

RÉPUBLIQUE ALGÉRIENNE DÉMOCRATIQUE ET POPULAIRE.  
MINISTÈRE DE L'ENSEIGNEMENT SUPÉRIEUR  
ET DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE  
UNIVERSITÉ SAAD DAHLAB - BLIDA 1 -



FACULTÉ DE MÉDECINE.  
DÉPARTEMENT DE PHARMACIE.

Thèse d'exercice de fin d'études

Présentée en vue de l'obtention du Diplôme de Docteur en Pharmacie

Session : SEPTEBRE 2017

**Validation analytique par profil d'exactitude de la spectrométrie UV pour le dosage des Chlorhydrates de Cyproheptadine par comparaison à la titration.**

**Présentée par :**

**Missoum Ibtissem & Moussaoui Aicha**

**Devant le jury :**

- Président : Pr. GHARBI A Maitre de conférences en chimie analytique
- Examineur : Dr. IMOUDACHE H Maitre-assistant en chimie minérale
- Examinatrice : Dr. GUERFI B Maitre-assistante en chimie thérapeutique
- Promoteur : Dr. BOUNAB A Maitre-assistant en chimie minérale.

**Année universitaire : 2016-2017**



*Au nom d'Allah*

*Le Clément*

*Le Miséricordieux*



# Table des matières

Remerciements .....	VII
Dédicaces.....	VIII
Dédicaces.....	IX
Liste des abréviations : .....	X
Liste des figures : .....	XIII
Liste des tableaux : .....	XIV
Introduction : .....	1
<b>PARTIE THEORIQUE</b> .....	<b>2</b>
<b>I. Dosage acido-basique</b> : .....	<b>3</b>
<b>I.1. Méthode titrimétriques</b> : .....	<b>3</b>
I.1.1. Principe général des méthodes titrimétrique : .....	3
I.1.2. Quelques définitions : .....	3
I.1.3. Préparation des solutions étalons : .....	5
<b>I.2. Méthodes potentiométriques</b> : .....	<b>5</b>
I.2.1. Principe général des méthodes potentiométriques : .....	5
I.2.2. Cellules électrochimiques : .....	5
I.2.3. Potentiel de membrane : .....	6
I.2.4. Electrode de verre indicatrice de pH : .....	7
<b>II. Spectrométrie UV-Visible</b> .....	<b>8</b>
II.1. Généralité sur les méthodes spectrales : .....	8
II.2. Spectrométrie d'absorption de l'ultraviolet et du visible : .....	9
II.3. Applications et avantages : .....	9
II.4. Le domaine spectral UV-Visible : .....	10
II.5. Le spectre UV-Visible : .....	10
II.6. Appareillage : .....	10
II.7. Analyse quantitative : loi de l'absorption moléculaire : .....	11
II.7.1. Loi de Lambert-Beer : .....	11
II.7.2. Validation de la loi de Beer-Lambert : .....	13
II.7.3. Additivité des absorbances : .....	13

II.7.4.	Ecart à la loi de Beer :	15
III.	Etude de la Cyproheptadine :	16
III.1.	Définition :	16
III.2.	Caractères :	16
III.3.	Propriétés :	16
III.4.	Indications :	16
III.5.	Contre-indications :	17
III.6.	Pharmacodynamie :	17
III.7.	Pharmacocinétique :	17
III.8.	Interactions :	18
III.8.1.	Associations déconseillées :	18
III.8.2.	Associations à prendre en compte :	18
III.9.	Fertilité/ grossesse/ allaitement :	18
III.9.1.	Grossesse :	18
	Compte-tenu de sa composante antisérotonine :	19
III.9.2.	Allaitement :	19
III.10.	Conduite et utilisation de machines :	19
III.11.	Effets indésirables :	19
III.11.1.	Affections de la peau et du tissu sous cutané :	19
III.11.2.	Affection du système immunitaire :	19
III.11.3.	Affections du système nerveux :	19
III.11.4.	Affections hématologiques et du système lymphatique :	20
III.11.5.	Affections psychiatrique :	20
III.11.6.	Troubles du métabolisme et de la nutrition :	20
III.12.	Surdosage :	20
IV.	Généralités sur les méthodes analytiques :	21
IV.1.	Définition d'une méthode analytique :	21
IV.2.	Étapes de la mise en œuvre d'une procédure analytique :	22
V.	Validation analytique : application de la procédure SFSTP 2003-2006.....	23
V.1.	Introduction :	23
V.2.	Principe :	23
V.3.	Critères généraux de la validation:	24
V.3.1.	Spécificité/ sélectivité :	24
V.3.2.	Linéarité des résultats d'analyse :	24

V.3.3.	Justesse (biais) : .....	24
V.3.4.	Fidélité : .....	24
V.3.5.	Erreur systématique : .....	24
V.3.6.	Erreur aléatoire : .....	25
V.3.7.	Exactitude : .....	25
V.3.8.	Sensibilité : .....	25
V.4.	Rappels statistiques : .....	25
V.4.1.	La moyenne : .....	25
V.4.2.	Ecart type : .....	25
V.4.3.	Variance : .....	26
V.4.4.	Coefficient de variation : .....	26
V.4.5.	MSM : .....	26
V.4.6.	MSE : .....	26
V.5.	Les différentes approches de la validation analytique : .....	27
V.5.1.	L'approche classique : .....	27
V.5.2.	Approche de différence : .....	28
V.5.3.	Approche de validation par profil d'exactitude : .....	28
PARTIE PRATIQUE .....		30
Problématique : .....		31
Le lieu de l'étude : .....		31
Domaine de validation : .....		31
Plans d'expérience : .....		31
Appareillage : .....		31
I.	Dosage potentiométrique du chlorhydrate de Cyprohéptadine : .....	32
I.1.	Introduction : .....	32
I.2.	Appareillage et verrerie : .....	33
Les appareils et la verrerie utilisés dans cette méthode sont : .....		33
I.3.	Les réactifs : .....	33
Les réactifs utilisés sont : .....		33
I.4.	Préparation d'un litre de solution de NaOH 0.1M : .....	33
Selon la pharmacopée européenne Tom 1: .....		33
I.4.1.	Application : .....	33
I.4.2.	Mode opératoire: .....	33
I.5.	Détermination du titre du NaOH : .....	34

I.5.1.	Application :.....	34
I.6.	Dosage potentiométrique de chlorhydrate de Cyprohéptadine :.....	36
I.6.1.	Principe :.....	36
I.6.2.	Mode opératoire :.....	36
	Nous avons :.....	36
I.6.3.	Application :.....	37
II.	Dosage spectrophotométrique du chlorhydrate de Cyprohéptadine :.....	42
II.1.	Introduction :.....	42
II.2.	Principe :.....	42
II.3.	Mode opératoire :.....	42
II.4.	Appareillage :.....	42
II.5.	Réactifs :.....	43
II.6.	Résultats :.....	43
II.7.	Calcul de la pureté :.....	44
DISCUSSION	.....	45
I-	Détermination de l'exactitude :.....	46
I-1-	Détermination de l'intervalle de tolérance :.....	46
	Les calculs statistiques sont représentés dans le tableau suivant : (Tableau IV).....	46
	Calcul de la moyenne :.....	46
	Calcul de la moyenne générale :.....	47
	Calcul du biais absolu :.....	47
	Calcul du biais relatif :.....	47
	Calcul du recouvrement :.....	47
	Calcul de l'écart-type :.....	47
	Calcul de l'écart-type général :.....	48
	Calcul de la variance :.....	48
	Calcul de la variance générale :.....	48
	Calcul de la variance fidélité :.....	48
	Calcul de la variance répétabilité :.....	49
	Calcul du coefficient de variation :.....	49
	Calcul du coefficient de variation fidélité :.....	49
	Calcul du coefficient de variation répétabilité :.....	50
	Calcul de <b>Rj</b> :.....	50
	Calcul de <b>Bj</b> :.....	50

Calcul de Q :.....	50
Calcul du degré de liberté $v$ :.....	50
Calcul de $k$ :.....	51
Calcul de la limite inférieure $Li$ : .....	51
Calcul de la limite supérieure $Ls$ :.....	51
Intervalle de tolérance : .....	51
Conclusion :.....	53
Bibliographie.....	55
Annexe.....	57

## *Remerciements*

Nous tenon à remercier d'abord **Allah** le tout puissant de nous avoir donné le pouvoir et la patience pour réaliser ce modeste travail.

Notre profonde reconnaissance à **Pr. Gharbi A** le président du jury, **Dr. Imoudache H** et **Dr. Guerfi B** les examinateurs ; pour avoir bien accepté d'évaluer notre travail.

Nous adressons nos remerciements à notre promoteur **Dr. Bounab A**.

Nous remercions également **Mme Souleimane Z** ; la technicienne du laboratoire de chimie analytique du département de pharmacie pour son aide et sa gentillesse ; **Dr. Bouchachia H** ; résident en chimie analytique pour son aide précieux et **Dr. Lattreuche R** ; résidente en chimie thérapeutique pour son assistance.

Nos vifs remerciements à nos enseignants qui nous ont transmis leur savoir et leur expérience durant notre cursus universitaire.

Nous remercions tous ceux qui ; de près ou de loin ; ont contribué par leurs conseils, leurs encouragements et leurs amitiés à l'édification de ce travail.



# Dédicaces

**Du profond du cœur je dédie ce travail,**

**A tous ceux qui me sont chers**

**A mes chers parents,**

En témoignage de leur affection, leurs sacrifices et de leurs précieux conseils qui m'ont conduit à la réussite dans tous ce que je fais ;

**A mon frère Abderrahmane et mes sœurs Fadhila, Yasmine et Israa,**

Je leur souhaitant tout le succès...tout le bonheur ;

**A mon binôme Ibtissem,**

Pour tout ce qu'elle a fait pour la réussite de ce travail ;

**A tous mes proches,**

A mes amies, **Hiba, Sabrina, Khaoula et Meriem,**

A tous ceux qui m'ont aidé afin de réaliser ce travail,

Et à tous ceux que j'aime et qui m'aiment.

*Moussaoui Aïcha*

# Dédicaces

**C'est avec grand amour et immense joie que je dédie ce travail à :**

**Mes chers parents,**

qui ont cru en moi et qui m'ont soutenu tout au long de mon cursus,

**A ma sœur Manel et mon frère Abderrahmane,**

qui m'ont aidé ; avec leur bonne humeur à surmonter toutes les difficultés,

**A mes amies,**

Aicha, Khaoula, Soumia, Sabrine, Meriem et Sabrina avec lesquelles j'ai vécu d'agréables moments de joie pendant les six dernières années,

**A tous les miens.**

*Missoum Ftissem*

## Liste des abréviations :

**%** : Pour cent.

**±** : Plus ou moins.

**<** : Inferieur.

**$\lambda$**  : Longueur d'onde.

**$\Sigma$**  : Somme.

**5HT<sub>2</sub>** : Récepteur sérotoninergique.

**a<sub>i</sub>** : Activité de l'ion analysé.

**a<sub>1</sub>** : L'activité de l'analyte en solution

**a<sub>2</sub>** : L'activité de la solution interne.

**BPF** : Bonnes Pratiques de Fabrication.

**CV<sub>fi</sub>** : Coefficient de variation de fidélité.

**CV<sub>r</sub>** : Coefficient de variation de reproductibilité.

**c** : Concentration.

**C** : Concentration.

**CV** : Coefficient de variation.

**D** : Dermatologie.

**ddp** : Différence de potentiel.

**dx** : Epaisseur.

**E<sub>cellule</sub>** : Potentiel de la cellule chimique.

**E<sub>asy</sub>** : Potentiel d'asymétrie, de valeur faible, d'origine mécanique, varie lentement au cours du temps.

**E<sub>int</sub>**: Potentiel de l'électrode de référence interne.

**E<sub>1</sub>**: Le potentiel qui se développe à l'interface entre l'extérieur du verre et la solution d'analyte.

**E<sub>2</sub>** : Le potentiel qui se développe à l'interface entre la solution interne et l'intérieur du verre.

**E`** : Potentiel standard de la chaine de mesure.

**EIS** : Electrode ionique sélective.

**EMEA** : agence européenne des médicaments.

**ERE** : Electrode de référence extérieure.

**ERI** : Electrode de référence interne.

**F** : Constante de Faraday.

**FDA** : Agence américaine des produits alimentaires et médicamenteux, « Food and Drug Administration ».

**GMP** : Bonnes Pratiques de Fabrication, « Good Manufacturing Practices ».

**HCl** : Acide chlorhydrique.

**H<sub>1</sub>** : Récepteur histaminique.

**H<sub>2</sub>O** : Molécule d'eau.

**I<sub>0</sub>** : Intensité incidente.

**I** : Intensité lumineuse transmise.

**ICH** : Conseil International pour l'Harmonisation des exigences techniques pour les produits pharmaceutiques à usage humain, « the International Council for Harmonisation of technical requirements for pharmaceuticals for human use ».

**IR** : Infrarouge.

**ISO** : Organisation Internationale de Normalisation, « International Organization for Standardization ».

**l** : Longueur de la cuve.

**Log** : Logarithme.

**LA<sub>i</sub>** : Limite d'acceptabilité inférieure.

**LA<sub>s</sub>** : Limite d'acceptabilité supérieure.

**LT<sub>i</sub>** : Limite de tolérance inférieure.

**LT<sub>s</sub>** : Limite de tolérance supérieure.

**L<sub>i</sub>** : Limite inférieure.

**L<sub>s</sub>** : Limite supérieure.

**M** : Moyenne.

**ml** : Millilitre.

**Nm** : Nanomètre.

**Par.ex** : Par exemple.

**pH** : Potentiel d'hydrogène.

**R** : Constante des gaz parfaits.

**R** : Système respiratoire.

**S** : Ecart-type.

**SFSTP** : Société Française des Sciences et Techniques Pharmaceutiques.

**S<sup>2</sup>** : Variance.

**T** : Transmittance.

**UV** : Ultra violet.

**V (ddl)** : Degré de liberté.

**VAR<sub>fi</sub>** : Variance fidélité.

**VAR<sub>r</sub>** : Variance de reproductibilité.

**W** : Watt.

**z** : Charge de l'ion analysé.

## Liste des figures :

<b><u>Figure 1</u></b> : Observation de la zone de virage de quelques indicateurs coloré .....	5
<b><u>Figure 2</u></b> : Schéma de principe du spectrophotomètre UV-visible .....	6
<b><u>Figure 3</u></b> : Point isobestique .....	14
<b><u>Figure 4</u></b> : Formule plane de la Cyprohéptadine .....	16
<b><u>Figure 5</u></b> : Cycle de vie d'une procédure analytique.....	22
<b><u>Figure 6</u></b> : Profil d'exactitude comme outil de décision pour quatre méthodes M1(fidèle et juste) ; M2(fidèle mais non juste) ; M3(non fidèle et non juste) et M4(non fidèle mais juste).....	28
<b><u>Figure 7</u></b> : Réaction chimique de la Cyprohéptadine avec l'hydroxyde de sodium .....	32
<b><u>Figure25</u></b> : Profil d'exactitude réalisé pour une limite d'acceptabilité à $\pm 2\%$ pour un seul niveau de concentration .....	52

## **Liste des tableaux :**

<b>Tableau I : Résultats de l'étalonnage du NaOH .....</b>	<b>36</b>
<b>Tableau II : Résultats du titrage acido-basique de la Cyproheptadine .....</b>	<b>41</b>
<b>Tableau III : Résultats des essais de spectrométrie UV-visible .....</b>	<b>43</b>
<b>Tableau IV : Tableau des statistiques .....</b>	<b>46</b>

## **Introduction :**

Le contrôle de qualité des médicaments fait partie intégrante des bonnes pratiques de fabrication (BPF). Il inclue la vérification de l'identité ; de la pureté et de la teneur ceci grâce à des méthodes d'analyse dont la validité et la fiabilité ont été préalablement démontrées.

L'objectif d'une méthode d'analyse quantitative est de quantifier l'analyte présent dans l'échantillon avec une exactitude connue et acceptable. La validation de ces méthodes est actuellement effectuée selon l'approche classique qui consiste à définir des critères de validation ; principalement la fidélité et la justesse, ces critères sont estimés et confrontés aux limites fixées ou imposées [1]. Cependant ; au lieu d'estimer ces critères il est possible d'évaluer l'exactitude par une nouvelle approche ; dite validation par profil d'exactitude ; basée sur l'estimation d'un intervalle dit de tolérance dans lequel se situe la moyenne des résultats d'un dosage et de vérifier qu'il ne sorte pas des limites d'acceptation fixées. Ceci est représenté schématiquement par le profil d'exactitude qui est l'outil de décision de la validation. Cette approche de validation par profil d'exactitude a été proposée par la SFSTP[2].

Le but de ce travail est de valider par profil d'exactitude une méthode de dosage des Chlorhydrates de Cyproheptadine par spectrométrie UV par comparaison à la titration.

Notre travail se divise en deux volets :

Le premier comporte une recherche bibliographique sur la validation analytique, le titrage acido-basique, la spectrométrie UV et les Chlorhydrates de Cyproheptadine.

Le deuxième volet est consacré à une étude expérimentale où on déterminera l'intervalle de tolérance pour valider la méthode de dosage par spectrométrie UV pour le dosage des Chlorhydrates de Cyproheptadine par comparaison à la titration.



# **PARTIE THEORIQUE**

## ***PARTIE THEORIQUE***

### **I. Dosage acido-basique :**

#### **I.1. Méthode titrimétriques :**

##### **I.1.1. Principe général des méthodes titrimétrique :**

Les méthodes titrimétriques reposent sur la détermination quantitative du nombre de moles d'une substance en effectuant une réaction complète avec une solution de concentration connue, pour cela il faut disposer d'un indicateur coloré marquant le point de fin du dosage.

On distingue :

Les titrages volumétriques : dont la potentiométrie, la conductimétrie, la pH-métrie [3]. On mesure le volume du réactif étalon ;

Les titrages gravimétriques : on mesure la masse du réactif étalon ;

Les titrages coulométrique : on mesure la charge nécessaire pour mener à terme la réaction avec l'analyte. [4]

##### **I.1.2. Quelques définitions :**

###### **a) Analyse volumétrique :**

Mesure du volume nécessaire d'une solution de concentration connue pour mener à terme sa réaction avec l'analyte.

###### **b) Titrage :**

Un titrage s'effectue en ajoutant lentement une solution étalon à un analyte jusqu'à mener à terme une analyse volumétrique.

###### **c) Solution étalon :**

Une solution étalon est une solution de concentration connue utilisée en analyse titrimétrique.

###### **d) Acide :**

Un acide est une substance capable de céder un ou plusieurs protons.

## ***PARTIE THEORIQUE***

### **e) Base :**

Une base est une substance capable d'accepter un ou plusieurs protons [5].

### **f) La stœchiométrie :**

Au cours d'une réaction chimique, « Rien ne se perd, rien ne se crée » (Lavoisier), il y a conservation de la masse totale du système et conservation des atomes. Les échanges d'électron se font de telle sorte qu'à la fin de la réaction ; le nombre de particules chargées ; protons (+) et électron (-) soit le même qu'au début de la réaction, ainsi, les charges sont conservées. [4]

### **g) Notion de pH :**

La valeur du pH (p : potentiel, H : hydrogene[Soërensen, 1909] d'une solution représente sa concentration en ions hydronium [ $H_3O^+$ ].

$$\text{pH} = -\log [H_3O^+]. [6]$$

Cette grandeur est une mesure de l'activité protonique d'une solution, c'est-à-dire de son acidité directe [7].

### **h) Point d'équivalent :**

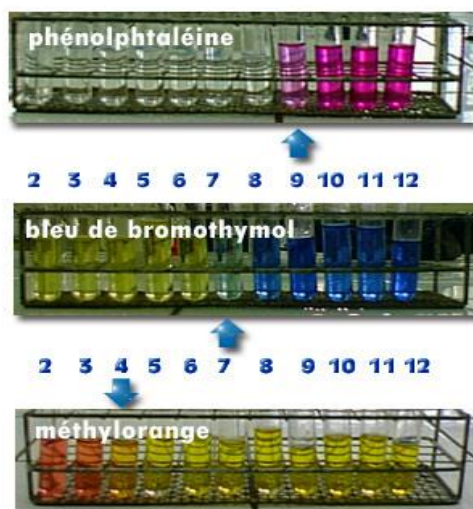
Le point de fin de titrage est le point où il y a une modification physique correspondante au point d'équivalence chimique.

### **i) Indicateur coloré :**

Les indicateurs colorés sont des acides faibles ou des bases faibles dont la coloration dépend de la valeur de pH du milieu [7]. (Figure 1).

## ***PARTIE THEORIQUE***

**Figure 1 : Observation de la zone de virage de quelques indicateurs colorés.[8]**



### **I.1.3. Préparation des solutions étalons :**

On prépare une solution de molarité donnée d'un réactif en dissolvant la pesée correspondante à la concentration désirée dans un volume connu d'un solvant approprié. Le réactif doit être à l'état pur.

## **I.2. Méthodes potentiométriques :**

### **I.2.1. Principe général des méthodes potentiométriques :**

Les méthodes potentiométriques sont des méthodes électrochimiques permettant d'effectuer des mesures quantitatives d'échantillons. Ces méthodes sont basées sur la mesure de la différence de potentiel entre deux électrodes plongées dans la solution à analyser.

L'ajout progressif de la solution étalon provoque le changement de la concentration d'analyte, ce changement se traduit par le changement de potentiel, détecté par les électrodes.

Les instruments utilisés vont du pH mètre au titrimètre automatique [9].

### **I.2.2. Cellules électrochimiques :**

La cellule électrochimique est constituée de deux électrodes plongées dans une solution conductrice [9]. Chaque électrode est entourée d'une solution d'électrolytes différente de celle

## ***PARTIE THEORIQUE***

de l'autre électrode, à fin d'éviter que ces solutions se mélangent, elles sont séparées par une jonction électrolytique [6].

On distingue :

- L'électrode de référence extérieure (ERE) : elle constitue une demi-cellule électrochimique de référence, son potentiel est constant par rapport à la solution à analyser.
- L'électrode ionique sélective (EIS) : Constituée d'une électrode de référence interne (ERI) plongée dans une solution de l'analyte et servant de référence. Une membrane perméable à l'analyte seulement sépare l'électrode de l'échantillon. Cette électrode est également appelée " électrode de travail" [9].

La chaîne de mesure est constituée ainsi :

Electrode sélective / membrane / solution échantillon / Jonction liquide / Electrode de référence externe.

### **I.2.3. Potentiel de membrane :**

L'électrode de référence interne et la paroi interne de la membrane de l'électrode sélective sont constituées de telle manière que la différence de potentiel (ddp) entre elles soit constante. En revanche, la différence de potentiel entre la paroi externe de la membrane et la solution échantillon dépend de l'activité de l'analyte. Ce qui peut être introduit par la relation suivante :

$$E_{memb} = 2,303 \frac{RT}{zF} \log \frac{a_{i.solution}}{a_{i.reference}} \quad (1)$$

L'activité de la solution de référence ne varie pas au cours de la réaction, donc :

$$E_{Cellule} = E' + 2.303 \frac{RT}{zF} a_{i.solution} \quad (2)$$

$E_{Cellule}$  : Potentiel de la cellule chimique.

$E'$  : Potentiel standard de la chaîne de mesure

R : constante des gaz parfaits

T : la température

F : la constante de Faraday

z : la charge de l'ion i analysé

$a_i$  : Activité de l'ion analysé.[9]

## ***PARTIE THEORIQUE***

### **1.2.4. Electrode de verre indicatrice de pH :**

Elle est constituée d'une électrode de référence au calomel saturé et d'une électrode indicatrice de verre elle-même constituée d'une membrane de verre mince sensible aux ions  $H^+$  ; ces électrodes sont plongées dans des solutions de pH inconnu. Une deuxième électrode de référence argent-chlorure d'argent est plongée dans un volume d'acide chlorhydrique dilué saturé en chlorures d'argent à l'intérieur d'un tube en verre à paroi épaisse. Les potentiels des deux électrodes de référence sont constants.

Le potentiel de membrane varie selon le pH de la solution d'analyte. Il représente la différence entre les deux potentiels  $E_1$  et  $E_2$  qui se développent de part et d'autre de la membrane. Ce qui peut être exprimé par la relation suivante :

$$E_m = E_1 - E_2 = 0.0592 \log \frac{a_1}{a_2} \quad (3)$$

D'où

$$E_m = 0.0592 \log a_1 - 0.0592 \log a_2 \quad (4)$$

Avec:  $E_1$ : le potentiel qui se développe à l'interface entre l'extérieur du verre et la solution d'analyte

$E_2$  : Le potentiel qui se développe à l'interface entre la solution interne et l'intérieur du verre

$a_1$  : L'activité de l'analyte en solution

$a_2$  : L'activité de la solution interne.

Le potentiel d'une électrode indicatrice de verre est exprimé ainsi :

$$E_{ind} = E_m + E_{int} + E_{asy} \quad (5)$$

Avec :  $E_{int}$ : potentiel de l'électrode de référence interne ;

$E_{asy}$  : Potentiel d'asymétrie, de valeur faible, d'origine mécanique, varie lentement au cours du temps.

De (4) et (5) :  $E_{ind} = 0.0592 \log a_1 - 0.0592 \log a_2 + E_{int} + E_{asy}$

D'où :  $E_{ind} = 0.0592 \log a_1 + L = L - 0.0592 \text{ pH}$

Avec L la somme des valeurs constantes.

## II. Spectrométrie UV-Visible

### II.1. Généralité sur les méthodes spectrales :

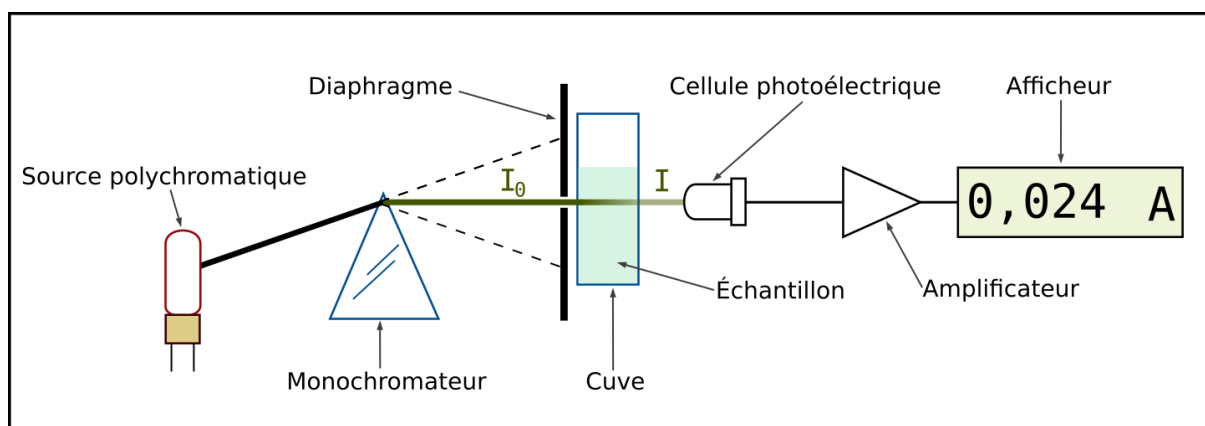
La spectroscopie est une méthode rapide, elle ne demande que peu de substances mais exige une instrumentation perfectionnée à savoir :

- Une source d'énergie ;
- Un monochromateur ;
- Un système de détection.

Selon la nature de la source d'énergie et du système de détection, on distingue :

- La spectroscopie : excitation par la chaleur (flamme) avec détection visuelle ;
- La spectrographie : excitation par la lumière ou la chaleur et détection par enregistrement sur une plaque photographique ;
- Les spectrométries :
  - La colorimétrie : avec excitation par la lumière et détection visuelle ;
  - La photométrie : avec excitation par la lumière et sélection d'un domaine du spectre à l'aide d'un filtre et utilisation d'un détecteur (cellule photoélectrique) ;
  - La spectrophotométrie : avec excitation par la lumière et sélection d'une longueur d'onde à l'aide d'un monochromateur et utilisation d'un détecteur (cellule photoélectrique). (Figure 2).

Figure 2: Schéma de principe du spectrophotomètre UV-visible.[10]



Pour les molécules : on a la spectrophotométrie UV, la colorimétrie, la néphélométrie et la spectrofluorimétrie ;

Et pour les atomes : on a l'absorption et l'émission atomiques.

## ***PARTIE THEORIQUE***

La spectroscopie moléculaire dans l'ultraviolet, le visible et l'infrarouge est la plus utilisée pour l'identification et le dosage de plusieurs espèces organiques et inorganiques [6].

### **II.2. Spectrométrie d'absorption de l'ultraviolet et du visible :**

La spectrométrie UV-Visible est la plus ancienne des méthodes et permet outre des applications quantitatives de mettre en évidence la présence de certains groupements chromophores (double liaison). Pour élucider des structures, la résonance magnétique nucléaire et la spectrophotométrie IR fournissent les meilleures informations. Dans ce cas, la spectrométrie UV-Visible apporte peu d'informations structurales, mais elle a beaucoup d'application en analyse quantitative (lorsqu'on choisit une longueur d'onde (où l'espèce absorbe le plus) et d'après la mesure de l'absorption on en déduit la concentration de la substance).

Les deux types de paramètre importants en spectroscopie UV-Visible sont les **longueurs d'onde** et l'intensité de leur absorption mesurée le plus souvent par la valeur de leurs coefficients d'extinction molaires  $\epsilon$  [11].

### **II.3. Applications et avantages :**

On n'utilisait guère l'absorptiométrie pour le dosage des traces car la précision était médiocre. Actuellement, les perfectionnements apportés aux appareils permettent d'atteindre parfois une précision comparable ou meilleure que celle des méthodes volumétriques courantes. Aussi l'absorptiométrie a pris une importance plus grande que la volumétrie. C'est aujourd'hui la méthode de dosage la plus importante en solution. [12]

- Elle est d'un emploi très général. Si le corps à doser est peu absorbant, on a la ressource d'ajouter un réactif convenable qui donne un composé absorbant.
- Elle peut avoir une très grande sensibilité. C'est le plus souvent la méthode de choix pour le dosage des traces.
- Elle peut être extrêmement rapide par suite de son utilisation pour des mesures directes sans addition de solution titrée, et de la facilité de la mesure. De plus, on peut réduire ou éviter les séparations car on dispose pour éliminer l'effet des ions gênants de tous les facteurs utilisables dans la chimie des solutions : choix du réactifs, oxydoréduction, fixation du pH, formation de complexes, utilisation de solvants organiques, et en outre d'un facteur supplémentaire qui est le choix de la longueur d'onde utilisée.

C'est en outre une méthode générale d'analyse des réactions. Elle permet souvent d'une façon spécifique de suivre la concentration des corps au cours des réactions, en fonction du temps si on le désire. Des appareils enregistreurs permettent d'obtenir rapidement tout ou partie du spectre d'absorption.



## ***PARTIE THEORIQUE***

### **II.4. Le domaine spectral UV-Visible :**

Ce domaine spectral est divisé en trois plages de longueurs d'onde appelées *UV* (100-400 nm), *visible* (400-750 nm) et *infrarouge* (750-1 400 nm). La plupart des spectromètres vont de 185 à 900 nm. La limite inférieure des appareils dépend à la fois de la nature des matériaux optiques utilisés et de la présence ou non sur le trajet optique de l'air ambiant, sachant que le dioxygène et la vapeur d'eau absorbent de manière intense en dessous de 190 nm.

### **II.5. Le spectre UV-Visible :**

Les spectromètres UV-Visible permettent d'obtenir le spectre des composés examinés sous la forme d'un tracé de la transmittance, ou de l'absorbance, en fonction des longueurs d'onde repérées en abscisses.

En optique, la transmittance  $T$  est une mesure de l'atténuation d'un faisceau lumineux monochromatique basée sur la comparaison entre l'intensité lumineuse transmise ( $I$ ) et l'intensité incidente ( $I_0$ ) selon que l'échantillon est placé ou non sur le trajet optique entre la source et le détecteur.  $T$  est exprimée par un nombre fractionnaire ou sous forme de pourcentage :

$$T = \frac{I}{I_0} \quad \text{ou} \quad \%T = \frac{I}{I_0} \times 100$$

L'absorbance est la grandeur définie par :  $A = -\log T$

Les spectres des composés pris en phase condensée, purs ou en solution, présentent généralement des bandes d'absorption larges et peu nombreuses. Mais les spectres obtenus à partir d'échantillons à l'état gazeux et sous faible pression font apparaître une «structure fine». Pour les composés dont la composition atomique est particulièrement simple, les transitions fondamentales apparaissent isolément si le spectromètre possède une très grande résolution. Dans ces situations extrêmes, les positions des absorptions sont repérées en  $cm^{-1}$ , unité mieux adaptée que le nm (le calcul montre, par ex., qu'il y a 110  $cm^{-1}$ , entre 300 et 301 nm).

### **II.6. Appareillage :**

Un spectrophotomètre UV-Visible est constitué schématiquement :

- d'une source lumineuse ;
- d'un sélecteur de longueur d'onde ou monochromateur ;
- d'une cellule de mesure ;
- d'un système de mesure de l'intensité lumineuse ou détecteur ;
- d'un dispositif d'affichage et de traitement du signal.

Les matériaux optiques utilisés doivent être transparents aux rayonnements : le verre absorbe les rayonnements de  $\lambda < 380$  nm aussi est-il remplacé par de la silice fondue ou du quartz. [11]

## ***PARTIE THEORIQUE***

Contrairement à l'œil, les cellules photoélectriques permettant de comparer les intensités lumineuses inégales et ceci à des instants différents. En outre leur utilisation n'est pas limitée aux radiations visibles. [12]

C'est seulement avec certains appareils de ce type que l'on peut espérer atteindre une précision de  $\pm 0.1\%$  sur la détermination des concentrations et par conséquent faire de l'absorptiométrie précise.

- ***Cellules photoélectriques*** : les cellules photoélectriques permettent de transformer l'intensité lumineuse en intensité électrique  $I = k_{\lambda}i$  ;  $k$  dépend de la longueur d'onde. Dans les meilleures conditions opératoires, certaines cellules photoémissoives permettent actuellement une reproductibilité à 0.03% près.
- ***Sources lumineuses*** : la source lumineuse est choisie selon les longueurs d'ondes que l'on désire obtenir. De 350 à 1300 nm les lampes à incandescence à filament de tungstène peuvent être employées, la lampe à hydrogène est utile de 180 à 380 nm.
- ***Monochromateurs*** : pour obtenir une bande de longueurs d'ondes étroite, on doit utiliser un système dispersif, prisme ou réseau et prélever à l'aide d'une fente étroite les radiations nécessaires.  
Les appareils commerciaux permettent d'obtenir une bande de longueurs d'ondes de l'ordre de 1 nm.

**Application** : le courant fourni par les cellules photoémissoives, et qui est en principe proportionnel à l'intensité lumineuse, peut être amplifié. On accroît ainsi la sensibilité. Lorsqu'on n'utilise pas une méthode de zéro, l'amplification doit être parfaitement linéaire, sinon on perd tous les avantages de la méthode.

### **II.7. Analyse quantitative : loi de l'absorption moléculaire :**

#### **II.7.1. Loi de Lambert-Beer :**

L'UV-Visible est largement exploité en analyse quantitative, 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. [11]

P. Bouguer a trouvé en 1729 que des épaisseurs égales de matière absorbent des quantités proportionnelles (et non pas égales) de lumière. Le physicien et astronome allemand J. Lambert qui connaissait les travaux de Bouguer a donné en 1760 une formulation mathématique plus exacte des observations de ce dernier. Ce n'est qu'en 1852 que A. Beer, professeur de mathématiques à Bonn, a trouvé la bonne formulation. De plus il a constaté que la loi s'applique également aux solutions.

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

## PARTIE THEORIQUE

$$A = \varepsilon_{\lambda}lc$$

Soit la cuve de mesure de longueur  $l$  contenant la solution du composé absorbant à la concentration  $c$ .

Considérons une tranche de solution d'épaisseur  $dx$ . La puissance radiante (énergie radiante par unité de temps : unité W), apportée par une radiation monochromatique qui y pénètre est  $\Phi + d\Phi$ . Selon les travaux des auteurs cités ci-dessus, la puissance absorbée  $d\Phi$  est proportionnelle à :

- l'épaisseur  $dx$  ;
- la puissance lumineuse incidente  $\Phi$  ;
- la concentration  $C$  ;

### a) Remarque :

La loi de Beer-Lambert peut être obtenue en considérant les puissances radiantes par unité de surface soit  $\frac{\Phi}{A}$  où  $A$  est l'aire de la tranche de solution d'épaisseur  $dx$ . Le raisonnement est identique au précédent. Le rapport  $\frac{\Phi}{A}$  s'appelle l'intensité lumineuse (unité  $Wm^{-2}$ , symbole I). La loi de Beer-Lambert devient alors :

$$\log \frac{I_0}{I} = \varepsilon lc$$

Où  $I_0$  et  $I$  sont les intensités initiales et transmises. Puisque chaque tranche a la même surface  $A$ , on a :

$$\log \frac{I_0}{I} = \log \frac{\Phi_0}{\Phi_t}$$

La loi de Beer-Lambert est souvent exprimée dans la littérature en termes d'intensités lumineuse.

### b) Définitions :

La transmittance  $T$  est définie comme le rapport des deux intensités lumineuses  $T = \frac{I}{I_0}$  ; on l'exprime souvent en %. L'absorbance est le logarithme du rapport inverse :  $A = \log \frac{I_0}{I}$ .  $l$  est toujours exprimé en centimètres.

La constante de proportionnalité  $\varepsilon$  est appelée *coefficient d'absorption molaire* ou *absorptivité molaire*, la concentration étant exprimée en moles par litre.  $\varepsilon$  dépend de la nature du corps absorbant, de la longueur d'onde, de la température et est en principe indépendant du solvant.

## ***PARTIE THEORIQUE***

Cette loi, qui ne concerne que la fraction de la lumière absorbée, est vérifiée dans les conditions suivantes :

- La lumière utilisée doit être monochromatique ;
- Les concentrations doivent être 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.[9]

### **II.7.2. Validation de la loi de Beer-Lambert :**

Cette loi n'est vérifiée rigoureusement que dans des conditions idéales :

- La lumière utilisée doit être suffisamment monochromatique. Si cette condition n'est pas réalisée, on a pour deux longueurs d'ondes voisines  $\lambda$  et  $\lambda'$  :

$$\log \frac{I_0}{I} = \varepsilon_\lambda l c \quad \text{et} \quad \log \frac{I_0}{I'} = \varepsilon_{\lambda'} l c.$$

La loi de Beer n'est pas vérifiée pour l'ensemble du faisceau polychromatique du fait que  $\varepsilon_\lambda$  est en général différent de  $\varepsilon_{\lambda'}$ . Ceci montre qu'on peut se rapprocher des conditions idéales en choisissant le faisceau lumineux de telle façon que l'intervalle de longueurs d'ondes chevauche un maximum de la courbe d'absorption, ou se trouve si possible dans une partie horizontale, de façon à réaliser dans tout l'intervalle  $\varepsilon_\lambda \neq \varepsilon_{\lambda'}$ .

- La concentration  $c$  de la substance ne doit pas être trop élevée.
- Des concentrations importantes de sels incolores, en l'absence de toute réaction chimique, influent d'une façon parfois sensible sur l'absorption.
- La loi n'est pas suivie dans le cas de solutions fluorescentes ou de suspensions.
- Equilibres chimiques

Enfin on peut avoir des variations apparentes très importantes très importantes lorsque la dilution déplace sensiblement les équilibres chimiques. C'est un cas fréquent. [12]

### **II.7.3. Additivité des absorbances :**

La loi de Beer et Lambert est additive. Soit deux cuves de même épaisseur  $l$  contenant en solutions des substances différentes ; soient  $\varepsilon_1$  et  $c_1$ ,  $\varepsilon_2$  et  $c_2$  les coefficients d'absorption et les concentrations de chacune des solutions. [12]

Soit d'autre part une cuve unique d'épaisseur  $l$ , contenant à la fois les deux substances aux concentrations respectives  $c_1$  et  $c_2$ .

## ***PARTIE THEORIQUE***

En lumière monochromatique, l'absorbance  $A$  de la cuve unique est égale à la somme des absorbances  $A_1$  et  $A_2$  des deux autres cuves :

$$A = A_1 + A_2 = l(\varepsilon_1 c_1 + \varepsilon_2 c_2).$$

Cette propriété est importante comme nous le verrons par la suite : elle est la base de la plupart des déterminations et elle permet en particulier le dosage de corps absorbants les uns en présence des autres.

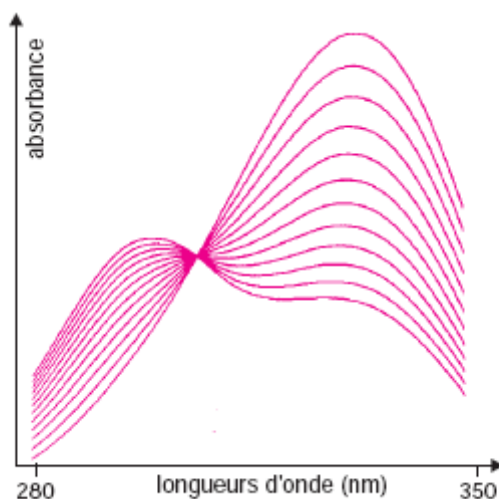
L'additivité permet le dosage des mélanges et la détermination de constantes d'équilibres et cinétiques.

Pour des mesures de chimie physique, il convient de se souvenir que l'absorbance est fonction des concentrations et non pas des activités. [11]

Il peut arriver que dans un équilibre ou dans un phénomène cinétique deux espèces présentent le même coefficient d'absorption molaire  $\varepsilon$  pour une ou plusieurs longueurs d'onde entraînant l'apparition de points isobestiques (Figure 3). Lors d'un équilibre acide-base. Les formes acide et basique présentent en ces points la même valeur. En conséquence le pH est sans incidence sur la valeur de l'absorbance.

**Au point isobestique** où se croisent les courbes d'absorption de chaque forme.

**Figure 3 : point isobestique.**



En chimie physique, la découverte de points isobestiques est précieuse. Elle permet de signaler l'existence d'équilibre ou de cinétiques ne faisant intervenir que deux espèces absorbant à la longueur d'onde en question.

## ***PARTIE THEORIQUE***

### **II.7.4. Ecart à la loi de Beer :**

La loi de Beer s'applique généralement dans un large domaine de concentration, à condition que la structure de l'ion ou celle de l'espèce non ionisée à l'état dissous ne change pas avec la concentration. L'addition de faibles quantités d'électrolyte ne réagissant pas chimiquement avec les composés n'affecte généralement pas l'absorption de la lumière. En revanche, de grandes quantités d'électrolytes peuvent provoquer un déplacement du maximum d'absorption et peuvent aussi modifier le coefficient d'absorption molaire. On observe généralement des écarts quand le soluté s'ionise, se dissocie ou s'associe en solution car la nature des espèces dans la solution peut alors changer avec la concentration. La loi de Beer n'est pas vérifiée quand le soluté coloré forme des complexes, la composition de la solution étant alors fonction des concentrations. Des écarts à la loi peuvent aussi intervenir si l'on n'utilise pas un rayonnement monochromatique. On peut toujours vérifier la validité de la loi de Beer pour la substance étudiée en traçant  $\log\left(\frac{I_0}{I_t}\right)$  ou  $\log\left(\frac{l}{T}\right)$  en fonction de sa concentration : on doit obtenir une droite passant par l'origine. [13]

Pour des solutions ne se conformant pas à la loi de Beer, il est hautement préférable de tracer une courbe d'étalonnage à partir d'une série d'étalons de concentrations connues. Les valeurs lues sur l'appareil sont alors portées graphiquement en fonction de la concentration, par exemple en mg pour 100 ml ou pour 1000 ml. Pour un travail très précis, et pour permettre une véritable comparaison, la courbe d'étalonnage doit couvrir le domaine de concentration dans lequel on est susceptible d'effectuer les mesures. Des effets provoquant de l'appareil peuvent être à l'origine d'écarts à la loi de Beer. Par exemple, si le photomultiplicateur ne fonctionne pas correctement, la droite obtenue en traçant l'absorbance en fonction de la concentration, coupera l'axe des concentrations à une valeur différente de zéro. De même, si les cuves (ou cellules) sont sales, la droite coupera l'axe des absorbances pour une valeur supérieure à zéro.

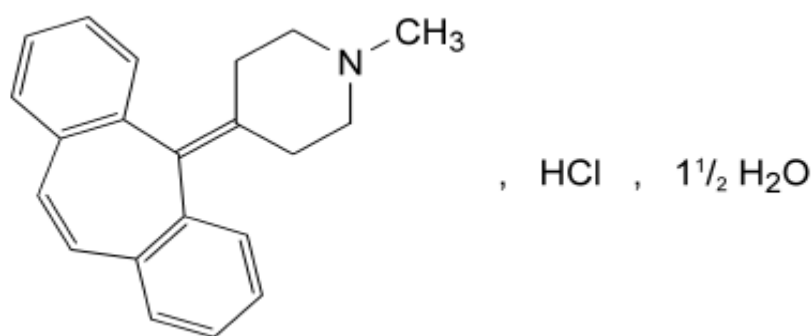
## *PARTIE THEORIQUE*

### **III. Etude de la Cyproheptadine :**

#### **III.1. Définition :**

Le chlorhydrate de cyproheptadine contient au minimum 98,5 pour cent et au maximum l'équivalent de 101,0 pour cent de chlorhydrate de 4-(5H-dibenzo[a,d]cycloheptèn-5-ylidène)-1-méthylpipéridine, calculé par rapport à la substance anhydre. [14] (Figure 4).

**Figure 4 : Formule plane de la Cyprohéptadine.**



#### **III.2. Caractères :**

Poudre cristalline, blanche ou légèrement jaune, peu soluble dans l'eau, facilement soluble dans le méthanol, assez soluble dans l'alcool.

#### **III.3. Propriétés :**

Antagonistes  $H_1$  et antagonistes  $5HT_2$ , indiqué pour stimuler l'appétit (effet orexigène).[15]

#### **III.4. Indications :**

Traitement symptomatique des manifestations allergiques diverses :

- Rhinite (saisonnière ou perannuelle),
- Conjonctivite,
- Urticaire.

## ***PARTIE THEORIQUE***

### **III.5. Contre-indications :**

- Hypersensibilité à l'un des composants,
- Risque de glaucome par fermeture de l'angle,
- Risque de rétention urinaire liée à des troubles uréthro-prostatiques,
- Antécédent d'agranulocytose,
- Enfants de moins de 6 ans en raison du risque de fausse route avec la forme comprimé.

Ce médicament ne doit généralement pas être utilisé pendant la grossesse ni en cas d'allaitement.

### **III.6. Pharmacodynamie :**

#### **Antihistaminique à usage systémique**

(D : Dermatologie)

(R : Système respiratoire)

La cyprohéptadine est un antihistaminique  $H_1$  qui se caractérise par :

- Un effet sédatif marqué aux doses usuelles, liés à une activité antihistaminique, anticholinergique et adrénolytique centrale,
- Un effet anticholinergique à l'origine d'effets indésirables,
- Un effet adrénolytique, pouvant retenir au plan hémodynamique (risque d'hypotension orthostatique).

Les antihistaminiques ont en commun la propriété de s'opposer, par antagonisme compétitif plus ou moins réversible, aux effets de l'histamine notamment sur la peau, les vaisseaux et les muqueuses conjonctivales, nasales, bronchiques et intestinales.

Une activité antisérotonine pour la lacyprohéptadine a été mise en évidence, à l'origine d'effets utrotoniques.

### **III.7. Pharmacocinétique :**

Le temps pour atteindre une concentration plasmatique maximale en cyprohéptadine après administration par voie orale est de 6 à 9 heures. La demi-vie d'élimination est comprise entre 10 et 15 heures. Le métabolisme consiste en une déméthylation suivie d'une oxydation et d'une hydroxylation, puis d'une sulfoconjugaison.

L'élimination par voie rénale représente 2/3 à 3/4 de la clairance totale. Environ 5 % de la quantité de cyprohéptadine administrée est retrouvée sous forme inchangée dans les urines.

Variation physiopathologique : l'élimination étant diminuée chez les insuffisants rénaux, il existe un risque de surdosage chez ces patients.



## ***PARTIE THEORIQUE***

### **III.8. Interactions :**

#### **Interactions médicamenteuses :**

##### **III.8.1. Associations déconseillées :**

###### **+ Alcool**

Majoration par l'alcool de l'effet sédatif des antihistaminiques  $H_1$ . L'altération de la vigilance peut rendre dangereuse la conduite de véhicules et l'utilisation de machines.

Eviter la prise de boissons alcoolisées et de médicaments contenant de l'alcool.

##### **III.8.2. Associations à prendre en compte :**

###### **+ Autres dépresseurs du système nerveux central**

Dérivés morphiniques (analgésiques, antitussifs et traitements de substitution); benzodiazépines; barbituriques; anxiolytiques autres que benzodiazépines; hypnotiques; neuroleptiques; antidépresseurs sédatifs; antihypertenseurs centraux; baclofène; thalidomide.

Majoration de la dépression centrale. L'altération de la vigilance peut rendre dangereuses la conduite de véhicules et l'utilisation de machines.

**+ Atropine et autres substances atropiniques** (antidépresseurs imipraminiques, antiparkinsoniens anticholinergiques, antispasmodiques atropiniques, disopyramide, neuroleptiques phénothiaziniques) :

Addition des effets indésirables atropiniques à type de rétention urinaire, constipation, séchresse des muqueuses.

###### **+ Inhibiteurs sélectifs de la recapture de la sérotonine**

Risque de diminution de l'efficacité de l'antidépresseur.

### **III.9. Fertilité/ grossesse/ allaitement :**

#### **III.9.1. Grossesse :**

##### **Aspect malformatif (1<sup>er</sup> trimestre) :**

- Les études effectuées chez l'animal n'ont pas mis en évidence un effet tératogène.
- En clinique, il n'existe pas actuellement de données suffisamment pertinentes pour évaluer un éventuel effet malformatif ou fœtotoxique de la Cyproheptadine lorsqu'elle est administrée pendant la grossesse.

## ***PARTIE THEORIQUE***

### **Aspect fœtotoxique (2eme et 3eme trimestres) :**

Chez les nouveau-nés de mères traitées au long cours par de fortes posologies de médicaments anticholinergiques ont été rarement décrits : des signes digestifs liés aux propriétés atropiniques (distension abdominale...).

### **Compte-tenu de sa composante antisérotonine :**

A l'origine d'un effet utérotonique, l'utilisation de ce médicament est **DECONSEILLEE** tout au long de la grossesse.

### **III.9.2. Allaitement :**

Il existe un passage faible mais réel de la cyproheptadine dans le lait maternel.

Compte tenu des possibilités de sédation ou d'excitation paradoxale du nouveau-né de la cyproheptadine, l'allaitement est déconseillé.

### **III.10. Conduite et utilisation de machines :**

L'attention est appelée, notamment chez les conducteurs de véhicules et les utilisateurs de machines, sur les risques de somnolence attachés à l'emploi de ce médicament, surtout en début de traitement.

Ce phénomène est accentué par la prise de boissons alcoolisées ou de médicaments contenant de l'alcool.

### **III.11. Effets indésirables :**

#### **III.11.1. Affections de la peau et du tissu sous cutané :**

- Erythèmes, purpura.

#### **III.11.2. Affection du système immunitaire :**

- Urticaire, œdème, plus rarement œdème de Quincke,
- Choc anaphylactique.

#### **III.11.3. Affections du système nerveux :**

- Sédation ou somnolence, plus marquée en début de traitement,

## ***PARTIE THEORIQUE***

- Incoordination motrice, tremblements,
- Troubles de l'équilibre, vertiges plus fréquents chez le sujet âgé,
- Hypotension orthostatique,
- Effets anti cholinergiques périphériques : (sécheresse des muqueuses, constipation, trouble de l'accommodation, mydriase, palpitations cardiaques, rétention urinaire, tarissement de la sécrétion lactée),
- Baisse de la mémoire ou de la concentration plus fréquente chez le sujet âgé.

### **III.11.4. Affections hématologiques et du système lymphatique :**

- Leucopénie, neutropénie, agranulocytose,
- Insuffisance hépatique,
- Ictère,
- Hépatite cholestatique et/ou cytolytique.

### **III.11.5. Affections psychiatrique :**

- Excitation, nervosité, insomnie, agitation, comportement agressif,
- Confusion mentale, hallucinations.

### **III.11.6. Troubles du métabolisme et de la nutrition :**

- Augmentation de l'appétit/prise de poids.

### **III.12. Surdosage :**

Symptômes d'un surdosage en cyprohéptadine :

- Syndrome anticholinergique central et périphérique,
- Convulsions, arrêt respiratoire et cardiaque (surtout chez l'enfant),
- Troubles de la conscience, coma.

Traitement symptomatique en milieu spécialisé. [16]

## **IV. Généralités sur les méthodes analytiques :**

### **IV.1. Définition d'une méthode analytique :**

La procédure d'analyse repose sur la description des moyens et modes opératoires nécessaires pour effectuer l'analyse de l'analyte :

- Le domaine d'application
- Le principe et/ou les réactions
- Les modes opératoires
- L'expression des résultats
- Tests de conformité
- Rapport d'essai

On distingue :

- Procédure d'analyse quantitative : permet de mesurer la quantité d'analyte présente dans l'échantillon à analyser.
- Procédure d'analyse de référence : procédure d'analyse prise comme référence par accord entre les parties, qui donne la valeur de référence acceptée de la grandeur de l'analyte à mesurer.
- Procédure d'analyse alternative : procédure d'analyse utilisée par le laboratoire à la place de la procédure de référence.

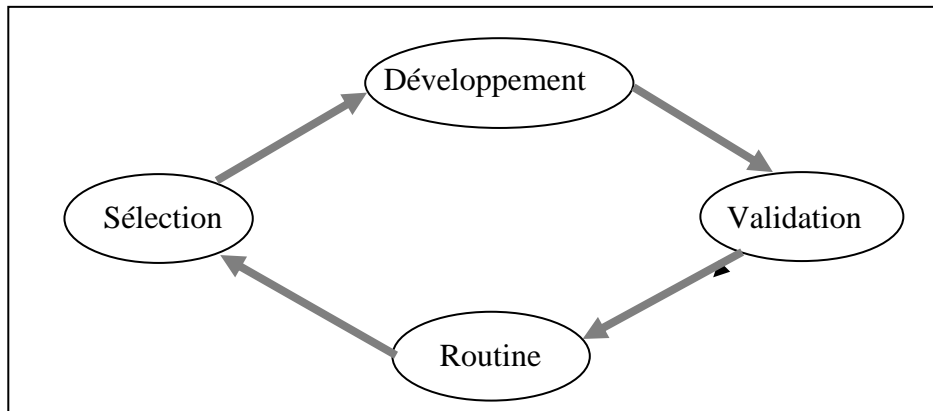
## ***PARTIE THEORIQUE***

### **IV.2. Étapes de la mise en œuvre d'une procédure analytique :**

La mise en œuvre d'une procédure analytique se compose de quatre phases comme le montre la figure :

1. La phase de sélection qui permet de définir les objectifs et les conditions opératoires initiales.
2. La phase de développement au moyen de plans d'expérience.
3. La phase de validation.
4. La phase d'application en routine incluant le plus souvent une validation en routine et parfois une validation partielle [17]. (Figure 5).

**Figure 5 : cycle de vie d'une procédure analytique.**



### ***V. Validation analytique : application de la procédure SFSTP 2003-2006***

#### **V.1. Introduction :**

La clause 5.4.51 de la norme ISO 17025 :2005 définit ainsi la validation : « la validation et la confirmation par examen et apport de preuves objectives du fait que les exigences particulières en vue d'une utilisation prévue déterminée sont remplies ». [18]

Le guide SFSTP 2003-2006 a été élaboré pour organiser les démarches de cette validation.

Les secteurs visés par ce guide sont divers tels que :

- les sociétés prestataires de services,
- les autorités réglementaires,
- les laboratoires officiels de contrôle,
- les industries des domaines d'activité suivants : chimie, pharmacie, biopharmacie, agroalimentaire, environnement, cosmétologie, etc. [19]

C'est dans le contexte pharmaceutique que se positionne cette thèse. Les diverses réglementations relatives aux bonnes pratiques (BPF, GMP,...) et autres documents à caractère normatif (ISO, ICH, EMEA, FDA) exigent aux entreprises pharmaceutiques de démontrer que l'ensemble des procédés et des méthodes utilisées pour l'élaboration d'un produit de santé conduit effectivement au résultat attendu.

Les laboratoires pharmaceutiques sont tenus de prouver que les méthodes d'analyse employées sont parfaitement valides et fiables.

#### **V.2. Principe :**

La procédure de validation SFSTP 2003-2006 vise à évaluer si la méthode analytique va pouvoir ou non quantifier avec une exactitude suffisante chacune des quantités inconnues que le laboratoire aura à déterminer. La méthode analytique doit être validée tel qu'elle est utilisée en routine et ce grâce à l'outil de décision offert par la procédure de validation, cette décision se repose sur l'estimation du « vrai biais » qui représente l'erreur systématique et de « la vraie fidélité » qui représente l'erreur aléatoire mesurée par un écart type ou une variance.

## ***PARTIE THEORIQUE***

### **V.3. Critères généraux de la validation:**

#### **V.3.1. Spécificité/ sélectivité :**

La spécificité d'une méthode est sa capacité à analyser de façon univoque la substance recherchée en présence d'autres composants.

#### **V.3.2. Linéarité des résultats d'analyse :**

La linéarité d'une méthode est sa capacité, à l'intérieur d'un certain intervalle, d'obtenir des résultats de mesure directement proportionnels à la concentration en substance de l'échantillon analysé.

L'exigence de linéarité s'applique aux résultats [concentration calculée = f (concentrations introduites)].

#### **V.3.3. Justesse (biais) :**

Egalement appelée " exactitude" ou " exactitude de la moyenne", elle représente l'étroitesse de l'accord entre la valeur moyenne d'une série de résultats d'essais et la valeur de référence acceptée. Elle est exprimée en terme de biais.

#### **V.3.4. Fidélité :**

La fidélité d'une méthode analytique est l'étroitesse de l'accord entre des résultats d'essais indépendants provenant d'un même échantillon homogène effectuées dans des conditions stipulées.

Elle est évaluée à trois niveaux : répétabilité, fidélité intermédiaire (Intra laboratoire), reproductibilité (inter laboratoires). [19]

#### **V.3.5. Erreur systématique :**

Est la partie de l'erreur expérimentale qui quantifie l'écart entre la valeur vraie mesurande et la valeur moyenne des mesurages.

Elle peut être due à une mauvaise connaissance du processus de mesure (effet physique non pris en compte, mauvaise connaissance des appareils.

L'erreur systématique est égale à l'erreur moins l'erreur statistique.

Elle est associée à l'erreur de justesse.

Elle ne dépend pas du nombre de mesurages effectués. [20]

## ***PARTIE THEORIQUE***

### **V.3.6. Erreur aléatoire :**

”Composante de l’erreur de mesure qui, dans des mesurages répétés, vraie de façon imprévisible.

La valeur de référence pour une erreur aléatoire est la moyenne qui résulterait d’un nombre infini de mesurages répétés du même mesurande...” [21]

### **V.3.7. Exactitude :**

Valeur conventionnellement vraie exprime l’étroitesse de l’accord entre le résultat d’essais et la valeur de référence acceptée. L’exactitude est l’expression de la somme de la justesse et de la fidélité.

### **V.3.8. Sensibilité :**

La sensibilité exprime le rapport de la variation de la réponse de la méthode à la variation de la quantité d’analyte. Si une faible variation de celle-ci entraîne un changement significatif de la réponse ; la méthode est dite ‘sensible’.

## **V.4. Rappels statistiques :**

### **V.4.1. La moyenne :**

Dans le cas où une population sur un échantillon est répétée un certain nombre de fois : La moyenne est la somme des grandeurs mesurées divisée par le nombre d’individus. La moyenne d’une grandeur  $x$  est notée :  $\bar{X}$  [22]

$$\bar{X} = \frac{x_1+x_2+x_3+\dots+x_n}{n} = \frac{\sum x_i}{n}$$

$\bar{X}$  : Moyenne arithmétique

$x_i$  : Valeurs des observations de la variable  $x$

$n$  : Nombre d’observations.

### **V.4.2. Ecart type :**

L’écart type mesure la dispersion d’une série de valeurs autour de leur moyenne. C’est la racine carrée de la variance .Il est noté  $S$ . [22]



## PARTIE THEORIQUE

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

### V.4.3. Variance :

La variance est une mesure servant à caractériser la dispersion d'un échantillon ou d'une distribution. Elle est notée  $S^2$ . [22]

$$S^2 = \frac{1}{n-1} \sum_{i=1}^n (x_i - \bar{X})^2$$

### V.4.4. Coefficient de variation :

Le coefficient de variation indique la dispersion relative qui est un nombre sans unité qui permet de comparer deux variables statistiques de natures différentes. [22]

Il se calcule comme rapport entre l'écart type et la moyenne, représenté en % :

$$CV = \frac{S}{\bar{X}} \times 100$$

### V.4.5. MSM :

Représente la variance des moyennes :

$$MSM_j = \frac{1}{p-1} \sum_{i=1}^p n_{ij} (\bar{x}_{ij,calc} - \bar{x}_{j,calc})^2$$

### V.4.6. MSE :

Représente la moyenne des variances :

$$MSE_j = \frac{1}{\sum_{i=1}^p n_{ij-p}} \sum_{i=1}^p \sum_{k=1}^{n_{ij}} (\bar{x}_{ijk,calc} - \bar{x}_{ij,calc})^2$$

Les variances  $\sigma_{B,j}^2$  et  $\sigma_{W,j}^2$  représentent les variances inter-série et intra-série, respectivement.

## ***PARTIE THEORIQUE***

Dans le cas d'un schéma équilibré (le nombre de répétitions est identique pour tout niveau de concentration dans chaque série), les composantes de la variance sont estimées comme suit (n étant le nombre de répétition dans chaque série) :

Si  $MSE_j < MSM_j$  alors :

$$\sigma^2_{W,j} = MSE_j$$

$$\sigma^2_{B,j} = \frac{MSM_j - MSE_j}{n}$$

Sinon :

$$\sigma^2_{W,j} = \frac{1}{pn-1} \sum_{i=1}^p \sum_{j=1}^k (\bar{x}_{ijk,calc} - \bar{x}_{j,calc})^2$$

$$\sigma^2_{W,j} = 0$$

$j$  : indice de concentration ;  $j \in [1 ; m]$ ;

$i$  : indice de série ;  $i \in [1 ; p]$ ;

$k$  : indice de répétition ;  $\in [1 ; n]$ . [19]

### **V.5. Les différentes approches de la validation analytique :**

#### **V.5.1. L'approche classique :**

L'approche descriptive utilise seulement des estimations des paramètres statistiques : biais et fidélité intermédiaire.

Les valeurs estimées de chaque critère sont calculées à chaque niveau de concentration des standards de validation et sont comparées aux limites d'acceptation fixées à priori.

Les limites d'acceptation rencontrées dans l'industrie pharmaceutique pour des méthodes de dosages de principes actifs dans des produits finis sont :

- ✓  $\pm 2$  % pour le biais relatif
- ✓ 3% pour le CVFI

Cela signifie que si le biais estimé est inclus dans l'intervalle de [2 %, +2 %], la justesse de la méthode pour le niveau de concentration étudié est acceptée.

Pour le critère de fidélité, si le CVFI est plus petit que 3 %, la fidélité de la méthode pour le niveau de concentration étudié est acceptée.

## PARTIE THEORIQUE

### V.5.2. Approche de différence :

L'approche de différence est basée sur le test d'hypothèse. Ce test est composé de deux hypothèses à savoir l'hypothèse nulle  $H_0$  et l'hypothèse alternative  $H_1$ .

Le critère de justesse (ou le biais de la méthode) est évalué en utilisant un test bilatéral de Student dont les hypothèses nulles et alternatives sont données ci-dessous. Ceci peut être vérifié en comparant l'intervalle de confiance à 95 % du biais global estimé à la valeur 0% de biais relatif.

Hypothèse nulle :

$H_0$  : biais = 0 ou biais relatif = 0 % ou recouvrement = 100 %

Hypothèse alternative :

$H_1$ : biais  $\neq$  0 ou biais relatif  $\neq$  0 % ou recouvrement  $\neq$  100 %

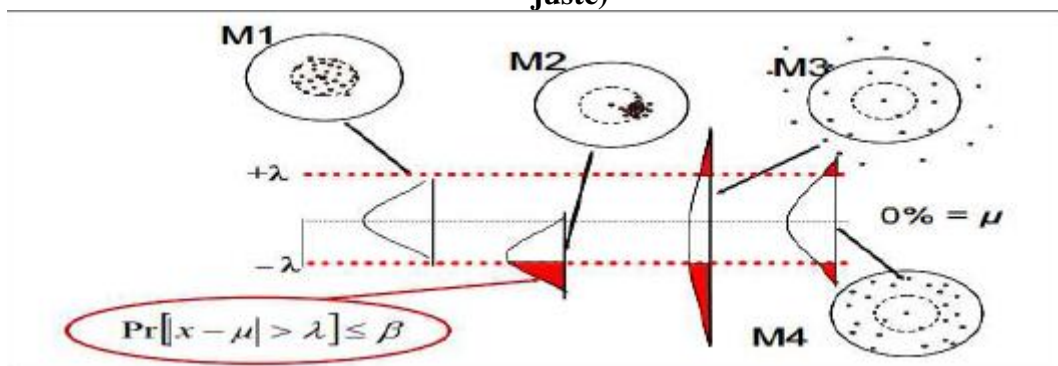
Avec : biais =  $X_i - \mu$ , biais relatif =  $\frac{X_i - \mu}{\mu_t} \times 100$  et le recouvrement =  $(X_i / \mu) \times 100$

Si cet intervalle contient 0 % de biais, la justesse de méthode est acceptée. Sinon, elle devrait être rejetée.

### V.5.3. Approche de validation par profil d'exactitude :

Cette approche est basée sur l'estimation du vrai biais et de la vraie fidélité de la procédure analytique. Pour que cette dernière soit valide, ces valeurs ne doivent pas dépasser la limite d'acceptation fixée par la réglementation. L'outil de décision utilisé est le profil d'exactitude construit à partir de la limite d'acceptation ; l'intervalle de tolérance et le biais de la procédure comme l'illustre la figure : (Figure 6)

**Figure 6 : Profil d'exactitude comme outil de décision pour quatre méthodes M1 (fidèle et juste), M2 (fidèle mais non juste), M3 (non fidèle et non juste) et M4 (non fidèle mais juste)**



## ***PARTIE THEORIQUE***

Cette nouvelle approche a été proposée par le guide SFSTP 2003.

### **Les étapes de la mise en œuvre du profil d'exactitude :**

1. Définir la quantité mesurée :

La quantité mesurée est définie à partir du mode opératoire de la méthode en précisant les formules d'expression du résultat final et la procédure pour établir ce résultat.

2. Précision des objectifs de la validation :

Choix du domaine de validation.

3. Sélection des échantillons de validation :

Choix d'un échantillon de validation dont la concentration représente la valeur de référence attendue.

4. Planification des essais de validation :

Choix du nombre de répétitions, nombre de séries et des niveaux de concentration.

5. Réalisation des essais :

La méthode doit être validée tel qu'elle sera utilisée en routine.

6. Calcul des critères de validation :

Calcul du biais, de la fidélité et de l'intervalle de tolérance.

7. Construction du profil d'exactitude.

8. Interprétation du profil d'exactitude.

9. Transfert de la méthode en routine. [2]

# **PARTIE PRATIQUE**

### **Problématique :**

Notre travail porte sur la validation analytique de la méthode de dosage simultané de Chlorhydrate de Cyprohéptadine par spectrophotométrie UV-visible, par l'approche de profil d'exactitude, fondée sur l'estimation des intervalles de tolérance, avec une proportion  $\beta$  de mesures dans les limites d'acceptations ( $\pm \lambda$ ).

✓ Les limites d'acceptabilités sont fixées à  $\pm 2\%$  autour de la valeur de concentration introduite.

✓ La proportion  $\beta$  est fixée à 90%.

### **Le lieu de l'étude :**

Notre stage pratique s'est déroulé au niveau du laboratoire de chimie minérale de département de la pharmacie, faculté de médecine de l'université de Saad Dahleb-Blida-.

### **Domaine de validation :**

Chaque principe actif possède une monographie à la pharmacopée européenne, la pureté de ce principe actif est déclarée dans cette monographie.

### **Plans d'expérience :**

Pour cette validation, le nombre  $i$  de série de validation a été fixé à 3, en considérant qu'une série est équivalente à un jour.

Pour le plan d'expérience de validation, le nombre  $j$  de répétition a été fixé à 3 et le nombre de niveaux de concentration  $k$  est de 1.

La réglementation a fixé la limite d'acceptabilité à  $\pm 2\%$  pour les matières premières.

En considérant les conditions de travail au laboratoire (spectrophotomètre non équilibré, manque de réactifs,) ; une deuxième limite d'acceptabilité a été fixée à  $\pm 5\%$ .

### **Appareillage :**

Le dosage spectrométrique d'un principe actif est réalisé à l'aide d'un spectrophotomètre UV-Visible.

La cuve utilisée dans cet appareil est une cuve en quartz.

## PARTIE PRATIQUE

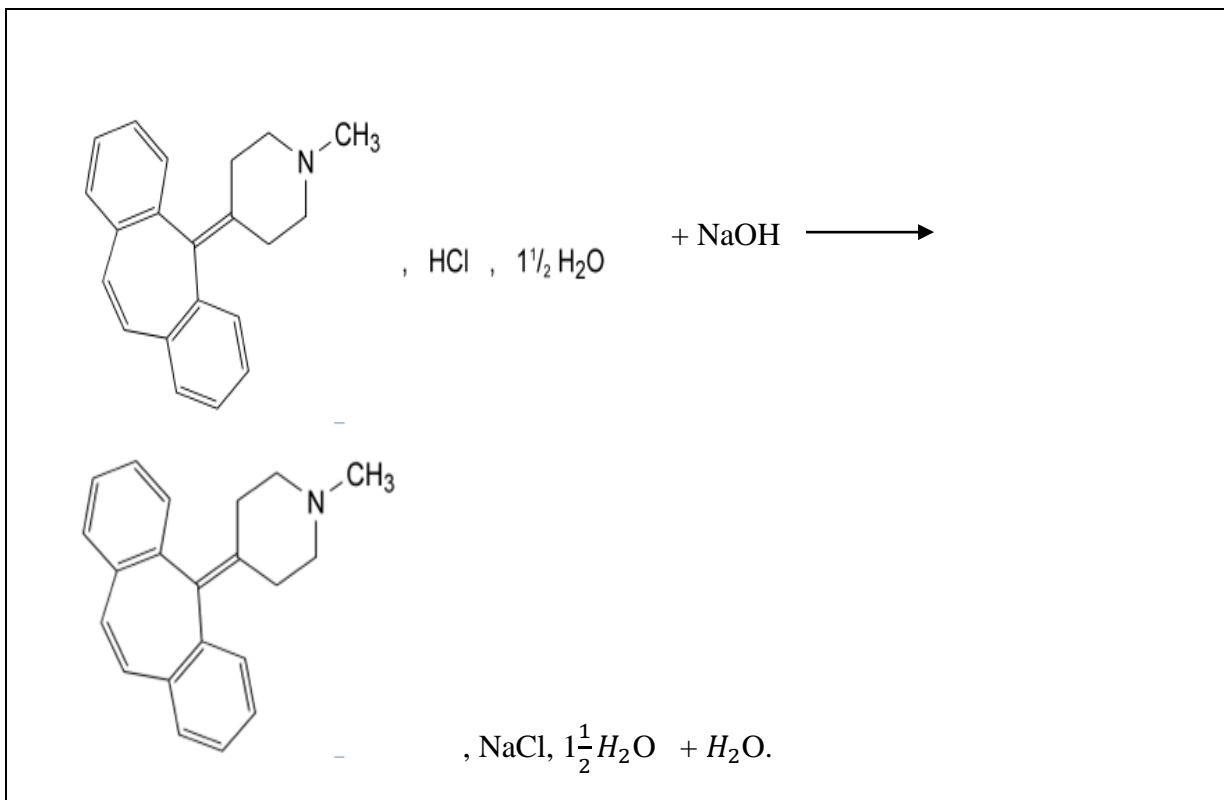
### I. Dosage potentiométrique du chlorhydrate de Cyprohéptadine :

#### I.1. Introduction :

La première étape de cette étude, est le dosage par méthode acido-basique du chlorhydrate de Cyprohéptadine, et on la considère comme méthode de référence.

- Nous savons qu'un acide réagit avec une base. Le chlorhydrate de la Cyprohéptadine réagit avec l'hydroxyde de sodium : (Figure 7)

Figure 7 : réaction chimique de la Cyprohéptadine avec l'hydroxyde de sodium.



# ***PARTIE PRATIQUE***

## **I.2. Appareillage et verrerie :**

Les appareils et la verrerie utilisés dans cette méthode sont :

- ✓ Potentiomètre.
- ✓ Balance.
- ✓ Pipette.
- ✓ Agitateur.
- ✓ Spatule. [23]
- ✓ Fiole.
- ✓ Bécher.

## **I.3. Les réactifs :**

Les réactifs utilisés sont :

- ✓ Éthanol 96%.
- ✓ Acide benzoïque.

## **I.4. Préparation d'un litre de solution de NaOH 0.1M :**

Selon la pharmacopée européenne Tom 1:

« Dissolvez 42 g d'hydroxyde de sodium R dans de l'eau exempte de dioxyde de carbone R et complétez à 1000,0 ml avec le même solvant ». [24]

### **I.4.1. Application :**

Calcul de la quantité d'hydroxyde de sodium à dissoudre pour l'obtention d'une solution de soude 0.1M :

$$m_{NaOH} = 42/10$$

$$m_{NaOH} = 4.2 \text{ g.}$$

### **I.4.2. Mode opératoire:**

Dissolution de **4.23 g** d'NaOH dans 1L d'eau distillée dans un ballon de **1L**.



## ***PARTIE PRATIQUE***

### **I.5. Détermination du titre du NaOH :**

Selon la pharmacopée européenne Tom 1 :

« Sodium (hydroxyde de) 0,1 M :

Détermination du titre pour le dosage des sels halogénés de bases organiques. Dissolvez 0,100 g d'acide benzoïque dans un mélange de 5 ml d'acide chlorhydrique 0,01 M et 50 ml d'alcool. Titrez par la solution d'hydroxyde de sodium et tracez la courbe potentiométrique.

Mesurez le volume de la solution d'hydroxyde de sodium utilisé entre les 2 points d'inflexion.

1 ml d'hydroxyde de sodium 0,1 M correspond à 12,21 mg de C<sub>7</sub>H<sub>6</sub>O<sub>2</sub> ». [24]

#### **I.5.1. Application :**

##### **a. 1er essai :**

Nous avons :

- Pesée de **102.1 mg** d'acide benzoïque dans un bécher de 80 ml.
- Mesure de 5 ml d'acide chlorhydrique 0.01 M et de 50 ml d'éthanol à l'aide d'une éprouvette de 25 ml.
- Versement des 2 volumes peu à peu dans le bécher.
- Remuement jusqu'à dissolution complète de l'acide benzoïque.
- Titrage de la solution d'acide benzoïque par la solution d'hydroxyde de sodium 0.1M en utilisant un potentiomètre.

#### • **Résultats :**

- Calcul du volume équivalent :

$$V_{eq} = V_{inf2} - V_{inf1}$$

$$V_{eq} = 9.137 - 0.643$$

$$V_{eq} = \mathbf{8.494 \text{ ml.}}$$

- Calcul du titre de solution d'NaOH :

1ml NaOH 0.1M → 12.21mg d'acide benzoïque

8.494 ml NaOH XM → 102.1 mg d'acide benzoïque. [24]

$$X = (102.1 \times 0.1) / (12.21 \times 8.494)$$

$$\mathbf{X = 0.09844 \text{ M.}}$$

## ***PARTIE PRATIQUE***

### **b. 2<sup>ème</sup> essai :**

Nous avons :

- Pesée de **102.8 mg** d'acide benzoïque dans un bécher de 80 ml.
- Mesure de 5 ml d'acide chlorhydrique 0.01 M et de 50 ml d'éthanol à l'aide d'une éprouvette de 25 ml.
- Versement des 2 volumes peu à peu dans le bécher.
- Remuement jusqu'à dissolution complète de l'acide benzoïque.
- Titration de la solution d'acide benzoïque par la solution d'hydroxyde de sodium 0.1M en utilisant un potentiomètre.

#### **• Résultats :**

- Calcul du volume équivalent :

$$V_{eq} = V_{inf2} - V_{inf1}$$

$$V_{eq} = 9.128 - 0.610$$

$$V_{eq} = \mathbf{8.518 \text{ ml.}}$$

- Calcul du titre de solution d'NaOH :

1ml NaOH 0.1M → 12.21mg d'acide benzoïque

8.518 ml NaOH XM → 102.1 mg d'acide benzoïque. [24]

$$X = (102.8 \times 0.1) / (12.21 \times 8.518)$$

$$\mathbf{X = 0.09884 \text{ M.}}$$

### **c. 3<sup>ème</sup> essai :**

Nous avons :

- Pesée de **102.9 mg** d'acide benzoïque dans un bécher de 80 ml.
- Mesure de 5 ml d'acide chlorhydrique 0.01 M et de 50 ml d'éthanol à l'aide d'une éprouvette de 25 ml.
- Versement des 2 volumes peu à peu dans le bécher.
- Remuement jusqu'à dissolution complète de l'acide benzoïque.
- Titration de la solution d'acide benzoïque par la solution d'hydroxyde de sodium 0.1M en utilisant un potentiomètre.

## PARTIE PRATIQUE

- **Résultats :**

- Calcul du volume équivalent :

$$V_{eq} = V_{inf2} - V_{inf1}$$

$$V_{eq} = 9.150 - 0.653$$

$$V_{eq} = \mathbf{8.497 \text{ ml.}}$$

- Calcul du titre de solution d'NaOH :

1ml NaOH 0.1M → 12.21mg d'acide benzoïque

8.497 ml NaOH XM → 102.9 mg d'acide benzoïque. [24]

$$X = (102.9 \times 0.1) / (12.21 \times 8.497)$$

$$\mathbf{X = 0.09918 \text{ M.}} \text{ (Tableau I)}$$

**Tableau I : Résultats de l'étalonnage du NaOH**

Essai	Titre (M)	Moyenne	Ecart-type
1er essai	0,09844	0,09882	0,0003704
2ème essai	0,09884		
3ème essai	0,09918		

### **I.6. Dosage potentiométrique de chlorhydrate de Cyprohéptadine :**

#### **I.6.1. Principe :**

« Dissolvez 0,250 g de chlorhydrate de cyproheptadine dans un mélange de 5,0 ml d'acide chlorhydrique 0,01 M et de 50 ml d'alcool R. Titrez par l'hydroxyde de sodium 0,1 M et tracez la courbe potentiométrique (2.2.20). Mesurez le volume d'hydroxyde de sodium 0,1 M utilisé entre les 2 points d'inflexion.

1 ml d'hydroxyde de sodium 0,1 M correspond à 32,39 mg de C<sub>21</sub>H<sub>22</sub>CIN ». [14]

#### **I.6.2. Mode opératoire :**

Nous avons :

- Pesée de chlorhydrates de Cyproheptadine dans un bécher de 80 ml.
- Mesure de 5 ml d'acide chlorhydrique et de 50 ml d'éthanol à l'aide d'une éprouvette de 25 ml.
- Versement des 2 volumes dans le bécher.

## ***PARTIE PRATIQUE***

- Remuement jusqu'à dissolution totale des chlorhydrates de Cyproheptadine.
- Titration par la solution de NaOH 0.092M à l'aide d'un potentiomètre.

### **I.6.3. Application :**

#### **a. 1<sup>er</sup> essai :**

Nous avons :

- Pesée de **250.4mg** de chlorhydrate de Cyproheptadine dans un bécher de 80 ml.
- Mesure de **5 ml** d'acide chlorhydrique et de **50 ml** d'éthanol à l'aide d'une éprouvette de 25 ml.
- Versement des 2 volumes dans le bécher.
- Remuement jusqu'à dissolution totale des chlorhydrates de cyproheptadine.
- Titration par la solution de NaOH **0.0989M** à l'aide d'un potentiomètre.

#### **• Résultats :**

- Volume équivalent :

$$V_{eq} = V_{inf2} - V_{inf1}$$

$$V_{eq} = \mathbf{7.241 \text{ ml.}}$$

- Calcul du titre de chlorhydrate de Cyprohéptadine :

1ml NaOH 0.1M → 32.39mg de chlorhydrate de Cyproheptadine purs

7.241ml NaOH 0.09898M → X mg de chlorhydrate de Cyproheptadine purs

$$X = \frac{32.39 \times 7.241 \times 0.09898}{0.1}$$

**X = 232.143 mg** de chlorhydrates de Cyprohéptadine purs.

$$P_{pur}\% = 232.14/250.4 \times 100$$

$$P_{pur}\% = \mathbf{92.709 \%}.$$

## ***PARTIE PRATIQUE***

- **Calcul du pourcentage d'eau :**

« **Eau:** 7,0% à 9,0%, déterminé sur 0,200 g de chlorhydrate de cyproheptadine ».

$$7 - 9\% \rightarrow 0.2 \text{ g}$$

$$E\% \rightarrow 0.2504 \text{ g}$$

$$E\% = \frac{0.2504 \times 7}{0.2} \qquad E\% = \frac{0.2504 \times 9}{0.2}$$

$$E\% = 8.764\%$$

$$E\% = 11.268\%$$

Le pourcentage d'eau est compris entre 8.764% et 11.268%.

- **Interprétation du résultat :**

Selon la pharmacopée européenne :

« Le chlorhydrate de Cyproheptadine contient au minimum 98,5 pour cent et au maximum l'équivalent de 101,0 pour cent de chlorhydrate de 4-(5*H*-dibenzo [*a,d*]cycloheptén-5-ylidène)-1-méthylpipéridine, calculé par rapport à la substance anhydre ». [14]

« **Eau:** 7,0% à 9,0%, déterminé sur 0,200 g de chlorhydrate de cyproheptadine ».

**Calcul de la pureté de l'échantillon de cyproheptadine :**

$$P\% = P_{anh}\% + E\%$$

$$P\% = 92.709\% + 8.764\%$$

$$P\% = 92.709\% + 11.268\%$$

$$P\% = 101.473\%$$

$$P\% = 103.977\%$$

La pureté de l'échantillon de cyproheptadine est comprise entre 101.473 % et 103.977%.

### **b. 2<sup>ème</sup> essai :**

Nous avons :

- Pesée de **251 mg** de chlorhydrate de Cyproheptadine dans un bécher de 80 ml.
- Mesure de **5 ml** d'acide chlorhydrique et de **50 ml** d'éthanol à l'aide d'une éprouvette de 25 ml.
- Versement des 2 volumes dans le bécher.
- Remuement jusqu'à dissolution totale des chlorhydrates de cyproheptadine.
- Titrage par la solution de NaOH **0.09898M** à l'aide d'un potentiomètre.

## PARTIE PRATIQUE

- **Résultats :**

- Volume équivalent :

$$V_{eq} = V_{inf2} - V_{inf1}$$

$$V_{eq} = 7.227 \text{ ml.}$$

- Calcul du titre de chlorhydrate de Cyprohéptadine :

1ml NaOH 0.1M → 32.39mg de chlorhydrate de Cyproheptadine purs

7.227 ml NaOH 0.09898M → X mg de chlorhydrate de Cyproheptadine purs

$$X = \frac{32.39 \times 7.227 \times 0.09898}{0.1}$$

**X = 231.69 mg** de chlorhydrate de Cyprohéptadine purs.

$$P_{anh}\% = 232.14/251 \times 100$$

$$P_{anh}\% = 92.38 \%$$

- **Calcul du pourcentage d'eau :**

« **Eau:** 7,0% à 9,0%, déterminé sur 0,200 g de chlorhydrate de cyproheptadine ».

$$7 - 9\% \rightarrow 0.2 \text{ g}$$

$$E\% \rightarrow 0.251 \text{ g}$$

$$E\% = \frac{0.251 \times 7}{0.2} \qquad E\% = \frac{0.251 \times 9}{0.2}$$

$$E\% = 8.785\% \qquad E\% = 11.295 \%$$

Le pourcentage d'eau est compris entre 8.785% et 11.295%.

- **Interprétation du résultat :**

« Le chlorhydrate de Cyproheptadine contient au minimum 98,5 pour cent et au maximum l'équivalent de 101,0 pour cent de chlorhydrate de 4-(5*H*-dibenzo [*a,d*]cycloheptén-5-ylidène)-1-méthylpipéridine, calculé par rapport à la substance anhydre ». [14]

- **Calcul de la pureté de l'échantillon de cyproheptadine :**

$$P\% = P_{anh}\% + E\%$$

$$P\% = 92.38\% + 8.785\% \qquad P\% = 92.38\% + 11.295\%$$

## ***PARTIE PRATIQUE***

$$P\% = 101.165\%$$

$$P\% = 103.675\%$$

La pureté de l'échantillon de cyproheptadine est comprise entre 101.165% et 103.675%.

### **c. 3<sup>ème</sup> essai :**

Nous avons :

- Pesée de **250.3 mg** de chlorhydrate de Cyproheptadine dans un bécher de 80 ml.
- Mesure de **5 ml** d'acide chlorhydrique et de **50 ml** d'éthanol à l'aide d'une éprouvette de 25 ml.
- Versement des 2 volumes dans le bécher.
- Remuement jusqu'à dissolution totale de chlorhydrate de Cyproheptadine.
- Titrage par la solution de NaOH **0.09898M** à l'aide d'un potentiomètre.

#### **• Résultats :**

- Volume équivalent :

$$V_{eq} = V_{inf2} - V_{inf1}$$

$$V_{eq} = \mathbf{7.222\ ml.}$$

- Calcul du titre de chlorhydrate de Cyprohéptadine :

1ml NaOH 0.1M → 32.39mg de chlorhydrate de Cyproheptadine pur

7.222 ml NaOH 0.09898M → X mg de chlorhydrate de Cyproheptadine pur

$$X = \frac{32.39 \times 7.222 \times 0.09898}{0.1}$$

**X = 231.53 mg** de chlorhydrate de Cyprohéptadine pur.

$$P_{pur}\% = 232.14/250.3 \times 100$$

$$P_{pur}\% = \mathbf{92.5\ \%}.$$

#### **• Calcul du pourcentage d'eau :**

« Eau: 7,0% à 9,0%, déterminé sur 0,200 g de chlorhydrate de cyproheptadine ».

$$7 - 9\% \rightarrow 0.2\ g$$

## ***PARTIE PRATIQUE***

$$E\% \rightarrow 0.2503 \text{ g}$$

$$E\% = \frac{0.2503 \times 7}{0.2}$$

$$E\% = 8.7605\%$$

$$E\% = \frac{0.2503 \times 9}{0.2}$$

$$E\% = 11.2635 \%$$

Le pourcentage d'eau est compris entre 8.7605% et 11.2635%.

- **Interprétation du résultat :**

« Le chlorhydrate de Cyproheptadine contient au minimum 98,5 pour cent et au maximum l'équivalent de 101,0 pour cent de chlorhydrate de 4-(5*H*-dibenzo [*a,d*]cycloheptén-5-ylidène)-1-méthylpipéridine, calculé par rapport à la substance anhydre ». [14]

**d. Calcul de la pureté de l'échantillon de cyproheptadine :**

$$P\% = P_{pur}\% + E \%$$

$$P\% = 92.5\% + 8.7605\%$$

$$P\% = 101.2605 \%$$

$$P\% = 92.5 \% + 11.2635\%$$

$$P\% = 103.7635 \%$$

La pureté de l'échantillon de cyproheptadine est comprise entre 101.2605 % et 103.7635%. (Tableau II)

**Tableau II : Résultats du titrage acido-basique de la Cyproheptadine.**

Prise d'essai (mg)	Volume équivalent (ml)	P%	moyenne	écart-type
250,4	7,241	92,709	92,5296667	0,16649424
251	7,227	92,38		
250,3	7,222	92,5		



## ***PARTIE PRATIQUE***

### **II. Dosage spectrophotométrique du chlorhydrate de Cyprohéptadine :**

#### **II.1. Introduction :**

La deuxième étape de la présente étude consiste en le dosage spectrophotométrique du chlorhydrate de cyproheptadine dans le domaine UV, le résultat sera comparé à celui du titrage acido-basique cette dernière prise comme méthode de référence.

#### **II.2. Principe :**

Selon la pharmacopée britannique :

« Pesez et broyez 20 comprimés en poudre. Ajoutez 100ml d'éthanol 96% à la quantité de poudre contenant l'équivalent de 1.5mg de chlorhydrate de cyproheptadine et filtrez si nécessaire. Mesurez l'absorbance de la solution résultante à 286nm. Calculez le contenu de  $C_{21}H_{21}N$ . HCl en prenant 355 comme valeur de A (1%,1cm) à 286nm ». [25]

Cette méthode qui basée sur le produit fini est une méthode adoptée, dans notre travail on utilise la matière première.

#### **II.3. Mode opératoire :**

Les essais ont été effectués sur trois séries de même concentration; chaque série étant composée de trois solutions.

Les séries ont été préparées comme suit :

- 1- Dissolution de 15mg de chlorhydrates de Cyproheptadine dans 100ml d'éthanol 96% ;
- 2- Dilution de la solution résultante au 1/10 en ajoutant 9ml d'éthanol 96% à 1ml de solution.
- 3- Remplir la cuve photométrique de solution et mesurer l'absorbance au spectrophotomètre.

#### **II.4. Appareillage :**

Dans cette étude, les appareils suivants ont été utilisés :

- ✓ Spectrophotomètre : dispose de modes de mesure pour l'absorbance ; la transmittance et la concentration. Ce matériel couvre une gamme de longueurs d'onde de 198 à 1000nm avec une bande passant de 2nm. [26]
- ✓ Micropipette de 1ml.

## ***PARTIE PRATIQUE***

- ✓ Cuve photométrique en quartz de 10mm de diamètre. [27]
- ✓ Bécher de 100ml. [28]
- ✓ Balance.
- ✓ Agitateur.
- ✓ Pipette. [29]
- ✓ Eprouvette de 100ml. [30]

### **II.5. Réactifs :**

- ✓ Éthanol 96%.

### **II.6. Résultats :**

Les résultats obtenus sont présentés dans le tableau suivant :(Tableau III)

**Tableau III : Résultats des essais de spectrométrie UV-visible.**

Série	Absorbance	Pureté (%)	Moyenne (%)
Série 01 Prise d'essais= 15,3mg	0.497	91.5	92.89
	0.496	91.31	
	0.495	91.13	
Série 02 Prise d'essais= 15,2mg	0.5	92.66	
	0.498	92.29	
	0.504	93.4	
Série 03 Prise d'essais= 15,2mg	0.491	91.58	
	0.515	96.07	
	0.515	96.07	

## ***PARTIE PRATIQUE***

### **II.7. Calcul de la pureté :**

10µg/ml → 0.355

C µg/ml → 44

**Exemple :**

10µg/ml → 0.355

C µg/ml → 0.497

$$C = (0.497 \cdot 10) / 0.355$$

$$C = 14 \mu\text{g/ml}$$

$$\text{Pureté} = \frac{\text{Concentration obtenue par spectrophotométrie UV}}{\text{Prise d'essais}} * 100$$

$$\text{Pureté} = \frac{14}{15.3} * 100$$

$$\text{Pureté} = 91.50 \%$$

# **DISCUSSION**

## *DISCUSSION*

### I- Détermination de l'exactitude :

#### I-1- Détermination de l'intervalle de tolérance :

Série	S1	S2	S3	Biais absolu	0,34	Rj	0,79
	91,5	92,66	91,58	Biais %	0,36	Bj	0,72
92,55	91,31	92,29	96,07	recouvrement %	100,36	v <(ddl)	4,52
	91,13	93,4	96,07	VAR r (W)	2,35	Q	2,13
moyenne	91,31	92,78	94,57	VAR fi (B)	1,87	k	2,34
variance	0,03	0,31	6,72	CV r %	1,65	Li	-3,09
cv%	0,20	0,60	2,74	Cv fi%	1,47		
moyenne générale	92,89	MSM	7,99			Ls	3,82
variance générale	3,76	MSE	2,35				
ectype	0,18	0,56	2,59	Ecartype général	1,94		

Les calculs statistiques sont représentés dans le tableau suivant : (Tableau IV)

**Tableau IV : Tableau des statistiques.**

#### Les calculs :

##### Calcul de la moyenne :

Calcul de la moyenne de la série 1 :

$$M_1 = (C_1 + C_2 + C_3) / 3$$

$$M_1 = (91.5 + 91.31 + 91.13) / 3$$

$$M_1 = 91.31$$

## DISCUSSION

### Calcul de la moyenne générale :

$$M = \frac{M_1 + M_2 + M_3}{3}$$

$$M = \frac{91,31333333 + 92,78333333 + 94,57}{3}$$

$$M = 92.89$$

### Calcul du biais absolu :

$$\text{Biais absolu} = \hat{u}_j - \bar{X}_j$$

$$\text{Biais absolu} = 92.89 - 92,55$$

$$\text{Biais absolu} = 0,34$$

### Calcul du biais relatif :

$$\text{Biais relatif (\%)} = \frac{\hat{u}_j - \bar{X}_j}{\bar{X}_j} \times 100$$

$$\text{Biais relatif (\%)} = \frac{92.89 - 92,55}{92,55} \times 100$$

$$\text{Biais relatif (\%)} = 0,36 \%$$

### Calcul du recouvrement :

$$\text{Recouvrement (\%)} = \frac{\hat{u}_j}{\bar{X}_j} \times 100$$

$$\text{Recouvrement (\%)} = \frac{92.89}{92,55} \times 100$$

$$\text{Recouvrement (\%)} = 100,36 \%$$

### Calcul de l'écart-type :

Calcul de l'écart type de la série 1 :

$$S_1 = \sqrt{\frac{1}{3-1} \sum_2^3 (x_i - \bar{X})^2}$$

## DISCUSSION

$$S_1 = \sqrt{(1/2) (91.5 - 91.3133)^2 + (91.13 - 91.133)^2 + (91.31 - 91.133)^2}$$

$$S_1 = 0,18$$

### Calcul de l'écart-type général :

$$S = \frac{S_1 + S_2 + S_3}{3}$$

$$S = 1,94$$

### Calcul de la variance :

Calcul de la variance de la série 1 :

$$S^2_1 = \frac{1}{3-1} \sum_2^3 (x_i - \bar{X})^2$$

$$S^2_1 = (1/2) (91.5 - 91.31)^2 + (91.13 - 91.13)^2 + (91.31 - 91.13)^2$$

$$S^2_1 = 0,03$$

### Calcul de la variance générale :

$$S^2 = \frac{S^2_1 + S^2_2 + S^2_3}{3}$$

$$S^2 = \frac{0,034233333 + 0,319433333 + 2,619633333}{3}$$

$$S^2 = 3,76$$

### Calcul de la variance fidélité :

Si  $MSE_j < MSM_j$  alors :

$$S^2_{B,j} = \frac{MSM_j - MSE_j}{n}$$

$n$  étant le nombre de répétition dans chaque série.

Sinon :

$$S^2_{B,j} = 0$$

On a :  $MSE_j = 2,35$

## DISCUSSION

$$MSM_j = 7,99$$

$$MSE_j < MSM_j$$

$$\text{Donc : } S^2_{B.j} = \frac{MSM_j - MSE_j}{n}$$

$$S^2_{B.j} = \frac{13.10147778 - 0.9911}{3}$$

$$S^2_{B.j} = 1,87$$

### Calcul de la variance répétabilité :

Si  $MSE_j < MSM_j$  alors :

$$S^2_{w.j} = MSE_j$$

Sinon :

$$S^2_{w.j} = \frac{1}{pn-1} \sum_{i=1}^p \sum_{j=1}^k (x_{ijk,calc} - \bar{x}_{j,calc})^2$$

On a:  $MSE_j = 2,35$

$$MSM_j = 7,99$$

$$MSE_j < MSM_j$$

$$\text{Donc : } S^2_{w.j} = MSE_j$$

$$S^2_{w.j} = 2,35$$

### Calcul du coefficient de variation :

$$CV\% = \frac{S}{M}$$

$$CV\% = 0,20\%$$

### Calcul du coefficient de variation fidélité :

$$CV_B\% = \frac{\sqrt{S_{B.j}^2}}{M} \times 100$$

$$CV_B\% = 1.47\%$$



## DISCUSSION

**Calcul du coefficient de variation répétabilité :**

$$CV_w \% = \frac{\sqrt{S_{w,j}^2}}{M} \times 100$$

$$CV_w \% = 1,65 \%$$

**Calcul de  $R_j$  :**

$$R_j = \frac{S_{B,j}^2}{S_{w,j}^2}$$

$$R_j = 0,79$$

**Calcul de  $B_j$  :**

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

$$B_j = 0,72$$

**Calcul de Q :**

$$Q \left( v; \frac{1 + \beta}{2} \right)$$

$$Q = 2,13$$

**Calcul du degré de liberté  $v$  :**

$$v = \frac{(R+1)^2}{\frac{(R+\frac{1}{n})^2}{p-1} + \frac{1-\frac{1}{n}}{pn}}$$

Avec  $p$  : nombre de séries

$n$  : nombre de répétitions pour chaque série.

$$v = 4,52$$

## ***DISCUSSION***

### **Calcul de k :**

$$k = Q \times \sqrt{1 + \frac{1}{pn \times B_j^2}}$$

$$k = 2,34$$

### **Calcul de la limite inférieure Li :**

$$Li = \text{Biais \%} - k \times \text{CV fi \%}$$

$$Li = -3,09\%$$

### **Calcul de la limite supérieure Ls :**

$$Ls = \text{Biais\%} + k \times \text{CV fi \%}$$

$$Ls = 3,82\%$$

### **Intervalle de tolérance :**

$$\{-3,09\% ; 3,82\%\}$$

### **I-2- Construction du profil d'exactitude :**

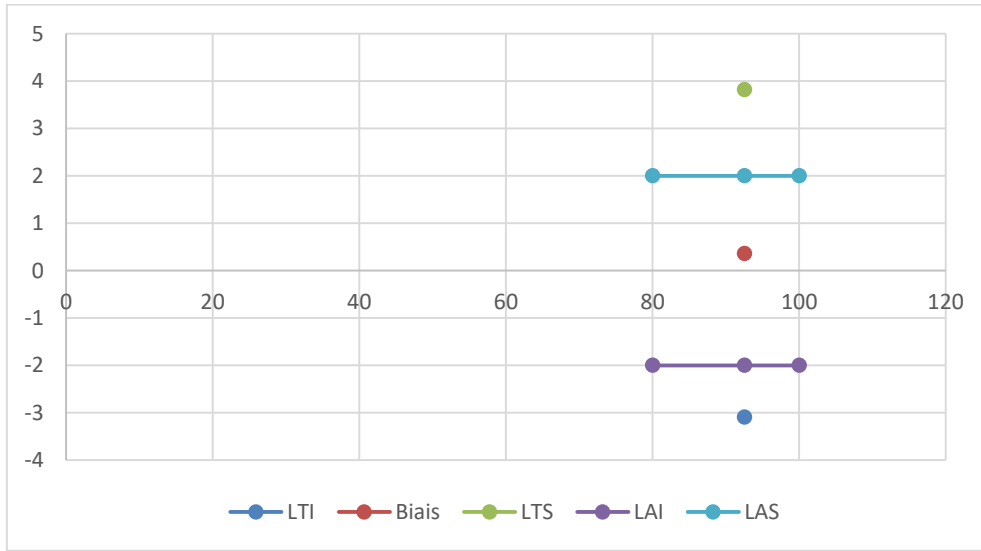
Selon le protocole de validation SFSTP 2003-2006, le profil d'exactitude s'obtient en reliant les bornes des intervalles de tolérance des différents niveaux de concentrations entre-elles.

Pour la présente étude, il n'a été possible de réaliser qu'un seul niveau de concentration, par défaut de matières premières de niveaux de concentration différents.

## DISCUSSION

Profil d'exactitude pour une limite d'acceptabilité de  $\pm 2\%$  : (Figure 8)

Figure 8 : profil d'exactitude réalisé pour une limite d'acceptabilité à  $\pm 2\%$  pour un seul niveau de concentration.



Interprétation :

Pour une limite d'acceptabilité de  $\pm 2\%$ , les limites de l'intervalle de tolérance dépassent les limites d'acceptabilité, l'exactitude de la méthode n'est donc pas vérifiée pour cet intervalle ; cela peut être dû à l'application des essais à un seul niveau de concentration ainsi qu'aux conditions de travail au niveau du laboratoire de chimie minérale (spectromètre non calibré, manque de précision du matériel utilisé, titre non précis des réactifs).

# *Conclusion*

## **Conclusion :**

La validation analytique est une étape primordiale de la mise en œuvre d'une procédure analytique, pour ce plusieurs approches ont été élaborées, dont la validation analytique par profil d'exactitude crée par le SFSTP.

A cet effet ; ce travail nous a permis de mieux comprendre la validation analytique du dosage par spectrométrie UV des chlorhydrates de Cyproheptadine par comparaison avec la titration.

En premier lieu ; nous avons effectué le dosage acido-basique des Chlorhydrates de Cyproheptadine qui a servi de méthode de référence.

En deuxième lieu ; nous avons réalisé un dosage par spectrométrie UV des Chlorhydrates de Cyproheptadine qui est la méthode à valider.

En troisième lieu ; l'établissement de l'intervalle de tolérance appariée à des limites d'acceptation nous permet de construire le profil d'exactitude. Le profil d'exactitude construit à l'issue de ce travail caractérisant la méthode n'est pas valide pour l'intervalle de concentration étudiée pour les Chlorhydrates de Cyproheptadine avec une proportion  $\beta = 90\%$  de mesure dans les limites d'acceptation  $\pm 2\%$ .



# Bibliographie

## Ouvrage et articles :

- [4] Le Coarer, J. *Chimie, le minimum à savoir (Nelle édition)*. Edp Sciences. 2012.
- [5] SKOOG.WEST.HOLLER *Chimie analytique*. Traduction et révision scientifique de la 7eme édition américaine par Claudine Buess-Herman, Josette Dauchot-Weymeers et Freddy Dumont.de boeck.2015
- [6] Chimie Analytique : chimie des solutions.
- [7] Jean-Louis Burgot. *Chimie analytique et équilibres ioniques*. LAVOISIER 2011.
- [9] Rouessac, F., & Rouessac, A.. *Analyse Chimique: Méthodes et techniques instrumentales modernes*. Dunod.8<sup>e</sup> éd.2016.
- [11] GWENOLA et JEAN-LOUIS BURGOT *Méthodes instrumentales d'analyse chimique et applications* .Lavoisier.2011.
- [12] Charlot, G. *Chimie analytique quantitative*. 1974.
- [13] Vogel-J.Mendham *Analyse chimique quantitative*. De boeck supérieur.2005.
- [14] *Pharmacopée européenne*. Tom2. 6<sup>ème</sup> édition.2008.
- [15] Landry, Y., & Gies, J. P.*Pharmacologie: des cibles vers l'indication thérapeutique*. Dunod. .2003.
- [16] *Vidal*.2013.
- [18] Exigences générales concernant la compétence des laboratoires d'étalonnages et d'essais : ISO/CEI 17025 :2005.
- [19] *SFSTP* 2003-2006.
- [20] Richard Taillet, LoicVillain, Pascal Febvre. *Dictionnaire de physique*. 2<sup>ème</sup> édition de book, 2009, page 206.
- [21] VIM collectif, JCGM 200 *vocabulaire international de métrologie\_ concepts fondamentaux et généraux et termes associés*, BIPM, 2008 page 23.
- [24] *Pharmacopée européenne*. Tom1. 6<sup>ème</sup> édition.2008.
- [25] *Pharmacopée britannique*.2008.

## Les thèses :

[1] Validation d'une méthode de dosage par profil d'exactitude de la méthode de dosage simultanée de Métronidazole et de Spiramycine par HPLC.

[2] Analyse des différentes approches de validation de méthode de dosage et proposition d'un guide de validation de méthode de dosage.

[17] Mise en œuvre du profil d'exactitude validation des méthodes d'analyse quantitative par profil d'exactitude max feinberg.

[22] Validation statistique du dosage de L'Aspirine par spectrophotométrie UV-Visible.

## Les sites Web :

[8] Observation de la zone de virage de quelques indicateurs acide-base.

[http://home.scarlet.be/at\\_home/indic-vir.htm](http://home.scarlet.be/at_home/indic-vir.htm) .21/02/2017 .18:30

[10] Principe d'un spectrophotomètre UV-visible

<https://fr.wikipedia.org/wiki/Spectrophotom%C3%A9trie> 25/02/2017.15 :21.

[23] Spatule [https://www.aucomptoirdesflacons.com/en/flacon-de-laboratoire-500-ml-gradue-en-verre-borosilicate-xml-353\\_362\\_404-1005.html](https://www.aucomptoirdesflacons.com/en/flacon-de-laboratoire-500-ml-gradue-en-verre-borosilicate-xml-353_362_404-1005.html)

28/02/2017.12:05.

[26] Spectromètre <http://www.servilab.fr/go/jenway%C2%AE/j730501.htm> 27/02/2017 .14:40.

[27] Cuves de spectrophotomètre UV en quartz. <http://www.hellopro.fr/cuves-de-spectro-uv-en-plastique-a-usage-unique-2004385-170499-produit.html>

.25/02/2017.19:15

[28] LOAI 2. <http://nguyenlieulammyphamhcm.com/dung-cu-lam-my-pham/coc-thuy-tinh-100-ml-loai-2.html>

25/02/2017.19:45.

[29] Fournitures de laboratoire. <http://www.allsciences.com/catalogue/10-multilabo/5-fournitures-de-laboratoire/135-pipettes-verre-ou-plastique-/1264-pipette-verre-graduee-zero-en-bas-classe-a-p-468018010-pipette-graduee-verre-a-boule-classe-a-zero-en-bas-2-ml-1-20.html>

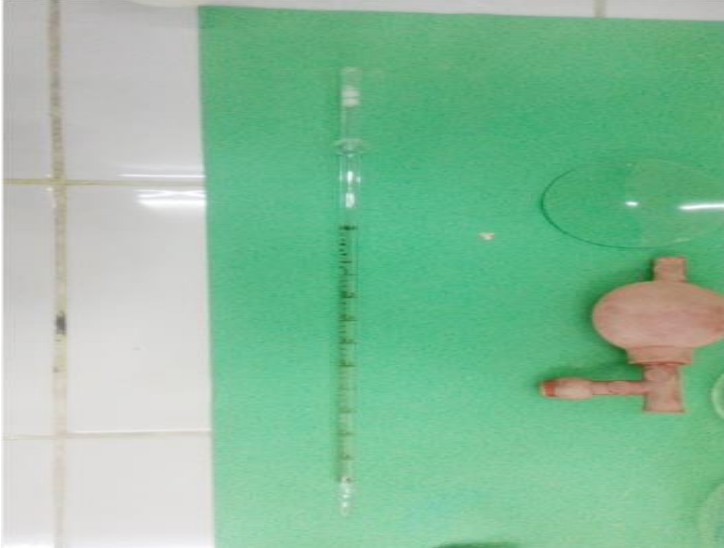
.01/03/2017.16:50.

[30] Eprouvette graduée 100ml – Forme basse- Le lot de 2 – brand

<http://www.laboandco.com/eprouvette-graduee-100-ml-forme-basse-le-lot-de-2-brand.html>

20/03/2017. 16:50 .

## Annexe



**Annexe 1 : Pipette graduée.**

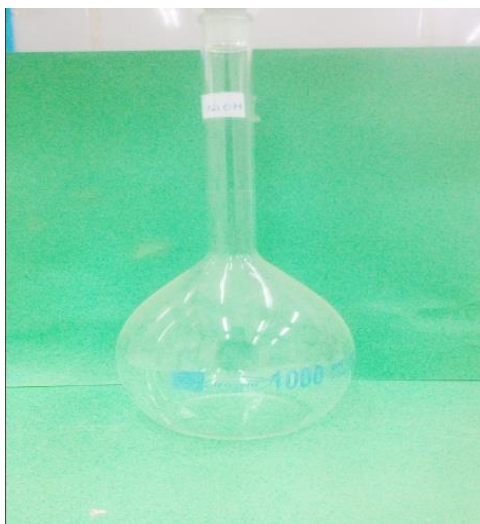


**Annexe 2 : Agitateur.**





**Annexe 3 : Spatule.**



**Annexe 4 : Fiole.**



**Annexe 5 : Bécher.**



**Annexe 6 : Spectrophotomètre.**



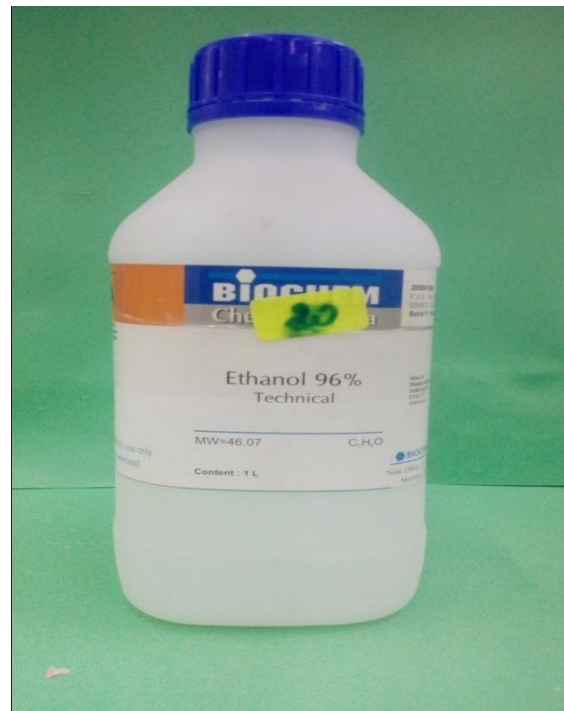
**Annexe 7 : Micropipette.**



**Annexe 8 : Pipettes.**



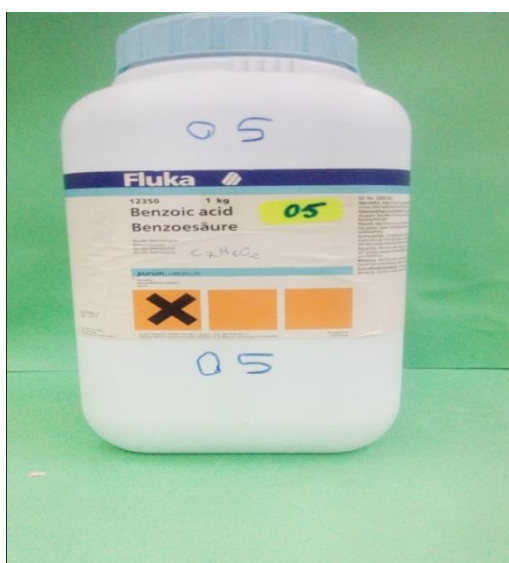
**Annexe 9 : Bécher.**



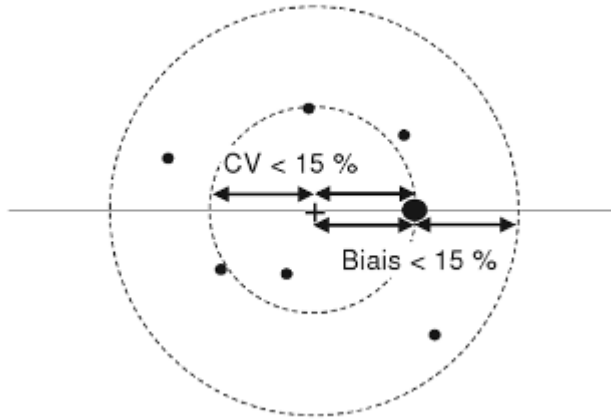
**Annexe 11 : Ethanol 96%.**



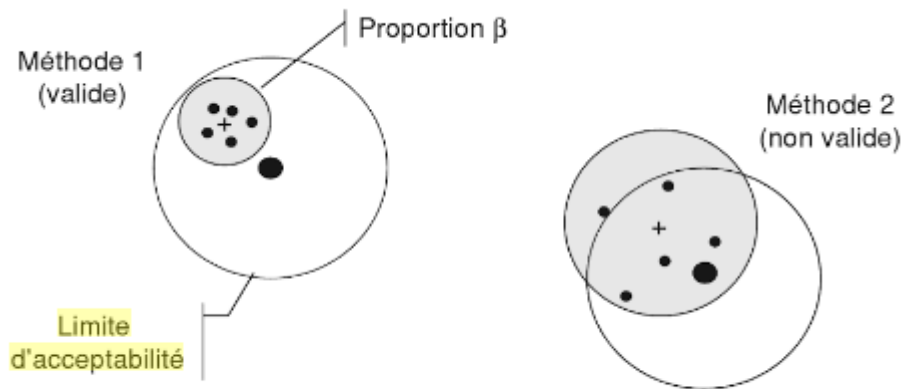
**Annexe 10 : Eprouvette.**



**Annexe 12 : Acide benzoïque.**



**Annexe 13 : Dispersion de mesures considérées comme conformes pour un CV de fidélité < 15% et un biais de justesse < 15%.**



La **limite d'acceptabilité** représente « l'emploi prévu » de la méthode.

**Annexe 14 : Les concepts de base de la validation : valeur vraie, incertitude et limite d'acceptation.**

Type d'analyse	Identification	Analyse des impuretés	Dosage - dissolution (mesure seulement) - teneur/activité
Caractéristiques		Teneur limite	
Exactitude	-	+ -	+
Précision			
Répétabilité	-	+ -	+
Précision interméd.	-	+ (1) -	+ (1)
Spécificité (2)	+	+ +	+
Limite de détection	-	- (3) +	-
Limite de dosage	-	+ -	-
Linéarité	-	+ -	+
Écart d'utilisation	-	+ -	+

**Annexe 15 :**



