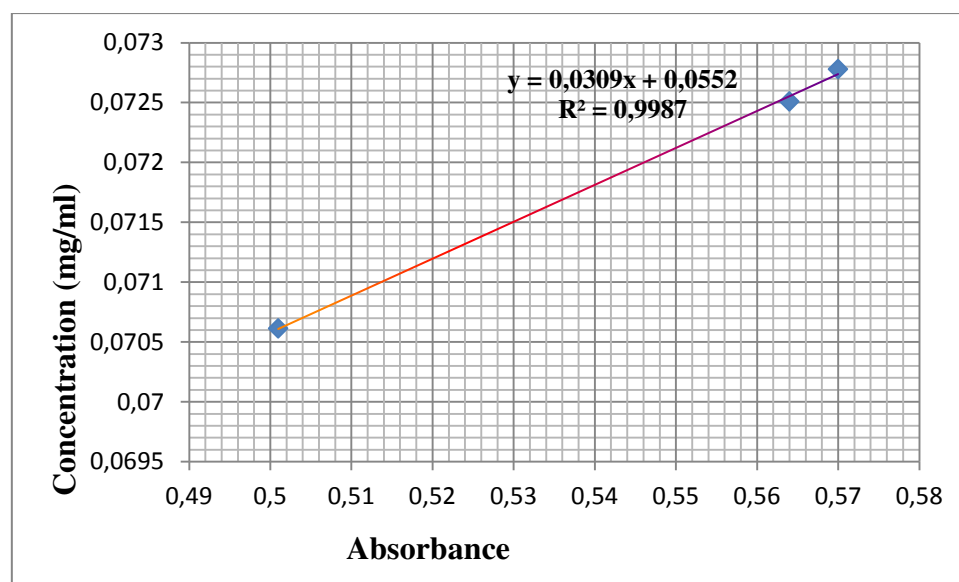


Fig. 13- Droite de Reproductibilité.

- **Analyse statistique**

Tableau 4. Résultats de calcul de la masse prise et la concentration théorique et la concentration réelle.

Poids Sirop	Absorbance	Volume Sirop (ml)	Masse Prise (mg)	C.S mère essai (mg/ml)	C théorique (mg/ml)	C réelle (mg/ml) *
10,5	0,497	10,401	20,802	0,41605	0,08321	0,070071
10,58	0.501	10,480	20,961	0,41922	0,08384	0,07061249
10,68	0.518	10,579	21,159	0,42318	0,08464	0,07128936
10,7	0.536	10,599	21,199	0,42397	0,08479	0,07142473
10,86	0.564	10,758	21,516	0,43031	0,08606	0,07250772
10,9	0.570	10,797	21,595	0,43190	0,08638	0,07277847

*Calculée à partir de la droite d'étalonnage

Tableau 5. Résultats de calcul de teneur en pourcentage et en masse.

Teneur (%)	Teneur en masse (g)
84,210	0,1684
84,219	0,1684
84,231	0,1685
84,233	0,1685
84,250	0,1685
84,254	0,1685

1-Le coefficient de corrélation (R²)

$$R^2 = \frac{\overline{XY} - \bar{X} \bar{Y}}{\sqrt{(X - \bar{X})^2 (Y - \bar{Y})^2}}$$

X : Valeur d'absorbance.

Y : Valeur de concentration.

\bar{X} : Moyenne d'absorbance.

\bar{Y} : Moyenne de concentration.

Alors :

$$R^2 = 0.9987.$$

2-La variance

$$Var = \frac{1}{n} \sum (X^2 - \bar{X}^2)$$

$$Var = \frac{1}{6} (1.165626)$$

$$Var = 0.194$$

3- L'écart type

$$\Delta = \sqrt{\text{var}(x)}$$

$$\Delta = \sqrt{0.194} = 0.44$$

4-Moyenne de teneur

On a été calculées pour chaque lecture les dosages. Les dosages sont exprimés en %, on a été déterminées à partir de l'expression :

$$\begin{array}{l} 100\% \longrightarrow C \text{ théorique} \\ T\% \longrightarrow C \text{ réelle} \end{array}$$

$$T\% = \frac{C_{\text{réelle}}}{C_{\text{théorique}}} * 100 \text{ (Tableau 5)}$$

$$\text{Moyenne de teneur} = 84.23\%.$$

5-Le coefficient de variation

$$Cv = \frac{\text{écart type}}{\text{moyenne de teneur}} * 100$$

$$Cv = \frac{0.44}{84.23} * 100$$

$$Cv = 0.52 \%$$

7-La déviation standard

$$S = \sqrt{\frac{1}{n-1} \sum (X - \bar{X})^2}$$

$$S = \sqrt{\frac{1}{5}(3.186 - 0.531)^2}$$

$$S = 1,769.$$

8-La densité

$$\text{densité} = \frac{\text{fiolle (25ml)sirop} - \text{fiolle(25ml)vide}}{\text{fiolle(25ml)eau} - \text{fiolle(25ml)vide}}$$

Alors :

$$\text{Densité} = 1.0095.$$

- Ces résultats indiquent que **la méthode est reproductible** et affectée d'un coefficient de corrélation très satisfaisant ($R^2 = 0.9987$).
- La valeur du coefficient de variation et la variance et la moyenne des teneurs rendent parfaitement compte de la bonne reproductibilité de la méthode.

V-3- Exactitude

Tableau 6. Résultats de mesure d'absorption des 3 séries.

Série 01 (90%)	Série02 (100%)	Série03 (110%)
V= 09 ml	V= 10 ml	V = 11 ml
Absorbance		
0.521	0.568	0.625
0.523	0.569	0.635
0.524	0.567	0.619

- **La droite d'étalonnage :**

Une régression linéaire effectuée sur les absorbances obtenues en fonction des concentrations abouties à une droite d'équation :

$$Y=0.143x-0.001.$$

- Représentation graphique

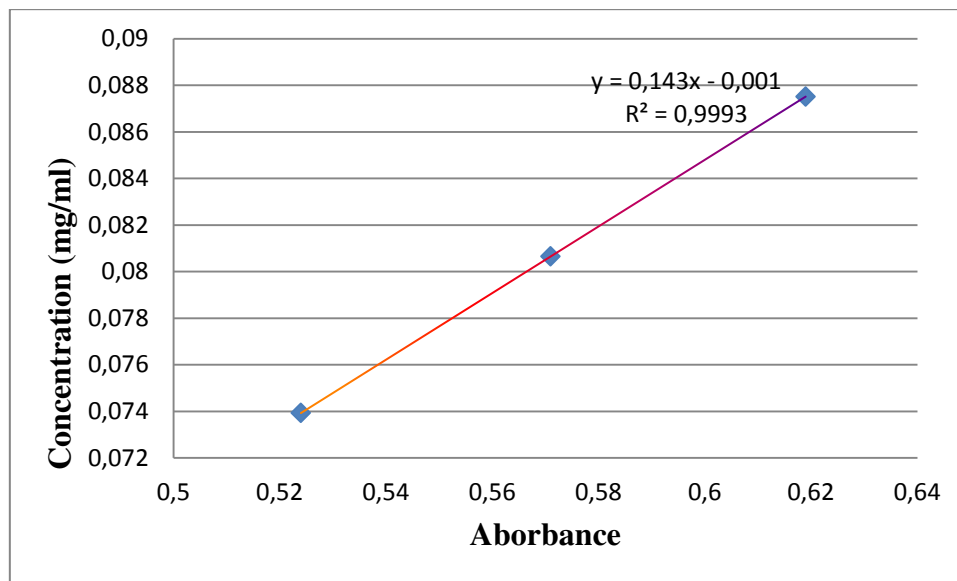


Fig. 14- Droite d'Exactitude.

- Analyse statistique

1-Le coefficient de corrélation (R^2)

$$R^2 = \frac{\overline{XY} - \bar{X} \bar{Y}}{\sqrt{(\overline{X^2} - \bar{X}^2)(\overline{Y^2} - \bar{Y}^2)}}$$

X : Valeur d'absorbance.

Y : Valeur de concentration.

\bar{X} : Moyenne d'absorbance.

\bar{Y} : Moyenne de concentration.

Alors :

$$R^2 = 0.9993.$$

Série 01

2- La moyenne

$$m = \frac{\sum x_i}{n}$$

$$m = \frac{1.568}{3}$$

$$m = 0.52.$$

3-La variance

$$Var = \frac{1}{n} \sum (X^2 - \bar{X}^2)$$

$$Var = \frac{1}{3} (0.549146)$$

$$Var = 0.183.$$

4- L'écart type

$$\Delta = \sqrt{\text{var}(x)}$$

$$\Delta = \sqrt{0.183} = 0.427.$$

5-Moyenne de teneur

On été calculées pour chaque lecture les dosages. Les dosages sont exprimées en %, on été déterminées à partir de l'expression :

$$\begin{array}{l} 100\% \longrightarrow C \text{ théorique} \\ T\% \longrightarrow C \text{ réelle} \end{array}$$

$$T\% = \frac{C_{\text{réelle}}}{C_{\text{théorique}}} * 100$$

Tableau 7. Résultats de calcule de teneur en pourcentage et en masse (série01).

Teneur (%)	Teneur en masse (g)
102,088	0,2042
102,485	0,2050
102,683	0,2054

Moyenne de teneur = 102.41%.

6-Le coefficient de variation

$$Cv = \frac{\text{écart type}}{\text{moyenne de teneur}} * 100$$

$$Cv = \frac{0.427}{102.41} * 100$$

$$Cv = 0.41 \%$$

Série 02

1- La moyenne

$$m = \frac{\sum x_i}{n}$$

$$m = \frac{1.704}{3}$$

$$m = 0.568.$$

2-La variance

$$Var = \frac{1}{n} \sum (X^2 - \bar{X}^2)$$

$$Var = \frac{1}{3} (0.64525)$$

$$Var = 0.215.$$

3- L'écart type

$$\Delta = \sqrt{\text{var}(x)}$$

$$\Delta = \sqrt{0.215} = 0.463.$$

4-Moyenne de teneur

On été calculées pour chaque lecture les dosages. Les dosages sont exprimées en %, on été déterminées à partir de l'expression :

$$\begin{array}{l} 100\% \longrightarrow C \text{ théorique} \\ T\% \longrightarrow C \text{ réelle} \end{array}$$

$$T\% = \frac{C_{\text{réelle}}}{C_{\text{théorique}}} * 100$$

Tableau 8. Résultats de calcule de teneur en pourcentage et en masse (série 02).

Teneur (%)	Teneur en masse (g)
100,280	0,2006
98,671	0,1973
100,816	0,2016

Moyenne de teneur = 99.92%.

5-Le coefficient de variation

$$Cv = \frac{\text{écart type}}{\text{moyenne de teneur}} * 100$$

$$Cv = \frac{0.463}{99.92} * 100$$

$$Cv = 0.46 \%$$

Série 03

1- La moyenne

$$m = \frac{\sum x_i}{n}$$

$$m = \frac{1.879}{3}$$

$$m = 0.62.$$

2-La variance

$$Var = \frac{1}{n} \sum (X^2 - \bar{X}^2)$$

$$Var = \frac{1}{3} (0.7926)$$

$$Var = 0.264.$$

3- L'écart type

$$\Delta = \sqrt{\text{var}(x)}$$

$$\Delta = \sqrt{0.215} = 0.514.$$

4-Moyenne de teneur

On été calculées pour chaque lecture les dosages. Les dosages sont exprimées en %, on été déterminées à partir de l'expression :

$$100\% \longrightarrow C \text{ théorique}$$

$$T\% \longrightarrow C \text{ réelle}$$

$$T\% = \frac{C_{\text{réelle}}}{C_{\text{théorique}}} * 100$$

Tableau 09. Résultats de calcul de teneur en pourcentage et en masse (série 03).

Teneur (%)	Teneur en masse (g)
110,469	0,2209
111,541	0,2231
109,396	0,2188

Moyenne de teneur = 110.46%.

5-Le coefficient de variation

$$Cv = \frac{\text{écart type}}{\text{moyenne de teneur}} * 100$$

$$Cv = \frac{0.514}{110.04} * 100$$

$$Cv = 0.47 \%$$

Tableau 10. Résultats de calcul de la masse prise et la concentration de solution mère et de solution fille (série 01).

Volume Sirop (ml)	Masse Prise (g)	C.S. mère	C fille
9,000	18,000	0,36000	0.07200
9,000	18,000	0,36000	0.07200
9,000	18,000	0,36000	0.07200

C.S.mère : Concentration de la solution mère, C.S. : Concentration de la solution fille.

Tableau 11. Résultats de calcul de la masse prise et la concentration de solution mère et de solution fille (série 02).

Volume Sirop (ml)	Masse Prise (g)	C.S. mère	C fille
10,000	20,000	0,40000	0,08000
10,000	20,000	0,40000	0,08000
10,000	20,000	0,40000	0,08000

Tableau 12. Résultats de calcul de la masse prise et la concentration de solution mère et de solution fille (série 03).

Volume Sirop (ml)	Masse Prise (g)	C.S. mère	C fille
11,000	20,000	0,40000	0,08000
11,000	20,000	0,40000	0,08000
11,000	20,000	0,40000	0,08000

- Ces résultats indiquent que **la méthode est exacte** et affectée d'un coefficient de corrélation très satisfaisant ($R^2 = 0.9993$).
- La valeur du coefficient de variation et la variance et l'écart type et la moyenne des teneurs sont excellents donc la méthode de dosage proposée considérée comme exacte.

V-4- Spécificité

Tableau 13. Résultats de calcul de la concentration réelle et la concentration théorique et les titres en pourcentage et en masse (**Bromhexine seul**).

C réelle	C théorique (mg/ml)	Absorbance	Titre %	Titre en masse
0.079	0.08	0.470	99	198
0.079	0.08	0.472	99	198
0.079	0.08	0.475	99	198

- **Analyse statistique**

On a calculé pour chaque lecture les dosages. Les dosages sont exprimés en %, on a déterminé à partir de l'expression :

$$100\% \longrightarrow C \text{ théorique}$$

$$T\% \longrightarrow C \text{ réelle}$$

$$T\% = \frac{C_{\text{réelle}}}{C_{\text{théorique}}} * 100$$

1-La moyenne

$$m = \frac{\sum x_i}{n}$$

$$m = \frac{1.417}{3} m = 0.47.$$

2-La variance

$$Var = \frac{1}{n} \sum (X^2 - \bar{X}^2)$$

$$Var = \frac{1}{3} (0.448)$$

$$Var = 0.15.$$

3- L'écart type

$$\Delta = \sqrt{\text{var}(x)}$$

$$\Delta = \sqrt{0.15} = 0.386.$$

4-Le coefficient de variation

$$Cv = \frac{\text{écart type}}{\text{moyenne de teneur}} * 100$$

$$Cv = \frac{0.386}{0.99} * 100$$

$$Cv = 0.38 \%$$

5-La déviation standard

$$S = \sqrt{\frac{1}{n-1} \sum (X - \bar{X})^2}$$

$$S = \sqrt{\frac{1}{2} (1.417 - 0.47)^2}$$

$$S = 0.66.$$

Tableau 14. Résultats de calcul de la masse prise et la concentration mère et fille (Bromhexine +excipients).

Volume sirop (ml)	Masse prise (mg)	C sol mère (mg/ml)	C sol fille (mg/ml)
10	0.02	0.4	0.08

C.sol. mère : concentration de la solution mère, C.sol. fille : concentration de la solution fille.

- Ces résultats indiquent que **la méthode est spécifique.**
- Il apparaît qu'aucun excipient du comprimé ou impureté n'interfère sur le dosage du principe actif.

V-5-Précision

Tableau 15. Résultats de calcul de la concentration et l'absorbance.

Absorbance	Concentration (mg/ml)
0.463	0.6
0.468	0.6
0.470	0.6

- **Analyse statistique**

1- La moyenne

$$m = \frac{\sum x_i}{n}$$

$$m = \frac{1.401}{3}$$

$$m = 0.467.$$

2-La variance

$$Var = \frac{1}{n} \sum (X^2 - \bar{X}^2)$$

$$\text{Var} = \frac{1}{3}(0.436)$$

$$\text{Var} = 0.14.$$

3- L'écart type

$$\Delta = \sqrt{\text{var}(x)}$$

$$\Delta = \sqrt{0.14} = 0.381.$$

4-Le coefficient de variation

$$Cv = \frac{\text{écart type}}{\text{moyenne de teneur}} * 100$$

$$Cv = \frac{0.381}{99} * 100$$

$$Cv = 0.385 \%$$

5-La déviation standard

$$S = \sqrt{\frac{1}{n-1} \sum (X - \bar{X})^2}$$

$$S = \sqrt{\frac{1}{2} (1.398 - 0.467)^2}$$

$$S = 0.658.$$

- Ces résultats indiquent que **la méthode est précise.**

Donc la méthode proposée est spécifique, linéaire, exacte, reproductible, précise. La méthode peut, par conséquent, être considérée comme validée.



Conclusion

Le dosage par spectrophotométrie est un dosage très utilisé dans la Pharmacopée et généralement dans l'industrie Pharmaceutique. C'est une méthode utilisée pour déterminer la concentration d'une espèce chimique en solution par la mesure de l'intensité d'absorption ou d'émission (spectrophotométrie) d'un rayonnement électromagnétique par les espèces à doser (Bromhénine chlorhydrate).

La validation d'une méthode analytique peut être définie comme une démarche scientifique critique visant à s'assurer de sa qualité en termes de validité. L'objectif de la validation n'est pas de comparer une méthode à une autre préexistante mais de mieux connaître et évaluer ses caractéristiques et ses capacités. On conçoit que le but de la validation d'une méthode d'analyse est de démontrer qu'elle correspond à l'usage pour lequel elle est prévue par un ensemble d'opérations nécessaires pour prouver que le protocole est suffisamment exacte et fiable et ce afin d'avoir confiance dans les résultats fournis. Cette démarche constitue une étape importante pour mieux connaître les caractéristiques d'un médicament.

Dans le présent travail, on s'est intéressé à l'analyse et à la validation d'une méthode de dosage spectrale d'un médicament appelé Bromhénine chlorhydrate.

Les critères de la validation étudiés sont :

- **La précision.**
- **La linéarité.**
- **La reproductibilité.**
- **La spécificité.**
- **L'exactitude.**

Une étude statistique a été nécessaire afin de valider la méthode de dosage du Bromhexine. Ainsi, nous avons pu montrer que la méthode de dosage adoptée est spécifique, exacte, précise et linéaire et reproductible. Les coefficients de corrélation sont respectivement 0.9939 et 0.9993. Cette méthode validée est appliquée pour le dosage d'une forme pharmaceutique le «Bromhexine » avec un excellent taux de recouvrement.



Références bibliographique

Références bibliographique

Afnor, 1998. Validation des procédures analytiques quantitatives. Harmonisation des démarches. STP Pharma Pratiques 2003 ; 13 : 101-38.

Aiache et al, 1995. Préparation et administration des médicaments à risques pour le personnel et l'environnement 2011 ; 11 : 101-38.

Albert, 2006. Guidelines for Evaluating and expressing the Uncertainty of NIST Measurement Results, NIST Technical Note 1297, 1-20

ANSM 2000. Agence nationale du médicament et des produits de santé.

Art L5111-1. Article- Code de la santé publique.

Autrans, 2010. Bioanalytical Method Validation, US Department of Health and Human Services, Food and Drug Administration, Center for Drug Evaluation and Research (CDER), Center for Biologics Evaluation and Research (CBER), Rockville, MD, USA, May 2001.

Baixas-Noguères, 1987. Développement et validation de méthodes de dosage des différents constituants, Université de Liège, 1987 – 1999.

Berberan-Santos M.N.1990. Beer's Law Revisited – J. Chem. Ed ; 67 :757-759.

Boulanger, 2003. Exactitude (justesse et fidélité) des résultats et méthodes de mesure. Partie 4 : Méthodes de base pour la détermination de la justesse d'une méthode de mesure normalisée.

Brors, 1990. Recommendations for the bioanalytical method validation of ligand-binding assays to support pharmacokinetic assessments of macromolecules. Pharm. Res. 1990 ; 20 : 1885-900.

Buhrman, 1996. Validation des méthodes chimiques pour les suppléments alimentaires et les botaniques. AOAC, Méthodes officielles d'analyse, vol. 1, Association of Official Analytical Chemists (AOAC), Arlington, 1996 ; 673-674.

Causón, 2003. Harmonisation des stratégies de validation des procédures analytiques quantitatives Une proposition SFSTP Partie III, Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis 2003 ; 45 : 82-96.

Dams, 2003. Validation de la méthode dans toutes les disciplines - Analyse critique des principaux critères de validation et des protocoles expérimentaux associés, J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci.

Desilva, 2003. Validation dans l'analyse pharmaceutique. Partie I: une approche intégrée, J. Pharm. Biomed. Anal 2001 ; 24, 755-67.

Duarte, 2005. Protocole d'évaluation d'une méthode alternative d'analyse physico-chimique quantitative par rapport à une méthode de référence.

Etienne M, 2005. Analyse critique de plusieurs stratégies de validation de méthodes analytiques dans le cadre du concept d'ajustement pour but, Journal of Chromatography A, 2010 ; 20 : 3180-3192.

Feinberg, 2009. La validation des méthodes d'analyse. Le cahier des Techniques de l'Inra, 44, 19-49.

Findlay, 2000. Guide de validation des méthodes d'analyse; Lavoisier Editions Tec & Doc 2000.

Gabriel Moreau, 2006. Méthodes spectrométriques d'analyse et de caractérisation, spectrométrie d'absorption atomique. Axe "Génie des Procédés", Centre SPIN, Ecole des Mines de Saint-Etienne.

Goupy, 1996. Étalonnage en chimie analytique et utilisation de matériaux de référence certifiés.

Gwenola Burgot, 2006. Techniques d'analyse et de contrôle dans les industries agroalimentaires 1993 ; 24 :12 :56-80.

Hamel, 1998. Application de la précision statistique (exactitude et précision) des résultats et méthodes de mesure - Parties 1 à 6, Organisation internationale de normalisation (ISO), ISO 5725, ISO, Genève, Suisse, 1998.

Hartmann, 1999. Approche globale et harmonisée de la validation. Spectra Analyse, 249, avril-mai 2006, 16-23.

Héloïse Gay & Gabriel Moreau. Spectrométrie d'absorption, Problèmes généraux. Masson, Paris, 1979 ; 696 : 2-225.

Iglesias, 1990. Analyse des récents documents réglementaires pharmaceutiques sur la validation de la méthode analytique, Journal of Chromatography A, 2007, 111-125.

Jemal, 2003. Méthodes instrumentales d'analyse chimique et applications: procédés chromatographiques, électrophorèses, méthodes spectrales et méthodes thermiques, édition Tec, Paris: 3e édition, 2011.

John Wiley & Sons, 2004. Application de la précision statistique (exactitude et précision) des résultats et méthodes de mesure - Parties 1 à 6, Organisation internationale de normalisation (ISO), ISO 5725, ISO, Genève, Suisse, 2004.

Louis Burgot, 2006. Méthodes analytiques pour la spectroscopie d'absorption atomique. États-Unis d'Amérique 1996 ; 17 :100.

Mariné-Foat, 2001. Une approche pratique de la validation de la méthode dans l'analyse pharmaceutique. J Pharm. Biomed Anal. 1990 ; 86 : 613-618.

Marini, 2005. Mise en œuvre du profil d'exactitude in Validation des méthodes d'analyse quantitative par le profil d'exactitude. Le Cahier des Techniques de l'Inra, numéro spécial, 27-44.

Monique Mayor, 2003. Harmonisation des stratégies pour la validation des procédures analytiques quantitatives Une proposition du SFSTP - Partie III, Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis 2003 ; 45 : 82-96.

Moulin et Coqurel, 2002. Le droit du médicament: évolutions récentes. Revue de droit sanitaire et social 2002; 4 :579-603.

Nijhuis, 1999. Développement d'une nouvelle méthode de dosage par spectrométrie UV: l'analyse multi composant, de pharmacie, Bordeaux, 2004.

Rozet, 2008. Le rôle et la place de la validation dans la vie d'une méthode d'analyse 2008 ; 45 : 70-86.

Ruiz-Capillas, 1999. Développement d'une méthode d'analyse quantitative par proche infrarouge d'un principe actif dans un mélange de poudres, thèse de pharmacie, Bordeaux, 2009.

Shabir, 2003. Comparaison de diverses directives internationales pour la validation de la méthode analytique Pharmacie 2003 ; 24 : 4-14.

Shah, 1996. Approche globale et harmonisée de la validation, Spectra analysis 1996 ; 12 :50-112.

Thanh X. Bui, 1990. Validation des procédures analytiques: texte et méthodologie, Genève, Suisse, 1990.

Thiam M, 2000. Le dosage par spectroscopie proche infrarouge: application au test de l'uniformité de teneur des comprimés - méthodologie, STP Pharma Pratiques 2000 ; 05 :1-20.

Vidal-Carou, 2001. Limite de détection et de quantification. Validation de la méthode dans l'analyse des produits pharmaceutiques. Une Guide de bonnes pratiques; Wiley-VCH: Weinheim, 2005.

Yeung, 1992. Guide de validation analytique. Rapport d'une commission SFSTP. I: Méthodologie, STP Pharma Pratiques 1992 ; 2 : 205-226 .