

REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE.

MINISTERE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR

ET DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE

UNIVERSITE SAAD DAHLAB - BLIDA 1 -



FACULTE DE MEDECINE.

DEPARTEMENT DE PHARMACIE.

**VALIDATION D'UNE METHODE ANALYTIQUE DE
DOSAGE DE PINAVERIUM BROMURE DANS LE
PRODUIT FINI PAR HPLC UV-VIS**

Mémoire de fin d'études

Présenté en vue de l'obtention du diplôme de docteur en pharmacie

Session : Juin 2014.

Présenté par :

- ATTOUI Omar
- MENOUEUR Nassima
- ZENATI Maroua

Devant le jury :

Présidente : Dr. MEZAOUR Yacine, maitre-- assistante en biophysique pharmaceutique, Faculté de Médecine, ALGER.

Examinatrices : Dr. REGGABI Ferial, maitre- assistante en biophysique pharmaceutique, Faculté de Médecine, BLIDA

Dr. KHADER Nadia, maitre- assistante en biophysique pharmaceutique, Faculté de médecine, BLIDA

Promoteur : Dr. BENGHEZAL Islem, Maitre- assistant en biophysique pharmaceutique.

TABLE DES MATIERES

REMERCIEMENTS	IV
LISTE DES TABLEAUX	VIII
LISTE DES FIGURES	X
LISTE DES ABREVIATIONS ET DES SIMBOLES	XI
INTRODUCTION	1

PARTIE BIBLIOGRAPHIQUE

I- I. Généralités sur le pinavérium bromure :	4
I-1. Définition / Généralité sur le médicament	4
I-2. Dénomination et formule chimique	4
I-3. Propriétés physico-chimiques du pinavérium bromure	4
II. La méthode chromatographique	7
II-1. Définition	8
II-2. la classification des méthodes chromatographiques	8
III. Chromatographie liquide à haute performance (HPLC)	11
III-1. Définition et principe	12
III-2. Les grandeurs fondamentales de la chromatographie	13
III-3. Les Modes de séparation	16
III-3-1. Chromatographie d'exclusion stérique	16
III-3-2. Chromatographie d'adsorption	17
III-3-3. chromatographie de partage	17
III-3-3- a. sur phases stationnaires polaires	17
III-3-3-b. sur phases stationnaires apolaires	17
III-3-4. Chromatographie par échange d'ions	17
III-3-5. Chromatographie de paires d'ions	18
III-3-5-a. principe	18
III-3-5-b. mécanisme	18
III-3-5-c. Paramètres influençant la rétention	19
III-3-6. Chromatographie d'échange de ligands	21
III-3-7. Chromatographie par transfert de charges	21
III-4-Appareillages	21
a. Réservoir de la phase mobile	21
b. Pompe	22
c. Injecteur	22
d. colonne	22
e. Détecteurs	22
g. La phase stationnaire	23

h. La phase mobile.....	23
IV- I. Validation analytique	25
IV-1.Définition.....	26
IV-2.Objectifs.....	26
IV-3.Types de procédés analytiques à valider	26
IV-4.Référentiels réglementaires sur la validation et champs d'application	28
IV-4-1. Les référence réglementaires en vigueur de la validation	28
IV- 4-2.Champs d'application de la validation analytique	29
IV- 5.Critères prérequis	30
IV-5-1.robustesse	30
IV-5-2.stabilité des solutions	30
V-6.Critères de validation	30
V- 6-1.Spécificité /Sélectivité	30
V-6-2.Linéarité	30
V- 6-3.Fidélité	31
V- 6-3-1.Répétabilité	31
V- 6-3-2.-Reproductibilité	31
V- 6-3-3.Fidélité intermédiaire	31
V- 6-4.Exactitude	31
V- 6-5.Limite de détection	31
V- 6-6.Limite de quantification	31
V- 6-7.Intervalle de validité	32
IV-7. Étude statistique	32

PARTIE PRATIQUE

I.Validation analytique	34
I-1.Problématique	34
I-2.O BJECTIFS	34
I-3.materiels et méthode	34
I-3-1. Standard	34
I-3-2. Formule de produit fini	35
I-3-3. Équipements	35
I-3-4. Réactif	35
I-3-5. Description de la méthode analytique	36
I-3-6. Réalisation des réactifs utilisés	38
I-3-7. Réalisation des solution pour la validation	38
I-4.protocole expérimentale de de la robustesse et de la stabilité des solutions... 40	40
I-4-1. Robustesses	40
I-4-1. Stabilité des solution	41

I-5- protocole expérimentale des Paramètres de validation de la procédure analytique	41
I-5-1.Spécificité	41
I-5-2.Linéarité	41
I-5-3.Exactitude	42
I-5-4.Fidélité	42
II-rapport des criteres prérequis	43
II-1.robustesse	43
II-1.stabilité des solution	48
III-rapport de validation	49
III-1. Spécificité	49
III-2. Linéarité	55
III-3.Exactitude	70
III-4.Fidélité	74
III-5.Seuil de détection et seuil de quantification	78
III-6.Sensibilité	78
III-7.résumé du rapport de validation	78
 CONCLUSION GENERALE	80
 REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES	
 ANNEXES	

Remerciements

Nous tenons avant tout à remercier DIEU de nous avoir donné la force et la puissance à accomplir ce modeste travail.

*Notre profonde et durable gratitude et nos vifs remerciements vont tout particulièrement à notre promoteur **Dr. BENGHEZAL I**, maître-assistant en biophysique pharmaceutique à la faculté de médecine, BLIDA, qui a suivi ce travail avec un grand intérêt.*

Nos vifs remerciements vont également aux membres du jury :

*A **Dr. MEZAOUR Yacine** : Maître-assistant en biophysique pharmaceutique à la faculté de médecine, ALGER de nous avoir fait l'honneur de présider le jury de notre mémoire.*

*A **Dr. REGGABI Feriel** : Maître-assistante en biophysique pharmaceutique à la faculté de médecine, BLIDA.*

*A **Dr. KHADER Nadia** : Maître-assistante en biophysique pharmaceutique à la faculté de médecine, BLIDA.*

*pour avoir participé, avec intérêt, à nos jurys de mémoire en qualité d'examinatrices.
Nous exprimons nos profondes et respectueuses gratitude.*

*Nos remerciements tendent également à tous nos enseignants durant toutes nos années d'études pour la richesse et la qualité de leur enseignement, ainsi qu'à **Pr. BELOUNI R**, chef de département de pharmacie et à **Dr. MAHFOD M**, l'adjoint de chef de département.*

*Nous tenons à remercier **Mrs. YAHIAOUI Amar**, **BENAOUICHA Tahar** et **Mmes SLIMANI Cherifa** et **REGUIEG Hinda** de l'unité de développement à GenericLab pour leur accueil, leur aide, leur attention et leur gentillesse tout au long de la durée du stage.*

Nous remercions aussi l'ensemble du personnel de GenericLab, pour leurs conseils avisés, leur sympathie et la bonne humeur partagée.

*Et c'est avec reconnaissance que nous remercions tous ceux qui ont contribué et nous ont aidé de près ou de loin à la réalisation de ce mémoire, particulièrement **Dr. BOUCHACHIAH**, résident en chimie analytique, pour son aide, ses orientations et ses précieux conseils tout au long de l'élaboration de ce modeste travail.*

À MES CHERS PARENTS

Aucune dédicace ne saurait exprimer mon respect, mon amour éternel et ma considération pour les sacrifices que vous avez consenti pour mon instruction et mon bien être.

Je vous remercie pour tout le soutien et l'amour que vous me portez depuis mon enfance et j'espère que votre bénédiction m'accompagne toujours.

Que ce modeste travail soit l'exaucement de vos vœux tant formulés, le fruit de vos innombrables sacrifices, bien que je ne vous en acquitterai jamais assez.

Puisse ALLAH, vous accorder santé, bonheur et longue vie et faire en sorte que jamais je ne vous déçoive.

A mes chers frères

Kamel, Oussama, Ryma, Salsabile ma petite sœur que j'aime profondément.

En témoignage de mon affection fraternelle, de ma profonde tendresse et reconnaissance, je vous souhaite une vie pleine de bonheur et de succès et qu'ALLAH, le tout puissant, vous protège et vous garde.

A notre chère et dynamique frère et ami Hamza BOUCHACHIA

Un remerciement particulier et sincère pour tous vos efforts fournis. Vous avez toujours été présent. Que ce travail soit un témoignage de ma gratitude et mon profond respect.

A tous mes collègues de mon cursus d'étude depuis primaire jusqu'à ce jour.

A mes chers collègues

Rahmani, Sofiane, khaled, Mouloud, Abdellah, Noureddine, Wassim, Rafik, Abdelhak, Raouf, Tarik, Ibrahim, Akram, Fouad, Sallah, Sid Ahmed, Rydha, Mohammed, Nassima, Maroua, Maroua, Asma, Nour El Houda, Faiza....

Je ne peux trouver les mots justes et sincères pour vous exprimer mon affection et mes pensées, vous êtes pour moi des frères, sœurs et des amis sur qui je peux compter. En témoignage de l'amitié qui nous uni et des souvenirs de tous les moments que nous avons passé ensemble, je vous dédie ce travail et je vous souhaite une vie pleine de santé et de bonheur.

Omar

Dédicace

*Avec un énorme plaisir, un cœur ouvert et une immense joie,
que je dédie ce mémoire à mes chers, respectueux et magnifiques parents
qui m'ont soutenus tout au long de ma vie
ainsi à ma sœur et sa petite famille, mes frères,
mes cousins et mes cousines,
et en particulier à mes trinômes Maroua et Omar
et mes amis Nardjes, Hiba, Billel, Moussa... et à tous mes collègues de
cursus d'étude depuis le primaire jusqu'à ce jour.
A toute personne qui m'a encouragé ou aidé au long de mes études.*

Nassima

** Je dédie ce mémoire à ... **

A ma très chère mère

Tu représentes pour moi ma mère, ma sœur et mon amie, et la source de tendresse et l'exemple du dévouement qui n'a pas cessé de m'encourager et de prier pour moi.

Aucune dédicace ne saurait être assez éloquente pour exprimer ce que tu mérites pour tous les sacrifices que tu n'as cessé de me donner depuis ma naissance, durant mon enfance et même à l'âge adulte.

A mon très cher Père

Aucune dédicace ne saurait exprimer l'amour, l'estime, le dévouement et le respect que j'ai toujours eu pour vous.

Rien au monde ne vaut les efforts fournis jour et nuit pour mon éducation et mon bien être.

Ce travail est le fruit de tes sacrifices que tu as consentis pour mon éducation et ma formation.

A mon très cher frère Lotfi

Tu m'as toujours soutenu dans les moments difficiles. ton affection n'a d'égale que ta gentillesse.

Avec mon grand amour, je te dédie ce travail en te souhaitant beaucoup de Bonheur et un avenir plein de joie.

A mon très cher frère Amine, sa femme Naima,

Votre encouragement, affection et votre spontanéité de Cœur me sont très chers.

Que dieu vous protège et vous offre un avenir plein de succès, de Bonheur santé.

A tous les membres de ma famille, petits et grands

Je vous dédie ce travail en vous souhaitant tout le bonheur du monde

A mes chers amis qui ont été des sœurs Youssra, Ichtrak et Sabrina

j'n'ai jamais connu des amis comme vous

A mes cher(e)s ami(e)s

Maroua, Hiba, Nardjes, Khadidja, Billel, Amine, Moussa, Aïssa, Mohamed Badi

Je ne peux trouver les mots justes et sincères pour vous exprimer mon affection et mes pensées, vous êtes pour moi des frères, sœurs et des amis sur qui je peux compter.

En témoignage de l'amitié qui nous unit et des souvenirs de tous les moments que nous avons passé ensemble, je vous dédie ce travail et je vous souhaite une vie pleine de santé et de bonheur.

A mes chers collègues de soutenance Nassima et Omar

Je vous dédie ce travail avec mes sentiments les plus sincères, en mémoire de tous les moments agréables vécus ensemble.

Maroua

LISTE DES TABLEAUX

PARTIE BIBLIOGRAPHIQUE :

Tableau N° 01 : Chromatographie en phase gazeuse.	8
Tableau N° 02 : Chromatographie en phase liquide	9
Tableau N° 03 : Techniques chromatographiques en fonction de support de la phase stationnaire.	10
Tableau N° 04 : Principaux contre-ions utilisés en chromatographie de paires d'ions	20
Tableau N° 05 : propriétés des principaux solvants utilisés en chromatographie en phase liquide	24
Tableau N° 06 : Critères de validation en fonction de type de procédure à valider	27

PARTIE PRATIQUE :

Tableau N°01 : formule de produit fini.....	35
Tableau N°02 : plan factoriel de robustesse	40
Tableau N°03 : robustesse modification des paramètres opératoires	40
Tableau N°04 : Matrice de calcul des effets des facteurs et leur interaction sur l'Aire du pic	43
Tableau N°05 : Calcul des effets sur l'aire du pic	43
Tableau N°06 : Matrice de calcul des effets des effets des facteurs et leur interaction sur le temps de rétention	44
Tableau N°07 : Calcul des effets sur le temps de rétention	44
Tableau N°08 : Matrice de calcul des effets des facteurs et leur interaction sur le nombre de plateaux théoriques	45
Tableau N° 09 : Calcul des effets sur le nombre de plateaux théoriques.....	45
Tableau N°10 : Matrice de calcul des effets des facteurs et leur interaction sur le Facteur de symétrie	46
Tableau N°11 : Calcul des effets sur le Facteur de symétrie.....	46
Tableau N°12 : résultats de stabilité des solutions	49
Tableau N°13 :spécificité: temps de rétention de blanc, placebo et de pinavérium bromure	51
Tableau N°14 : linéarité : données brutes du principe actif seul	55
Tableau N°15 : linéarité : données brutes de forme pharmaceutique reconstitué	56
Tableau N°16 : linéarité : calcul les variance de principe actif seul	59
Tableau N°17 : linéarité : calcul les variances de forme pharmaceutique reconstituée	60
Tableau N°18 : linéarité :Test de comparaison des pentes des droites D1et D2.....	63
Tableau N°19 : linéarité :Test de comparaison des ordonnées à l'origine des droites D1et D2	64
Tableau N°20 : linéarité :Test d'Homogénéité des Variance (test de cochran) de Principe actif seul et forme pharmaceutique reconstituée	65
Tableau N°21 : linéarité :test de l'existence d'une pente significative	66
Tableau N°22 : linéarité : test de l'existence d'une pente significative principe actif seul et forme pharmaceutique reconstitué	67
Tableau N°23 : linéarité : Test de validité de la droite de régression	68

Tableau N°24 : linéarité :Tableau récapitulatif de l'étude statistique de la linéarité	69
Tableau N°25 : exactitude : les valeurs journalières de b_2	70
Tableau N°26 : exactitude : résultats de la forme pharmaceutique reconstitué	71
Tableau N°27 : exactitude : Test d'Homogénéité des Variances.....	72
Tableau N°28 : exactitude : test de validité des moyennes.....	72
Tableau N°29 : exactitude : résultat test de validité des moyennes.....	73
Tableau N°30 : fidélité : les valeurs journalières de b_2	74
Tableau N°31 : fidélité résultats de forme pharmaceutique reconstitué	75
Tableau N°32 : fidélité : test d'homogénéité des variances (test de cochran).....	76
Tableau N°33 : seuil de détection et seuil de quantification.....	78
Tableau N°34 : sensibilité.....	78
Tableau N°35 : Tableau récapitulatif des résultats de l'étude statistique de la validation ...	79

LISTE DES FIGURES

PARTIE BIBLIOGRAPHIQUE :

Figure N° 01 : Principe de fonctionnement de l'HPLC	12
Figure N° 02 : Caractéristiques d'un pic chromatographique	13
Figure N° 03 : Domaines d'application de la chromatographie liquide	16
Figure N° 04 : recouvrement des chaines alkyle par le contre-ion	18
Figure N° 05 : représentation des mécanismes de la chromatographie de paire d'ions	19

PARTIE PRATIQUE :

Figure N°01 : chromatogramme de principe actif a t_0	48
Figure N°02 : chromatogramme de principe actif a t_{12}	49
Figure N°03 : Spécificité : Chromatogrammes de (a) blanc, (b) FR, (c) PA, (d) principe actif et forme reconstitué	51
Figure N°04 : Spécificité: Dégradation alcaline de (a) PA, (b) PA+FR, (c) FR	52
Figure N°05 : Spécificité : Dégradation acide de (a) PA, (b) PA+FR, (c) FR	53
Figure N°06 : Spécificité :Dégradation oxydante de (a) PA, (b) PA+FR, (c) FR	54
Figure N°07 : linéarité principe actif seul	57
Figure N°08 : linéarité forme pharmaceutique	57
Figure N°09 : linéarité forme pharmaceutique reconstitué et principe actif seul	58

Liste des symboles

A_{ECH} : Aire du pic du pinavérium du chromatogramme de la solution essai

A_{STD} : Aire du pic du pinavérium du chromatogramme de la solution standard

a_1 : Pente de droite de régression du PA

a_2 : Pente de droite de régression du FR

α : Risque égal à 0.05 bilatéral

α : Facteur de sélectivité

b_1 : Ordonnées à l'origine de droite de régression du PA

b_2 : Ordonnées à l'origine de droite de régression du FR

β : Risque égal à 0.05 unilatéral

C^- : Contre-ion

C_m : Concentration à l'équilibre du soluté dans la phase mobile

C_s : Concentration à l'équilibre du soluté dans la phase stationnaire

C_{STD} : Concentration du standard en mg

E^+ : éluant

E : Erreur expérimentale

H : Hauteur du pic

IR : Recouvrement

N : Nombre total des essais

N : Nombre de plateaux théoriques

k : Nombre total des groupes ou des niveaux de concentration

K : Coefficient de distribution

k : Facteur de capacité

L : Erreur de la régression

L : Longueur de la colonne

- l : Volume prélevé
- PE_{ech} : Prise d'essai de l'échantillon
- PM : Masse moyenne des comprimés
- Q_i : Quantité retrouvée
- R_S : Résolution
- r : Limite de répétabilité
- r : Coefficient de corrélation
- r^2 : Coefficient détermination
- S_a^2 : Variance de la pente a
- S_b^2 : Variance de l'ordonnée à l'origine b
- S^+ : Soluté
- S_C^2 : Erreur intergroupe
- S_E : Racine carrée de la variance expérimentale
- S_E^2 : Erreur intra-groupe
- S_I : Variation due à la régression
- S_R : Variation résiduelle
- S_e^2 : Variance résiduelle
- S_j^2 : Variance de chaque niveau de concentration
- S_{max}^2 : Variance la plus élevée
- S_R^2 : Variance de répétabilité intermédiaire
- S_g^2 : Variance intergroupe
- S_r^2 : Variance de la répétabilité
- SE : Sensibilité
- V_M : Volume mort
- V_R : Volume de rétention

X_{ij} : Pesée de principe actif

\overline{X}_{ij} : Moyenne des pesées de chaque groupe

Y_{ij} : Réponse instrumentale mesurée

\overline{Y}_{ij} : Moyenne des réponses

T : Titre de pinavérium WS utilisé exprimé en fraction décimale

t_M : Temps mort

t_R : Temps de rétention

δ : Largeur du pic à mi-hauteur

ω : Largeur du pic à la base

Liste des abréviations

- AM M : Autorisation de Mise sur le Marché
- BPF : Bonnes Pratiques de Fabrication
- CEE : Certificat d'Exigence Européenne
- CES : Chromatographie d'exclusion stérique
- CF : Cochran Calculé
- CCM : Chromatographie sur Couche Mince
- CL : Chromatographie Liquide
- Cp : Comprimé
- CPG : Chromatographie en Phase Gazeuse
- CPL : Chromatographie en Phase Liquide
- CV_r : Coefficient de variation de la répétabilité
- DAE : Complexes Donneur-accepteur d'électrons
- DDL : Degré De Liberté
- DI: Diamètre Interne
- FDA: Food and Drug Administration
- FO : Fraction Organique
- FR : Forme Reconstituée
- HEPT : Hauteur Equivalente à un Plateau Théorique
- HPLC ou CLHP : Chromatographie Liquide à Haute Performance
- ICH : International Conference on Harmonization
- IR : Infra-Rouge
- Moy : Moyenne
- NF : National Formulary
- NS : Non Significatif
- PA : Principe Actif

Pop : Population

RRT : Relative Retention Time

RSD : Relative Standard Deviation

SFSTP : Société Française des Sciences et Techniques Pharmaceutiques

SCE : Somme des Carrés des Écarts

SPE : Somme des produits des Écarts

test Q : Test de Dixon

test-t : Test de Student

USP : United States Pharmacopeia

UV : Ultra-Violet

WS: Working Standard

Introduction :

Avoir les résultats attendus d'un médicament (atténuer un symptôme, soulager un mal, guérir une maladie...) est fonction de ses spécifications, de même que son inefficacité et sa toxicité, d'où l'intérêt d'effectuer une série d'analyses sur ce même médicament pour s'en assurer. Mais qui apporte-t-il la preuve sur la reproductibilité de ces méthodes d'analyses et la fiabilité de leurs résultats ?

La validation des méthodes analytiques est un concept fondamental au sein des laboratoires de contrôle qualité de l'industrie pharmaceutique. Cette étape est essentielle afin d'une part, de se conformer aux exigences réglementaires, et, d'autre part, dans une approche qualité, de développer la maîtrise des méthodes d'analyse, au quotidien.

BIBLIOPHILIQUE

Chapitre I

MEDICAMENT

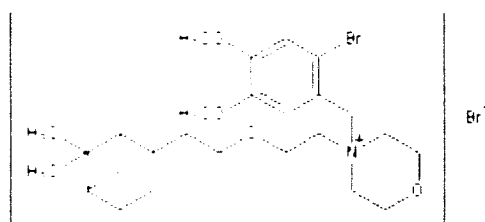
I. Généralités sur le pinavérium bromure :

I-1. Définition/Généralité sur le médicament :

Le pinavérium bromure est un spasmolytique, dont les effets s'exercent sélectivement au niveau du tube digestif. C'est un antagoniste calcique qui inhibe l'entrée du calcium au niveau de la cellule musculaire lisse intestinale.[26] Ce médicament s'utilise pour le traitement des symptômes associés au syndrome du côlon irritable. Il aide à soulager la douleur abdominale, les troubles intestinaux et la sensation d'inconfort intestinal.[27]

I-2. Dénomination et formule chimique :

Structure chimique :



[28]

Dénomination commune : pinavérium bromure

Dénomination chimique : bromure de 4-(6-bromovératryl)-4-[2-[2-(6,6-diméthyl-2-norpinyl)éthoxy]éthyle]-morpholinium.[29]

Formule brute : $C_{26}H_{14}Br_2NO_4$

I-3. propriétés physico-chimiques du pinavérium bromure:

Caractères organoleptiques : il se présente sous forme d'une fine poudre blanche, cristalline

Polymorphisme : aucune forme polymorphe n'a été observée (calorimétrie différentielle à balayage)

Distribution de la taille des particules plus de 90% des particules < 50µm

Poids moléculaire.....591,42 g/mol

L'intervalle de fusion159- 164 °C.

Pouvoir rotatoire spécifique.....-7.5° à - 6.0 °[10]

Solubilité :

- Méthanol..... très soluble
- Chloroforme.....librement soluble
- Eau distillée..... peu soluble
- Cyclohexane..... pratiquement insoluble

Absorption dans l'ultra-violet (UV) : Il possède un maximum d'absorption dans l'UV (méthanol) à 286 et 245 nm et minimum à 268 nm et 230 nm. [10]

Stabilité et réactivité :

- **Stabilité :** Stable dans les conditions de stockage recommandées (pas de condition particulières de conservation : 25°C ±2 et 60%±5 humidité relative). [10]
- **Matières incompatibles :** Incompatible avec les agents comburants.
- **Conditions à éviter :** Chaleur, flammes et étincelles, Variations extrêmes de température et lumière du jour directe.
- **Produits dangereux résultant de la décomposition :** Oxydes de carbone, Oxydes d'azote (NO_x).
- **Polymérisation dangereuse :** Aucune polymérisation dangereuse ne se produit [12]

Impuretés : [10]

- **Impureté 1 :**

Nom chimique : 2-bromo-4,5-diméthoxybenzyl alcool

Formule brute : $C_9H_{11}BrO_3$

Poids moléculaire : 247.08 g/mole

Déterminée par : HPLC

Origine : produit de dégradation principal

RRT : 0.15

- **Impureté 2 :**

Nom chimique : (2-bromo-4,5-diméthoxybenzyl)-(isopropyl)éther

Formule brute : $C_{12}H_{17}BrO_3$

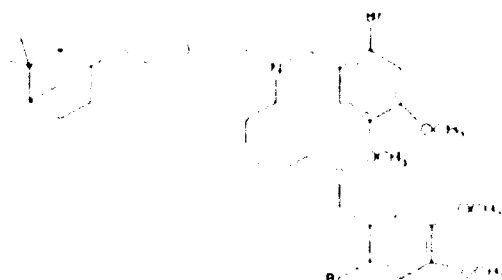
Poids moléculaire : 289 g/mole

Origine : réaction secondaire

Déterminée par : HPLC

RRT : 0.41

- impureté 3 :



Nom chimique : (2-bromo-4,5-diméthoxybenzyl)-[2-[2-(2-bromo-4,5-diméthoxybenzyloxy)éthoxy]éthyl][2-[2-(6,6-diméthylbicyclo[3,1,1]hept-2-yl)éthoxy]éthylamine]

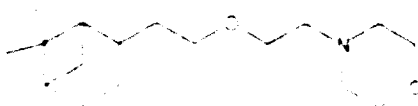
Formule brute : C₃₅H₅₁Br₂NO₇

Poids moléculaire : 757 g/mole

Origine : réaction secondaire

Déterminée par : HPLC

RRT : 1.27



- impureté 4 :

Nom chimique : N-(diméthyl-6,6-biciclo-[3,1,1]-heptan-2-éthoxyéthyl)morpholine

Formule brute : C₁₇H₃₁NO₂

Poids moléculaire : 281.43 g/mole

Déterminée par : CPG

Chapitre II
METHODE
CHROMATOGRAPHIQUE

II. La méthode chromatographique :

II-1. Définition :

Il est difficile de définir rigoureusement le terme « chromatographie » parce qu'il s'applique à une grande diversité de systèmes et de techniques. Cependant, toutes les méthodes ont en commun l'utilisation simultanée d'une phase stationnaire et d'une phase mobile. Les constituants de l'échantillon à analyser sont entraînés à travers la phase stationnaire par le flux d'une phase mobile gazeuse ou liquide, et les séparations résultent de la différence entre les vitesses de progression des diverses substances. [9]

II-2. La classification des méthodes chromatographiques :

Les méthodes chromatographiques regroupent des techniques très variées qui peuvent être classées selon les modalités suivantes :

➤ **Selon la nature des phases et les mécanismes de séparation :**

On distingue :

Tableau 1: Chromatographie en phase gazeuse.[3][11]

Chromatographie en phase gazeuse

Type	Phase stationnaire	
Gaz/Solide	Adsorption	Solide poreux.
Gaz/Liquide		Dans les colonnes remplies, solide poreux inerte enrobé de liquide.
	Partage (partition)	Dans les colonnes capillaires, paroi interne de la colonne qui sert de support.

Tableau 2 : Chromatographie en phase liquide.[3][5][11]

Chromatographie en phase liquide		
	Type	Phase stationnaire
Liquide/Solide	Adsorption	Solide poreux.
	Echange d'ions	Solide à la surface duquel se trouvent des sites ioniques qui permettent à l'aide d'un solvant approprié l'échange d'ions présents dans la phase mobile.
	Exclusion (filtration sur gel, perméation de gel)	Solide dont la dimension des pores permet la séparation des espèces selon leur taille.
Liquide/Liquide	Partage Phase normale	Solide poreux inerte enrobé de liquide (de moins en moins utilisée).
	Partage Phase inversée	Solide poreux sur lequel sont greffées des chaînes hydrocarbonées non-polaires.

➤ Selon le support ou le conditionnement de la phase stationnaire :

Tableau 3 : Techniques chromatographiques en fonction de support de la phase stationnaire.

Circulation de la phase mobile	Type de support	Dénomination de la chromatographie
	<u>Chromatographie sur papier :</u>	
Par capillarité	Papier en cellulose ou fluide supporté par le papier.	Sur papier
Par capillarité	Gel de silice ou cellulose étalé sur un support inerte.	CCM
	<u>Chromatographie sur colonne :</u>	
Par gravité	Phase stationnaire solide de granulométrie normale dans une colonne ouverte.	A pression ambiante
Sous pression	Phase stationnaire solides très fine dans une colonne fermée.	CLHP
Sous pression	Phase stationnaire solide de granulométrie normale dans une colonne fermée.	Flash

Chapitre III
CHROMATOGRAPHIE
LIQUIDE A HAUTE
PERFORMANCE

III. Chromatographie liquide à haute performance (HPLC) :

III-1. Définition et principe :

La Chromatographie en phase liquide à haute performance (HPLC) est une forme de chromatographie en phase liquide pour séparer les composés qui sont dissous dans la solution.

Le principe de séparation repose sur l'interaction des solutés entre deux phases non miscibles : la phase stationnaire qui est fixe et la phase mobile. [7]

Les composés à séparer (solutés) sont mis en solution dans un solvant. Ce mélange est introduit dans la phase mobile liquide (éluant). Suivant la nature des molécules, elles interagissent plus ou moins avec la phase stationnaire dans un tube appelé colonne chromatographique.

La phase mobile poussée par une pompe sous haute pression, parcourt le système chromatographique. En sortie de colonne, grâce à un détecteur approprié, les différents solutés sont caractérisés par un pic. L'ensemble des pics enregistrés est appelé chromatogramme.

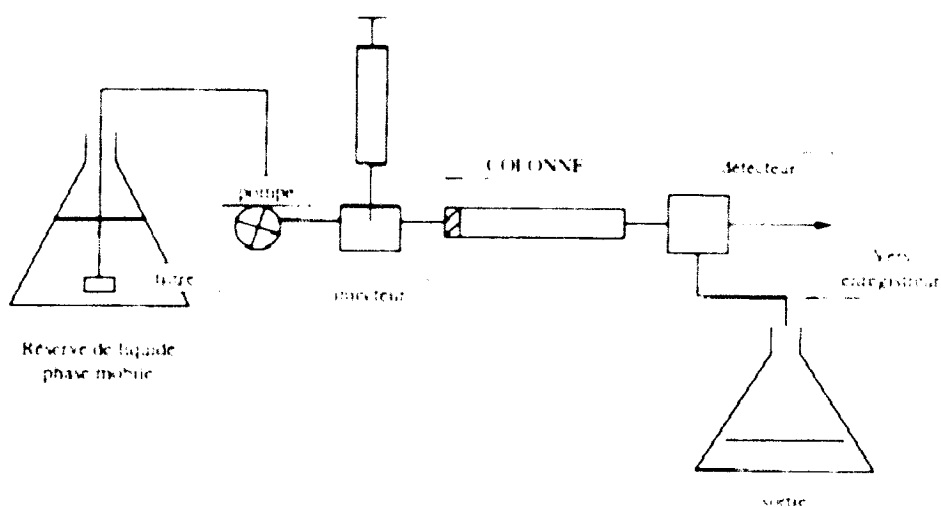


Figure 1 : Principe de fonctionnement de l'HPLC [30]

III-2. Les grandeurs fondamentales de la chromatographie :



Figure 2 : Caractéristiques d'un pic chromatographique[7]

Chromatogramme : [09]

C'est un graphique représentant le signal du détecteur correspondant à la concentration en soluté en fonction du temps (ou du volume de la phase mobile écoulée), on obtient une série formée d'autant de pics symétriques qu'il y a de composés séparés et détectés en sortie de la colonne. Il est utilisé à la fois en analyse qualitative et quantitative. Les positions des pics sur l'axe du temps permettent d'identifier les constituants de l'échantillon tandis que les aires sous les pics mesurent leur quantité.

Coefficient de distribution : [09]

Les différences de répartition d'un soluté A entre la phase mobile et la phase stationnaire sont données par l'équation :

$$A_{mobile} \rightleftharpoons A_{stationnaire}$$

La constante d'équilibre de cette réaction est appelée coefficient de distribution, et est définie par la relation :

$$k = \frac{C_s}{C_m}$$

où C_s et C_m sont les concentrations respectives, à l'équilibre, du soluté dans la phase stationnaire et la phase mobile. Idéalement, il est indépendant de la concentration du soluté.

Temps de rétention : [10]

Le temps de rétention t_R est le temps qui s'écoule entre l'injection de l'échantillon et l'apparition d'un pic de soluté sur le détecteur. Lorsque le soluté n'est pas retenu, on parle de temps mort t_M , et c'est le temps nécessaire pour qu'un soluté non retenu traverse la colonne.

Volume de rétention : [7]

V_R représente le volume de la phase mobile nécessaire pour éluer chaque composé. Les espèces non retenues apparaissent dans l'effluent après le temps mort correspondant à l'écoulement du volume de la phase mobile, dit volume mort V_M , contenu dans la colonne.

Le temps de rétention et le volume de rétention sont des grandeurs caractéristiques de chaque composé, dans des conditions et pour une colonne données.

Facteur de capacité : [10]

Le facteur de capacité k' est le rapport des quantités d'un soluté présentes à l'équilibre dans les deux volumes des phases stationnaire et mobile adjacentes. Idéalement, le facteur de capacité des analytes dans un échantillon doit être compris entre 1 et 5.

$$k' = \frac{C_s V_s}{C_m V_m} = \frac{t_R - t_M}{t_M}$$

Efficacité d'une colonne : [7]

L'efficacité d'une colonne chromatographique, dont dépend l'étalement des pics, est mesurée, pour chaque composé, par le nombre de plateaux théoriques N de la colonne.

En assimilant les pics d'élution à des courbes de Gauss, on établit que le nombre de plateaux théoriques d'une colonne s'exprime, pour un soluté donné, par les relations :

$$N = 16 \frac{t_R^2}{\omega} = 5.54 \frac{t_R^2}{\delta}$$

avec :

ω : largeur du pic à la base, définie comme la distance entre les points d'intersection des tangentes d'inflexion avec la ligne de base,

δ : largeur du pic à mi-hauteur.

Pour pouvoir comparer entre elles des colonnes de différentes longueurs, on définit la hauteur équivalente à un plateau théorique *HEPT* ou *H* :

$$H = \frac{L}{N}$$

Avec : *L* longueur de la colonne.

Le facteur de sélectivité : [09]

Le facteur de sélectivité α relatif à deux analytes, A et B, permet d'estimer jusqu'à quel point la colonne peut les séparer. Il est donné par la relation suivante :

$$\alpha = \frac{t_{R_B} - t_M}{t_{R_A} - t_M} = \frac{K'_B}{K'_A} = \frac{K_B}{K_A}$$

où l'indice B se rapportant au soluté le plus retenu et l'indice A au soluté le plus rapidement élué.

La résolution : [09]

La résolution R_S d'une colonne donne une mesure quantitative de son aptitude à séparer deux analytes. Elle est définie par :

$$R_S = 2 \frac{t_{R_B} - t_{R_A}}{\omega_A + \omega_B}$$

Une résolution de 1,5 permet la séparation pratiquement complète de A et B, le chevauchement est d'environ 0,3 %.

La relation liant la résolution d'une colonne à la sélectivité, au facteur de capacité et au nombre de plateaux théoriques est la suivante :

$$R_S = \frac{1}{4} \left(\frac{\alpha - 1}{\alpha} \right) \left(\frac{K'_B}{1 + K'_B} \right) \sqrt{N}$$

où l'indice B se rapportant au soluté le plus retenu.

III-3. Les Modes de séparation :

Plusieurs modes d'HPLC ont été développées afin de couvrir un large domaine d'application :

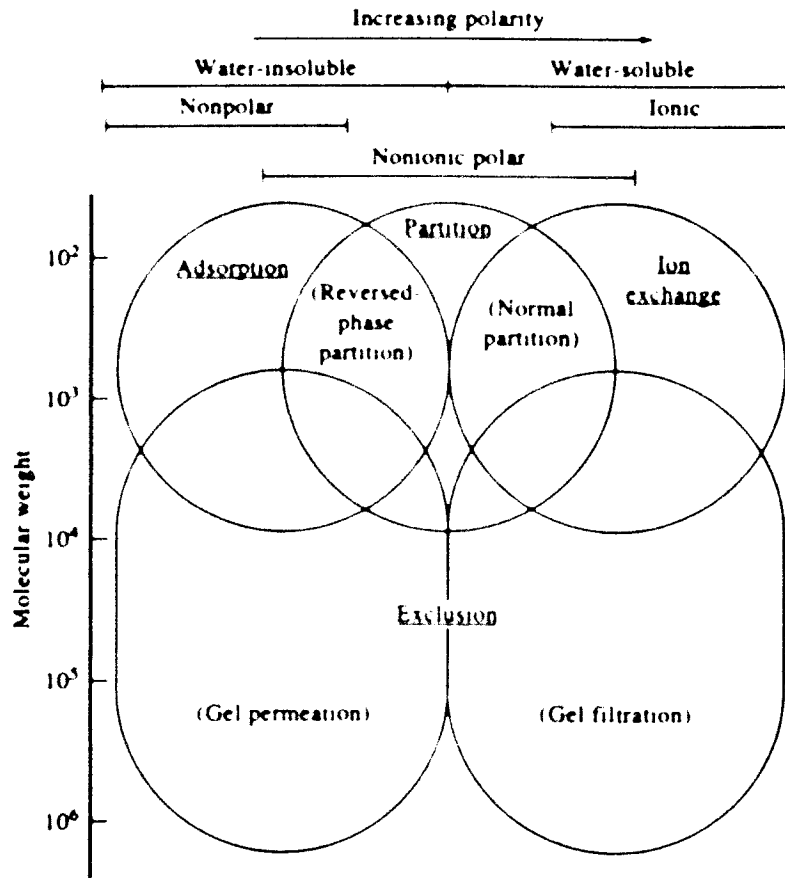


Figure 3. : Domaines d'application de la chromatographie liquide. [11]

III-3-1. Chromatographie d'exclusion stérique : [4]

La chromatographie d'exclusion stérique (CES) permet de séparer les molécules suivant de leur taille, est basée sur la différence de pénétration des molécules de l'échantillon dans la phase stationnaire, la séparation résulte de l'existence de pores dans la phase stationnaire, dont le diamètre est comparable à celui des espèces présentes lorsqu'elles sont en solution dans la phase mobile. On désigne la CES par filtration sur gel quand la phase stationnaire est hydrophile (phase mobile aqueuse) et par perméation de gel quand elle est hydrophobe (la phase mobile est un solvant organique).

III-3-2. Chromatographie d'adsorption: [22]

La chromatographie d'adsorption est basée sur le partage des solutés entre l'adsorbant solide fixe et la phase mobile. Chacun des solutés est soumis à une force de rétention par adsorption et une force d'entraînement par la phase mobile. L'équilibre qui en résulte aboutit à une migration différentielle des solutés de l'échantillon à analyser, ce qui permet leur séparation. Les séparations sont basées sur le principe de polarité, c'est-à-dire l'existence de dipôles dans une structure moléculaire.

III-3-3. Chromatographie de partage : [7]

III-3-3-a. Sur phases stationnaires polaires :

Le mécanisme de cette séparation fait intervenir une solvation des greffons polaires par le solvant le plus polaire contenu en faible quantité dans la phase mobile. Les molécules de solutés vont soit interagir avec la phase liquide polaire stationnaire, soit déplacer des molécules de celle-ci et de façon d'autant plus intense que leur polarité est plus élevée. Du fait du déplacement de l'équilibre de distribution, la rétention des solutés diminue lorsque la teneur en solvant polaire dans la phase mobile augmente.

III-3-3-b. Sur phases stationnaires apolaires :

Deux mécanismes de rétention macroscopiques ont été proposés dans le cas des silices greffées alkyle :

— le solvant organique de la phase mobile (on utilise principalement des mélanges eau-méthanol ou eau-acétonitrile) se fixe préférentiellement à la surface des greffons apolaires : il y a alors partage des solutés entre la phase mobile et la phase liquide adsorbée.

— une autre approche décrit la rétention comme une conséquence de l'effet hydrophobe.

La réalité est probablement intermédiaire entre ces deux mécanismes. Il y a effectivement solvation des chaînes alkyle par le solvant organique de la phase mobile ; les chaînes solvatées ressemblent à un liquide, assez visqueux, dans lequel les solutés peuvent diffuser.

L'importance relative de ces deux mécanismes dépend de la nature des solutés et en particulier de leur caractère hydrophobe.

III-3-4. Chromatographie par échange d'ions : [7]

Les séparations par échange d'ions s'adressent plus particulièrement aux espèces ionisées ou ionisables, encore que de nombreuses séparations de solutés non ioniques puissent également être obtenues par le partage entre les deux phases.

La phase stationnaire est un échangeur d'ions, c'est-à-dire un solide comportant des groupements fonctionnels ionisés, fixes, porteurs de charges positives ou négatives, et des ions mobiles de signe contraire assurant l'électro-neutralité. Les ions, retenus au voisinage des groupements fonctionnels par des forces d'attraction électrostatique, sont interchangeables, en nombre équivalent, avec ceux de la solution mise en contact avec l'échangeur.

Dans le même temps, les ions de même signe que les groupements fonctionnels ionisés, du fait du champ répulsif créé par la forte densité des groupements fonctionnels au sein des particules, se voient interdire l'accès à l'intérieur de celle-ci : c'est le phénomène d'exclusion d'ion.

Enfin, les molécules non soumises à des interactions électrostatiques peuvent pénétrer dans les pores des particules et donner lieu ainsi à un mécanisme de partage connu sous le nom d'équilibre de Donnan.

III-3-5. Chromatographie de paires d'ions : [7]

III-3-5-a. Principe :

La chromatographie de paires d'ions encore appelée chromatographie d'interactions d'ions met en œuvre une phase stationnaire apolaire, souvent une silice greffées alkyle (octyle ou octadécyle) et une phase mobile hydro-organique (souvent acétonitrile ou méthanol) contenant un contre-ion ; ion de charge opposée à celle des solutés et comportant une partie hydrophobe. Ce contre-ion présent de façon permanente dans la phase éluante, se fixe sur les chaînes alkyle de sorte que la phase stationnaire effective comporte des greffons recouverts par ce contre-ion.

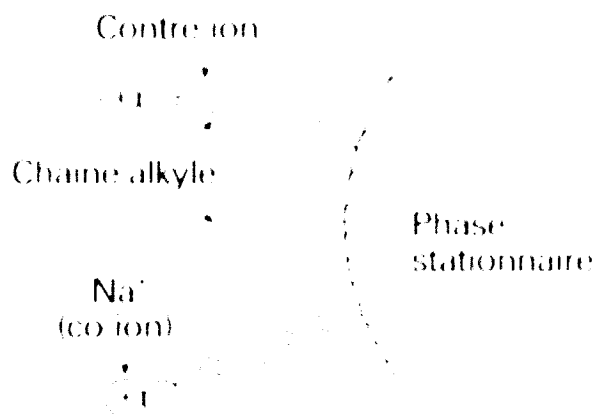


Figure 4 : recouvrement des chaînes alkyle par le contre-ion [7]

Une « paire d'ions » est l'entité formée par l'association de deux ions de charge opposée. Cette association peut être due soit à des interactions électrostatiques, soit à des effets hydrophobes. La propriété fondamentale des paires d'ions est leur aptitude à passer des solutions aqueuses aux milieux de faible constante diélectrique [7]

III-3-5-b. Mécanisme :

Compte tenu de la structure de la phase stationnaire après équilibre avec la phase éluante, deux mécanismes de rétention coexistent :

— échange d'ions avec le co-ion assurant l'électro-neutralité vis-à-vis du contre-ion fixé par effet hydrophobe à la surface des chaînes alkyle ; on génère ainsi in situ un échangeur d'ions

dont la capacité dépend de la concentration du contre-ion dans la phase éluante (on parle « d'échangeur d'ions dynamique ») ;

— partage hydrophobe, à la surface des chaînes demeurées libres, de paires d'ions formées entre les solutés qui doivent être alors suffisamment hydrophobes et les contre-ions. [7]

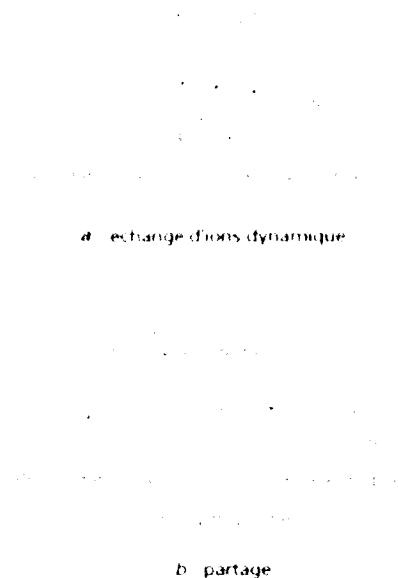


Figure 5 : représentation des mécanismes de la chromatographie de paire d'ions. [7]

III-3-5-c. Paramètres influençant la rétention : [7]

La rétention des solutés dépend de leur degré d'ionisation régit par le pH et de la capacité disponible de l'échangeur dynamique qui fait intervenir elle-même la teneur en solvant organique, la nature et la concentration du contre-ion dans la phase éluante.

- Capacité disponible de l'échangeur dynamique :

Pour une teneur fixe en solvant organique, la rétention de soluté croît avec la concentration du contre-ion dans la phase éluante : la capacité de l'échangeur d'ions dynamique croît du fait de l'augmentation du nombre de chaînes recouvertes par le contre-ion.

Pour une concentration fixe du contre-ion, la rétention diminue lorsque la teneur en solvant organique dans la phase éluante augmente : la concentration du contre-ion en phase stationnaire diminue et partant le nombre de sites échangeurs d'ions et les effets hydrophobes du partage des paires d'ions solutés-contre-ions sont également diminués du fait de la diminution de la teneur en eau de la phase éluante.

De même, la rétention des solutés augmente avec la longueur de la chaîne hydrocarbonée du contre-ion du fait de l'augmentation du caractère hydrophobe de ce dernier, ce qui est favorable à sa fixation par la phase stationnaire alkyle et à la formation de paires d'ions.

Tableau 4 : Principaux contre-ions utilisés en chromatographie de paires d'ions[7]

Anioniques	Cationiques
Alkyl- et arylsulfonates	Ammonium quaternaires
pentanesulfonate	tétraméthylammonium
hexanesulfonate	tétraéthylammonium
octanesulfonate	tétra-butylammonium
dodécanesulfonate	tétraheptylammonium
camphosulfonate	cétyltriméthylammonium(cétrimide)
naphtalènesulfonate	palmityltriméthylammonium
Alkylsulfates	Amines protonées
hexylsulfate	octylammonium
octylsulfate	trioctylammonium
décylsulfate	
dodécylsulfate	
Anions inorganiques	
trifluoroacétate	
trichloroacétate	
phosphate	
perchlorate	

- pH :

L'influence du pH de la phase éluante est importante pour les acides et les bases faibles car il régit leur degré d'ionisation.

Pour un couple HA^+/A , la forme ionique prédomine pour des valeurs de pH inférieures au pK_a du couple, on a en effet :

$$pH = pK_a + \log \frac{[A]}{[HA^+]}$$

Si $pH = pK_a - 2$, alors $[HA^+] = 100[A]$

Ainsi, la rétention augmente avec le degré d'ionisation. [7]

III-3-5-d.Application :

La chromatographie de paires d'ions est consacrée aux séparations des solutés ionisés et ionisables seuls ou en présence de solutés moléculaires dans des mélanges complexes.[7]

III-3-6. Chromatographie d'échange de ligands : [7]

Le mécanisme de la séparation est fondé sur la réaction de formation de complexes entre un soluté donneur de doublets électroniques et un cation métallique présentant des orbitales vacantes facilement accessibles du point de vue énergétique.

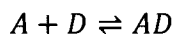
Les cations métalliques utilisés sont principalement ceux des métaux de transition : Cu^{2+} , Zn^{2+} , Cd^{2+} , Ni^{2+} qui donnent des complexes stables avec des ligands très variés.

On distingue, en chromatographie d'échange de ligands, les modes :

- statique : le cation métallique est fixé dans la phase stationnaire par des liaisons ioniques et (ou) covalentes ; les réactions de formation de complexes ont lieu dans la phase stationnaire ;
- dynamique : les réactions de formation de complexes ont lieu dans la phase mobile et la séparation est fondée sur les différences de distribution de ces complexes entre les phases mobile et stationnaire.

III-3-7. Chromatographie par transfert de charges : [7]

Certains composés sont capables de transférer un électron à une autre entité moléculaire : on les appelle donneurs d'électrons D, les composés auxquels il est possible de transférer un électron sont dits accepteurs d'électrons A. On parle de complexes donneur-accepteur d'électrons (DAE) dont la formation peut être représentée par l'équilibre :



La formation de complexes DAE peut être utilisée pour exercer une rétention en chromatographie en phase liquide. On parle de chromatographie donneur-accepteur d'électrons, Les complexes DAE peuvent être formés soit dans la phase mobile, soit dans la phase stationnaire, la formation de complexes DAE dans la phase stationnaire est la méthode la plus utilisée,

La rétention dépend de la stabilité du complexe DAE formé entre la phase stationnaire et le soluté.

III-4. Appareillages :

III-4-1. Réservoir de la phase mobile : [09]

Les appareils modernes sont équipés d'un ou plusieurs réservoirs en verre ou en acier inoxydable, contenant chacune au moins 500ml de solvant, on y adjoint souvent des dispositifs qui permettent d'en éliminer les poussières et les gaz dissous

Elle existe deux modes de travail isocratique et gradient :

- Mode isocratique : s'effectue avec un solvant de composition constante
- Mode gradient : s'effectue en modifiant la composition de solvant au cours de l'élution.

III-4-2. Pompe :

Toute installation de CLHP comporte au moins une pompe pour forcer le passage de la phase mobile à travers la colonne dont le remplissage est très compact. [4]

Les pompes requises doivent répondre à des exigences rigoureuses :

- Obtention des pressions allant jusqu'à 420 bars
- Absence de pulsation
- Débit compris entre 0,1 et 10 ml/min
- Contrôle de débit meilleur que 0,5%
- Résistance à la corrosion quel que soit le solvant [109]

III-4-3. Injecteur : [109]

- Injecteur manuel :

On injecte souvent l'échantillon à l'aide d'une seringue à travers un septum en élastomère ; toutefois cette procédure n'est pas reproductible et reste limitée aux pressions inférieures à environ 420 bars.

- Injecteur automatique :

Ces dispositifs font généralement partie intégrante de l'appareillage de HPLC moderne qui possède des boucles interchangeables permettant de choisir des volumes d'échantillon compris entre 5 et 500 μ l.

III-4-4. Colonne : [4]

La colonne se présente comme un tube, le plus souvent en acier, dont la longueur et le diamètre présentent des différences selon les modèles. Les colonnes « standard » dont le diamètre interne (DI) est d'environ 4,5 mm et la longueur de 10 cm.

La colonne est souvent précédée d'une précolonne, dite *colonne de garde*, courte (0,4 à 1 cm), remplie de la même phase stationnaire, ce qui sert à retenir certaines impuretés. On augmente ainsi la durée de vie de la colonne principale en préservant ses performances.

III-4-5. Détecteurs :

Le détecteur convertit un changement dans l'effluent de la colonne en un signal électrique qui est enregistré par le système de données. Les détecteurs sont classés comme sélective ou universelle en fonction de la propriété mesurée [4]

IL existe plusieurs détecteurs :

- Détecteur UV –Visible
- Détecteur à indice de réfraction
- Détecteur stéréochimique.
- Détecteur de radioactivité.

Le détecteur le plus utilisé en HPLC, est le spectromètre d'absorption UV-visible (190-600nm) relié à la sortie de colonne.

III-4-6. *La phase stationnaire* : [21]

En chromatographie analytique, la taille des particules constituant la phase stationnaire les plus souvent utilisées est comprise entre 3 μ m et 10 μ m, les particules peuvent être de forme sphérique ou irrégulière, et de porosité et surface spécifique variables, ces paramètres ont une influence sur le comportement chromatographique de la phase stationnaire.

De nombreux types de phases stationnaires sont utilisés en CL, notamment :

- de la silice, de l'alumine ou du graphite poreux, utilisés en chromatographie à polarité de phase normale
- des résines ou de polymères à groupement acides ou basiques, utilisés en chromatographie à échange d'ions
- de la silice ou de polymères poreux, utilisés en chromatographie d'exclusion stérique
- divers supports chimiquement modifiés, préparés à partir de polymères, de silice ou de graphite poreux, utilisés en CL à polarité de phase inversée
- phases stationnaires spéciales chimiquement modifiées, par exemple dérivés de cellulose ou d'amylose, protéines ou peptides, cyclodextrines, etc., pour la séparation des énantiomères (chromatographie chirale).

III-4-7. *La phase mobile* :

Le tableau N°5 rassemble les propriétés des solvants les plus fréquemment utilisés en CPL. Pourtant en pratique, la plupart des séparations effectuées en chromatographie d'adsorption et de partage sont réalisées avec une dizaine de solvants.

Tableau 5: Propriétés des principaux solvants utilisés en chromatographie en phase liquide [7]

Solvant	Longueur d'onde minimale (nm)	Indice de réfraction à 25° C	Température d'ébullition (°C)	Viscosité à 25° C (cP)	Solubilité dans l'eau (%)	Constante diélectrique à 25° C	n° 1 Polarité du solvant P ₁	n° 2 Pouvoir accepteur de protons K _a	n° 3 Pouvoir donneur de protons K _b	n° 4 Interactions dipôle-dipôle K _D	n° 5 Groupe de sélectivité	n° 6 t sur alumine	n° 7 t sur silica	n° 8 t sur C ₁₈ (12)
1. CO ₂ sec	210	1,257	50	0,4		1,69	< -2					0,25		
2. CO ₂ H ₂ O	210	1,275	102	0,8		1,69	< -2					-0,25		
3. CO ₂ Me ₂ S	210	1,297	174	2,6		1,6	< -2					-0,25		
4. Cyclohexane	197	1,385	99	0,47	0,011	1,84	0,1					0,01	0,02	
5. Cyclohexane	195	1,395	98	0,40	0,010	1,87	0,2					0,01	0	7,4
6. Cyclohexane	190	1,372	98	0,30	0,010	1,89	0,1					0,01	0	7,3
7. Cyclohexane	195	1,395	98	0,22	0,010	1,84	0,0					0,00	0	7,0
8. Cyclohexane	200	1,423	97	0,30	0,012	2,02	0,2					0,04		8,2
9. Cyclohexane	200	1,404	98	0,42	0,014	1,97	0,2					0,03		
10. Cyclohexane	220	1,404	98	0,42		1,4	1,0				V	0,23		
11. Dichlorométhane	265	1,457	37	0,40	0,009	2,24	1,8					0,19	0,11	8,6
12. Éthanol absolu	220	1,397	142	0,94	0,19	2,6	2,1	0,44	0,19	0,36	I	0,23		
13. Éthanol 95%	1,396	99	0,98	0,4	1,9	0,56	0,12	0,32			I	0,54		
14. Bromobenzène	1,421	98	0,28	9,4	10,0						V	0,35		5,6
15. Éthyl acétate	220	1,396	68	0,26	0,30	3,6	2,4	0,48	0,14	0,38	I	0,28	0,30	
16. Méthyl tert-butylether	315	1,359	55	0,27									0,41	
17. n-Hexane	225	1,427	199	1,3	3,9	10,3	3,4	0,56	0,18	0,25	II	0,5		10,3
18. Fluorobenzène	1,497	95	0,55	5,4	3,1	2,24	0,32	0,45			III			
19. Chlorure de méthyle	233	1,427	40	0,41	0,11	6,5	3,1	0,29	0,19	0,53	V	0,42		9,7
20. Diéthane	1,405	100	0,5	3,7	14,7	3,7	0,53	0,13	0,26		II	0,61		
21. 1,2-Dichlorobenzène	225	1,442	93	0,76	0,16	10,4	3,5	0,30	0,21	0,46	V	0,44		9,6
22. Tert-Butanol	1,385	83	3,6	insoluble	12,5	4,1	0,58	0,20	0,24		II	0,7	0,51	
23. n-Butanol	210	1,397	118	0,8	20,1	11,6	3,3	0,59	0,19	0,25	II	0,7		13,4
24. n-Propyl	240	1,395	97	1,9	insoluble	20,0	4,0	0,54	0,13	0,21	II	0,62		11,9
25. Méthylchlorure	212	1,405	69	0,46	insoluble	7,6	4,0	0,38	0,22	0,42	II	0,57	0,53	9,7
26. Propylamine	1,395	48	0,35	insoluble	5,3	4,2					I			
27. Acétate d'éthyle	265	1,370	77	0,43	insoluble	6,0	4,4	0,34	0,23	0,40	V	0,59	0,46	9,7
28. 2-Propanol	225	1,394	82	1,4	insoluble	20,0	3,3	0,55	0,13	0,27	II	0,62	0,40	11,5
29. Diméthylformamide	225	1,443	37	0,53	0,072	4,8	4,1	0,25	0,41	0,33	V	0,40	0,26	9,3
30. Méthyléthylamine	324	1,376	60	0,38	23,4	16,5	4,7	0,35	0,22	0,40	VI	0,51		9,3
31. Diméthylsulfoxyde	215	1,400	101	1,0	insoluble	30	4,9	0,33	0,24	0,40	V	0,56		10,0
32. Méthyléthylamine	210	1,400	123	1,90	insoluble	18,9	5,5	0,28	0,24	0,38	II			
33. Chlorure de propyle	1,421	240		3,1	0,31	0,27	0,42	V						13,3
34. Éthanol	210	1,359	78	1,08	insoluble	24,6	4,3	0,52	0,19	0,29	II	0,69		12,7
35. Acétate d'éthyle	1,370	77	insoluble	6,2	6,0	0,39	0,21	0,30			IV			10,1
36. Acétonitrile	190	1,347	82	0,34	insoluble	37,5	5,8	0,37	0,27	0,40	V	0,65	0,50	11,9
37. Diméthylsulfoxyde	258	1,471	189	2,90	insoluble	4,7	7,2	0,33	0,23	0,35	II	0,75		12,0
38. Méthanol	225	1,325	65	0,54	insoluble	30,7	5,1	0,48	0,22	0,37	II	0,95	0,70	14,5
39. Eau	1,333	100	0,99		78,5	72,2		0,37	0,27	0,25	VI	-0,95	-0,70	23,4

1. CO₂ sec sans trace d'eau.
 2. Unité de polarité exprimée en parts par rapport à l'hexane (100 parts) à 101,3 kPa et 25°C.

Chapitre IV

VALIDATION

ANALYTIQUE

IV-Validation analytique :

IV-1.Définition

La validation d'une méthode d'analyse est une procédure permettant d'établir, par des études expérimentales, que les critères de performance de la méthode satisfont aux exigences prévues par les applications analytiques de la méthode.[25]

Autrement dit : La validation d'une méthode est la procédure par laquelle on prouve que le protocole est suffisamment exact et fiable pour avoir confiance dans les résultats fournis et ceci pour un usage déterminé.

IV-2.Objectifs

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 [19]

IV-3.Types de procédures analytiques à valider :

La discussion sur la validation des méthodes d'analyse est dirigée vers les trois types les plus communs des procédures analytiques :

❖ Les identifications

Ont pour objet de confirmer l'identité d'une substance à analyser contenue dans un échantillon.

❖ Les essais de pureté

Peuvent être, soit des essais quantitatifs, soit des essais limites portant sur les impuretés contenues dans un échantillon.

❖ Les dosages

Ont pour objet de mesurer la quantité de substance à analyser contenue dans un échantillon donné.

Tableau 6 : Critères de validation en fonction de type de procédure à valider. [14]

Critères	Type de procédure analytique à valider				
	Identification	Test d'impuretés		Dosage	Dosage
		Dosage D'impuretés	Test limite D'impuretés	Analytique(4) (activité/ teneur)	Bio analytique
Exactitude	-	+	-	+	+
Fidélité :					
Répétabilité	-	+	-	+	+
Fidélité intermédiaire	-	+(1)	-	+(1)	+
Spécificité et/ou Sélectivité	+	+	+	+	+
Limite de Détection	-	-(3)	+	-	+
Limite de Quantification	-	+	-	-	+
Linéarité	-	+	-	+	fonction de réponse
Intervalle de validité	-	+	-	+	+
Robustesse	-(3)	-(3)	-(3)	+	+
Système de Pertinence	-	+	-	+	-

(-) Signifie que le critère n'est normalement pas évalué,

(+) Signifie que le critère est normalement évalué,

(1) Dans les cas où la reproductibilité (analyse inter-laboratoires) a été évaluée, la fidélité intermédiaire n'est pas nécessaire,

(2) Le manque de spécificité d'une procédure d'analyse pourrait être compensé par l'utilisation d'autres procédures d'analyse,

(3) Peut être nécessaire dans certains cas.

(4) Les mêmes critères sont étudiés en cas de test de dissolution.

**Dans la pratique l'ordre des critères est très important.

IV-4. Référentiels réglementaires sur la validation et champs d'application.

IV-4-1. Les Références réglementaires en vigueur de la validation :

- ❖ 2 “guidelines” ICH dédiés

Q2: «Analytical Validation»

- Q2A: «Text on Validation of Analytical Procedures»

Présente une discussion sur les caractéristiques qui doivent être prises en compte au cours de la validation des méthodes analytiques

- Q2B: «Methodology»

Son but est de fournir des conseils et recommandations sur la manière d'appréhender les différentes caractéristiques de la validation pour chaque méthode analytique. En outre, le document fournit une indication sur les données qui devraient être présentées dans un dossier d'enregistrement.

Autres guidelines ICH :

Q1 : «Stability»

- Q1A (*in revision*): «Stability Testing of New Drugs and Products»
- Q1B: «Photostability Testing»
- Q1C: «Stability Testing for New Dosage Forms»

Q3: «Impurities»

- Q3A (*in revision*): «Impurities in New Drug Substances»
- Q3B (*in revision*): «Impurities in New Drug Products»
- Q3C: «Impurities: Residual Solvents»

Q6: «Specifications»

- Q6A: «Chemical Substances with its Decision Trees»
- Q6B: «Biotechnological Substances»

- ❖ FDA «Guidance for Industry --Analytical Procedures and Methods Validation -- Chemistry, Manufacturing, and Controls Documentation» (Draft, August 2000) (2000)
- ❖ Guides Eurachem
- ❖ Normes (ISO 5725, V03 (V03--110, ...))

IV-4.2-Champs d'application de la validation analytique :

IV-4.2.1-Au niveau Européen:

La validation analytique constitue un support permanent, son exigence est avant tout une pratique réglementaire, surtout pour :

- ❖ Le dossier d'autorisation de mise sur le marché (AMM):

La note explicative III/844/87 définit le champ d'application de la validation analytique à toute procédure d'analyse utilisée dans les chapitres suivants de la documentation chimique, Pharmaceutique et biologique définis par la directive 75/318/CEE modifié, en vue de l'octroi de l'AMM d'un médicament :

- Développement galénique ;
- Contrôles en cours de fabrication ;
- Contrôle de la matière première (active ou non) ;
- Contrôle sur les produits intermédiaires de la fabrication ;
- Contrôle du produit fini ;
- Essais de la stabilité.
- ❖ Les monographies de la pharmacopée Européenne:

Elles doivent être considérées comme validées. Leurs conditions d'application peuvent faire l'objet d'une étude de validation si nécessaire.

IV-4.2.2-Au niveau Américain:

Les procédures analytiques et les normes des monographies de l'USP (United states pharmacopée) et du NF (National Formulary) constituent des références légales. Les BPF (bonnes pratiques de fabrication) (21 CFR (Federal Code of Regulations) 211.1945 (a)) recommandent que les procédures analytiques utilisées pour vérifier que les produits pharmaceutiques sont conformes aux normes établies soient suffisamment exactes et fiables.

Les utilisateurs de procédures analytiques décrites dans l'USP et le NF ne sont pas tenus de vérifier la justesse et la fiabilité de ces méthodes mais, en revanche, doivent, vérifier leur adéquation dans les conditions d'utilisation proposées.

S'il s'agit de soumettre à L'USP de nouvelles procédures d'analyse, ou des révisions de procédures déjà existantes, les dossiers de soumissions devront comporter suffisamment d'informations:

- Pour permettre au comité de révisions de l'USP d'évaluer les mérites relatifs des différentes procédures;
- Pour permettre à tout analyste de reproduire la méthode;
- Et pour permettre, dans le cas de révision de procédure, de comparer les limites de la procédure de la pharmacopée par rapport aux avantages offerts par la méthode proposée. [13]

IV-5.Critères prérequis :

IV-5-1 .Robustesse :

IV-5-1-a.Définition :

La robustesse est une mesure de la capacité de la méthode à rendre des résultats exacts et de rester non affectée par de faibles variations, délibérément introduites dans les paramètres de la méthode. Elle donne une indication de la fiabilité de la méthode dans les conditions normales d'utilisation. [14]

L'ICH recommande que l'étude de la robustesse soit réalisée pendant la phase de développement. [14]

IV-5-1-b.Intérêts de l'étude de la robustesse : [15]

- La mise en évidence des qualités de stabilité d'une procédure d'analyse en présence des changements de la matière à doser ou de faibles changements des conditions opératoires.
- La robustesse donne une aide procurée à l'analyste pour affiner un mode opératoire au niveau de certains paramètres opératoires déterminants ou pour optimiser une procédure d'analyse au cours de son développement.
- Les résultats d'exploration de la robustesse d'une procédure d'analyse, lorsqu'ils figurent dans un rapport de validation apportent une aide à l'analyste qui cherchera à valider un résultat obtenu par l'application de cette procédure ayant incidemment présenté une variation sur un paramètre opératoire.

IV-5-2. Stabilité des solutions : [24]

Stabilité de la solution du principe actif après préparation selon le protocole de la méthode, doit être évalué suivant la méthode de dosage .la plupart des laboratoires utilisent leurs HPLC en mode nuit et les échantillons seront en solution pendant des heures dans les conditions ambiantes de laboratoire avant que l'analyse soit terminée, d'où l'importance d'étudier la stabilité des solutions.

IV-6.Critères de validation :

IV-6-1.Spécificité /Sélectivité :

La spécificité d'une procédure analytique est sa capacité à établir de manière univoque l'existence de la substance à analyser en présence d'autres composants potentiellement présents.

IV-6-2.Linéarité

C'est la capacité d'une méthode d'analyse, à l'intérieur d'un certain intervalle (domaine d'utilisation), d'obtenir des résultats directement proportionnels à la quantité ou à la concentration de substance à doser.

IV-6-3.Exactitude

L'exactitude exprime l'étroitesse de l'accord entre le résultat d'essai et la valeur de référence acceptée, aussi appelée « valeur conventionnellement vraie ». L'étroitesse de l'accord ainsi observée est la résultante de la somme des erreurs systématique et aléatoire, en d'autres termes l'erreur totale liée au résultat. Par conséquent, l'exactitude est l'expression de la somme de la justesse et de la fidélité.

IV-6-4.Fidélité

La fidélité exprime l'étroitesse de l'accord entre une série de mesures provenant de multiples prises d'un même échantillon homogène dans des conditions prescrites. Elle fournit une indication sur les erreurs liées au hasard.

La fidélité peut être évaluée à trois niveaux : la répétabilité, la fidélité intermédiaire (intralaboratoire) et la reproductibilité (interlaboratoire).

IV-6-4-1.Répétabilité :

Conditions où les résultats d'essai indépendants sont obtenus par la même méthode sur des échantillons d'essai identiques dans le même laboratoire, par le même opérateur, utilisant le même équipement et pendant un court intervalle de temps.

IV-6-4-2.Fidélité intermédiaire :

Conditions où les résultats d'essai indépendants sont obtenus par la même méthode sur des échantillons d'essai identiques dans le même laboratoire, avec différents opérateurs et utilisant des équipements différents et pendant un intervalle de temps donné.

IV-6-4-3.Reproductibilité

Toutes les opérations sont refaites dans des conditions maximales de variabilité, c'est la précision de la méthode lorsqu'elle est appliquée dans des conditions différentes - généralement dans des laboratoires différents - à des échantillons distincts, théoriquement identiques, prélevés sur le même lot homogène de produit à analyser. [17]

IV-6-5.Limite de détection

Elle correspond à la plus petite quantité d'une substance à analyser dans un échantillon pouvant être détectée, mais non quantifiée comme une valeur exacte.

IV-6-6.Limite de quantification

C'est la plus petite quantité de l'analyse dans un échantillon pouvant être dosée dans les conditions expérimentales décrites avec une exactitude définie. [23]

IV-6-7. Intervalle de validité : [15]

Intervalle compris entre la concentration (quantité) la plus élevée et la plus faible de l'échantillon dans lequel il a été démontré que la méthode d'analyse présente une fidélité, une exactitude et une linéarité satisfaisante.

IV-7. Etude statistique :

a. Test de DIXON ou test Q :

Est un test utilisé pour éliminer des valeurs aberrantes d'une série de données.

b. Test de COCHRAN :

Est l'un des tests développés pour permettre d'identifier et d'étudier l'homogénéité d'une série de variances.

c. Test de FISHER ; [31]

utilisé pour tester l'égalité de deux variances, il est très sensible à la non-normalité des échantillons.

d. Test de STUDENT ou test t : [32]

Est un test statistique permettant de comparer les moyennes de deux groupes d'échantillons. Il s'agit donc de savoir si les moyennes des deux groupes sont significativement différentes au point de vue statistique.

PARTE PRACTIQUE

La partie pratique porte sur la validation d'une méthode analytique de dosage de pinavérium bromure dans le produit fini (comprimé de 100 mg) par HPLC UV-VIS. Le stage pratique, réalisé à GenericLab®, entreprise de production de produits pharmaceutiques située à la zone industrielle de Rouiba, dans le laboratoire de Développement pharmaceutique, unité de développement analytique.

I. Validation analytique :

Valider une méthode analytique de dosage de pinavérium bromure dans le produit fini, comprimé de 100 mg, par HPLC UV-VIS.

- ✓ Démontrer la robustesse, la stabilité des solutions standards de la méthode analytique développée afin de doser le pinavérium bromure dans le produit fini ;
- ✓ Valider la méthode analytique de dosage de pinavérium bromure dans le produit fini : Démontrer la spécificité, la linéarité, l'exactitude et la fidélité de la méthode, fixer ses limites de détection, limite de quantification et l'intervalle de mesure ;
- ✓ Etablir la sensibilité de la méthode.

1-3-1. Standards :

Working standard (WS): pinavérium bromure

Formule générale : $C_{26}H_{41}Br_2NO_4$

Poids moléculaire : 591,42 g/mol

Pureté minimale : 99,68%

Aspect : poudre blanche cristalline

Solubilité : soluble en acétonitrile

Date de production : Novembre 2015

Date de péremption : Novembre 2016

Numéro de lot : PNB/RS/00415

Conditions de stockage : température inférieur à 25°C

*I-3-2. Formule de produit fini :***Tableau 1 : composition unitaire de produit fini**

Nom des composants	Formule unitaire (mg/cp)
Principe actif : bromure de pinavérium	100
Excipients :	
-Cellulose microcristalline type 101	110.03
-Cellulose microcristalline type 12	111.87
- Amidon de maïs pré-gélatinisé	37.00
-Stéarate de magnésium (végétal)	3.70
- Talc	7.40
- Eau purifiée	q.s
-Agent de pelliculage	11.44
Masse théorique du comprimé pelliculé (mg)	381.44

I-3-3. Equipements :

- Fioles jaugées de 2000 ml (classe A), de 1000 ml (classe A), de 100 ml (classe A), 50ml (classe A)
- Epruvette graduée de 1000 ml (classe A)
- Pipette jaugée de 1 ml (classe A)
- Filtre seringue en nylon de diamètre 25 mm et de porosité 0,45 µm
- Filtre membrane nylon de diamètre 47 mm et de porosité 0.2 µm (phase mobile)
- Dispositif de filtration
- Balance analytique
- pH mètre
- Appareil de Sonication
- Purificateur d'Eau.
- Appareil HPLC : Alliance Waters e2695, détecteur UV-VIS 2489
- Outils statistique : Excel

I-3-4. Réactifs :

Acétonitrile : Date de péremption : 30/08/2018, Qualité : UV, IR, HPLC, ACS, Fournisseur : **ApplichemPanec ITW companies**, Lot : 0000514642

Sodium dodécyl sulfate : Date d'ouverture : 07/10/2015, Date de péremption : 31/07/2020, Fournisseur : **Sigma-Aldrich**, N° lot : BCBL8758V

Tétrabutyl ammonium hydrogénosulfate : Date de péremption : 04/11/2018, N° lot : BCBJ4810V

Acide sulfurique 95% : Date de péremption : 16/07/2016, Fournisseur : **VWR prolabo Chemical**

Hydroxyde de sodium : Date d'ouverture : 14/06/2014, Date de péremption : 26/05/2017, Fournisseur :Sigma-Aldrich, N° lot : S7BC1660V

Acide chlorhydrique 37% : Date de péremption : 06/2018, Fournisseur : VWR prolabo chemical, N° lot : 135240516

Eau distillée.

*1-3-5.*Description de la méthode analytique :

Dosage de pinavérium bromure dans le produit fini :

Matériel :

- Fioles jaugées 50ml, 100 ml
- Pipettes jaugées 1ml
- Filtre seringue en nylon 0.45µm

Réactif :

- Sodium dodécyl sulfate R
- Tétrabutylammoniumhydrogenosulfate R
- H₂SO₄
- NaOH
- Acétonitrile qualité HPLC
- Eau R

Equipement :

- Balance analytique
- Appareil de Sonication
- Alliance waters e 2695, détecteur UV-VIS 2489 ou équivalent

Préparation de la solution standard :

Dans une fiole jaugée de 50 ml, dissoudre 25mg de pinavérium bromure exactement pesés dans la phase mobile et compléter au trait de jauge à l'aide du même solvant. Prélever 1ml de la solution obtenue, l'introduire dans une fiole de 100ml et compléter au trait de jauge avec la phase mobile. La solution diluée est filtrée sur filtre seringue en nylon de diamètre 25 mm et de porosité 0,45 µm.

Préparation de l'échantillon :

Prélever 10 unités, peser, déterminer la masse moyenne, broyer, et transférer l'équivalent de la moitié de la masse moyenne dans une fiole de 100ml, dissoudre et compléter avec la phase mobile. Prélever 1ml de la solution obtenue, l'introduire dans une fiole jaugée de 100ml puis compléter au trait de jauge avec la phase mobile. La solution diluée est filtrée sur filtre seringue en nylon de diamètre 25 mm et de porosité 0,45 µm.

Conditions chromatographiques :

Colonne : C18, 150 x 4.6, 5µm

Débit : 1ml/min

Longueur d'onde : 210 nm

Volume d'injection : 20 µl

Phase mobile : Tampon pH 3,3/Acétonitrile (380/620)

➤ Tampon pH 3.3 :

- Sodium dodécyl sulfate R2.88g
- Tétrabutylammoniumhydrogenosulfate R.....0.68g
- Eau R.....900ml
- H₂SO₄ 10% (v/v).....20ml
- Ajuster le pH à 3.3 avec NaOH
- Eau distillée.....qsp 1000ml

Système suitability :

Le RSD de cinq injections consécutives de la solution standard est inférieur à 2 %

Formule de calcul :

$$\frac{A_{ECH} \times C_{STD} \times T \times 100 \times 100 \times PM}{A_{STD} \times l \times PE_{ech}}$$

- C_{STD} : concentration du standard en mg
- A_{ECH} : aire du pic du pinavérium du chromatogramme de la solution essai
- A_{STD} : aire du pic du pinavérium du chromatogramme de la solution standard
- PE_{ech} : prise d'essai de l'échantillon
- 100 : volume de dilution
- 100:volume de dilution
- T : titre de pinavérium WS utilisé exprimé en fraction décimale
- l : volume prélevé
- PM : masse moyenne des comprimés

Critères d'acceptation :

L'essai est satisfaisant si le dosage du principe actif est entre 95.0mg et 105.0mg par comprimé

Le temps de rétention de la solution essai est semblable à celui du standard.

1-3-6. Réalisations des réactifs utilisés :

- Préparation de la solution de l'acide sulfurique à 10% :

Prélever 10 ml de l'acide sulfurique pur, les mettre dans une fiole jaugée de 100 ml contenant un peu d'eau purifiée, laissé refroidir et compléter par le même solvant au trait de jauge.

- Préparation de la solution de l'hydroxyde de sodium 1N :

Dans une fiole jaugée de 1000 ml, dissoudre 42 g d'hydroxyde de sodium dans l'eau exempté de dioxyde de carbone, laisser refroidir et compléter à 1000 ml avec le même solvant.

- Préparation de la solution de l'acide chlorhydrique 1N :

Prélever 8,5 ml de l'acide chlorhydrique, les mettre dans une fiole jaugée de 100 ml contenant un peu d'eau purifiée et compléter par le même solvant au trait de jauge.

- Préparation de la phase mobile :

Acétonitrile 620 ml

Tampon pH 3.3380 ml

Tampon pH 3.3 :

- Sodium dodécyl sulfate R 2.88g
- Tétrabutyl ammonium hydrogénosulfate R 0.68 g
- Eau distillée 900 ml
- H₂SO₄ à 10 % (v/v)..... 20 ml
- Ajuster le pH à 3.3 avec NaOH
- Eau distillée qsp 1000 ml

Filtrer la phase mobile sur filtre membrane nylon de diamètre 47 mm et de porosité 0.2 µm.

1-3-7. Réalisations des solutions pour la validation

- Préparation de la solution standard :

Dans une fiole jaugée de 50 ml (classe A), dissoudre une masse de 25 mg de pinavérium bromure exactement pesée dans la phase mobile, soniquer et compléter au trait de jauge à l'aide du même solvant.

Prélever 1.0 ml de la solution obtenue, l'introduire dans une fiole jaugée de 100 ml (classe A) et compléter au trait de jauge avec la phase mobile.

La solution diluée est filtrée sur filtre seringue en nylon de diamètre 25 mm et de porosité 0,45 µm.

- **Préparation de la solution de la forme reconstituée :**

Peser exactement 1100.3 mg de cellulose microcristalline type 101, 1118.7 mg de cellulose microcristalline type 12, 370.0 mg d'amidon pré-gélatinisé, 37.0 mg de stéarate de magnésium (végétal), 74.0 mg de talc, 114.4 mg de l'agent de pelliculage utilisé. Les transférer dans une fiole jaugée de 2000 ml, les dissoudre avec la phase mobile et compléter au trait de jauge avec le même solvant.

Prélever 1.0 ml de la solution ainsi préparée, l'introduire dans une fiole jaugée de 100 ml et compléter avec la phase mobile au trait de jauge.

Filtrer sur filtre seringue en nylon de diamètre 25 mm et de porosité 0,45 µm.

- **Préparation de la solution contenant la forme reconstituée et le pinavérium bromure :**

Prélever 1.0 ml de la solution qui a servi à la préparation de la solution standard (avant dilution) et 1.0 ml de la solution qui a servi à la préparation de la solution placebo. Les introduire dans une fiole jaugée de 100 ml et compléter au trait de jauge avec la phase mobile.

Filtrer sur filtre seringue en nylon de diamètre 25 mm et de porosité 0,45 µm.

- **Préparation des solutions des produits de dégradation (dégradation forcée):**

Préparer des solutions dans trois milieux de dégradation :

- Alcalin : NaOH 1N pendant 6h à température ambiante
- Acide : HCl 1N pendant 6h à température ambiante
- Oxydant : H₂O₂ pendant 6h à température ambiante

Préparation des solutions :

- Solution essai de pinavérium bromure :

Dans une fiole jaugée de 25 ml (classe A), dissoudre 25 mg de pinavérium bromure exactement pesés dans 5 ml de milieu de dégradation. Laisser la solution au repos suivant les conditions et le temps de dégradation décrits, et compléter au trait de jauge avec la phase mobile.

La solution est filtrée sur filtre seringue en nylon de diamètre 25 mm et de porosité 0,45 µm.

- Solution essai de la forme reconstituée :

Dans une fiole jaugée de 25 ml (classe A), dissoudre 70.36 mg (l'équivalent d'un quart d'un comprimé de 100 mg de pinavérium bromure) de la forme reconstituée exactement pesés dans 5 ml de milieu de dégradation. Laisser la solution au repos suivant les conditions et le temps de dégradation décrits, et compléter au trait de jauge avec la phase mobile.

La solution est filtrée sur filtre seringue en nylon de diamètre 25 mm et de porosité 0,45 µm.

- Solution essai de la forme reconstituée et le pinavérium bromure :

Dans une fiolejaugée de 25 ml (classe A), dissoudre 25 mg de pinavérium bromure et 70.36 mg de la forme reconstituée exactement pesés dans 5 ml de milieu de dégradation. Laisser la solution au repos suivant les conditions et le temps de dégradation décrits, et compléter au trait de jauge avec la phase mobile.

La solution est filtrée sur filtre seringue en Nylon de diamètre 25 mm et de porosité 0,45 μm .

I-4. Protocole expérimentale de la robustesse et de la stabilité des solutions :

I-4-1. Robustesse :

Les paramètres opératoires à étudier et leurs niveaux

Facteur A : la teneur en pinavérium bromure : 25 mg \pm 1,25 mg (\pm 5%)

Facteur B : le pH : 3.3 \pm 0.1

Facteur C : la fraction organique de la phase mobile 620ml \pm 20ml (\pm 2%)

➤ Les tests sont effectués selon le plan factoriel complet 2^3 suivant le tableau suivant :

Tableau 2 : plan factoriel de robustesse

Essai	La teneur en PA A	pH B	La fraction Organique C	Interact AB	Interact AC	Interact BC	Interact ABC	La moyenne
1	-1(23,75)	-1(3,2)	-1(600)	+1	+1	+1	-1	+1
2	+1(26,25)	-1(3,2)	-1(600)	-1	-1	+1	+1	+1
3	-1(23,75)	+1(3,2)	-1(600)	-1	+1	-1	+1	+1
4	+1(26,25)	+1(3,2)	-1(600)	+1	-1	-1	-1	+1
5	-1(23,75)	-1(3,4)	+1(640)	+1	-1	-1	+1	+1
6	+1(26,25)	-1(3,4)	+1(640)	-1	+1	-1	-1	+1
7	-1(23,75)	+1(3,4)	+1(640)	-1	-1	+1	-1	+1
8	+1(26,25)	+1(3,4)	+1(640)	+1	+1	+1	+1	+1

-1 et +1 représentent le niveau bas et le niveau haut de chaque facteur par rapport à sa valeur nominale.

Tableau 3 : robustesse : modification des paramètres opératoires

	Teneur en PA	pH	Fraction organique
Niveau bas -1	23,75	3,2	600ml
Niveau haut +1	26,25	3,4	640 ml

Préparation des solutions standards :

La préparation des solutions est décrite dans 'Matériel et Méthode, Réalisation des solutions pour la validation'. Préparation de la solution standard à 23.75 mg de bromure de pinavérium représentant le niveau bas, et à 26.25mg représentant le niveau haut.

Préparation de tampon :

La préparation de tampon est décrite dans 'Matériel et Méthode, Réalisation des réactifs utilisés, Préparation de la phase mobile'. Une aliquote ajustée à pH= 3.2 et l'autre à pH= 3.4

1-4-2. Stabilité des solutions

Préparer une solution standard à 100%, la préparation est décrite dans 'Matériel et Méthode, Réalisation des solutions pour la validation'. L'étudier, dans les conditions ambiantes, sur deux aliquotes, sur un intervalle de 12 heures (t_0 et t_{12}).

1-5-1. Spécificité :

Préparer les solutions suivantes (cf. Matériel et Méthode, Réalisation des solutions pour la validation) :

- Préparation de la solution standard (principe actif seul)
- Préparation de la solution de la forme reconstituée seule FR
- Préparation de la solution contenant la forme reconstituée et le pinavérium bromure
- Préparation des solutions contenant les produits de dégradation (obtenus lors de la dégradation forcée)
- Préparation de phase mobile (le blanc)

1-5-2. Linéarité :

La linéarité est étudiée sur un intervalle de mesure couvert par une série de cinq concentrations régulièrement espacées, allant de 80 % à 120 % de la concentration théorique (0.005mg/ml).

L'étude de la linéarité est réalisée : sur le Principe Actif seul : PA et sur la Forme Reconstituée : FR.

Préparer pour le PA et la FR, cinq échantillons de concentration x_i contenant respectivement environ 20, 22.5, 25, 27.5, 30 mg du pinavérium bromure et les analyser suivant la méthode analytique de dosage. Cette opération est répétée deux autres fois à raison d'une fois par jour.

a. Principe actif seul :

Les pesées sont 20, 22.5, 25, 27.5, 30 mg de pinavérium bromure, Les transférer dans une fiole jaugée de 50 ml, les solubiliser avec la phase mobile, soniquer et compléter au trait de jauge avec le même solvant.

Prélever 1.0 ml de la solution ainsi préparée, l'introduire dans une fiole jaugée de 100 ml et

compléter avec la phase mobile au trait de jauge.

Filtrer sur filtre seringue cellulose régénérée de porosité 0.45 µm.

b. *Forme reconstituée + Principe actif*

Peser exactement 1100.3 mg de cellulose microcristalline type 101, 1118.7 mg de cellulose microcristalline type 12, 370.0 mg d'amidon pré-gélatinisé, 37.0 mg de stéarate de magnésium (végétal), 74.0 mg de talc, 114.4 mg de l'agent de pelliculage utilisé.

Les transférer dans une fiole jaugée de 2000 ml, les dissoudre avec la phase mobile et compléter au trait de jauge avec le même solvant.

Prélever 1.0 ml de la solution ainsi préparée et 1.0 ml de la solution du principe actif seul, les introduire dans une fiole jaugée de 100 ml compléter avec la phase mobile au trait de jauge.

Filtrer sur filtre seringue en nylon de diamètre 25 mm et de porosité 0,45 µm.

1-5-3. Exactitude :

L'étude de l'exactitude est réalisée sur la FR en se servant comme système de référence l'étalon à 100%. Le même protocole expérimental réalisé pour l'étude de la linéarité pour la FR est utilisé pour l'étude de l'exactitude : Cinq échantillons de la FR contenant respectivement environ 20, 22.5, 25, 27.5, 30 mg de pinavérium bromure, cette opération est répétée deux autres fois à raison d'une fois par jour.

1-5-4. Fidélité :

Effectuer le dosage de 6 échantillons /jours pendant 3 jours de la forme reconstituée à 100% de pinavérium bromure (cf. préparation des solutions) répondant aux conditions de répétabilité (même laboratoire, même opérateur, même équipement et même jour) et de répétabilité intermédiaire (jour différent), on aura donc 3 groupes de 7 essais (on ajoute la valeur 100 % obtenue lors de l'étude de linéarité).

II. Rapport :

II-1 .Robustesse :

Tableau 4 : Matrice de calcul des effets des facteurs et leurs interactions sur l'Aire du pic

N° essai	Réponse : Aire du pic	FACTEUR			INTERACTION			
		Teneur (-1) => 23,75 (+1) => 26,25	pH (-1) => 3,2 (+1) => 3,4	FO (-1) => 600 (+1) => 640	Teneur / pH	Teneur / FO	pH / FO	Teneur / pH / FO
		A	B	C	AB	AC	BC	ABC
1	324736	-1	-1	-1	1	1	1	-1
2	394715	1	-1	-1	-1	-1	1	1
3	328934	-1	1	-1	-1	1	-1	-1
4	386789	1	1	-1	1	-1	-1	1
5	346556	-1	-1	1	1	-1	-1	1
6	434999	1	-1	1	-1	1	-1	-1
7	336325	-1	1	1	-1	-1	1	-1
8	411941	1	1	1	1	1	1	1
Moyenne		36486,62	-4627,5	11830,85	-3118,5	4528,15	-3695,5	-87,875
Effet			NS	NS	NS	NS	NS	NS

Tableau 5 : Calcul des effets sur l'aire du pic

Avec :

Ecart type pop	41905,28996
Ecart type moy	14815,75735
t° (0,05, 7)	2,365

Avec :

$$\sigma(E) = \frac{1}{\sqrt{n}} \sigma(y)$$

$\sigma(y)$: L'écart type de la population

A	36486,625	± 14815,757
B	-4627,125	± 14815,757
C	11830,875	± 14815,757
AB	-3118,875	± 14815,757
AC	4528,125	± 14815,757
BC	-3695,125	± 14815,757
ABC	-87,875	± 14815,757

Tableau 6 : Matrice de calcul des effets des facteurs et leurs interactions sur le temps de rétention

N° essai	Réponse : temps de rétention	FACTEUR			INTERACTION			
		Teneur (-1) => 23,75 (+1) => 26,25	pH (-1) => 3,2 (+1) => 3,4	FO (-1) => 600 (+1) => 640	Teneur / pH	Teneur /FO	pH / FO	Teneur / pH / FO
		A	B	C	AB	AC	BC	ABC
1	17.266	-1	-1	-1	1	1	1	-1
2	17.239	1	-1	-1	-1	-1	1	1
3	17.021	-1	1	-1	-1	1	-1	-1
4	17.015	1	1	-1	1	-1	-1	1
5	11.363	-1	-1	1	1	-1	-1	1
6	11.331	1	-1	1	-1	1	-1	-1
7	11.231	-1	1	1	-1	-1	1	-1
8	11.216	1	1	1	1	1	1	1
Moyenne		-0,028625	-0,06085	-2,943625	-0,0235	0,01685	-0,00085	0,0285
Effet		NS	NS		NS	NS	NS	NS

Tableau 7 : Calcul des effets sur le temps de rétention

Avec :

Ecart type pop	3,147987994
Ecart type moy	1,11298182
$t^{\circ}(0,05, 7)$	2,365

A	-0,028625	±1,11298182
B	-0,060875	±1,11298182
C	-2,943625	±1,11298182
AB	-0,023875	±1,11298182
AC	0,016875	±1,11298182
BC	-0,000875	±1,11298182
ABC	0,028125	±1,11298182

Tableau 8 : Matrice de calcul des effets des facteurs et leurs interactions sur le nombre de plateaux théoriques

N° essai	Réponse: N	FACTEUR			INTERACTION			
		Teneur (-1) => 23,75 (+1) => 26,25	pH (-1) => 3,2 (+1) => 3,4	FO (-1) => 600 (+1) => 640	Teneur / pH	Teneur / FO	pH / FO	Teneur / pH / FO
		A	B	C	AB	AC	BC	ABC
1	7852319	-1	-1	-1	1	1	1	-1
2	6768147	1	-1	-1	-1	-1	1	1
3	6348587	-1	1	-1	-1	1	-1	-1
4	6509281	1	1	-1	1	-1	-1	1
5	5089454	-1	-1	1	1	-1	-1	1
6	3682522	1	-1	1	-1	1	-1	-1
7	6149098	-1	1	1	-1	-1	1	-1
8	5730238	1	1	1	1	1	1	1
Moyenne		-0,3436	0,1080	-0,85337	0,279118	-0,11278	0,608743 8	-0,032098
Effet		NS	NS		NS	NS		NS

Avec :

Tableau 9 : Calcul des effets sur le nombre de plateaux théoriques

Ecart type pop	1,236048583
Ecart type moy	0,437009167
t°(0,05 , 7)	2,365

A	-0,343657873 ±0,437009167
B	0,108094373 ±0,437009167
C	-0,853378628 ±0,437009167
AB	0,279118128 ±0,437009167
AC	-0,11278373 ±0,437009167
BC	0,608743873 ±0,437009167
ABC	-0,032098372 ±0,437009167

Tableau 10 : Matrice de calcul des effets des facteurs et leurs interactions sur le facteur de symétrie

N° essai	Réponse : Facteur de symétrie	FACTEUR			INTERACTION			
		Teneur (-1) => 23,75 (+1) => 26,25	pH (-1) => 3,2 (+1) => 3,4	FO (-1) => 600 (+1) => 640	Teneur / pH	Teneur / FO	pH / FO	Teneur / pH / FO
		A	B	C	AB	AC	BC	ABC
1	1,217870	-1	-1	-1	1	1	1	-1
2	1,211156	1	-1	-1	-1	-1	1	1
3	1,245796	-1	1	-1	-1	1	-1	-1
4	1,209492	1	1	-1	1	-1	-1	1
5	1,266577	-1	-1	1	1	-1	-1	1
6	1,370517	1	-1	1	-1	1	-1	-1
7	1,190588	-1	1	1	-1	-1	1	-1
8	1,254712	1	1	1	1	1	1	1
Moyenne		0,015680	-0,02064	0,02471	-0,0087	0,02643	-0,0272	-0,0013
Effet		NS			NS			NS

Avec :

Tableau 11 : Calcul des effets sur le facteur de symétrie

Ecart type pop	0,056563368
Ecart type moy	0,019998171
t°(0,05 , 7)	2,365

A	0,01568075 ±0,019998171
B	-0,0206415 ±0,019998171
C	0,02471 ±0,019998171
AB	-0,00872575 ±0,019998171
AC	0,02643525 ±0,019998171
BC	-0,027207 ±0,019998171
ABC	-0,00132825 ±0,019998171

Interprétation :

D'après les tableaux ci-dessus :

- La surface de pic :

Les facteurs influençant :

- Une modification de $\pm 5\%$ de la teneur en pinavérium bromure influence significativement les valeurs de surface de pic de principe actif.

Les facteurs non influençant :

- Les effets d'une modification de $\pm 0,1$ et de $\pm 2\%$ de pH est de la fraction organique respectivement et les interactions entre les trois facteurs sont inférieures à l'erreur expérimentale donc n'ont aucune influence sur la surface des pics

- Le temps de rétention :

Les facteurs influençant :

- Une modification de $\pm 2\%$ de la fraction organique entraîne une modification importante des valeurs de temps de rétention de principe actif.

Les facteurs non influençant :

- Les effets d'une modification de $\pm 0,1$ et de $\pm 5\%$ de pH et de la teneur en pinavérium bromure respectivement et les interactions entre les trois facteurs sont inférieures à l'erreur expérimentale donc n'ont aucune influence sur le temps de rétention de PA.

- Le nombre de plateaux théoriques :

Les facteurs influençant :

- Une modification de $\pm 2\%$ de la fraction organique et l'interaction entre le pH et la fraction organique influencent significativement les valeurs de nombre de plateaux théoriques de principe actif.

Les facteurs non influençant :

- Les effets d'une modification de $\pm 0,1$ et de $\pm 5\%$ de pH et de la teneur en pinavérium bromure respectivement et les interactions entre les trois facteurs sauf l'interaction entre le pH et la fraction organique, sont inférieures à l'erreur expérimentale, donc n'ont aucune influence sur le nombre de plateaux théoriques de principe actif.

- Le Facteur de symétrie :

Les facteurs influençant :

- Une modification de $\pm 0,1$ et de $\pm 2\%$ de pH et de la fraction organique respectivement, influence significativement les valeurs du facteur de symétrie de principe actif.

- les interactions entre la teneur en PA et la fraction organique, et entre le pH et la fraction organique influencent significativement les valeurs du facteur de symétrie de principe actif.

Les facteurs non influençant :

- Une modification de $\pm 5\%$ de la teneur en pinavérium bromure et les interactions entre la teneur en PA et le pH et les interactions entre les trois facteurs au même temps n'ont aucune influence sur le facteur de symétrie de PA.

Conclusion :

Les surfaces des courbes sont influencées par la teneur en PA, ce qui est normal, vu que les surfaces des courbes reflètent les teneurs.

La modification de la fraction organique, entraîne des variations significatives du temps de rétention, donc il faut préparer la phase mobile avec soin.

Les variations, entraînées par les facteurs et les interactions des facteurs mentionnés ci-dessus, du nombre de plateaux théoriques et du facteur de symétrie, restent toujours dans les normes.

II-2. Stabilité des solutions :

Sur une solution de principe actif seul on a effectué 2 injections à 2 temps différents : $t = 0$ et $t = 12h$

- **A $t = 0$**

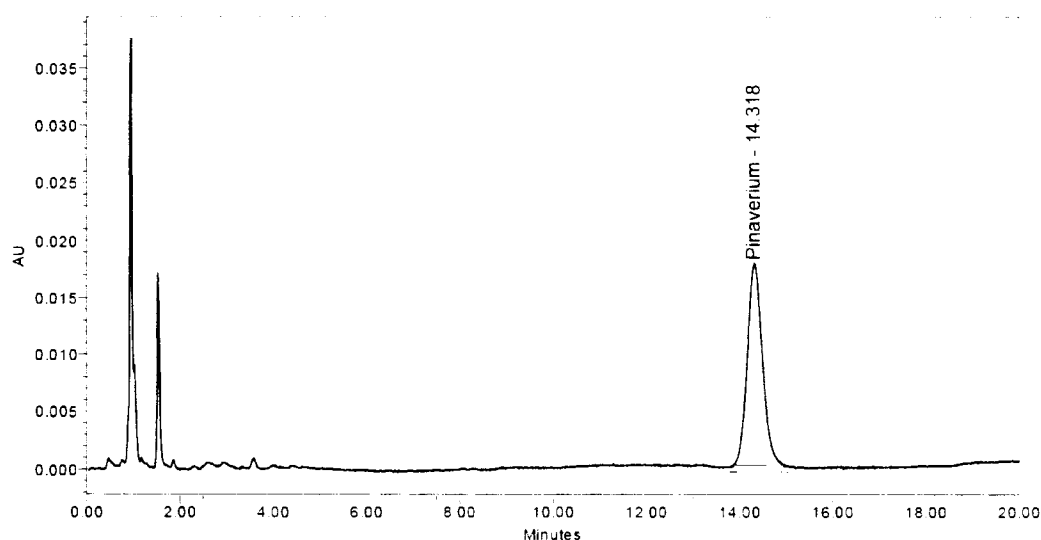


Figure 1 : Chromatogramme de principe actif à t_0

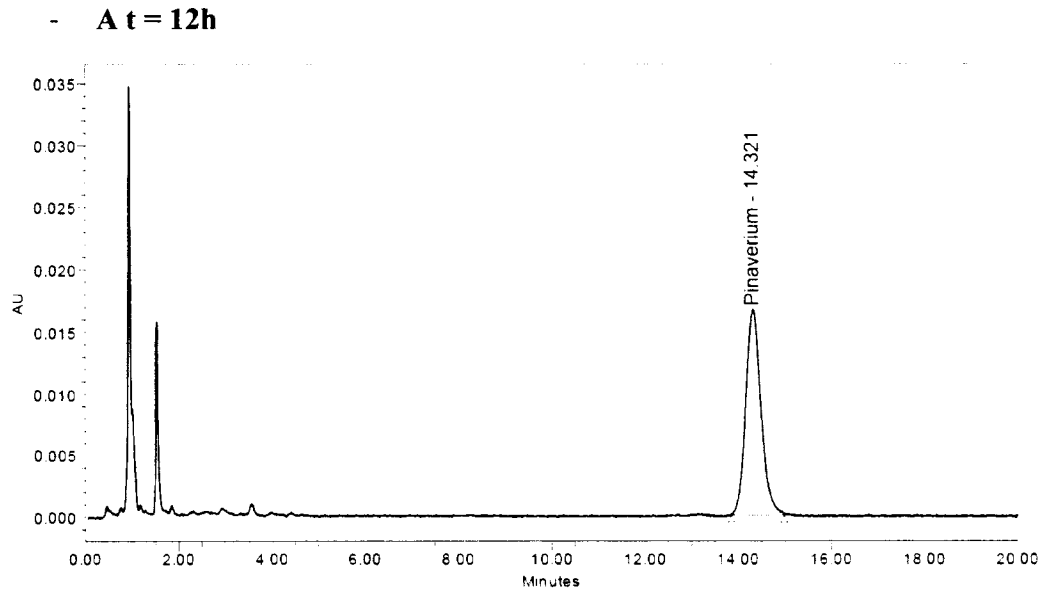


Figure 2 : Chromatogramme de principe actif a t_{12}

Résultats :

Tableau 12 : Résultats de stabilité des solutions

Temps	AUC
0h	395863
12h	389538

Calcul de pourcentage de dégradation :

$$X = 100 - (389538 * 100 / 395863) = 1.59\%$$

Conclusion :

Le pourcentage de dégradation est négligeable, donc la solution est stable dans les conditions ambiantes durant cet intervalle de temps.

III. Rapport de Validation

III-1. Spécificité :

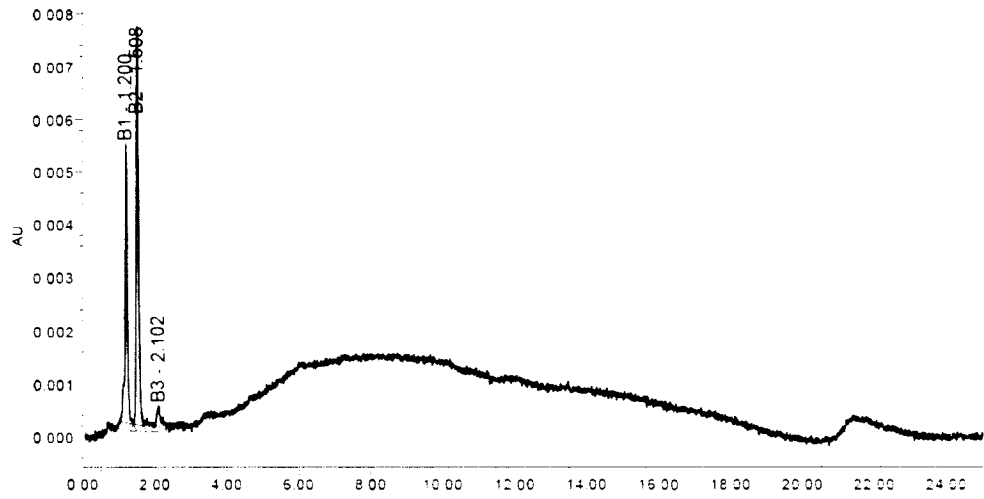
Exploitation des résultats :

Evaluer le temps de rétention de chaque pic, de chaque chromatogramme, de chaque solution, et vérifier la non-interférence des excipients, des produits de dégradation et de blanc avec le principe actif dosé.

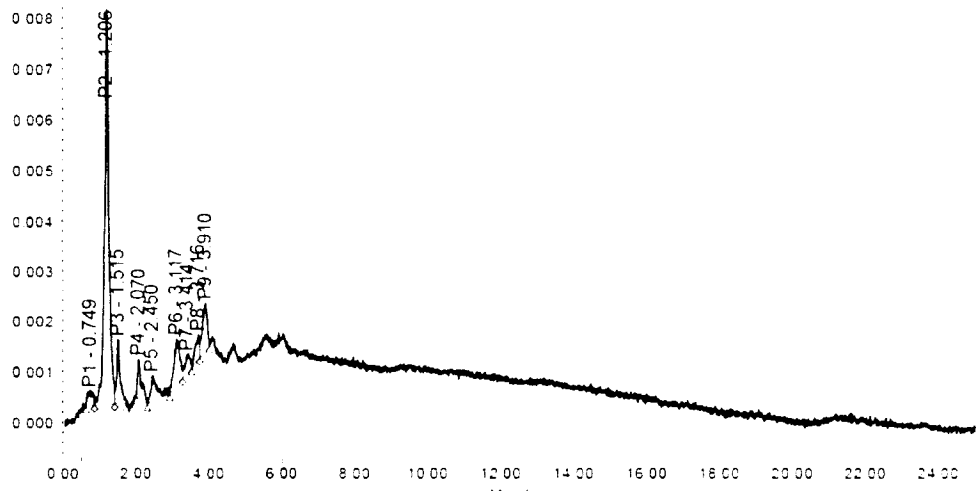
Critères d'acceptation :

Le temps de rétention du pinavérium bromure doit être significativement différent de blanc, des excipients et des produits de dégradation.

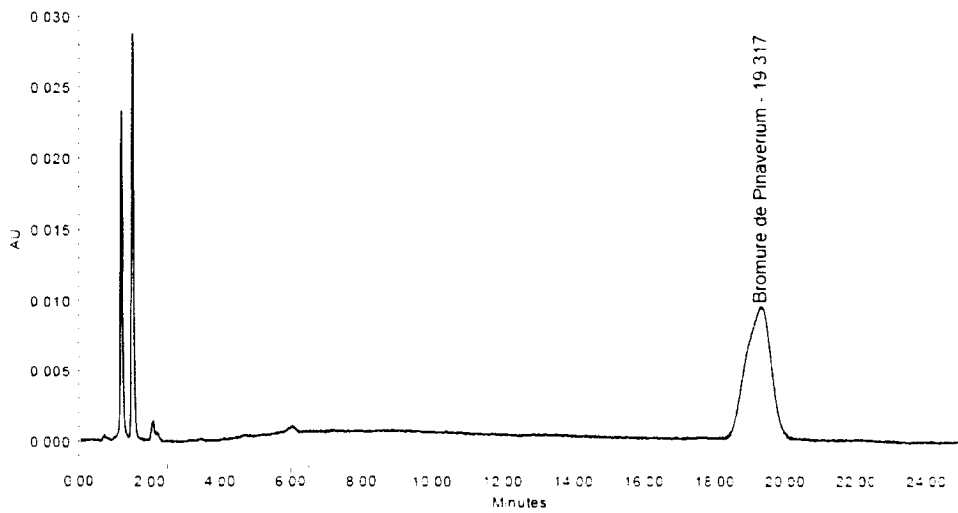
Résultats :



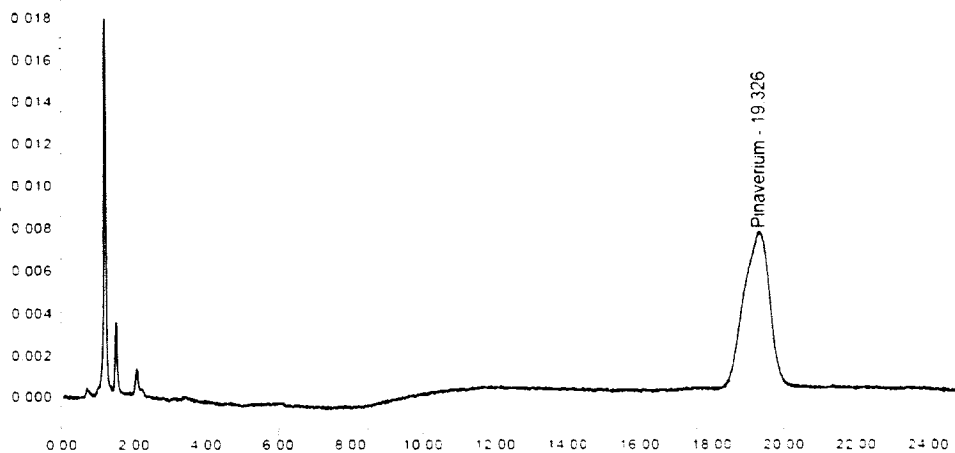
(a)



(b)



(c)

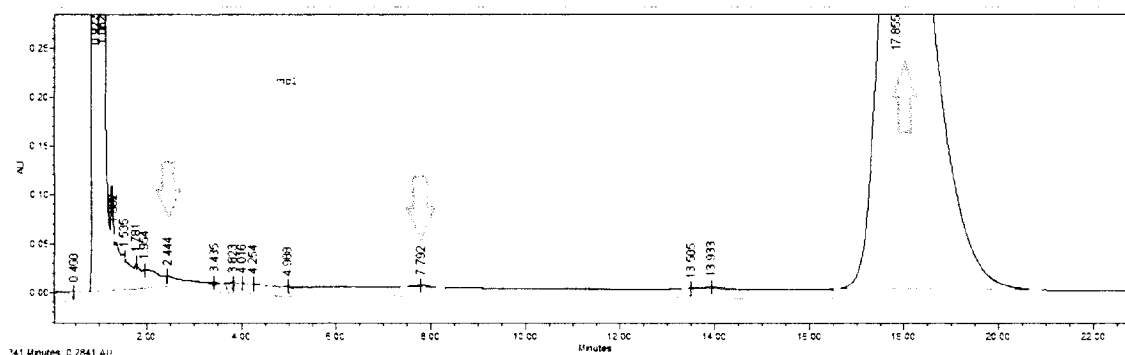


(d)

Figure 3 : Chromatogrammes de (a) blanc, (b) FR, (c) PA, (d) principe actif et forme reconstituée

Tableau 13 : Temps de rétention de blanc, placebo et de pinavérium bromure

Nom		Nombre d'injection	Volume injecté	Temps de rétention (minute)
Blanc	B1	01	20	1.2
	B2			1.508
	B3			2.102
Placebo		01	20	3.910
Pinaverium		01	20	19.317



(1)

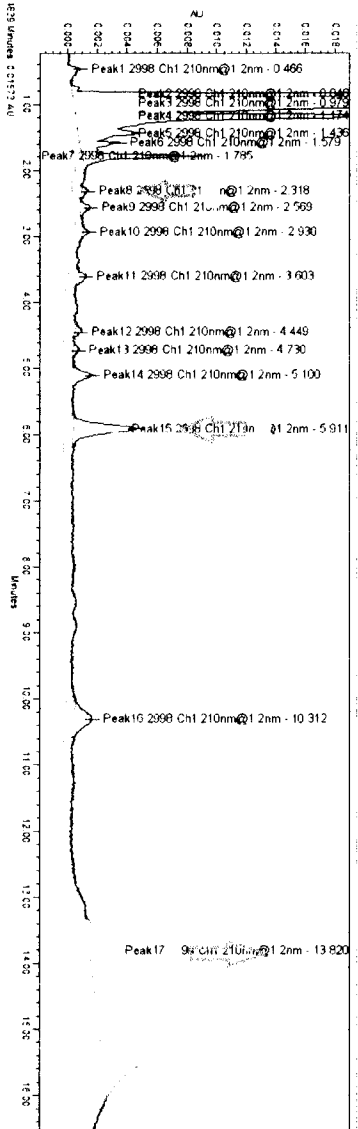
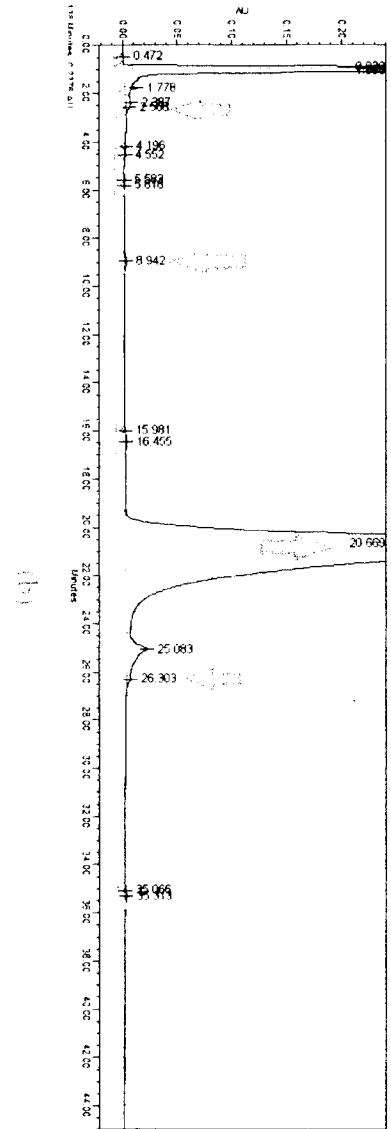
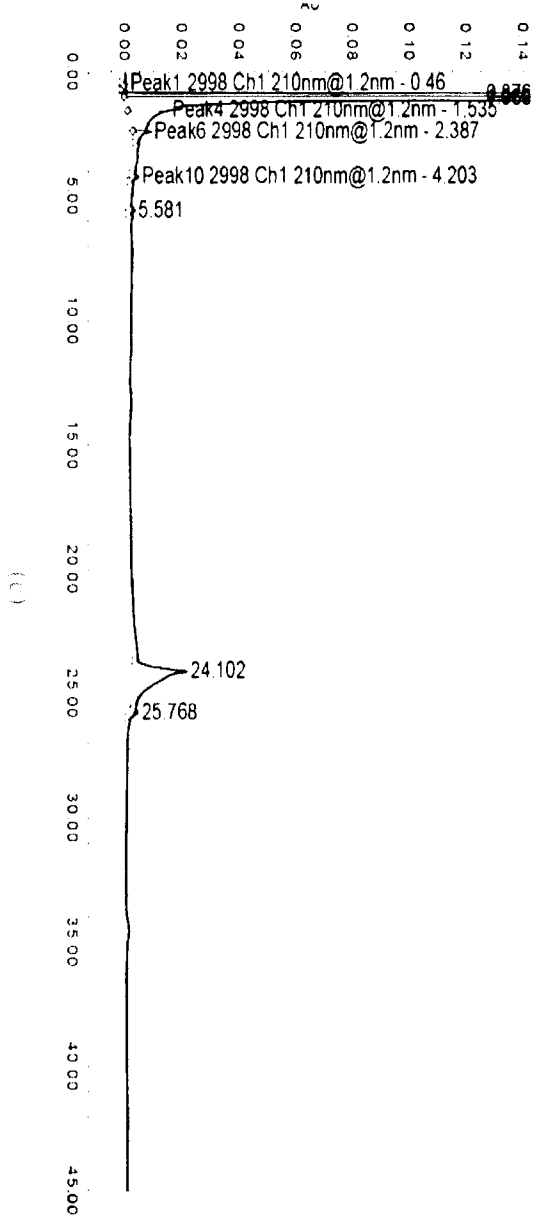
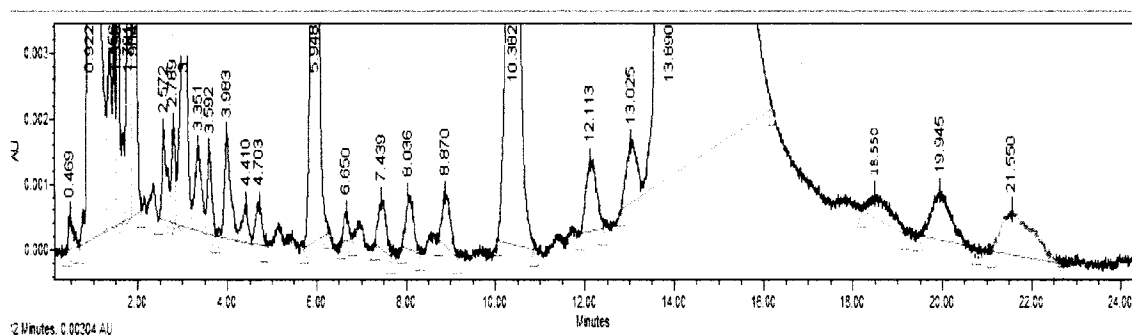
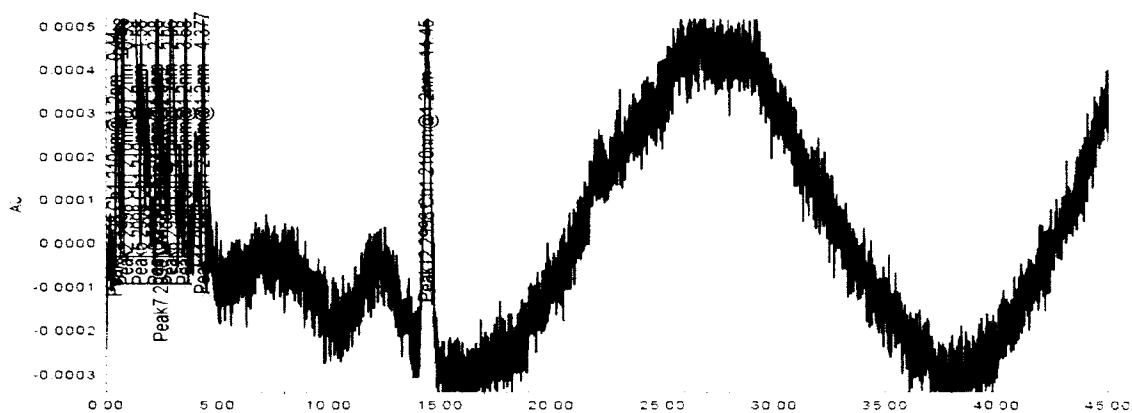


Figure 4 : Dégradation alcaline de (a) PA, (b) PA+FR, (c) FR





(b)



(c)

Figure 6 : Dégradation oxydante de (a) PA, (b) PA+FR, (c) FR

Interprétation des résultats :

1. La figure 3 et le tableau 13, montre qu'il n'y a aucune interférence entre la phase mobile et les excipients, et le pinavérium bromure.
2. Les figures 4, 5, 6 de la dégradation forcée montrent que les impuretés 1 et 2 n'interfèrent pas avec le pinavérium bromure. L'impureté 3 est éluée au trainé du pic principal, du fait de vieillissement de la colonne affectant leur séparation et dont la séparation est améliorée avec une colonne neuve (justifié et démontré par le fournisseur).

Conclusion :

La méthode de dosage proposée est spécifique et permet le dosage du PA dans le produit final.

III-2.Linéarité :**a-1. Données Brutes :****a-Principe actif :****Tableau 14 : Linéarité : données brutes de principe actif seul**

Niveau de Concentration %	Série	Pesée (mg) X_{ij}	Réponse Y_{ij} (Surface)
80%	1	20,10	288047,577
	2	20,10	280548,710
	3	20,10	301986,580
90%	1	22,40	318881,890
	2	22,40	324228,631
	3	22,50	338152,470
100%	1	25,00	376865,301
	2	25,00	400292,791
	3	24,90	370402,101
110%	1	27,50	408477,591
	2	27,50	415456,601
	3	27,60	403996,721
120%	1	30,00	451811,679
	2	30,00	447358,152
	3	30,00	446384,331

b- Forme pharmaceutique reconstitué :

Tableau 15 : Linéarité : données brutes de la forme pharmaceutique reconstitué

Niveau de Concentration %	Série	Pesée (mg) x_{ij}	Réponse y_{ij} (Surface)
80%	1	20,10	287557,511
	2	20,10	294475,031
	3	20,10	301493,920
90%	1	22,40	322270,047
	2	22,40	338092,531
	3	22,50	332614,141
100%	1	25,00	379320,151
	2	25,00	365964,691
	3	24,90	373664,505
110%	1	27,50	413098,340
	2	27,50	415012,461
	3	27,60	407027,076
120%	1	30,00	438394,001
	2	30,00	444291,572
	3	30,00	448431,271

A.2- Tracer les courbes de linéarité :

On aura 2 courbes :

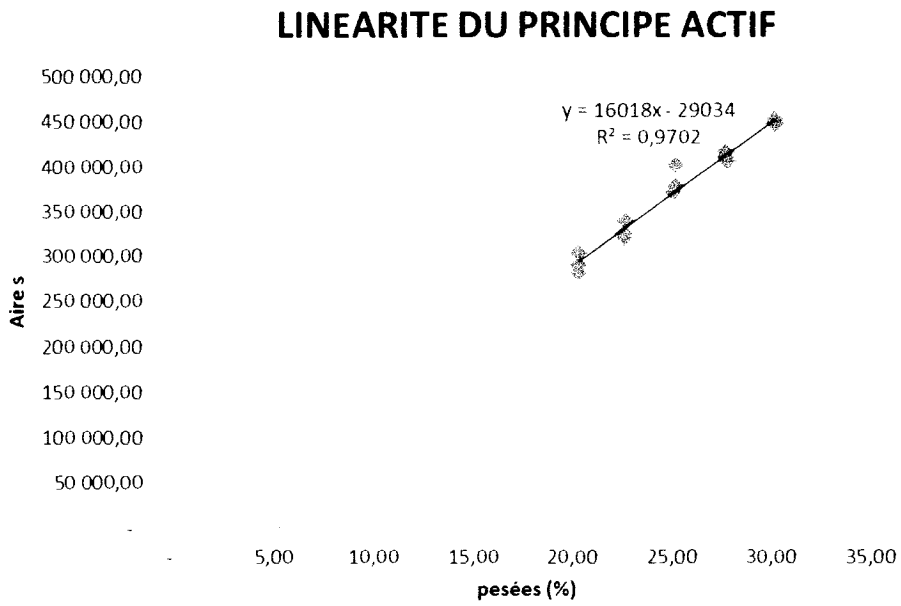


Figure 7 : Linéarité de principe actif seul

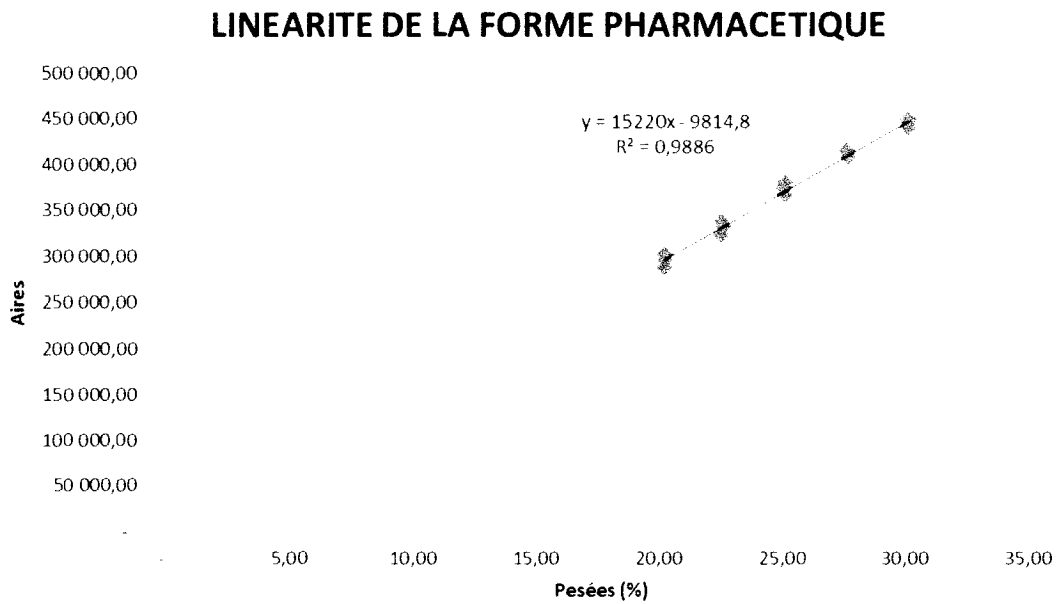


Figure 8 : Linéarité de la forme pharmaceutique reconstituée

LINEARITE FR et PA

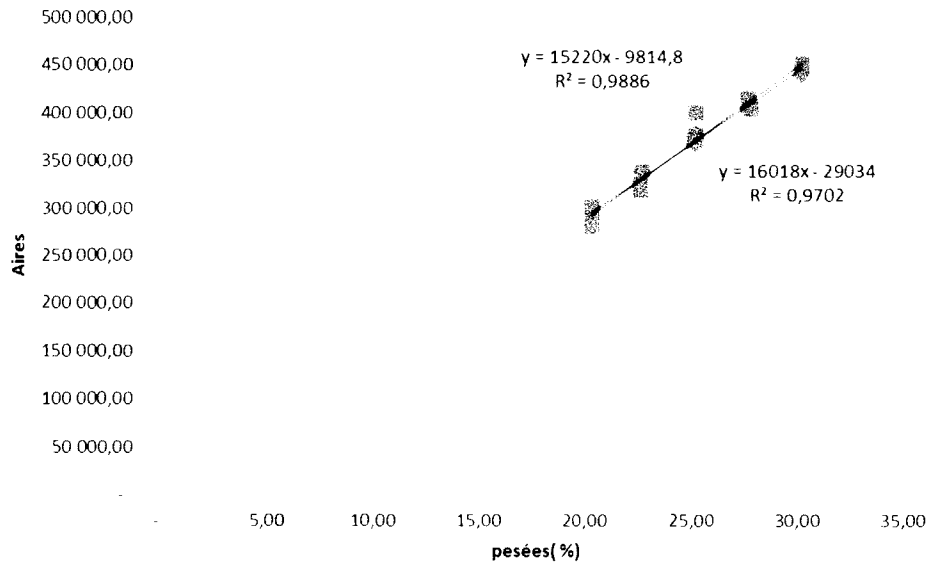


Figure 9 : Linéarité de la forme pharmaceutique reconstituée et de principe actif seul

A.3-changement de variable :

a-Principe actif :

Tableau 16 : Linéarité : Calcul des variances de principe actif seul

Niveau de Concentration %	Série	X_{ij} (mg)	\bar{X}_j	Surfaces Y_{ij}	\bar{Y}_j	Variances S_j^2
80%	1	20,10	20,10	288047,577	290194,289	118351847
	2	20,10		280548,710		
	3	20,10		301986,580		
90%	1	22,40	22,43	318881,890	327087,664	98969364
	2	22,40		324228,631		
	3	22,50		338152,470		
100%	1	25,00	24,97	376865,301	382520,064	247345598
	2	25,00		400292,791		
	3	24,90		370402,101		
110%	1	27,50	27,53	408477,591	409310,304	33352271
	2	27,50		415456,601		
	3	27,60		403996,721		
120%	1	30,00	30	451811,679	448518,054	8373056
	2	30,00		447358,152		
	3	30,00		446384,331		

b- Forme pharmaceutique reconstituée :**Tableau 17 : Linéarité : Calcul des variances de la forme pharmaceutique reconstituée**

Niveau de Concentration %	Série	X_{ij} (mg)	\bar{X}_j	Surfaces Y_{ij}	\bar{Y}_j	Variances S_j^2
80%	1	20,10	20,10	287557,511	294508,821	48556730
	2	20,10		294475,031		
	3	20,10		301493,920		
90%	1	22,40	22,43	322270,047	330992,240	64560673
	2	22,40		338092,531		
	3	22,50		332614,141		
100%	1	25,00	24,97	379320,151	372983,116	44940297
	2	25,00		365964,691		
	3	24,90		373664,505		
110%	1	27,50	27,53	413098,340	411712,626	17381747
	2	27,50		415012,461		
	3	27,60		407027,076		
120%	1	30,00	30,00	438394,001	443705,615	25444207
	2	30,00		444291,572		
	3	30,00		448431,271		

Avec :

 X_{ij} : Pesées (mg). \bar{X}_j : Moyenne des pesées de chaque groupe. Y_{ij} : Réponses. \bar{Y}_j : Moyenne des réponses de chaque groupe. S_j^2 : Variance des réponses de chaque groupe.

B-Exploitation statistique des résultats :

1-Estimation d'une droite de régression linéaire :

La gamme de pinavérium bromure seul, soit D_1 , d'équation :

$$y = a_1x + b_1$$

La gamme avec la forme reconstituée, soit D_2 , d'équation :

$$y = a_2x + b_2$$

2- Calculer les pentes a_1 et a_2 et les ordonnées à l'origine b_1 et b_2 respectives des droites de régression du PA seul et de la FR :

L'équation de la droite de régression est de la forme

$$y = ax + b$$

Méthode des moindres carrés :

- La pente a

$$a = SPE_{xy}/SCE_x$$

$$a_1 = 16018,12$$

$$a_2 = 15219,75$$

Avec :

N : nombre total des essais dans l'ensemble des k groupes

$$SPE_{xy} = \sum_{i=1}^N (x_i - \bar{x})(y_i - \bar{y})$$

$$SCE_x = \sum_{i=1}^N (x_i - \bar{x})^2$$

$$\bar{x} = \frac{1}{N} \sum_{i=1}^N x_i$$

$$\bar{y} = \frac{1}{N} \sum_{i=1}^N y_i$$

- L'ordonnée à l'origine b :

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

$$b_1 = -29033,64$$

$$b_2 = -9814,82$$

On aura : PA $y = 16018,12x + -29033,64$

FR $y = 15219,75x + -9814,82$

B.3- Calculer la variance résiduelle notée S_e^2 , la variance de la pente a et l'ordonnée à l'origine b notée respectivement S_a^2 et S_b^2 des droites de régression du PA seul et de la FR :

- La variance résiduelle S_e^2 :

$$S_e^2 = \frac{SCE_y - a \cdot SPE_{xy}}{N-2}$$

Avec :

$$SCE_y = \sum_{i=1}^N (y_i - \bar{y})^2$$

- La variance de la pente a et l'ordonnée à l'origine b notée respectivement S_a^2 et S_b^2

$$S_a^2 = \frac{S_e^2}{SCE_x}$$

$$S_b^2 = S_e^2 \cdot \left(\frac{1}{N} + \frac{\bar{x}^2}{SCE_x} \right)$$

PA :

$$S_e^2 = 112987540,29528$$

$$S_{\alpha_1}^2 = 607233,54177$$

$$S_{\beta_1}^2 = 387255904,46303$$

FR :

$$S_e^2 = 38231704,91720$$

$$S_{\alpha_2}^2 = 205470,20958$$

$$S_{\beta_2}^2 = 131036160,5198$$

B.6- Calculer le coefficient de corrélation noté r pour le PA seul et FR :

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

$$r^2 = \frac{SPE_{xy}^2}{SCE_x \cdot SCE_y}$$

$$r = \sqrt{r^2}$$

Soient r_1 et r_2 les coefficients de corrélation respectifs des droites D_1 et D_2 .

$$r_1 = 0,985$$

$$r_2 = 0,994$$

$r \approx 1$: bonne corrélation

B.7-Test de comparaison des ordonnées à l'origine de PA seul et de la FR avec 0 :

On vérifié l'inégalité :

$$\frac{|b|}{S_b} < t_{(1-\alpha; N-2)}$$

$$t_{(0.05; 13)} = 2.16$$

PA : $1.47 < 2.16$

FR : $0.85 < 2.16$

Les ordonnées à l'origine ne sont pas significativement différentes de zéro.

B.8- comparaison des pentes des droites D_1 et D_2 :

Soient $S_{a_1}^2$ et $S_{a_2}^2$ les variances respectives des pentes a_1 et a_2 des droites D_1 et D_2 . La comparaison s'effectue avec le test :

$$t = |a_2 - a_1| / \sqrt{S_{a_2}^2 + S_{a_1}^2}$$

Tableau 18 : Test de comparaison des pentes des droites D_1 et D_2

Test de comparaison des pentes	
Cobs (pente)	0,84419
Student théorique au risque (5%, 26)	Cobs (pente) < 2,16 \Rightarrow pas d'erreur systématique

$$0,84419 < 2.16$$

On peut conclure que les pentes des droites D_1 et D_2 ne sont pas significativement différentes au risque $\alpha=0.05$. Donc il n'y a pas d'erreur systématique.

B.9-Comparaison des ordonnées à l'origine des droites D_1 et D_2 :

La comparaison des ordonnées à l'origine b_1 et b_2 s'effectue avec le test :

$$t = |b_2 - b_1| / \sqrt{S_{b_2}^2 + S_{b_1}^2}$$

Tableau 19 : Test de comparaison des ordonnées à l'origine des droites D_1 et D_2

Test de comparaison des ordonnées à l'origine	
Cobs (ordonnée)	0,88559
Student théorique au risque (5%, 26)	Cobs (ordonnée) < 2,16 => pas d'effet matrice

$$0,88559 < 2,16$$

On peut conclure que les ordonnées à l'origine des droites D_1 et D_2 ne sont pas significativement différentes au risque $\alpha = 0.05$. Donc il n'y a pas d'effet matrice.

B.10-test d'homogénéité des variances :

Pour le PA seul et la FR :

- Calculer la variance S_j^2 de chaque niveau de concentration :

$$S_j^2 = \frac{SCE_y}{n - 1}$$

Avec :

$$SCE_y = \sum_{i=1}^n (y_i - \bar{y})^2$$

n : le nombre total des observations par niveau de concentration.

\bar{y} : est la moyenne de réponses de chaque niveau de concentration.

- Calculer la somme des variances calculées pour chaque niveau de concentration S

$$S = \sum S_j^2$$

- Trier les valeurs de variances calculées S_j^2 par ordre croissant et trouver la variance la plus élevée S_{max}^2 .
- Calculer le rapport :

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

Avec :

K : le nombre total des groupes ou des niveaux de concentration

Tableau 20 : Test d'homogénéité des variances (test de COCHRAN) de Principe actif seul et de la forme pharmaceutique reconstituée

	Test d'Homogénéité des Variances	
Principe actif seul	Somme des variances PA	506392137
	Variance max	247345598
	CF= COCHRAN calculé	0,4884
forme pharmaceutique reconstituée	Somme des variances	200883653
	Variance max	64560673
	CF= COCHRAN calculé	0,3214
Critères d'acceptation	COCHRAN théorique au risque (1%, 5, 3)	CF > 0,788 =>la variance max est considéré comme aberrante
	COCHRAN théorique au risque (5%, 5, 3)	CF < 0,684 =>le test n'est pas significatif et l'ensemble des variances sont considérées comme homogène

PA : 0,4884 < 0.684

FR : 0,3214 < 0.684

Résultat :

Le tableau de COCHRAN présenté ci-dessus, montre que les variances pour l'ensemble des points de gamme de l'intervalle étudié sont homogènes.

B.11- Test de l'existence d'une pente significative :

Ce test est effectué pour le PA seul et la FR. Il consiste à comparer les variations dues à la régression et aux erreurs (expérimentales et d'ajustement) :

$$F_1 = S_I^2 / S_R^2 > F_{(\alpha; 1; N-2)}$$

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

Tableau 21 : Test de l'existence d'une pente significative

variations	DDL	Somme des carrés	Variances	F calculée
Variation Totale T	$N - 1$	$\sum T^2 = \sum_{j=1}^k \sum_{i=1}^n (Y_{ij} - \bar{Y})^2$		
Variation due à la régression I	1	$\sum I^2 = a^2 \sum_{j=1}^k n_j (\bar{X}_j - \bar{X})^2$	$S_I^2 = \sum I^2$	$F_1 = S_I^2 / S_R^2$
Variation résiduelle R	$N - 2$	$\sum R^2 = \sum T^2 - \sum I^2$	$S_R^2 = \sum R^2 / (N - 2)$	

Tableau 22 : Linéarité : Test de l'existence d'une pente significative pour les droites de principe actif seul et de la forme pharmaceutique reconstituée

	sources de variat	sommes des carrées des éca	degrés de liberté	variances
PA seul	linéarité	47741683551,03	1	47741683551,03
	non-linéarité	456053750,65	3	152017916,8828
	erreur pure	1012784273,19	10	101278427,3190
	total	49210521574,8666	14	

F de Fisher	critères d'acceptation
471,3905	> 10,04
1,5010	< 6,55

	sources de variat	sommes des carrées des éca	degrés de liberté	variances
	linéarité	43101267657,72	1,0000	43101267657,72
	non-linéarité	95244857,85	3,0000	31748285,9513
	erreur pure	401767306,07	10,0000	40176730,6070
	total	43598279821,6452	14,0000	

F de Fisher	critères d'acceptation
1072,7918	> 10,04
0,7902	< 6,55

PA $F_1 = 471,3905 > 10.04$
 FR $F_1 = 1072,7918 > 10.04$

Résultat :

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

B.12- Test de validité de la droite de régression :

Il est aussi effectué pour le PA seul et la FR. Ce test permet de comparer les erreurs d'ajustement S_L^2 et expérimentales S_E^2 :

$F_2 = S_L^2/S_E^2 < F_{(\alpha; k-2; N-k)}$ avec $F(1\%, 3, 10) < 6.55$

Tableau 23 : Linéarité : Test de validité de la droite de régression

variations	DDL	Somme des carrées	Variances	F calculé
Erreur Expérimentale E	$N - k$	$\sum E^2 = \sum_{j=1}^k \sum_{i=1}^n (Y_{ij} - \bar{Y}_j)^2$	$S_E^2 = \sum E^2 / (N - k)$	$F_2 = S_L^2/S_E^2$
Erreur de la Régression L (erreur du model)	$k - 2$	$\sum L^2 = \sum R^2 - \sum E^2$	$S_L^2 = \sum L^2 / (k - 2)$	

PA $F_2 = 1,5010 < 6.55$

FR $F_2 = 0,7902 < 6.55$

Résultat :

F_2 N'est pas significatif : l'ajustement est considéré comme valide au seuil de probabilité considéré.

B.13- Calculer l'intervalle de confiance du blanc pour le PA seul et FR :

Pour cela il faut intervenir une variable de Student à $N - 2$ degrés de liberté pour un niveau de confiance réparti de chaque côté de l'intervalle $1 - \alpha/2$, noté $t_{(1-\alpha/2; N-2)}$. Si on appelle A et B les valeurs vrais de la pente et de l'ordonnée à l'origine :

$$b - t_{(1-\alpha/2; N-2)} \cdot S_b \leq B \leq b + t_{(1-\alpha/2; N-2)} \cdot S_b$$

Pour $N = 15$ et $\alpha = 5\%$: $t_{(1-\alpha/2; N-2)} = 2.160$

PA

$$-71539,88809 \leq \beta \leq 13472,60859$$

FR

$$-34540,56312 \leq \alpha \leq 14910,92060$$

Résultats :

Ces valeurs se trouvent dans cet intervalle, on dira que l'étalonnage réalisé est correcte.

La valeur zéro est comprise dans l'intervalle de confiance des ordonnées à l'origine des deux droites, donc les deux droites passent effectivement par le blanc.

Tableau 24 : Tableau récapitulatif de l'étude statistique de la linéarité

	Linéarité de la FR	Linéarité du PA	Valeurs statistiques théoriques au risque α et conclusion
Pente α	15219,75	16018,12	NA
Ordonnée à l'origine β	-9814,82	-29033,64	
Coefficient de Corrélation (r)	0,994	0,985	
Homogénéité des variances	0,3214	0,4884	COCHRAN (1%, 5, 3) : CF > 0,788 aberrante COCHRAN (5%, 5, 3) : CF = 0,684 Homogène
Existence d'une pente	1072,7918	471,3905	FISHER (1%, 1,10), F > 10,04
Validité de la droite	0,7902	1,5010	FISHER (1%, 3, 10), F < 6,55
Comparaison de pentes	0,08219		STUDENT (5%, 13) Cobs (ordonnée) < 2,16
Comparaison des ordonnées à l'origine	0,13994		STUDENT (5%, 13) Cobs (pente) < 2,16

Conclusion :

Toutes ces conditions ont été vérifiées, on peut conclure que la méthode est :

- Linéaire.
- Il n'y a pas d'effet matrice et d'erreur systématique.
- Le système de référence considéré est l'étalon 100%.

III-3.Exactitude :

Exploitations statistiques des résultats :

Cette étude statistique s'effectue sur les recouvrements entre les pesées retrouvées et les pesées introduites. Les pesées retrouvées ont été estimées selon le système de référence considéré : étalon 100%

Soient x_{100} et y_{100} respectivement, la pesée et l'observation correspondant à l'étalon 100%, calculer la quantité retrouvée et le recouvrement (Y_{ij}).

Calcul de la quantité retrouvée Q_i :

$$Q_i = y_i/b_2$$

Avec : $b_2 = \frac{y_{100}}{x_{100}}$ pour chacun des jours.

Tableau 25 : Exactitude : Les valeurs journalières de b_2

	Jour 1	Jour 2	Jour 3
b_2	13754,564	16011,712	14875,586

Calcul du recouvrement Y_{ij} :

Recouvrement = Quantité retrouvée /Quantité introduite

$$Y_{ij} = Q_{ij}/x_{ij}$$

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

Les résultats obtenus figurent dans le tableau suivant :

Tableau 26 : Exactitude : Résultats de la forme pharmaceutique reconstitué

Teneur en PA par rapport à la quantité théorique	Essais	Pesées (mg) X_{ij}	Réponses Y_{ij}	Quantités retrouvées y_i (mg)	Recouvrement IR (%)	S^2	Pente à 100%
80,00	1er jour	20,10	265968,88	19,337	96,203	21,7892	
	2e jour	20,10	294475,03	18,391	91,499		
	3e jour	20,10	301493,92	20,268	100,834		
90,00	1er jour	22,40	307243,04	22,338	99,721	9,3366	
	2e jour	22,40	338092,53	21,115	94,265		
	3e jour	22,50	332614,14	22,360	99,377		
100,00	1er jour	25,00	346009,98	25,156	100,624	29,0213	13754,564
	2e jour	25,00	365964,69	22,856	91,424		16011,712
	3e jour	24,90	373664,51	25,119	100,881		14875,586
110,00	1er jour	27,50	380675,78	27,676	100,641	11,1589	
	2e jour	27,50	415012,46	25,919	94,252		
	3e jour	27,60	407027,08	27,362	99,138		
120,00	1er jour	30,00	440409,91	32,019	106,731	50,9311	
	2e jour	30,00	444291,57	27,748	92,493		
	3e jour	30,00	448431,27	30,145	100,485		

Vérification de l'homogénéité des variances liées :

On effectue le test de COCHRAN, en considérant les valeurs Y_{ij} pour vérifier l'homogénéité des variances des différents groupes j. Le critère à utiliser est :

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

S^2_j : Variance de groupe j

$S_j^2 = \sum_{i=1}^n (Y_{ij} - \bar{Y}_{ij})^2 / (n - 1)$ avec : $\bar{Y}_{ij} = \frac{1}{n} \sum_{i=1}^n Y_{ij}$ la moyenne des recouvrements pour chaque groupe.

S_{max}^2 : La variance la plus élevée des k groupes j

Tableau 27 : Exactitude : Test d'homogénéité des variances

Test d'Homogénéité des Variances	
$\sum S^2$	122,2371
$S^2 \text{ max}$	50,9311
CF=COCHRAN calculé	0,4167
COCHRAN théorique au risque (1%, 5, 3)	CF > 0,788 => la variance max est considéré comme aberrante
COCHRAN théorique au risque (5%, 5, 3)	CF < 0,684 => le test n'est pas significatif et l'ensemble des variances sont considéré homogène

$$0,4034 < 0,684$$

Résultat :

C est inférieur à la valeur lue dans la table de COCHRAN pour 3 répétitions pour 5 niveaux de concentration au risque d'erreur α , l'ensemble des variances est considéré comme homogène.

1-1 Test de validité des moyennes :

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

$$F_3 = \frac{S_C^2}{S_E^2} < F_{(\alpha; k-1; N-k)}$$

Tableau 28 : Exactitude : Test de validité des moyennes

Variation	DDL	Somme Des Carrés	Variances	F calculé
Variation totale T	$N - 1$	$\sum T^2 = \sum_{j=1}^k \sum_{i=1}^n (Y_{ij} - \bar{Y})^2$	$S_T^2 = \frac{\sum T^2}{N - 1}$	$F_3 = \frac{S_C^2}{S_E^2}$
Variation intra-groupe E	$N - k$	$\sum E^2 = \sum_{j=1}^k \sum_{i=1}^n (Y_{ij} - \bar{Y}_j)^2$	$S_E^2 = \frac{\sum E^2}{N - k}$	
Variation intergroupe C	$k - 1$	$\sum C^2 = \sum T^2 - \sum E^2$	$S_C^2 = \frac{\sum C^2}{k - 1}$	

Avec :

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

k : nombre total des groupes.

j : indice du groupe.

i : indice de répétition.

$\bar{\bar{Y}}$: moyenne sur j et i des Y_{ij} et est égale à $\bar{\bar{Y}} = \sum_{j=1}^5 \frac{1}{k.n} \sum_{i=1}^3 Y_{ij}$

n : nombre de répétition.

\bar{Y}_j : moyenne sur i des Y_{ij} .

Si F_3 n'est pas significatif, on peut dire au risque considéré ($\alpha = 0.05$) que les variances des observations entre les différents groupes sont dues aux erreurs expérimentales

Tableau 29 : Exactitude : Résultat test de validité des moyennes

Teste de validité des moyennes		Critères d'acceptation
F3	0,2167	< 3,48

< 3.48

Donc il est possible de conclure que les variations des observations, entre les différents groupes, peuvent être considérées comme homogènes, au risque considéré. Et l'intervalle de confiance du recouvrement moyen peut donc être valablement calculé.

1-2 Estimation du recouvrement moyen :

Calculer la valeur du recouvrement moyen et son intervalle de confiance :

$$\bar{\bar{Y}} = \sum_{j=1}^k \frac{1}{k.n} \sum_{i=1}^n Y_{ij}$$

$$I_{Rm} = \bar{\bar{Y}} \pm \frac{t_{(\alpha; N-1)} \cdot S_T}{\sqrt{N}}$$

Avec : $t_{(0.05; 15-1)} = 2.145$

$$95,49186 < 100 < 100,31710$$

Résultat

La valeur 100% est incluse dans l'intervalle de confiance du recouvrement moyen, ce qui permet de conclure à l'exactitude de la méthode.

III-4.Fidélité :

Cette étude statistique s'effectue sur les recouvrements entre les pesées retrouvées et les pesées introduites. Les pesées retrouvées ont été estimées selon le système de référence considéré : étalon 100%

Soient x_{100} et y_{100} , la pesée et l'observation correspondant à l'étalon 100%, calculer la quantité retrouvée et le recouvrement(Y_{ij}).

a. Recouvrement

- Calcul de la quantité retrouvée Q_i :

$$Q_i = y_i/b_2$$

Avec : $b_2 = \frac{y_{100}}{x_{100}}$ pour chacun des jours.

Tableau 30 : Fidélité : Les valeurs journalières de b_2

	Jour 1	Jour 2	Jour 3
b_2	14227,50	14785,12	15616,83

a- Calculer le recouvrement, noté Y_{ij} , entre la valeur introduite x_{ij} et la valeur estimée X_{ij} à partir de l'étalon de référence 100% :

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

Tableau 31 : Fidélité : Résultats de la forme pharmaceutique reconstituée

Série	Essai	Quantité introduite (mg)	Réponse Y_{ij} (Surface)	Pente	Quantité retrouvée (mg)	Recouvrement R_{ij}
1	1	25,00	357898	14227,50	25,16	100,62144676
	2	25,00	360102		25,31	101,24109165
	3	25,00	366092		25,73	102,92515378
	4	25,00	356772		25,08	100,30487682
	5	25,00	357631		25,14	100,54638088
	6	25,00	357722		25,14	100,57196513
	7	25,00	357615		25,14	100,54188255
2	1	25,00	375818	14785,12	25,42	101,67463963
	2	25,00	379829		25,69	102,75978451
	3	25,00	373549		25,27	101,06077931
	4	25,00	369298		24,98	99,91070429
	5	25,00	372326		25,18	100,72990616
	6	25,00	375097		25,37	101,47957868
	7	25,00	397877		25,48	101,90976988
3	1	25,00	399425	15616,83	25,58	102,30626509
	2	25,00	398122		25,49	101,97252268
	3	25,00	398230		25,50	102,00018513
	4	25,00	398473		25,52	102,06242566
	5	25,00	398473		25,52	102,06242566
	6	25,00	397578		25,46	101,83318586
	7	25,00	399283		25,57	102,26989408

b-Test d'homogénéité de variance (test de COCHRAN) :

-Calculer la variance de recouvrement pour chaque jour de mesure (intra journalier) notée $S_{Y_{ij}}^2$:

$$S_{Y_{ij}}^2 = SCE_R / (7-1) \quad , \quad \text{avec} \quad SCE_R = \sum_{i=1}^7 (Y_{ij} - \bar{Y}_j)^2$$

- \bar{Y}_j est la moyenne de recouvrement pour chaque jour de mesure : $\bar{Y}_j = 1/7 \sum_{i=1}^7 Y_{ij}$

- Calculer la somme des variances calculées pour chaque niveau de concentration notée S, $S = \sum S_{Y_{ij}}^2$

-Trier les valeurs par ordre croissant et trouver la valeur $S_{Y_{ij}}^2 \text{ max}$

Tableau 32 : Fidélité : Test d'homogénéité des variances (test de COCHRAN)

Série j	n _j	Variances (S ² _j)	SCE (M _j)	Somme des variances	Variance max	C _f calculé
1	7	0,830161	4,9810	1,77928	0,922054	0,5182
2	7	0,922054	4,6103			
3	7	0,03	0,1895			

-Calculer le rapport C_f :

$$C_f = S_{Y_{ij}}^2 \text{ Max} / S \quad , \quad \text{avec} \quad C_f < 0.561$$

Critères d'acceptation :

COCHRAN théorique au risque (1%, 7, 3)

Si $C_f > 0.788 \Rightarrow$ la variance max est considéré comme aberrante.

COCHRAN théorique au risque (5%, 7, 3)

Si $C_f < 0.684 \Rightarrow$ le test n'est pas significatif et l'ensemble des variances sont considérées comme homogènes.

$$C_f = 0,5182 < 0.684$$

Résultat :

Le tableau représentant le test de COCHRAN montre que les variances pour l'ensemble des 3 séries sont homogènes.

C- Calculer la variance de la répétabilité notée S²_r :

$$S_r^2 = \sum_{j=1}^3 S_j^2 / 3$$

$$S_r^2 = (0,830161 + 0,922054 + 0,03) / 3$$

$$S_r^2 = 1,782275 / 3$$

$$S_r^2 = 0,5940916666666667$$

d- Calculer la limite de répétabilité notée r :

$$r = 2.83 \times S_r$$

e- Calculer le coefficient de variation de la répétabilité notée CV_r :

$$CV_r = S_r / \bar{m} \times 100$$

f- Calculer la variance intergroupe notée S_g^2 :

On peut calculer une variance inter-groupe S_g^2 qui traduit la dispersion existant entre les moyennes m_j des groupes.

$$S_g^2 = \frac{\sum_{j=1}^3 (m_j - \bar{m})^2}{3-1} - \frac{S_r^2}{n} \quad \text{avec } \bar{m} = \sum_{j=1}^3 m_j / 3$$

g- Calculer la variance de répétabilité intermédiaire notée S_R^2 :

$$S_R^2 = S_r^2 + S_g^2$$

h- Calculer la limite de la répétabilité intermédiaire notée R :

$$R = 2.83 \times S_R$$

i- Calculer le coefficient de variation de la répétabilité intermédiaire notée CV_R :

$$CV_R = S_R / \bar{m} \times 100$$

Avec Moyenne des recouvrements $\bar{m} = 101,4659459$

Critère d'acceptation :

Les coefficients de variation CV_r et CV_R doivent être respectivement inférieur à 1% et 2%.

Résultat :

Les coefficients de variation de la répétabilité et de reproductibilité sont respectivement inférieurs à 1% et 2%, ce qui démontre la fidélité de la méthode analytique pour la détermination de la teneur en pinavérium bromure dans le produit fini.

II-7. Seuil de détection et seuil de quantification :**Tableau 33 :** Seuil de détection et seuil de quantification

SD (µg/ml)	0,4512
SQ (µg/ml)	1,5042

II-8. Sensibilité :

$$x_1 - x_2 = \frac{\left[t_{\left(1-\frac{\alpha}{2}\right)} + t_{(1-\beta)} \right] S_E \cdot \sqrt{2}}{\alpha}$$

S_E : La racine carrée de la variance expérimentale calculée lors de l'étude de la linéarité.

α : Risque égal à 0.05 bilatéral

β : Risque égal à 0.05 unilatéral

Tableau 34 : Sensibilité

Sensibilité = SE (µg/ml)
1,1179

III-7. Résumé du rapport de validation :

Par rapport à l'ensemble des traitements statistiques, notre conclusion est la suivante :

Tableau 35 : Tableau récapitulatif des résultats de l'étude statistique de la validation

Critère	Conclusion
Spécificité	Les données expérimentales recueillies ont permis de prouver la spécificité de la méthode pour le principe actif pinavérium bromure.
Linéarité	Le traitement statistique des données brutes a permis de démontrer statistiquement la linéarité de la méthode sur l'intervalle étudié.
Exactitude	Le traitement des données brutes a permis de démontrer statistiquement l'exactitude sur l'intervalle étudié.
Fidélité	Le traitement statistique des données brutes a permis de démontrer statistiquement la fidélité de la méthode.
Intervalle de mesure	80%-120%
Seuil de détection	0,451273 µg/ml
Seuil de quantification	1,5042 µg/ml
Sensibilité	1,1179 µg/ml

Conclusion générale

En guise de conclusion, la technique d'analyse par chromatographie liquide à haute Performance présentée dans ce modeste mémoire est convenable pour le dosage de pinavéruim bromure dans le produit fini.

En effet les conditions chromatographiques permettent une bonne séparation de médicament.

Par ailleurs, les résultats de la validation montrent que la méthode est spécifique, linéaire, exact et fidèle, présentent une sensibilité de $1.1179 \mu\text{g/ml}$, un seuil de détection et un seuil de quantification de $0.451273 \mu\text{g/ml}$ et de $1.5042 \mu\text{g/ml}$ respectivement.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES :

► **Livres :**

1. A. Skoog, F. James Holler, Timothy A. Nieman-, Principes d'analyse instrumentale Douglas. 5ème édition. Amérique: de boeck, 2003, p 702 .
2. Andrea Weston, Phyllis R. Brown, HPLC and CE Principales and Practice, chapitre 3 pages 90,108
3. BURGOT, G et BURGOT, Méthodes instrumentales d'analyse chimique et applications : Méthodes chromatographiques, électrophorèses, méthodes spectrales et méthodes thermiques , édition : Tec et Doc / Lavoisier (Paris), J.L. 2011 (3ème édition).
4. Francis Rouessac, Annick Rouessac avec collaboration de Daniel Cruché, ANALYSE CHIMIQUE Méthodes et techniques instrumentales modernes 6ème édition, partie 1 : méthodes séparatives, page : 38,41., chapitre 2 , pages 42,44,49,50. Chapitre 7 p 114.
5. GEORGE, L. 2005, HPLC Methods for Recently Approved Pharmaceuticals , édition : Wiley-Interscience.
6. KAMOUN, P , Appareils et méthodes en biochimie et biologie moléculaire, édition : Flammarion ,1997.
7. Marcel CAUDE Alain JARDY , Chromatographie en phase liquide, Théorie et méthodes de séparation, Techniques de l'Ingénieur, traité Analyse et Caractérisation PE 1456-1,3,4,6, 17 , 20 , 25 , 30 ,31,32, 32 , 33 , 35.
8. Robert MARCHAL , chromatographie Edith ANTONOT ,1998 p 01
9. SKOOG, WEST, Holler, , Traduction et révision de la 7eme édition américaine par Claudine Buess-Herman , CHIMIE ANALYTIQUE , chapitre 28, page 660,661,663,664,665,676. chapitre 30 p 702,704.

► **Articles d'une revue :**

10. DMF pinavérium bromure 100 mg comprimé pelliculé, partie 3.2.S .
11. ETTRE, L.S, Le siècle de l'invention de la chromatographie , 2003, paru dans le journal de chromatographie et science-Vol 41.
12. FICHE DE DONNÉES DE SÉCURITÉ Santa Cruz Biotechnology, Inc. Date de révision 26-sept.-2014 Version 1.1.
13. Guide de validation analytique : Rapport d'une commission SFSTP : I. Méthodologie 1992.
14. ICH, Q2(R1) page 3, 2005.
15. Journées Qualité et Chimie 2010 Une démarche qualité au service de la chimie Autrans -14 octobre 2010 Marie-Dominique Blanchin Laboratoire de Chimie Analytique p26.

Références bibliographiques

16. margriet M.W.B Hendriks, jan H. de boer, age K.smilde, robustness of analytical chemical methods and pharmaceutical technological products Data handling in science and technology – volume 19:, édition: Elsevier 1996
17. Max FEINBERG, validation interne des méthodes d'analyses, traité Analyse et Caractérisation, page 224.
18. Michèle Désenfant – Marc Priel – Cédric Rivier, LA VALIDATION DES METHODES D'ANALYSE A L'EVALUATION DE L'INCERTITUDE DES RESULTATS DE MESURE Laboratoire National d'Essais BNM-LNE 1, rue Gaston Boissier 75724 Paris Cedex 15 .
19. OMS, Série de Rapports techniques, N° 823,1992.
20. Pharmacopée européenne 7.0 tome 1, chapitre : Réactifs .
21. pharmacopée européenne 8ème édition, voll, chapitre n°2 : méthodes d'analyses, page 45, juillet 2013.
22. Principes de la chromatographie université de SHERBROOK, cours : Techniques), 2014.
23. Validation des procédures analytiques quantitatives Harmonisation des démarches STP PHARMA -VAL ANA-2003 - PART I final STP PHARMA PRATIQUES - volume 13 - N° 3 - mai/juin 2003 pages 117.118 .119.
24. validation of chromathographique methodes ,Reviewer guidance ,novembre 1994
25. validation of compendial procedures United States Pharmacopeia 39, chapitre 1225 , page 1641. Année2006

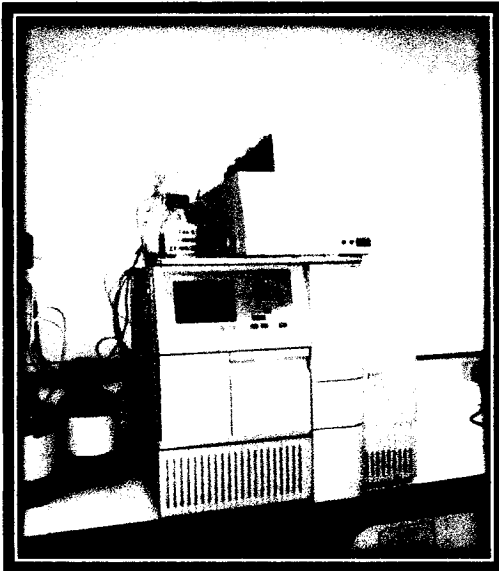
► Sites d'internet :

26. <https://www.vidal.fr/Medicament/dicetel-5140.htm>
27. http://sante.canoe.ca/drug_info/details.asp?brand_name_id=766
28. <http://www.drugfuture.com/chemdata/pinaverium-bromide.html>
29. <http://www.mylan.ca/media/mylanca/documents/french/product%20pdf/pdfs%20fr%20dec%202015/dicetel-pml-2016.01.08.pdf>
30. www4.ac-metz.fr/physique/CHIM/Jumber/HPLC/Chromatographie_en_phase_liquide.htm 50
31. <http://calamar.univ-ag.fr/uag-staps/cours/stat/stat.htm>
32. <http://www.adneurope.com/index.php?id=241>

LISTE DES ANNEXES

- ✓ ANNEXE I: Matériels et verreries.
- ✓ ANNEXE II : *Les Chromatogrammes.*
- ✓ ANNEXE III : *tableaux statistiques.*

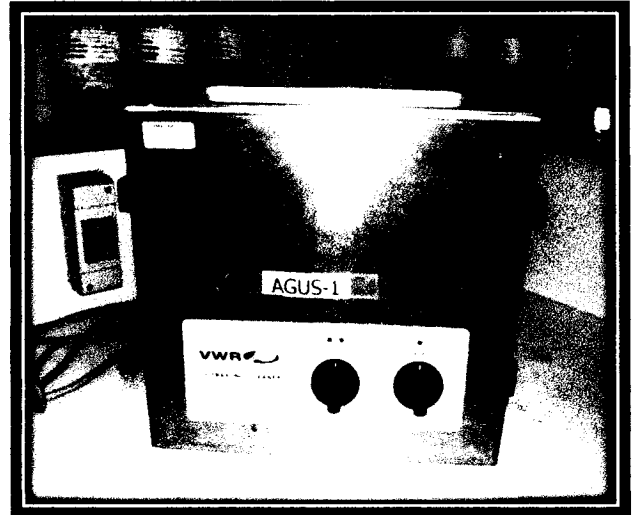
ANNEXE I: Matériels et verreries :



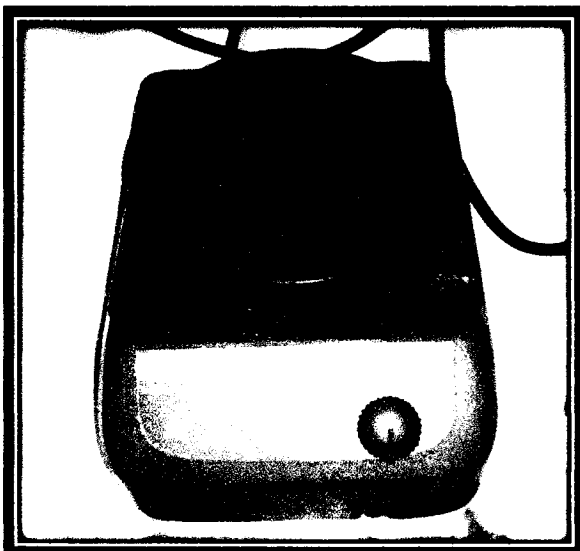
Alliance Water HPLC e2695

Serial number :G12SM4972A

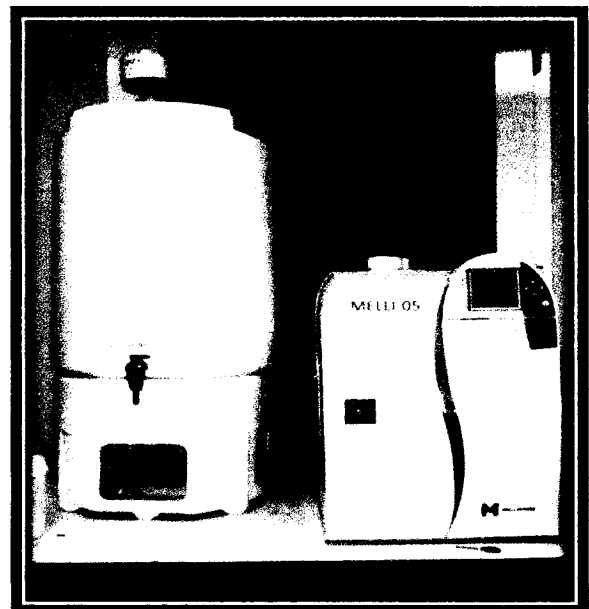
Détecteur PDA Waters 2998



Sonicateur

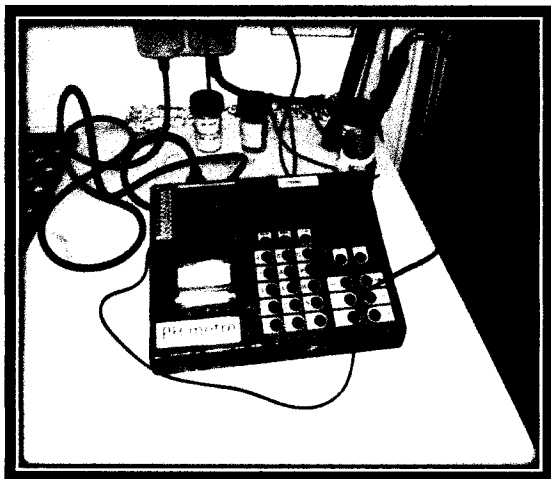


Agitateur magnétique



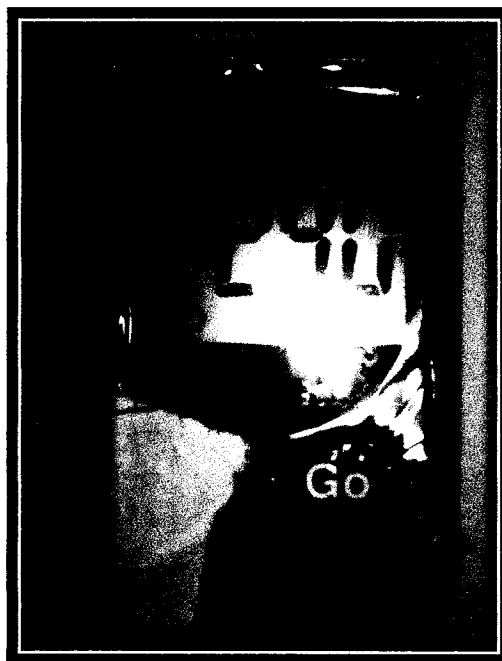
Purificateur Millipore Elix

Serial number :F111413376A

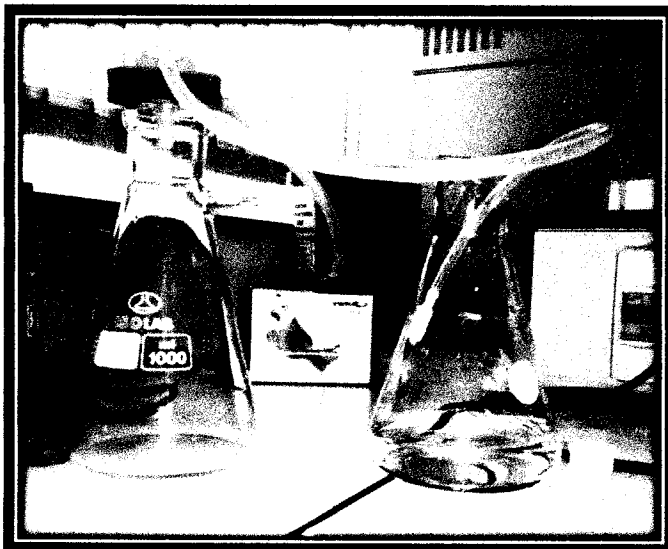


PH-mètre HANNA Instrument

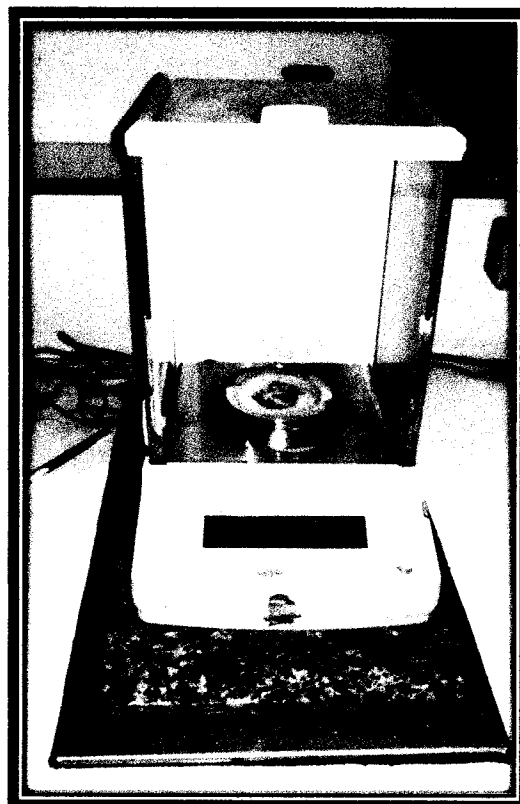
N° de série : 950870



Thermomètre

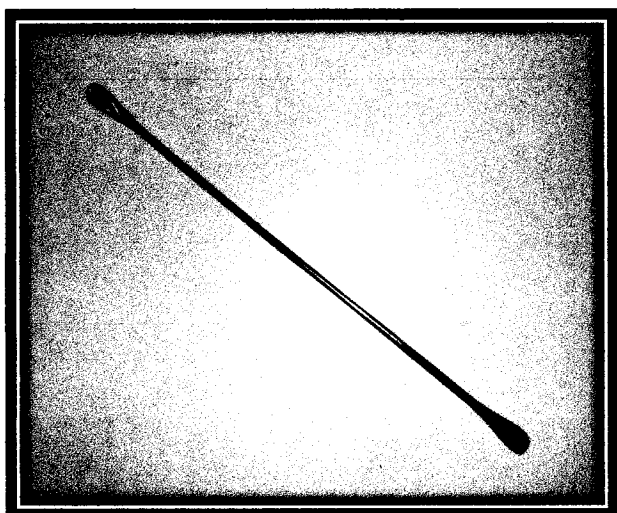


- Dispositif de filtration

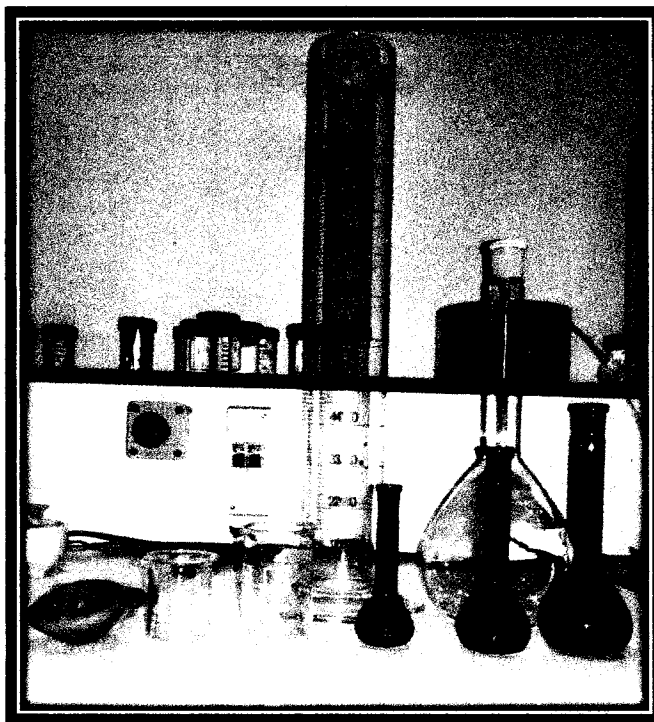
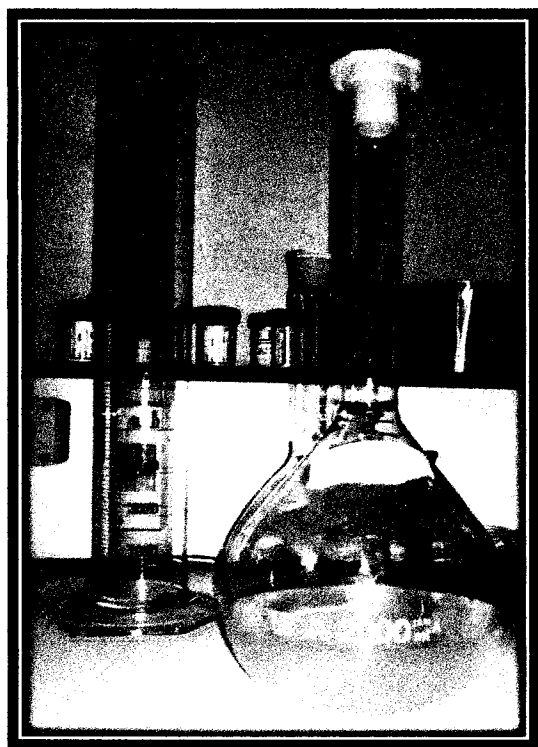


- Balance analytique Unibloc

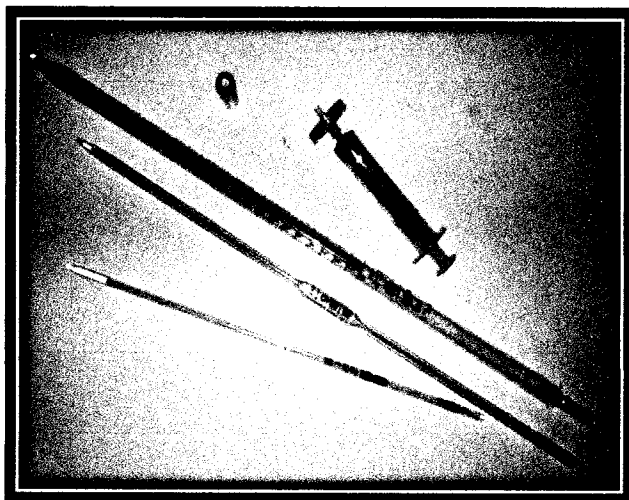
Max 220 g, min 10mg, e =1mg,d=0,1mg



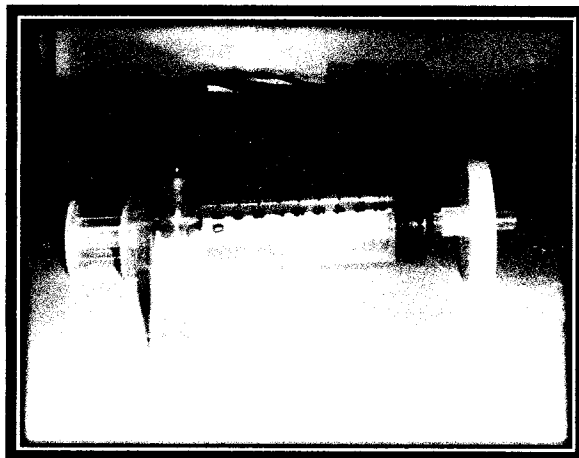
- Spatule



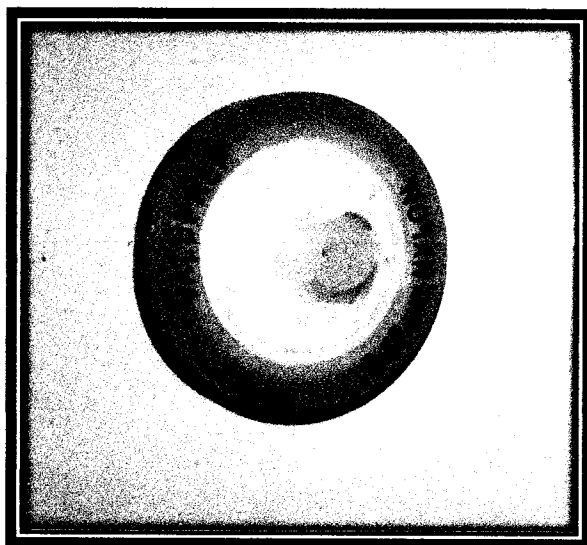
- Les verreries utilisées



- *Les pipettes utilisées*



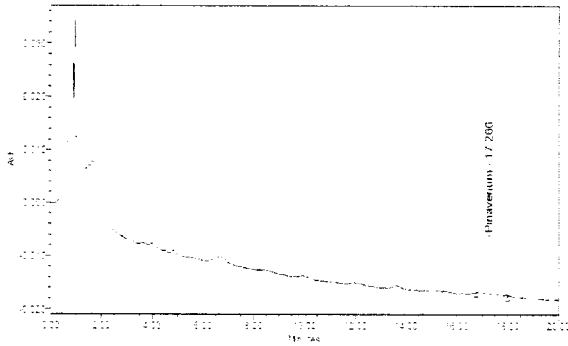
- *Le vial et filtre seringue*



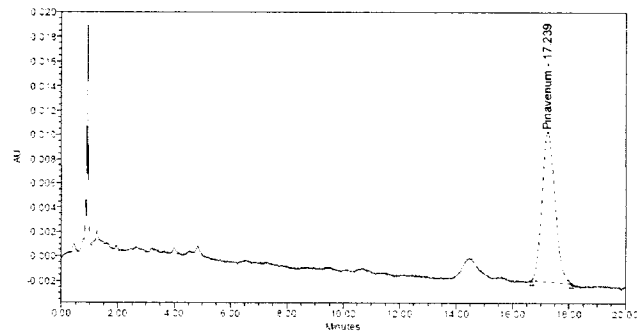
Filtre

ANNEXE II : Les Chromatogrammes

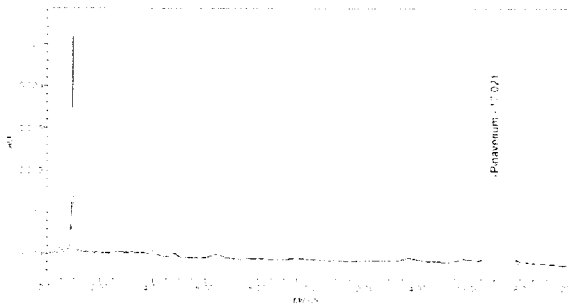
➤ Les Chromatogrammes de la robustesse :



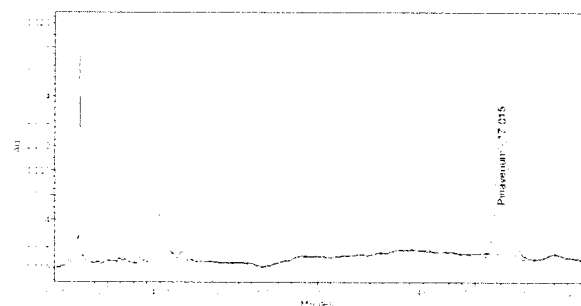
- Chromatogramme d'essai N°1 -



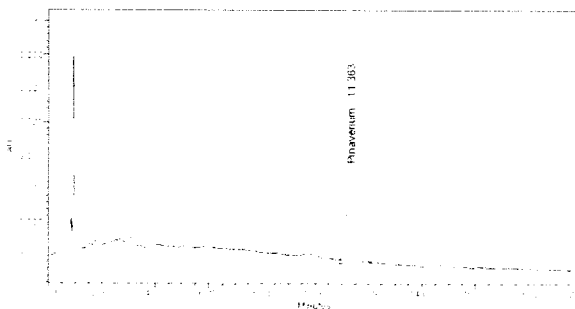
- Chromatogramme d'essai N°2 -



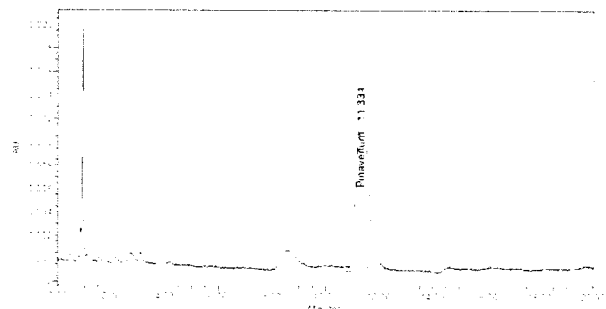
- Chromatogramme d'essai N°3 -



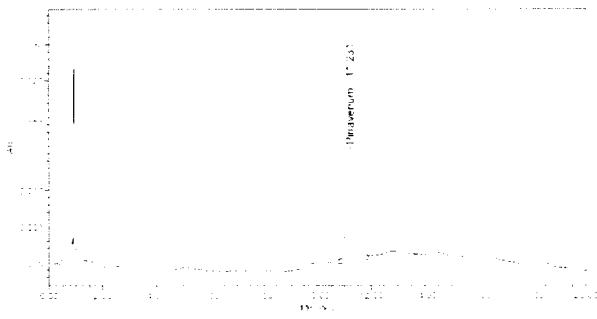
- Chromatogramme d'essai N°4 -



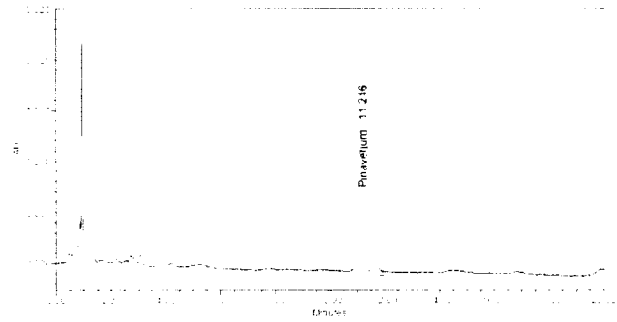
- Chromatogramme d'essai N°5 -



- Chromatogramme d'essai N°6 -

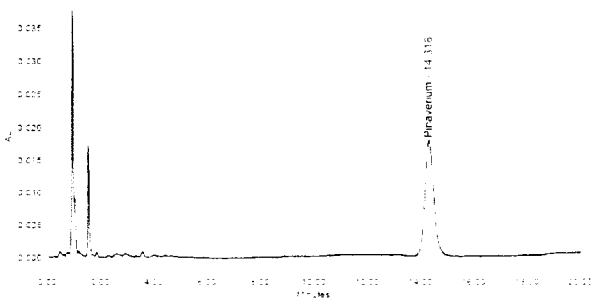


- Chromatogramme d'essai N°7 -

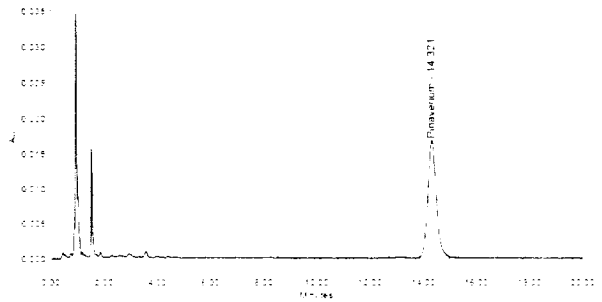


- Chromatogramme d'essai N°8 -

➤ *Les Chromatogrammes de la stabilité des solutions :*

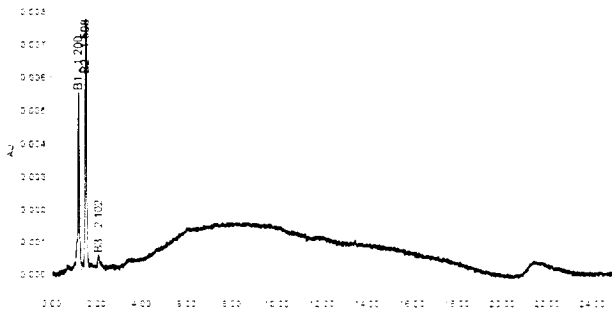


Chromatogramme de principe actif à t_0

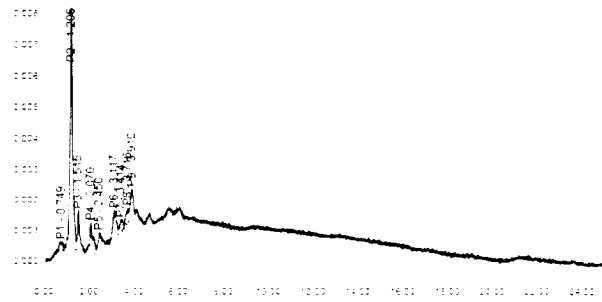


Chromatogramme de principe actif à t_{12}

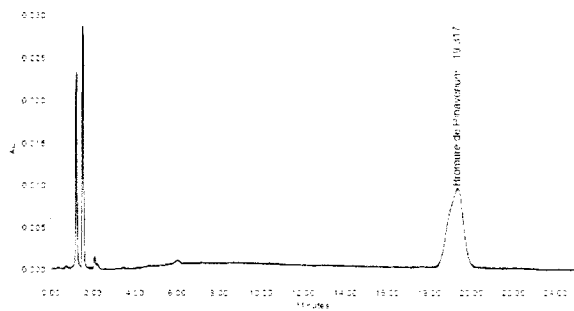
➤ *Les chromatogrammes spécificité :*



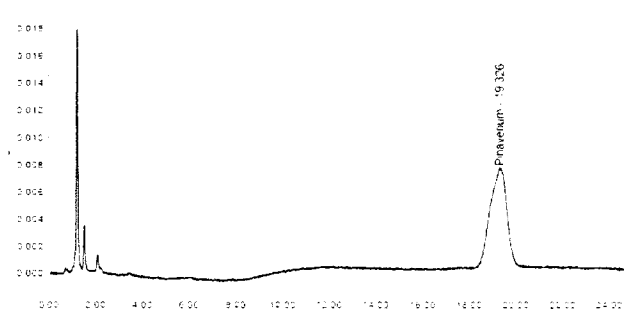
Chromatogramme du blanc



Chromatogramme de la FR



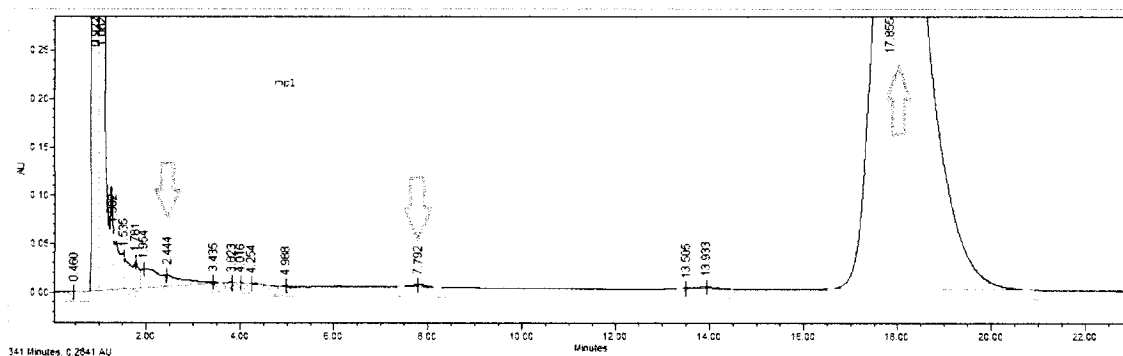
Chromatogramme de PA



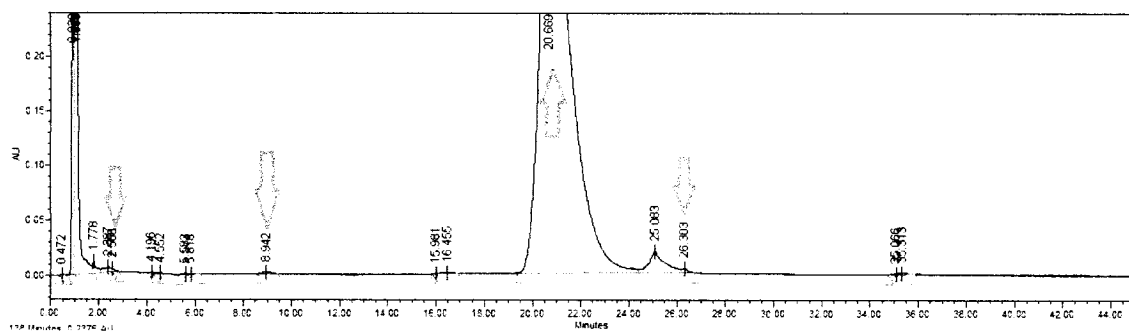
Chromatogramme de PA et FR

➤ Les chromatogrammes de la dégradation forcée :

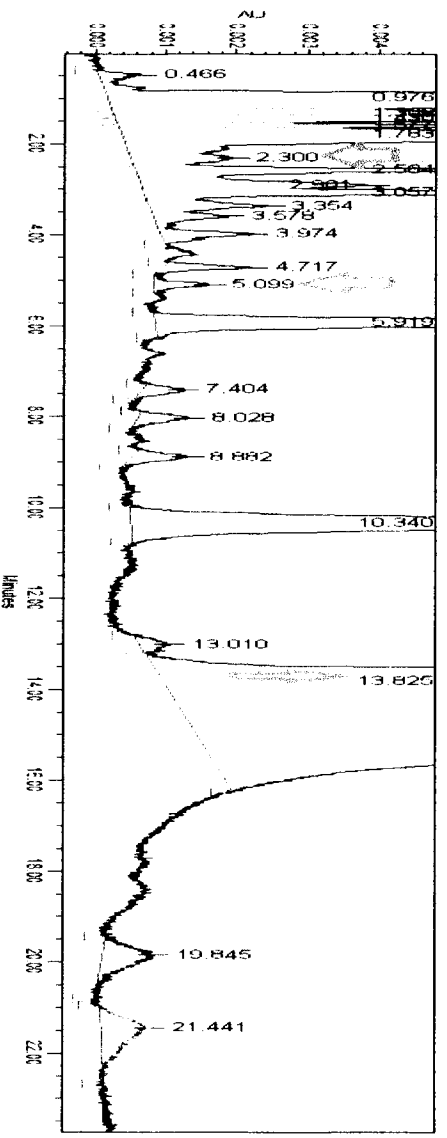
- Dégradation Alcaline :



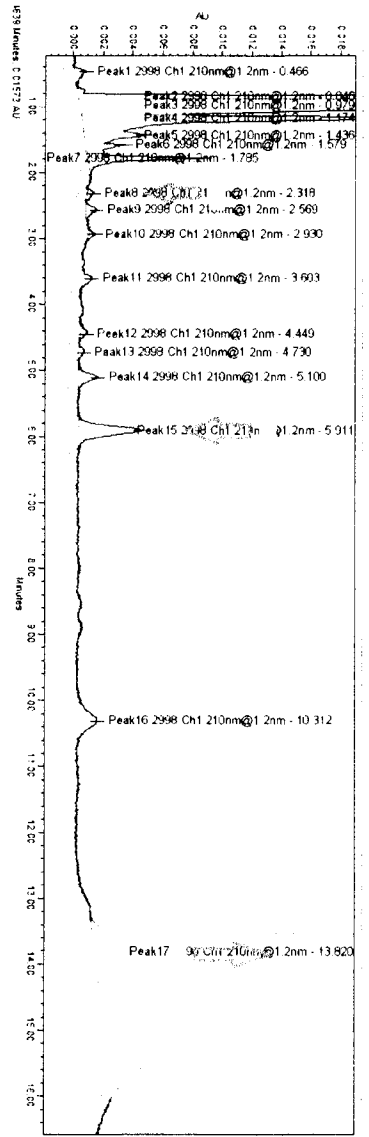
Chromatogramme du principe actif



Chromatogramme de FR et PA

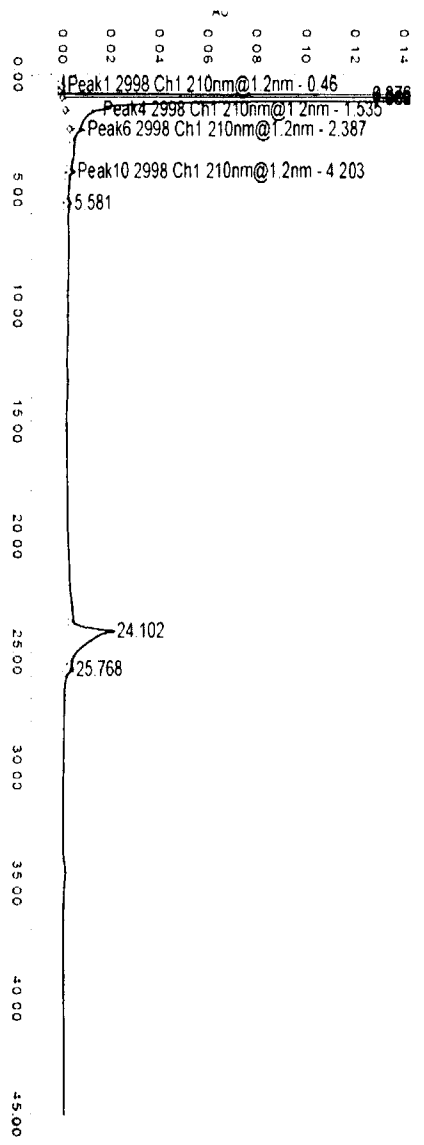


Chromatogramme de PA et FR

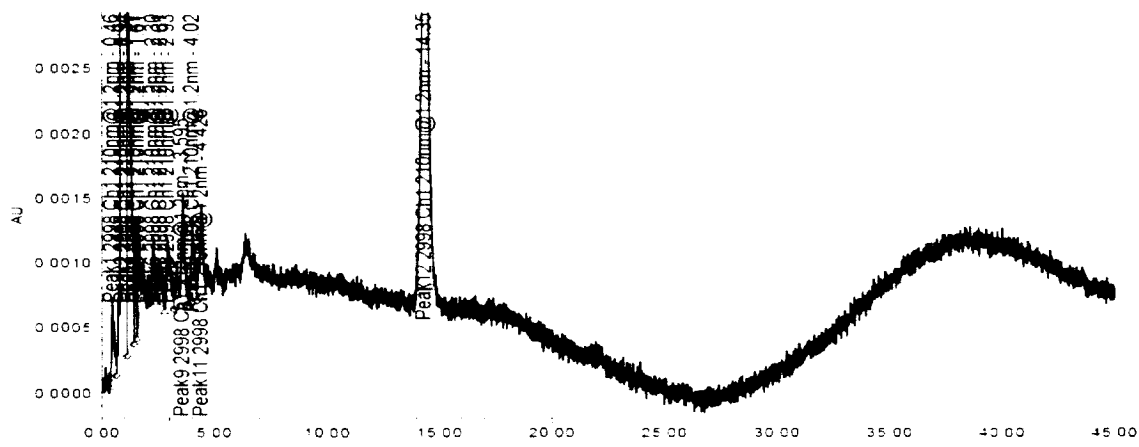


Chromatogramme du principe actif

• Dégradation Acide

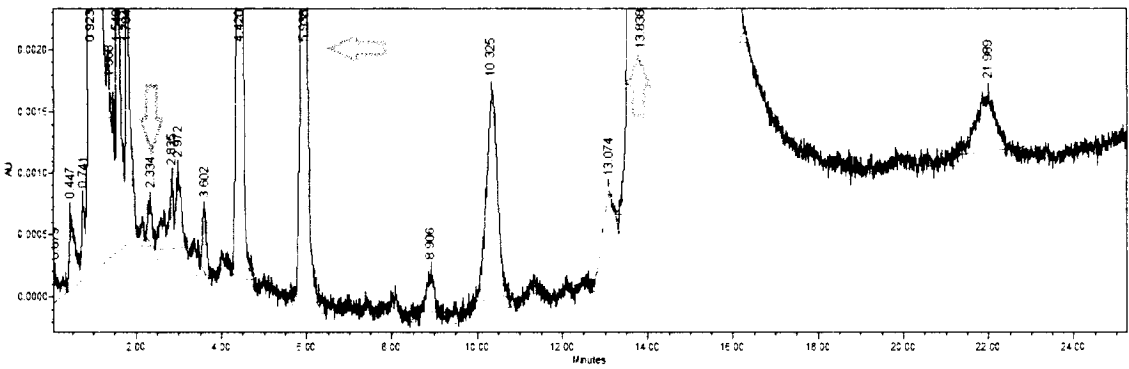


Chromatogramme de la FR

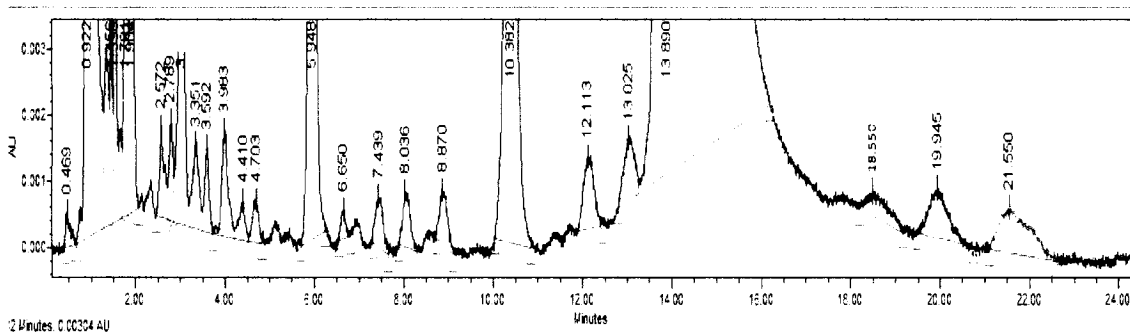


Chromatogramme de la FR

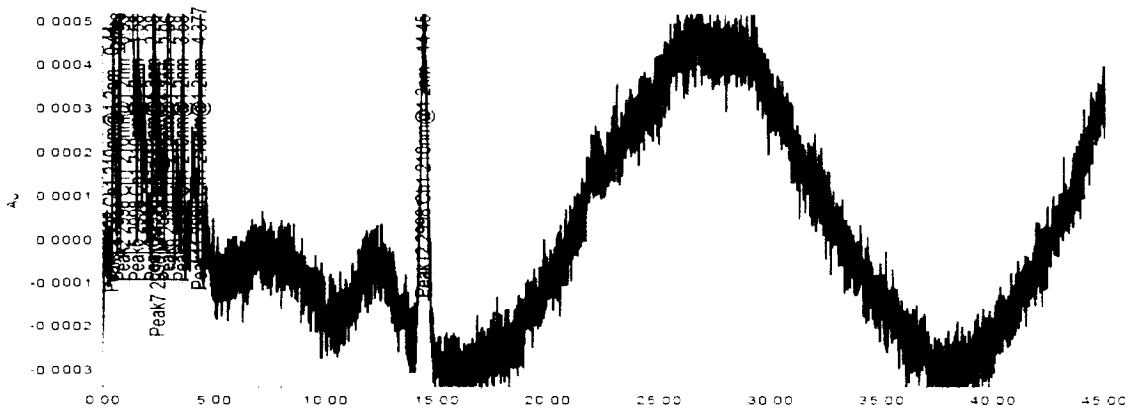
- *Dégradation Oxydante :*



Chromatogramme du principe actif



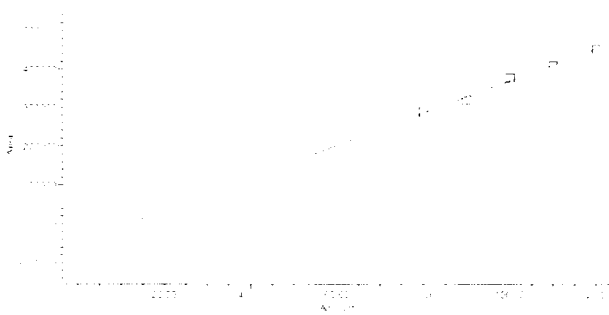
Chromatogramme de PA et FR



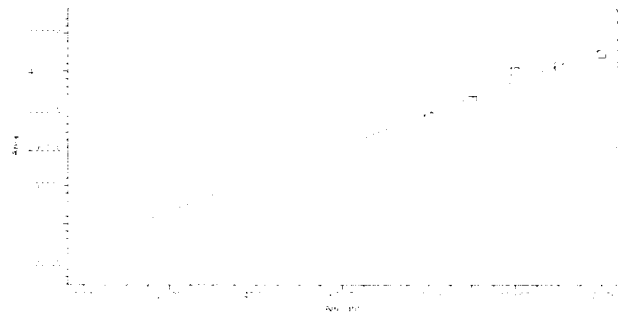
Chromatogramme de la FR

➤ Les droites de régression de linéarité :

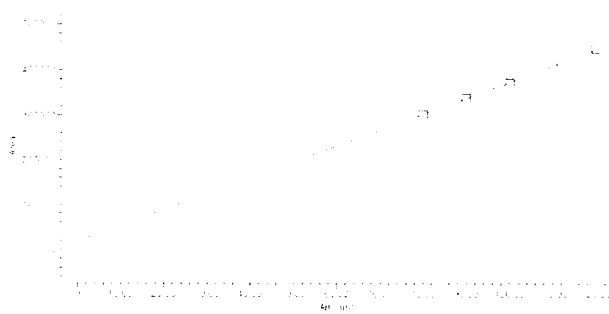
- Principe actif :



- Jour N°1

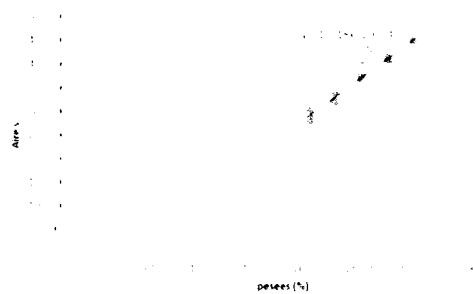


- Jour N°2



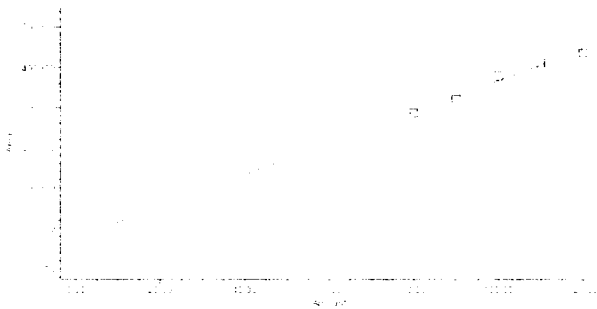
- JOUR N°3
seul

LINEARITE DU PRINCIPE ACTIF

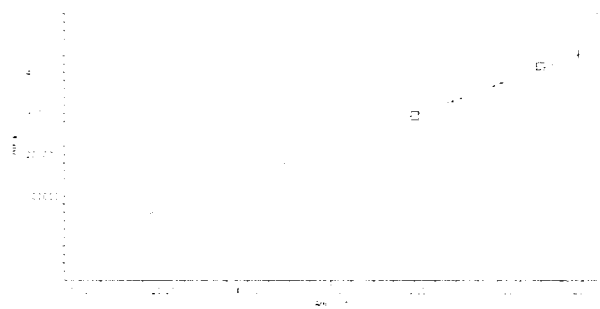


Droite de régression de principe actif

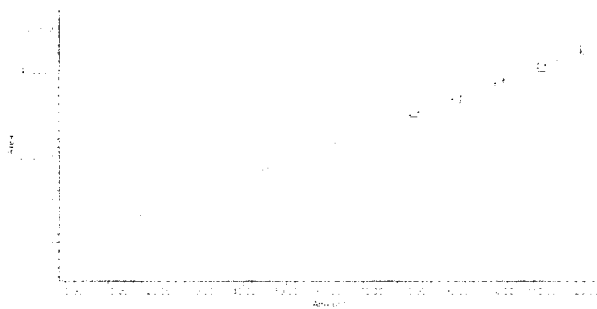
- **Forme reconstituée :**



- Jour N°1

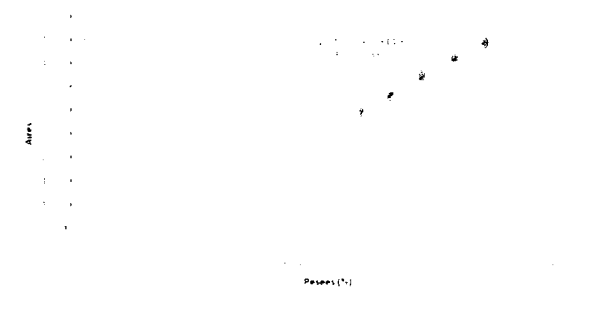


- Jour N°2



- Jour N°1

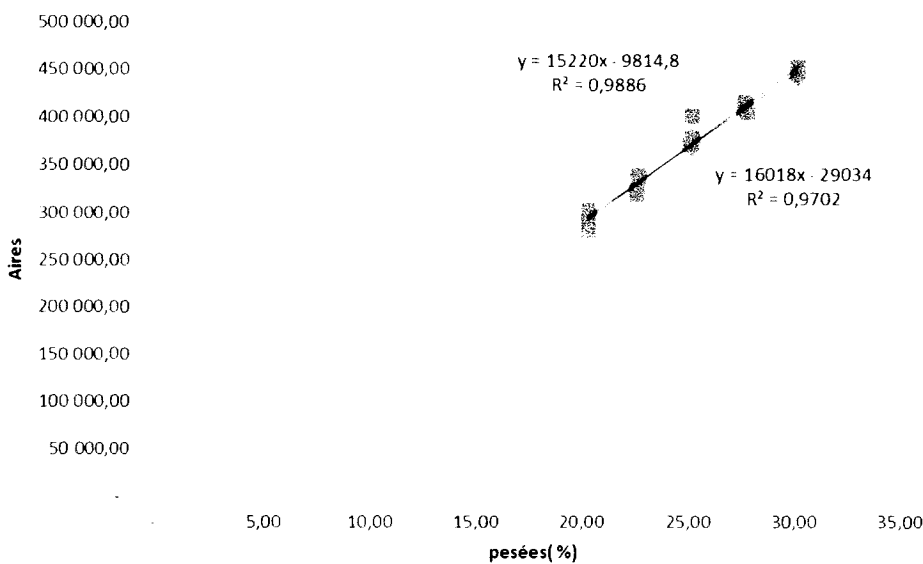
LINEARITE DE LA FORME PHARMACETIQUE



Droite de régression de la forme pharmaceutique

- *Principe actif et Forme reconstituée :*

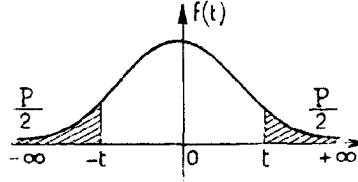
LINEARITE FR et PA



Droite de régression forme pharmaceutique reconstitué et principe actif seul

ANNEXE III : tableaux statistiques

Table de Student



$\frac{P}{2}$	0,90	0,80	0,70	0,60	0,50	0,40	0,30	0,20	0,10	0,05	0,02	0,01	0,001
1	0,158	0,325	0,510	0,727	1,000	1,376	1,983	3,078	5,314	12,706	31,621	63,657	636,619
2	0,142	0,289	0,445	0,617	0,616	1,061	1,386	1,886	2,920	4,303	8,965	9,325	31,598
3	0,137	0,277	0,424	0,584	0,785	0,978	1,250	1,638	2,353	3,182	4,541	5,841	12,929
4	0,134	0,271	0,414	0,569	0,741	0,941	1,190	1,533	2,132	2,776	3,747	4,604	8,611
5	0,132	0,267	0,408	0,559	0,727	0,920	1,156	1,476	2,015	2,571	3,365	4,032	6,869
6	0,131	0,265	0,404	0,553	0,718	0,906	1,134	1,440	1,943	2,447	3,143	3,707	5,959
7	0,130	0,263	0,402	0,549	0,711	0,896	1,119	1,415	1,895	2,365	2,998	3,499	5,408
8	0,130	0,262	0,399	0,546	0,706	0,889	1,108	1,397	1,860	2,306	2,896	3,355	5,041
9	0,129	0,261	0,396	0,543	0,703	0,883	1,100	1,383	1,833	2,262	2,821	3,250	4,781
10	0,129	0,260	0,397	0,542	0,700	0,879	1,093	1,372	1,812	2,228	2,764	3,169	4,587
11	0,129	0,260	0,396	0,540	0,697	0,876	1,088	1,363	1,795	2,201	2,718	3,106	4,437
12	0,128	0,259	0,395	0,539	0,695	0,873	1,083	1,356	1,782	2,179	2,681	3,055	4,318
13	0,128	0,259	0,394	0,538	0,694	0,870	1,079	1,350	1,771	2,160	2,650	3,012	4,221
14	0,128	0,258	0,393	0,537	0,692	0,868	1,076	1,345	1,761	2,145	2,624	2,977	4,140
15	0,128	0,258	0,393	0,536	0,691	0,866	1,074	1,341	1,753	2,131	2,602	2,947	4,073
16	0,128	0,258	0,392	0,535	0,690	0,865	1,071	1,337	1,745	2,120	2,583	2,921	4,015
17	0,128	0,257	0,392	0,534	0,689	0,863	1,069	1,333	1,740	2,110	2,567	2,898	3,963
18	0,127	0,257	0,392	0,534	0,688	0,862	1,067	1,330	1,734	2,101	2,552	2,878	3,922
19	0,127	0,257	0,391	0,533	0,688	0,861	1,066	1,328	1,729	2,093	2,539	2,861	3,883
20	0,127	0,257	0,391	0,533	0,687	0,860	1,064	1,325	1,725	2,086	2,528	2,845	3,850
21	0,127	0,257	0,391	0,532	0,686	0,859	1,063	1,323	1,721	2,080	2,518	2,831	3,819
22	0,127	0,256	0,390	0,532	0,686	0,858	1,061	1,321	1,717	2,074	2,508	2,819	3,792
23	0,127	0,256	0,390	0,532	0,685	0,858	1,060	1,319	1,714	2,069	2,500	2,807	3,767
24	0,127	0,256	0,390	0,531	0,685	0,857	1,059	1,318	1,711	2,064	2,492	2,797	3,745
25	0,127	0,256	0,390	0,531	0,684	0,856	1,058	1,316	1,708	2,060	2,485	2,787	3,725
26	0,127	0,256	0,390	0,531	0,684	0,856	1,058	1,315	1,706	2,056	2,478	2,779	3,707
27	0,127	0,256	0,389	0,531	0,684	0,855	1,057	1,314	1,703	2,052	2,473	2,771	3,690
28	0,127	0,256	0,389	0,530	0,683	0,855	1,056	1,313	1,701	2,048	2,467	2,763	3,674
29	0,127	0,256	0,389	0,530	0,683	0,854	1,055	1,311	1,699	2,045	2,462	2,756	3,659
30	0,127	0,256	0,389	0,530	0,683	0,854	1,055	1,310	1,697	2,042	2,457	2,750	3,646
40	0,126	0,255	0,388	0,529	0,681	0,851	1,050	1,303	1,684	2,021	2,423	2,704	3,551
80	0,126	0,254	0,387	0,527	0,679	0,848	1,046	1,296	1,671	2,000	2,390	2,660	3,460
120	0,126	0,254	0,388	0,526	0,677	0,845	1,041	1,269	1,658	1,980	2,358	2,617	3,373
∞	0,126	0,253	0,385	0,524	0,674	0,842	1,036	1,262	1,645	1,960	2,326	2,576	3,291

Table de Fisher

	1	2	3	4	5	6	8	10	15	
1	16,31	19,95	218,7	111,6	780,7	214,0	113,0	213,9	21,01	214,7
2	19,43	19,10	21,7	78,55	1,30	19,73	13,37	19,41	1,13	19,5
3	7,71	6,27	3,25	1,72	1,9	8,99	5,94	8,11	1,94	7,54
4	6,61	5,24	2,20	1,19	1,21	6,41	4,04	6,41	1,27	6,13
5	6,00	4,79	1,61	0,79	0,68	4,55	2,87	4,55	0,9	5,20
6	5,59	4,43	1,26	0,58	0,49	3,75	2,15	4,06	0,67	4,47
7	5,33	4,24	0,97	0,42	0,37	3,17	1,73	3,57	0,5	4,19
8	5,15	4,15	0,77	0,31	0,31	2,69	1,44	3,29	0,41	3,95
9	5,03	4,09	0,62	0,23	0,26	2,33	1,23	3,07	0,34	3,71
10	4,95	4,04	0,51	0,18	0,21	2,02	1,07	2,91	0,29	3,51
11	4,88	3,99	0,43	0,14	0,16	1,76	0,93	2,78	0,25	3,36
12	4,83	3,95	0,37	0,11	0,13	1,55	0,82	2,66	0,22	3,26
13	4,79	3,92	0,32	0,09	0,11	1,37	0,73	2,56	0,19	3,18
14	4,75	3,89	0,28	0,07	0,09	1,22	0,66	2,47	0,17	3,11
15	4,72	3,87	0,24	0,06	0,08	1,09	0,6	2,4	0,15	3,05
16	4,69	3,85	0,21	0,05	0,07	0,98	0,55	2,32	0,14	2,99
17	4,67	3,83	0,19	0,04	0,06	0,89	0,51	2,26	0,13	2,94
18	4,65	3,82	0,17	0,04	0,05	0,81	0,47	2,21	0,12	2,9
19	4,63	3,81	0,15	0,03	0,04	0,74	0,44	2,16	0,11	2,86
20	4,62	3,8	0,14	0,03	0,04	0,68	0,41	2,12	0,1	2,83
21	4,61	3,79	0,13	0,02	0,03	0,63	0,38	2,08	0,09	2,8
22	4,6	3,78	0,12	0,02	0,03	0,59	0,36	2,04	0,09	2,77
23	4,59	3,77	0,11	0,02	0,02	0,55	0,34	2,01	0,08	2,75
24	4,58	3,76	0,1	0,02	0,02	0,51	0,32	1,98	0,08	2,73
25	4,57	3,75	0,09	0,01	0,02	0,48	0,31	1,95	0,07	2,71
26	4,56	3,74	0,08	0,01	0,02	0,45	0,29	1,93	0,07	2,69
27	4,55	3,73	0,08	0,01	0,02	0,42	0,28	1,91	0,06	2,67
28	4,54	3,72	0,07	0,01	0,02	0,4	0,27	1,89	0,06	2,65
29	4,53	3,71	0,07	0,01	0,02	0,38	0,26	1,87	0,05	2,64
30	4,52	3,7	0,06	0,01	0,02	0,36	0,25	1,85	0,05	2,62
31	4,51	3,69	0,06	0,01	0,02	0,34	0,24	1,83	0,05	2,61
32	4,5	3,68	0,05	0,01	0,02	0,32	0,23	1,81	0,04	2,6
33	4,49	3,67	0,05	0,01	0,02	0,3	0,22	1,79	0,04	2,59
34	4,48	3,66	0,04	0,01	0,02	0,28	0,21	1,77	0,04	2,58
35	4,47	3,65	0,04	0,01	0,02	0,26	0,2	1,75	0,03	2,57
36	4,46	3,64	0,04	0,01	0,02	0,24	0,19	1,73	0,03	2,56
37	4,45	3,63	0,03	0,01	0,02	0,22	0,18	1,71	0,03	2,55
38	4,44	3,62	0,03	0,01	0,02	0,2	0,17	1,69	0,03	2,54
39	4,43	3,61	0,03	0,01	0,02	0,18	0,16	1,67	0,02	2,53
40	4,42	3,6	0,02	0,01	0,02	0,16	0,15	1,65	0,02	2,52
41	4,41	3,59	0,02	0,01	0,02	0,14	0,14	1,63	0,02	2,51
42	4,4	3,58	0,02	0,01	0,02	0,12	0,13	1,61	0,02	2,5
43	4,39	3,57	0,02	0,01	0,02	0,1	0,12	1,59	0,02	2,49
44	4,38	3,56	0,01	0,01	0,02	0,08	0,11	1,57	0,02	2,48
45	4,37	3,55	0,01	0,01	0,02	0,06	0,1	1,55	0,01	2,47
46	4,36	3,54	0,01	0,01	0,02	0,04	0,09	1,53	0,01	2,46
47	4,35	3,53	0,01	0,01	0,02	0,03	0,08	1,51	0,01	2,45
48	4,34	3,52	0,01	0,01	0,02	0,02	0,07	1,49	0,01	2,44
49	4,33	3,51	0,01	0,01	0,02	0,01	0,06	1,47	0,01	2,43
50	4,32	3,5	0,01	0,01	0,02	0,01	0,05	1,45	0,01	2,42

Test de Dixon

n	Level of Significance α		
	0.10	0.05	0.01
3	0.856	0.941	1.985
4	0.679	0.765	1.889
5	0.557	0.642	1.789
6	0.487	0.560	1.698
7	0.434	0.507	1.637
8	0.399	0.464	1.598
9	0.371	0.432	1.565
10	0.349	0.407	1.537
11	0.331	0.386	1.512
12	0.315	0.366	1.492
13	0.301	0.347	1.475
14	0.291	0.331	1.461
15	0.282	0.317	1.449
16	0.275	0.307	1.439
17	0.269	0.299	1.431
18	0.264	0.293	1.424
19	0.261	0.288	1.418
20	0.258	0.284	1.414
21	0.256	0.281	1.411
22	0.254	0.278	1.408
23	0.253	0.276	1.406
24	0.252	0.274	1.404
25	0.251	0.273	1.403
26	0.25	0.272	1.402
27	0.25	0.271	1.401
28	0.25	0.27	1.401
29	0.25	0.27	1.401
30	0.25	0.27	1.401

Table de Cochran

n	F _{0.05}		F _{0.01}		F _{0.001}		F _{0.0001}	
	1	2	1	2	1	2	1	2
2								
3	19.16	19.16	19.16	19.16	19.16	19.16	19.16	19.16
4	16.69	16.69	16.69	16.69	16.69	16.69	16.69	16.69
5	15.52	15.52	15.52	15.52	15.52	15.52	15.52	15.52
6	14.70	14.70	14.70	14.70	14.70	14.70	14.70	14.70
7	14.15	14.15	14.15	14.15	14.15	14.15	14.15	14.15
8	13.75	13.75	13.75	13.75	13.75	13.75	13.75	13.75
9	13.45	13.45	13.45	13.45	13.45	13.45	13.45	13.45
10	13.22	13.22	13.22	13.22	13.22	13.22	13.22	13.22
11	13.04	13.04	13.04	13.04	13.04	13.04	13.04	13.04
12	12.90	12.90	12.90	12.90	12.90	12.90	12.90	12.90
13	12.79	12.79	12.79	12.79	12.79	12.79	12.79	12.79
14	12.70	12.70	12.70	12.70	12.70	12.70	12.70	12.70
15	12.63	12.63	12.63	12.63	12.63	12.63	12.63	12.63

➤ *Dégradation forcée :*

- 1-milieu alcalin : NaOH 1N

- Tableaux de résultats :

PA + NAOH 1N	RT	RRT
1	0.460	0.025
2	0.922	0.051
3	1.062	0.059
4	1.302	0.072
5	1.535	0.085
6	1.781	0.09
7	1.954	0.10
8	2.444	0.136
9	3.435	0.192
10	3.832	0.214
11	4.016	0.224
12	4.254	0.238
13	4.988	0.279
14	7.792	0.436
15	13.505	0.756
16	13.933	0.780
17	17.855	1

PA+FR + NAOH 1N	TR	RRT
1	0.472	0.022
2	0.920	0.044
3	1.058	0.051
4	1.778	0.086
5	2.387	0.115
6	2.568	0.124
7	4.196	0.202
8	4.552	0.220
9	5.583	0.270
10	5.818	0.281
11	8.942	0.432
12	15.981	0.773
13	16.455	0.796
14	20.669	1
15	25.083	1.213
16	26.303	1.272
17	35.066	1.696
18	35.313	1.70

FR + NAOH 1N	RT
1	0.466
2	0.876
3	1.060
4	1.535
5	2.387
6	4.203
7	5.581
8	24.102
9	25.768

- milieu acide : HCL 1N

- Tableaux de résultats :

PA+HCL 1N	RT	RRT
1	0.466	0.033
2	0.846	0.061
3	0.979	0.070
4	1.174	0.08
5	1.436	0.103
6	1.579	0.114
7	1.785	0.129
8	2.318	0.167
9	2.569	0.185
10	2.930	0.212
11	3.603	0.260
12	4.449	0.321
13	4.730	0.342
14	5.100	0.369
15	5.911	0.427
16	10.312	0.746
17	13.820	1

PA+FR + HCL 1N	TR	RRT
1	0.466	0.033
2	0.976	0.070
3	1.306	0.094
4	1.430	0.103
5	1.577	0.114
6	1.783	0.128
7	2.300	0.166
8	2.564	0.185
9	2.901	0.209
10	3.057	0.221
11	3.354	0.242
12	3.578	0.258
13	3.974	0.287
14	4.717	0.341
15	5.099	0.368
16	5.919	0.428
17	7.404	0.535
18	8.028	0.580
19	8.882	0.642
20	10.340	0.747
21	13.010	0.941
22	13.825	1

FR + hcl 1N	RT
1	0.464
2	0.946
3	1.172
4	1.473
5	1.613
6	2.307
7	2.631
8	2.935
9	3.595
10	4.029
11	4.426
12	14.350

• milieu oxydant H_2O_2 :

- Tableaux de résultats

PA+ H_2O_2	RT	RTT
1	0.079	0.0057
2	0.447	0.032
3	0.741	0.053
4	0.923	0.066
5	1.368	0.098
6	1.540	0.111
7	1.784	0.128
8	2.334	0.168
9	2.835	0.204
10	2.972	0.214
11	3.602	0.260
12	4.420	0.319
13	5.938	0.429
14	10.325	0.746
15	13.830	1

PA+FR + h2o2	TR	RRT
1	0.469	0.033
2	0.922	0.066
3	1.456	0.104
4	1.538	0.110
5	1.781	0.128
6	1.904	0.137
7	2.572	0.185
8	2.789	0.200
9	3.024	0.217
10	3.351	0.241
11	3.592	0.258
12	3.983	0.286
13	4.410	0.317
14	4.703	0.338
15	5.948	0.428
16	6.650	0.478
17	7.439	0.535
18	8.036	0.578
19	8.870	0.638
20	10.382	0.747
21	12.113	0.872
22	13.025	0.937
23	13.890	1
24	19.945	1.43
25	18.550	1,33

FR+H2O2	0.446
1	0.748
2	0.931
3	1.580
4	2.289
5	2.519
6	2.960
7	3.581
9	4.377
10	14.452

Résumé :

La qualité constitue la priorité de l'industrie pharmaceutique. Des méthodes d'analyses validées vont permettre de limiter les risques non-qualité. Le présent document est consacré à la validation d'une méthode analytique de dosage, ne figurant dans aucune pharmacopée jusqu'à ce jour, développée et optimisée afin de doser, par chromatographie liquide de paires d'ions (HPLC UV-VIS) dans le produit fini, un médicament spasmolytique inhibant l'entrée du calcium au niveau de la cellule musculaire lisse intestinale dont la DCI : pinavérium bromure.

Les résultats de la validation de la présente méthode analytique apportent la preuve qu'elle est adaptée aux objectifs que l'on s'est fixé.

Mots clés :

Validation, Dosage, Pinavérium bromure, HPLC UV-VIS, Chromatographie de paires d'ion

Abstract:

Quality constitute the priority of pharmaceutical industry. Validated analytical methods allow limiting no-quality risks. The present document is devoted to validation of an analytical assay method, which does not figure in any pharmacopeia until this day. The developed and optimized method intends to measure, by ion-pair liquid chromatography (HPLC UV-VIS) in drug product, a spasmolytic drug, which inhibit the entrance of calcium in intestinal smooth muscle cell, named Pinaverium bromide.

Validation results of the present method demonstrate that it is suitable for its intended purposes.

Keywords:

Validation, Assay, Pinaverium bromide, HPLC UV-VIS, Ion-pair chromatography

- **ATTOUI Omar.**

- **attouioar@gmail.com.**

- **MENOUER Nassima.**

- **ph.menouer@gmail.com.**

- **ZENATI Maroua.**

- **phzenati@gmail.com.**

Résumé :

La qualité constitue la priorité de l'industrie pharmaceutique. Des méthodes d'analyses validées vont permettre de limiter les risques non-qualité. Le présent document est consacré à la validation d'une méthode analytique de dosage, ne figurant dans aucune pharmacopée jusqu'à ce jour, développée et optimisée afin de doser, par chromatographie liquide de paires d'ions (HPLC UV-VIS) dans le produit fini, un médicament spasmolytique inhibant l'entrée du calcium au niveau de la cellule musculaire lisse intestinale dont la DCI : pinavérium bromure.

Les résultats de la validation de la présente méthode analytique apportent la preuve qu'elle est adaptée aux objectifs que l'on s'est fixé.

Mots clés :

Validation, Dosage, Pinavérium bromure, HPLC UV-VIS, Chromatographie de paires d'ion

Abstract:

Quality constitute the priority of pharmaceutical industry. Validated analytical methods allow limiting no-quality risks. The present document is devoted to validation of an analytical assay method, which does not figure in any pharmacopeia until this day. The developed and optimized method intends to measure, by ion-pair liquid chromatography (HPLC UV-VIS) in drug product, a spasmolytic drug, which inhibit the entrance of calcium in intestinal smooth muscle cell, named Pinaverium bromide.

Validation results of the present method demonstrate that it is suitable for its intended purposes.

Keywords:

Validation, Assay, Pinaverium bromide, HPLC UV-VIS, Ion-pair chromatography