

ETUDE COMPARATIVE DE LA VALIDATION
D'UNE
METHODE DE DOSAGE D'amlodipine besilate
dans
une spécialité pharmaceutique Par hplc/uv.
Démarche classique vs nouvelle approche

THESE**

Présentée et soutenue publiquement le :.....

PAR M^{lle}.Hassania KAOUNI.

Né le 13 Janvier 1983 à FES.

Pour l'Obtention du Doctorat en
Pharmacie

MOTS CLES: Validation analytique-profil d'exactitude-contrôle du qualité-HPLC/UV-

JURY

Mr. Y.Cherrah

Professeur de Pharmacologie

PRESIDENT

Mr.A.Bouklouze

Professeur des Applications Pharmaceutiques

RAPPORTEUR

Mr. M.Draoui

Professeur de chimie Analytique

Mr. R.Aboukal

Professeur de Réanimation Médicale

JUGES

سُبْحَانَكَ

لَا عِلْمَ لَنَا إِلَّا بِمَا عَلَّمْتَنَا

إِنَّا كُنَّا أَنتَ الْعَلِيمُ الْحَكِيمُ

(البقرة: من الآية 32)



**UNIVERSITE MOHAMMED V- SOUISSI
FACULTE DE MEDECINE ET DE PHARMACIE - RABAT**

DOYENS HONORAIRES :

1962 – 1969	: Docteur Abdelmalek FARAJ
1969 – 1974	: Professeur Abdellatif BERBICH
1974 – 1981	: Professeur Bachir LAZRAK
1981 – 1989	: Professeur Taieb CHKILI
1989 – 1997	: Professeur Mohamed Tahar ALAOUI
1997 – 2003	: Professeur Abdelmajid BELMAHI

ADMINISTRATION :

Doyen :	Professeur Najia HAJJAJ
Vice Doyen chargé des Affaires Académiques et Estudiantines	Professeur Mohammed JIDDANE
Vice Doyen chargé de la Recherche et de la Coopération	Professeur Naima LAHBABI-AMRANI
Vice Doyen chargé des Affaires Spécifiques à la Pharmacie	Professeur Yahia CHERRAH
Secrétaire Général :	Monsieur Mohammed BENABDELLAH

PROFESSEURS :

Décembre 1967

1. Pr. TOUNSI Abdelkader Pathologie Chirurgicale

Février, Septembre, Décembre 1973

2. Pr. ARCHANE My Idriss* Pathologie Médicale
3. Pr. BENOMAR Mohammed Cardiologie
4. Pr. CHAOUI Abdellatif Gynécologie Obstétrique
5. Pr. CHKILI Taieb Neuropsychiatrie

Janvier et Décembre 1976

6. Pr. HASSAR Mohamed Pharmacologie Clinique

Février 1977

7. Pr. AGOUMI Abdelaziz Parasitologie
8. Pr. BENKIRANE ép. AGOUMI Najia Hématologie
9. Pr. EL BIED ép. IMANI Farida Radiologie

Février Mars et Novembre 1978

10. Pr. ARHARBI Mohamed Cardiologie
11. Pr. SLAOUI Abdelmalek Anesthésie Réanimation

Mars 1979

12. Pr. LAMDOUAR ép. BOUAZZAOUI Naima Pédiatrie

Mars, Avril et Septembre 1980

13. Pr. EL KHAMLIHI Abdeslam Neurochirurgie
14. Pr. MESBAHI Redouane Cardiologie

Mai et Octobre 1981

- 15. Pr. BENOMAR Said*
- 16. Pr. BOUZOUBAA Abdelmajid
- 17. Pr. EL MANOUAR Mohamed
- 18. Pr. HAMMANI Ahmed*
- 19. Pr. MAAZOUZI Ahmed Wajih
- 20. Pr. SBIHI Ahmed
- 21. Pr. TAOBANE Hamid*

Anatomie Pathologique
Cardiologie
Traumatologie-Orthopédie
Cardiologie
Chirurgie Cardio-Vasculaire
Anesthésie Réanimation
Chirurgie Thoracique

Mai et Novembre 1982

- 22. Pr. ABROUQ Ali*
- 23. Pr. BENOMAR M'hammed
- 24. Pr. BENSOUA Mohamed
- 25. Pr. BENOSMAN Abdellatif
- 26. Pr. CHBICHEB Abdelkrim
- 27. Pr. JIDAL Bouchaib*
- 28. Pr. LAHBABI ép. AMRANI Naïma

Oto-Rhino-Laryngologie
Chirurgie-Cardio-Vasculaire
Anatomie
Chirurgie Thoracique
Biophysique
Chirurgie Maxillo-faciale
Physiologie

Novembre 1983

- 29. Pr. ALAOUI TAHIRI Kébir*
- 30. Pr. BALAFREJ Amina
- 31. Pr. BELLAKHDAR Fouad
- 32. Pr. HAJJAJ ép. HASSOUNI Najia
- 33. Pr. SRAIRI Jamal-Eddine

Pneumo-phtisiologie
Pédiatrie
Neurochirurgie
Rhumatologie
Cardiologie

Décembre 1984

- 34. Pr. BOUCETTA Mohamed*
- 35. Pr. EL OUEDDARI Brahim El Khalil
- 36. Pr. MAAOUNI Abdelaziz
- 37. Pr. MAAZOUZI Ahmed Wajdi
- 38. Pr. NAJI M'Barek *
- 39. Pr. SETTAF Abdellatif

Neurochirurgie
Radiothérapie
Médecine Interne
Anesthésie -Réanimation
Immuno-Hématologie
Chirurgie

Novembre et Décembre 1985

- 40. Pr. BENJELLOUN Halima
- 41. Pr. BENSALD Younes
- 42. Pr. EL ALAOUI Faris Moulay El Mostafa
- 43. Pr. IHRAI Hssain *
- 44. Pr. IRAQI Ghali
- 45. Pr. KZADRI Mohamed

Cardiologie
Pathologie Chirurgicale
Neurologie
Stomatologie et Chirurgie Maxillo-Faciale
Pneumo-phtisiologie
Oto-Rhino-laryngologie

Janvier, Février et Décembre 1987

- 46. Pr. AJANA Ali
- 47. Pr. AMMAR Fanid
- 48. Pr. CHAHED OUAZZANI ép.TAOBANE Houria
- 49. Pr. EL FASSY FIIHRI Mohamed Taoufiq
- 50. Pr. EL HAITEM Naïma
- 51. Pr. EL MANSOURI Abdellah*
- 52. Pr. EL YAACOUBI Moradh
- 53. Pr. ESSAID EL FEYDI Abdellah
- 54. Pr. LACHKAR Hassan
- 55. Pr. OHAYON Victor*

Radiologie
Pathologie Chirurgicale
Gastro-Entérologie
Pneumo-phtisiologie
Cardiologie
Chimie-Toxicologie Expertise
Traumatologie Orthopédie
Gastro-Entérologie
Médecine Interne
Médecine Interne

56. Pr. YAHYAOUI Mohamed

Décembre 1988

- 57. Pr. BENHMAMOUCHE Mohamed Najib
- 58. Pr. DAFIRI Rachida
- 59. Pr. FAIK Mohamed
- 60. Pr. FIKRI BEN BRAHIM Noureddine
- 61. Pr. HERMAS Mohamed
- 62. Pr. TOULOUNE Farida*

Décembre 1989 Janvier et Novembre 1990

- 63. Pr. ABIR ép. KHALIL Saadia
- 64. Pr. ACHOUR Ahmed*
- 65. Pr. ADNAOUI Mohamed
- 66. Pr. AOUNI Mohamed
- 67. Pr. AZENDOUR BENACEUR*
- 68. Pr. BENAMEUR Mohamed*
- 69. Pr. BOUKILI MAKHOUKHI Abdelali
- 70. Pr. CHAD Bouziane
- 71. Pr. CHKOFF Rachid
- 72. Pr. FARCHADO Fouzia ép. BENABDELLAH
- 73. Pr. HACHIM Mohammed*
- 74. Pr. HACHIMI Mohamed
- 75. Pr. KHARBACH Aïcha
- 76. Pr. MANSOURI Fatima
- 77. Pr. OUZZANI Taïbi Mohamed Réda
- 78. Pr. SEDRATI Omar*
- 79. Pr. TAZI Saoud Anas
- 80. Pr. TERHZZAZ Abdellah*

Février Avril Juillet et Décembre 1991

- 81. Pr. AL HAMANY Zaïtounia
- 82. Pr. ATMANI Mohamed*
- 83. Pr. AZZOUZI Abderrahim
- 84. Pr. BAYAHIA ép. HASSAM Rabéa
- 85. Pr. BELKOUCHI Abdelkader
- 86. Pr. BENABDELLAH Chahrazad
- 87. Pr. BENCHEKROUN BELABBES Abdelatif
- 88. Pr. BENSOUDA Yahia
- 89. Pr. BERRAHO Amina
- 90. Pr. BEZZAD Rachid
- 91. Pr. CHABRAOUI Layachi
- 92. Pr. CHANA El Houssaine*
- 93. Pr. CHERRAH Yahia
- 94. Pr. CHOKAIRI Omar
- 95. Pr. FAJRI Ahmed*
- 96. Pr. JANATI Idrissi Mohamed*
- 97. Pr. KHATTAB Mohamed
- 98. Pr. NEJMI Maati
- 99. Pr. OUAALINE Mohammed*
- 100. Pr. SOULAYMANI ép. BENCHEIKH Rachida
- 101. Pr. TAOUFIK Jamal

Neurologie

Chirurgie Pédiatrique
Radiologie
Urologie
Médecine Préventive, Santé Publique et Hygiène
Traumatologie Orthopédie
Médecine Interne

Cardiologie
Chirurgicale
Médecine Interne
Médecine Interne
Oto-Rhino-Laryngologie
Radiologie
Cardiologie
Pathologie Chirurgicale
Pathologie Chirurgicale
Pédiatrique
Médecine-Interne
Urologie
Gynécologie -Obstétrique
Anatomie-Pathologique
Neurologie
Dermatologie
Anesthésie Réanimation
Ophtalmologie

Anatomie-Pathologique
Anesthésie Réanimation
Anesthésie Réanimation
Néphrologie
Chirurgie Générale
Hématologie
Chirurgie Générale
Pharmacie galénique
Ophtalmologie
Gynécologie Obstétrique
Biochimie et Chimie
Ophtalmologie
Pharmacologie
Histologie Embryologie
Psychiatrie
Chirurgie Générale
Pédiatrie
Anesthésie-Réanimation
Médecine Préventive, Santé Publique et Hygiène
Pharmacologie
Chimie thérapeutique

Décembre 1992

- 102. Pr. AHALLAT Mohamed
- 103. Pr. BENOUDA Amina
- 104. Pr. BENSOUA Adil
- 105. Pr. BOUJIDA Mohamed Najib
- 106. Pr. CHAHED OUAZZANI Laaziza
- 107. Pr. CHAKIR Nouredine
- 108. Pr. CHRAIBI Chafiq
- 109. Pr. DAOUDI Rajae
- 110. Pr. DEHAYNI Mohamed*
- 111. Pr. EL HADDOURY Mohamed
- 112. Pr. EL OUAHABI Abdessamad
- 113. Pr. FELLAT Rokaya
- 114. Pr. GHAFIR Driss*
- 115. Pr. JIDDANE Mohamed
- 116. Pr. OUAZZANI TAIBI Med Charaf Eddine
- 117. Pr. TAGHY Ahmed
- 118. Pr. ZOUHDI Mimoun

- Chirurgie Générale
- Microbiologie
- Anesthésie Réanimation
- Radiologie
- Gastro-Entérologie
- Radiologie
- Gynécologie Obstétrique
- Ophtalmologie
- Gynécologie Obstétrique
- Anesthésie Réanimation
- Neurochirurgie
- Cardiologie
- Médecine Interne
- Anatomie
- Gynécologie Obstétrique
- Chirurgie Générale
- Microbiologie

Mars 1994

- 119. Pr. AGNAOU Lahcen
- 120. Pr. AL BAROUDI Saad
- 121. Pr. ARJI Moha*
- 122. Pr. BENCHERIFA Fatiha
- 123. Pr. BENJAAFAR Nouredine
- 124. Pr. BENJELLOUN Samir
- 125. Pr. BENRAIS Nozha
- 126. Pr. BOUNASSE Mohammed*
- 127. Pr. CAOUI Malika
- 128. Pr. CHRAIBI Abdelmjid
- 129. Pr. EL AMRANI ép. AHALLAT Sabah
- 130. Pr. EL AOUDAD Rajae
- 131. Pr. EL BARDOUNI Ahmed
- 132. Pr. EL HASSANI My Rachid
- 133. Pr. EL IDRISSE LAMGHARI Abdennaceur
- 134. Pr. EL KIRAT Abdelmajid*
- 135. Pr. ERROUGANI Abdelkader
- 136. Pr. ESSAKALI Malika
- 137. Pr. ETTAYEBI Fouad
- 138. Pr. HADRI Larbi*
- 139. Pr. HDA Ali*
- 140. Pr. HASSAM Badredine
- 141. Pr. IFRINE Lahssan
- 142. Pr. JELTHI Ahmed
- 143. Pr. MAHFOUD Mustapha
- 144. Pr. MOUDENE Ahmed*
- 145. Pr. MOSSEDDAQ Rachid*
- 146. Pr. OULBACHA Said
- 147. Pr. RHRAB Brahim
- 148. Pr. SENOUCI ép. BELKHADIR Karima
- 149. Pr. SLAOUI Anas

- Ophtalmologie
- Chirurgie Générale
- Anesthésie Réanimation
- Ophtalmologie
- Radiothérapie
- Chirurgie Générale
- Biophysique
- Pédiatrie
- Biophysique
- Endocrinologie et Maladies Métabolique
- Gynécologie Obstétrique
- Immunologie
- Traumatologie Orthopédie
- Radiologie
- Médecine Interne
- Chirurgie Cardio- Vasculaire
- Chirurgie Générale
- Immunologie
- Chirurgie Pédiatrique
- Médecine Interne
- Médecine Interne
- Dermatologie
- Chirurgie Générale
- Anatomie Pathologique
- Traumatologie Orthopédie
- Traumatologie Orthopédie
- Neurologie
- Chirurgie Générale
- Gynécologie Obstétrique
- Dermatologie
- Chirurgie Cardio-vasculaire

Mars 1994

- 150. Pr. ABBAR Mohamed*
- 151. Pr. ABDELHAK M'barek
- 152. Pr. BELAIDI Halima
- 153. Pr. BARHMI Rida Slimane
- 154. Pr. BENTAHILA Abdelali
- 155. Pr. BENYAHIA Mohammed Ali
- 156. Pr. BERRADA Mohamed Saleh
- 157. Pr. CHAMI Ilham
- 158. Pr. CHERKAOUI Lalla Ouafae
- 159. Pr. EL ABBADI Najia
- 160. Pr. HANINE Ahmed*
- 161. Pr. JALIL Abdelouahed
- 162. Pr. LAKHDAR Amina
- 163. Pr. MOUANE Nezha

Urologie
Chirurgie - Pédiatrique
Neurologie
Gynécologie Obstétrique
Pédiatrie
Gynécologie - Obstétrique
Traumatologie - Orthopédie
Radiologie
Ophtalmologie
Neurochirurgie
Radiologie
Chirurgie Générale
Gynécologie Obstétrique
Pédiatrie

Mars 1995

- 164. Pr. ABOUQUAL Redouane
- 165. Pr. AMRAOUI Mohamed
- 166. Pr. BAIDADA Abdelaziz
- 167. Pr. BARGACH Samir
- 168. Pr. BELLAHNECH Zakaria
- 169. Pr. BEDDOUCHE Amocrane*
- 170. Pr. BENAZZOUZ Mustapha
- 171. Pr. CHAARI Jilali*
- 172. Pr. DIMOU M'barek*
- 173. Pr. DRISSI KAMILI Mohammed Nordine*
- 174. Pr. EL MESNAOUI Abbes
- 175. Pr. ESSAKALI HOUSSYNI Leila
- 176. Pr. FERHATI Driss
- 177. Pr. HASSOUNI Fadil
- 178. Pr. HDA Abdelhamid*
- 179. Pr. IBEN ATTYA ANDALOUSSI Ahmed
- 180. Pr. IBRAHIMY Wafaa
- 182. Pr. BENOMAR ALI
- 183. Pr. BOUGTAB Abdesslam
- 184. Pr. ER RIHANI Hassan
- 185. Pr. EZZAITOUNI Fatima
- 186. Pr. KABBAJ Najat
- 187. Pr. LAZRAK Khalid (M)
- 188. Pr. OUTIFA Mohamed*

Réanimation Médicale
Chirurgie Générale
Gynécologie Obstétrique
Gynécologie Obstétrique
Urologie
Urologie
Gastro-Entérologie
Médecine Interne
Anesthésie Réanimation
Anesthésie Réanimation
Chirurgie Générale
Oto-Rhino-Laryngologie
Gynécologie Obstétrique
Médecine Préventive, Santé Publique et Hygiène
Cardiologie
Urologie
Ophtalmologie
Neurologie
Chirurgie Générale
Oncologie Médicale
Néphrologie
Radiologie
Traumatologie Orthopédie
Gynécologie Obstétrique

Décembre 1996

- 189. Pr. AMIL Touriya*
- 190. Pr. BELKACEM Rachid
- 191. Pr. BELMAHI Amin
- 192. Pr. BOULANOUAR Abdelkrim
- 193. Pr. EL ALAMI EL FARICHA EL Hassan
- 194. Pr. EL MELLOUKI Ouafae*
- 195. Pr. GAMRA Lamiae
- 196. Pr. GAOUZI Ahmed
- 197. Pr. MAHFOUDI M'barek*
- 198. Pr. MOHAMMADINE EL Hamid

Radiologie
Chirurgie Pédiatrie
Chirurgie réparatrice et plastique
Ophtalmologie
Chirurgie Générale
Parasitologie
Anatomie Pathologique
Pédiatrie
Radiologie
Chirurgie Générale

199. Pr. MOHAMMADI Mohamed
200. Pr. MOULINE Soumaya
201. Pr. OUADGHIRI Mohamed
202. Pr. OUZEDDOUN Naima
203. Pr. ZBIR EL Mehdi*

Médecine Interne
Pneumo-phtisiologie
Traumatologie – Orthopédie
Néphrologie
Cardiologie

Novembre 1997

204. Pr. ALAMI Mohamed Hassan
205. Pr. BEN AMAR Abdesselem
206. Pr. BEN SLIMANE Lounis
207. Pr. BIROUK Nazha
208. Pr. BOULAICH Mohamed
209. Pr. CHAOUIR Souad*
210. Pr. DERRAZ Said
211. Pr. ERREIMI Naima
212. Pr. FELLAT Nadia
213. Pr. GUEDDARI Fatima Zohra
214. Pr. HAIMEUR Charki*
215. Pr. KADDOURI Nouredine
216. Pr. KANOUNI NAWAL
217. Pr. KOUTANI Abdellatif
218. Pr. LAHLOU Mohamed Khalid
219. Pr. MAHRAOUI CHAFIQ
220. Pr. NAZZI M'barek*
221. Pr. OUAHABI Hamid*
222. Pr. SAFI Lahcen*
223. Pr. TAOUFIQ Jallal
224. Pr. YOUSFI MALKI Mounia

Gynécologie – Obstétrique
Chirurgie Générale
Urologie
Neurologie
O.RL.
Radiologie
Neurochirurgie
Pédiatrie
Cardiologie
Radiologie
Anesthésie Réanimation
Chirurgie – Pédiatrique
Physiologie
Urologie
Chirurgie Générale
Pédiatrie
Cardiologie
Neurologie
Anesthésie Réanimation
Psychiatrie
Gynécologie Obstétrique

Novembre 1998

225. Pr. BENKIRANE Majid*
226. Pr. KHATOURI Ali*
227. Pr. LABRAIMI Ahmed*

Hématologie
Cardiologie
Anatomie Pathologique

Novembre 1998

228. Pr. AFIFI RAJAA
229. Pr. AIT BENASSER MOULAY Ali*
230. Pr. ALOUANE Mohammed*
231. Pr. LACHKAR Azouz
232. Pr. LAHLOU Abdou
233. Pr. MAFTAH Mohamed*
234. Pr. MAHASSINI Najat
235. Pr. MDAGHRI ALAOUI Asmae
236. Pr. MANSOURI Abdelaziz*
237. Pr. NASSIH Mohamed*
238. Pr. RIMANI Mouna
239. Pr. ROUIMI Abdelhadi

Gastro - Entérologie
Pneumo-phtisiologie
Oto- Rhino- Laryngologie
Urologie
Traumatologie Orthopédie
Neurochirurgie
Anatomie Pathologique
Pédiatrie
Neurochirurgie
Stomatologie Et Chirurgie Maxillo Faciale
Anatomie Pathologique
Neurologie

Janvier 2000

240. Pr. ABID Ahmed*
241. Pr. AIT OUMAR Hassan
242. Pr. BENCHERIF My Zahid
243. Pr. BENJELLOUN DAKHAMA Badr.Sououd

Pneumo-phtisiologie
Pédiatrie
Ophtalmologie
Pédiatrie

244. Pr. BOURKADI Jamal-Eddine
245. Pr. CHAOUI Zineb
246. Pr. CHARIF CHEFCHAOUNI Al Montacer
247. Pr. ECHARRAB El Mahjoub
248. Pr. EL FTOUH Mustapha
249. Pr. EL MOSTARCHID Brahim*
250. Pr. EL OTMANYAzzedine
251. Pr. GHANNAM Rachid
252. Pr. HAMMANI Lahcen
253. Pr. ISMAILI Mohamed Hatim
254. Pr. ISMAILI Hassane*
255. Pr. KRAMI Hayat Ennoufouss
256. Pr. MAHMOUDI Abdelkrim*
257. Pr. TACHINANTE Rajae
258. Pr. TAZI MEZALEK Zoubida

Pneumo-phtisiologie
Ophtalmologie
Chirurgie Générale
Chirurgie Générale
Pneumo-phtisiologie
Neurochirurgie
Chirurgie Générale
Cardiologie
Radiologie
Anesthésie-Réanimation
Traumatologie Orthopédie
Gastro-Entérologie
Anesthésie-Réanimation
Anesthésie-Réanimation
Médecine Interne

Novembre 2000

259. Pr. AIDI Saadia
260. Pr. AIT OURHROUIL Mohamed
261. Pr. AJANA Fatima Zohra
262. Pr. BENAMR Said
263. Pr. BENCHEKROUN Nabih
264. Pr. BOUSSELMANE Nabile*
265. Pr. BOUTALEB Najib*
266. Pr. CHERTI Mohammed
267. Pr. ECH-CHERIF EL KETTANI Selma
268. Pr. EL HASSANI Amine
269. Pr. EL IDGHIRI Hassan
270. Pr. EL KHADER Khalid
271. Pr. EL MAGHRAOUI Abdellah*
272. Pr. GHARBI Mohamed El Hassan
273. Pr. HSSAIDA Rachid*
274. Pr. MANSOURI Aziz
275. Pr. OUZZANI CHAHDI Bahia
276. Pr. RZIN Abdelkader*
277. Pr. SEFIANI Abdelaziz
278. Pr. ZEGGWAGH Amine Ali

Neurologie
Dermatologie
Gastro-Entérologie
Chirurgie Générale
Ophtalmologie
Traumatologie Orthopédie
Neurologie
Cardiologie
Anesthésie-Réanimation
Pédiatrie
Oto-Rhino-Laryngologie
Urologie
Rhumatologie
Endocrinologie et Maladies Métaboliques
Anesthésie-Réanimation
Radiothérapie
Ophtalmologie
Stomatologie et Chirurgie Maxillo-faciale
Génétique
Réanimation Médicale

PROFESSEURS AGREGES :

Décembre 2001

279. Pr. ABABOU Adil
280. Pr. AOUAD Aicha
281. Pr. BALKHI Hicham*
282. Pr. BELMEKKI Mohammed
283. Pr. BENABDELJILIL Maria
284. Pr. BENAMAR Loubna
285. Pr. BENAMOR Jouda
286. Pr. BENELBARHDADI Imane
287. Pr. BENNANI Rajae
288. Pr. BENOUACHANE Thami
289. Pr. BENYOUSSEF Khalil
290. Pr. BERRADA Rachid
291. Pr. BEZZA Ahmed*
292. Pr. BOUCHIKHI IDRISSE Med Larbi

Anesthésie-Réanimation
Cardiologie
Anesthésie-Réanimation
Ophtalmologie
Neurologie
Néphrologie
Pneumo-phtisiologie
Gastro-Entérologie
Cardiologie
Pédiatrie
Dermatologie
Gynécologie Obstétrique
Rhumatologie
Anatomie

293. Pr. BOUHOUCHE Rachida
 294. Pr. BOUMDIN El Hassane*
 295. Pr. CHAT Latifa
 296. Pr. CHELLAOUI Mounia
 297. Pr. DAALI Mustapha*
 298. Pr. DRISSI Sidi Mourad*
 299. Pr. EL HAJJOUI Ghziel Samira
 300. Pr. EL HJRI Ahmed
 301. Pr. EL MAAQILI Moulay Rachid
 302. Pr. EL MADHI Tarik
 303. Pr. EL MOUSSAIF Hamid
 304. Pr. EL OUNANI Mohamed
 305. Pr. EL QUESSAR Abdeljlil
 306. Pr. ETTAIR Said
 307. Pr. GAZZAZ Miloudi*
 308. Pr. GOURINDA Hassan
 309. Pr. HRORA Abdelmalek
 310. Pr. KABBAJ Saad
 311. Pr. KABIRI El Hassane*
 312. Pr. LAMRANI Moulay Omar
 313. Pr. LEKEHAL Brahim
 314. Pr. MAHASSIN Fattouma*
 315. Pr. MEDARHRI Jalil
 316. Pr. MIKDAME Mohammed*
 317. Pr. MOHSINE Raouf
 318. Pr. NABIL Samira
 319. Pr. NOUINI Yassine
 320. Pr. OUALIM Zouhir*
 321. Pr. SABBAH Farid
 322. Pr. SEFIANI Yasser
 323. Pr. TAOUFIQ BENCHEKROUN Soumia
 324. Pr. TAZI MOUKHA Karim

Cardiologie
 Radiologie
 Radiologie
 Radiologie
 Chirurgie Générale
 Radiologie
 Gynécologie Obstétrique
 Anesthésie-Réanimation
 Neuro-Chirurgie
 Chirurgie-Pédiatrique
 Ophtalmologie
 Chirurgie Générale
 Radiologie
 Pédiatrie
 Neuro-Chirurgie
 Chirurgie-Pédiatrique
 Chirurgie Générale
 Anesthésie-Réanimation
 Chirurgie Thoracique
 Traumatologie Orthopédie
 Chirurgie Vasculaire Périphérique
 Médecine Interne
 Chirurgie Générale
 Hématologie Clinique
 Chirurgie Générale
 Gynécologie Obstétrique
 Urologie
 Néphrologie
 Chirurgie Générale
 Chirurgie Vasculaire Périphérique
 Pédiatrie
 Urologie

Décembre 2002

325. Pr. AL BOUZIDI Abderrahmane*
 326. Pr. AMEUR Ahmed*
 327. Pr. AMRI Rachida
 328. Pr. AOURARH Aziz*
 329. Pr. BAMOU Youssef *
 330. Pr. BELGHITI Laila
 331. Pr. BELMEJDOUB Ghizlene*
 332. Pr. BENBOUAZZA Karima
 333. Pr. BENZEKRI Laila
 334. Pr. BENZOUBEIR Nadia*
 335. Pr. BERADY Samy*
 336. Pr. BERNOUSSI Zakiya
 337. Pr. BICHA Mohamed Zakarya
 338. Pr. CHOHO Abdelkrim *
 339. Pr. CHKIRATE Bouchra
 340. Pr. EL ALAMI EL FELLOUS Sidi Zouhair
 341. Pr. EL ALJ Haj Ahmed
 342. Pr. EL BARNOUSSI Leila
 343. Pr. EL HAOURI Mohamed *
 344. Pr. EL MANSARI Omar*

Anatomie Pathologique
 Urologie
 Cardiologie
 Gastro-Entérologie
 Biochimie-Chimie
 Gynécologie Obstétrique
 Endocrinologie et Maladies Métaboliques
 Rhumatologie
 Dermatologie
 Gastro – Entérologie
 Médecine Interne
 Anatomie Pathologique
 Psychiatrie
 Chirurgie Générale
 Pédiatrie
 Chirurgie Pédiatrique
 Urologie
 Gynécologie Obstétrique
 Dermatologie
 Chirurgie Générale

345. Pr. ES-SADEL Abdelhamid
 346. Pr. FILALI ADIB Abdelhai
 347. Pr. HADDOUR Leila
 348. Pr. HAJJI Zakia
 349. Pr. IKEN Ali
 350. Pr. ISMAEL Farid
 351. Pr. JAAFAR Abdeloihab*
 352. Pr. KRIOULE Yamina
 353. Pr. LAGHMARI Mina
 354. Pr. MABROUK Hfid*
 355. Pr. MOUSSAOUI RAHALI Driss*
 356. Pr. MOUSTAGHFIR Abdelhamid*
 357. Pr. MOUSTAINE My Rachid
 358. Pr. NAITLHO Abdelhamid*
 359. Pr. OUJILAL Abdelilah
 360. Pr. RACHID Khalid *
 361. Pr. RAISS Mohamed
 362. Pr. RGUIBI IDRISSE Sidi Mustapha*
 363. Pr. RHOU Hakima
 364. Pr. RKIOUAK Fouad*
 365. Pr. SIAH Samir *
 366. Pr. THIMOU Amal
 367. Pr. ZENTAR Aziz*
 368. Pr. ZRARA Ibtisam*

Janvier 2004

369. Pr. ABDELLAH El Hassan
 370. Pr. AMRANI Mariam
 371. Pr. BENBOUZID Mohammed Anas
 372. Pr. BENKIRANE Ahmed*
 373. Pr. BENRAMDANE Larbi*
 374. Pr. BOUGHALEM Mohamed*
 375. Pr. BOULAADAS Malik
 376. Pr. BOURAZZA Ahmed*
 377. Pr. CHERRADI Nadia
 378. Pr. EL FENNI Jamal*
 379. Pr. EL HANCHI Zaki
 380. Pr. EL KHORASSANI Mohamed
 381. Pr. EL YOUNASSI Badreddine*
 382. Pr. HACHI Hafid
 383. Pr. JABOUIRIK Fatima
 384. Pr. KARMANE Abdelouahed
 385. Pr. KHABOUZE Samira
 386. Pr. KHARMAZ Mohamed
 387. Pr. LEZREK Mohammed*
 388. Pr. MOUGHIL Said
 389. Pr. NAOUMI Asmae*
 390. Pr. SAADI Nozha
 391. Pr. SASSENOU Ismail*
 392. Pr. TARIB Abdelilah*
 393. Pr. TIJAMI Fouad
 394. Pr. ZARZUR Jamila

Chirurgie Générale
 Gynécologie Obstétrique
 Cardiologie
 Ophtalmologie
 Urologie
 Traumatologie Orthopédie
 Traumatologie Orthopédie
 Pédiatrie
 Ophtalmologie
 Traumatologie Orthopédie
 Gynécologie Obstétrique
 Cardiologie
 Traumatologie Orthopédie
 Médecine Interne
 Oto-Rhino-Laryngologie
 Traumatologie Orthopédie
 Chirurgie Générale
 Pneumo-phtisiologie
 Néphrologie
 Endocrinologie et Maladies Métaboliques
 Anesthésie Réanimation
 Pédiatrie
 Chirurgie Générale
 Anatomie Pathologique

Ophtalmologie
 Anatomie Pathologique
 Oto-Rhino-Laryngologie
 Gastro-Entérologie
 Chimie Analytique
 Anesthésie Réanimation
 Stomatologie et Chirurgie Maxillo-faciale
 Neurologie
 Anatomie Pathologique
 Radiologie
 Gynécologie Obstétrique
 Pédiatrie
 Cardiologie
 Chirurgie Générale
 Pédiatrie
 Ophtalmologie
 Gynécologie Obstétrique
 Traumatologie Orthopédie
 Urologie
 Chirurgie Cardio-Vasculaire
 Ophtalmologie
 Gynécologie Obstétrique
 Gastro-Entérologie
 Pharmacie Clinique
 Chirurgie Générale
 Cardiologie

Janvier 2005

395. Pr. ABBASSI Abdelah
396. Pr. AL KANDRY Sif Eddine*
397. Pr. ALAOUI Ahmed Essaid
398. Pr. ALLALI fadoua
399. Pr. AMAR Yamama
400. Pr. AMAZOUZI Abdellah
401. Pr. AZIZ Nouredine*
402. Pr. BAHIRI Rachid
403. Pr. BARAKAT Amina
404. Pr. BENHALIMA Hanane
405. Pr. BENHARBIT Mohamed
406. Pr. BENYASS Aatif
407. Pr. BERNOUSSI Abdelghani
408. Pr. BOUKALATA Salwa
409. Pr. CHARIF CHEFCHAOUNI Mohamed
410. Pr. DOUDOUH Abderrahim*
411. Pr. EL HAMZA OUI Sakina
412. Pr. HAJJI Leila
413. Pr. HESSISSEN Leila
414. Pr. JIDAL Mohamed*
415. Pr. KARIM Abdelouahed
416. Pr. KENDOUCI Mohamed*
417. Pr. LAAROUSSI Mohamed
418. Pr. LYACOUBI Mohammed
419. Pr. NIAMANE Radouane*
420. Pr. RAGALA Abdelhak
421. Pr. REGRAGUI Asmaa
422. Pr. SBIHI Souad
423. Pr. TNACHERI OUAZZANI Btissam
424. Pr. ZERAIDI Najia

Chirurgie Réparatrice et Plastique
Chirurgie Générale
Microbiologie
Rhumatologie
Néphrologie
Ophtalmologie
Radiologie
Rhumatologie
Pédiatrie
Stomatologie et Chirurgie Maxillo Faciale
Ophtalmologie
Cardiologie
Ophtalmologie
Radiologie
Ophtalmologie
Biophysique
Microbiologie
Cardiologie
Pédiatrie
Radiologie
Ophtalmologie
Cardiologie
Chirurgie Cardio Vasculaire
Parasitologie
Rhumatologie
Gynécologie Obstétrique
Anatomie Pathologique
Histo Embryologie Cytogénétique
Ophtalmologie
Gynécologie Obstétrique

Avril 2006

425. Pr. ACHEMLAL Lahsen*
426. Pr. AFIFI Yasser
427. Pr. AKJOUJ Said*
428. Pr. BELGNAOUI Fatima Zahra
429. Pr. BELMEKKI Abdelkader*
430. Pr. BENCHEIKH Razika
431. Pr. BIYI Abdelhamid*
432. Pr. BOUHAFS Mohamed El Amine
433. Pr. BOULAHYA Abdellatif*
434. Pr. CHEIKHAOUI Younes
435. Pr. CHENGUETI ANSARI Anas
436. Pr. DOGHMI Nawal
437. Pr. ESSAMRI Wafaa
438. Pr. FELLAT Ibteissam
439. Pr. FAROUDY Mamoun
440. Pr. GHADOUANE Mohammed*
441. Pr. HARMOUCHE Hicham
442. Pr. HNAFI Sidi Mohamed*
443. Pr. IDRIS LAHLOU Amine
444. Pr. JROUNDI Laila
445. Pr. KARMOUNI Tariq

Rhumatologie
Dermatologie
Radiologie
Dermatologie
Hématologie
O.R.L
Biophysique
Chirurgie – Pédiatrique
Chirurgie Cardio-Vasculaire
Chirurgie Cardio-Vasculaire
Gynécologie Obstétrique
Cardiologie
Gastro-Entérologie
Cardiologie
Anesthésie Réanimation
Urologie
Médecine Interne
Anesthésie Réanimation
Microbiologie
Radiologie
Urologie

- 446. Pr. KILI Amina
- 447. Pr. KISRA Hassan
- 448. Pr. KISRA Mounir
- 449. Pr. KHARCHAFI Aziz*
- 450. Pr. LMIMOUNI Badreddine*
- 451. Pr. MANSOURI Hamid*
- 452. Pr. NAZIH Naoual
- 453. Pr; OUANASS Abderrazzak
- 454. Pr. SAFI Soumaya*
- 455. Pr. SEKKAT Fatima Zahra
- 456. Pr. SEFIANI Sana
- 457. Pr. SOUALHI Mouna
- 458. Pr. ZAHRAOUI Rachida

Pédiatrie
 Psychiatrie
 Chirurgie – Pédiatrique
 Médecine Interne
 Parasitologie
 Radiothérapie
 O.R.L
 Psychiatrie
 Endocrinologie
 Psychiatrie
 Anatomie Pathologique
 Pneumo-Phtisiologie
 Pneumo-Phtisiologie

ENSEIGNANTS SCIENTIFIQUES
PROFESSEURS

- 1. Pr. ALAMI OUHABI Naima
- 2. Pr. ALAOUI KATIM
- 3. Pr. ALAOUI SLIMANI Lalla Naïma
- 4. Pr. ANSAR M'hammed
- 5. Pr. BOUKLOUZE Abdelaziz
- 6. Pr. BOURJOUANE Mohamed
- 7. Pr. DRAOUI Mustapha
- 8. Pr. EL GUESSABI Lahcen
- 9. Pr. ETTAIB Abdelkader
- 10. Pr. FAOUZI Moulay El Abbes
- 11. Pr. HMAMOUCHE Mohamed
- 12. Pr. REDHA Ahlam
- 13. Pr. TELLAL Saida*
- 14. Pr. TOUATI Driss
- 15. Pr. ZELLOU Amina

Biochimie
 Pharmacologie
 Histologie – Embryologie
 Chimie Organique et Pharmacie Chimique
 Applications Pharmaceutiques
 Microbiologie
 Chimie Analytique
 Pharmacognosie
 Zootechnie
 Pharmacologie
 Chimie Organique
 Biochimie
 Biochimie
 Pharmacognosie
 Chimie Organique

* *Enseignants Militaires*



DEDICACES



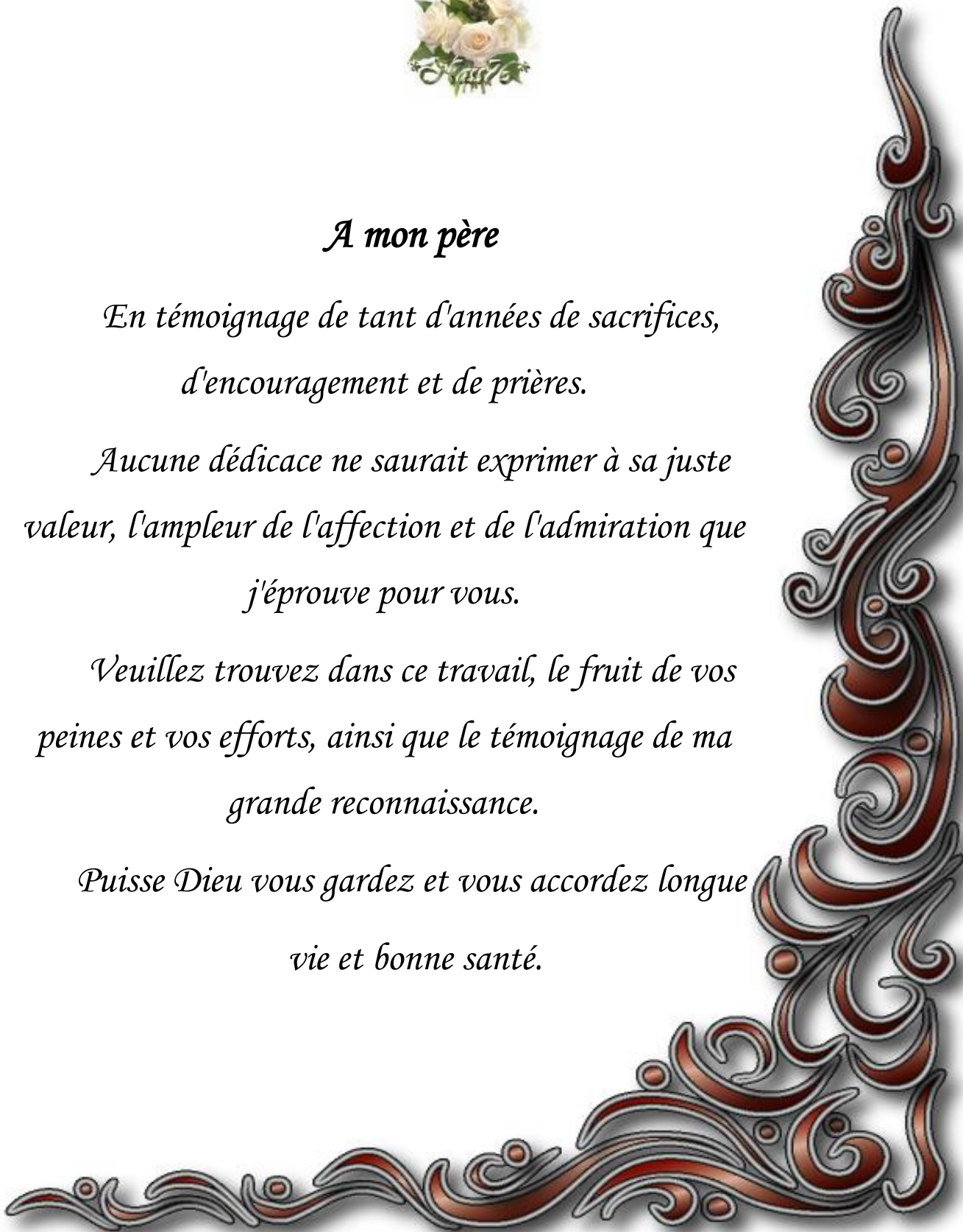
A mon père

*En témoignage de tant d'années de sacrifices,
d'encouragement et de prières.*

*Aucune dédicace ne saurait exprimer à sa juste
valeur, l'ampleur de l'affection et de l'admiration que
j'éprouve pour vous.*

*Veillez trouvez dans ce travail, le fruit de vos
peines et vos efforts, ainsi que le témoignage de ma
grande reconnaissance.*

*Puisse Dieu vous gardez et vous accordez longue
vie et bonne santé.*





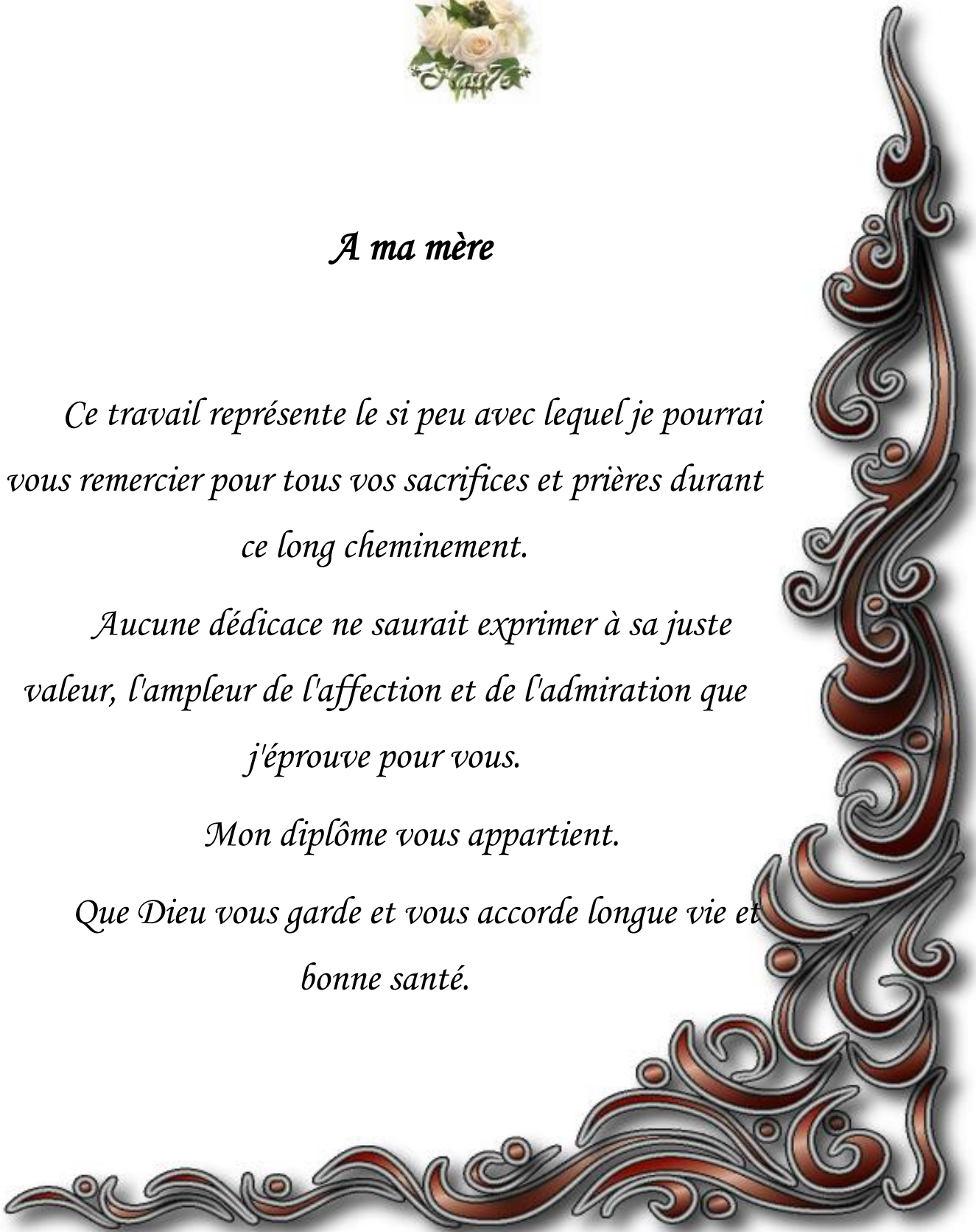
A ma mère

Ce travail représente le si peu avec lequel je pourrai vous remercier pour tous vos sacrifices et prières durant ce long cheminement.

Aucune dédicace ne saurait exprimer à sa juste valeur, l'ampleur de l'affection et de l'admiration que j'éprouve pour vous.

Mon diplôme vous appartient.

Que Dieu vous garde et vous accorde longue vie et bonne santé.





A mes frères:

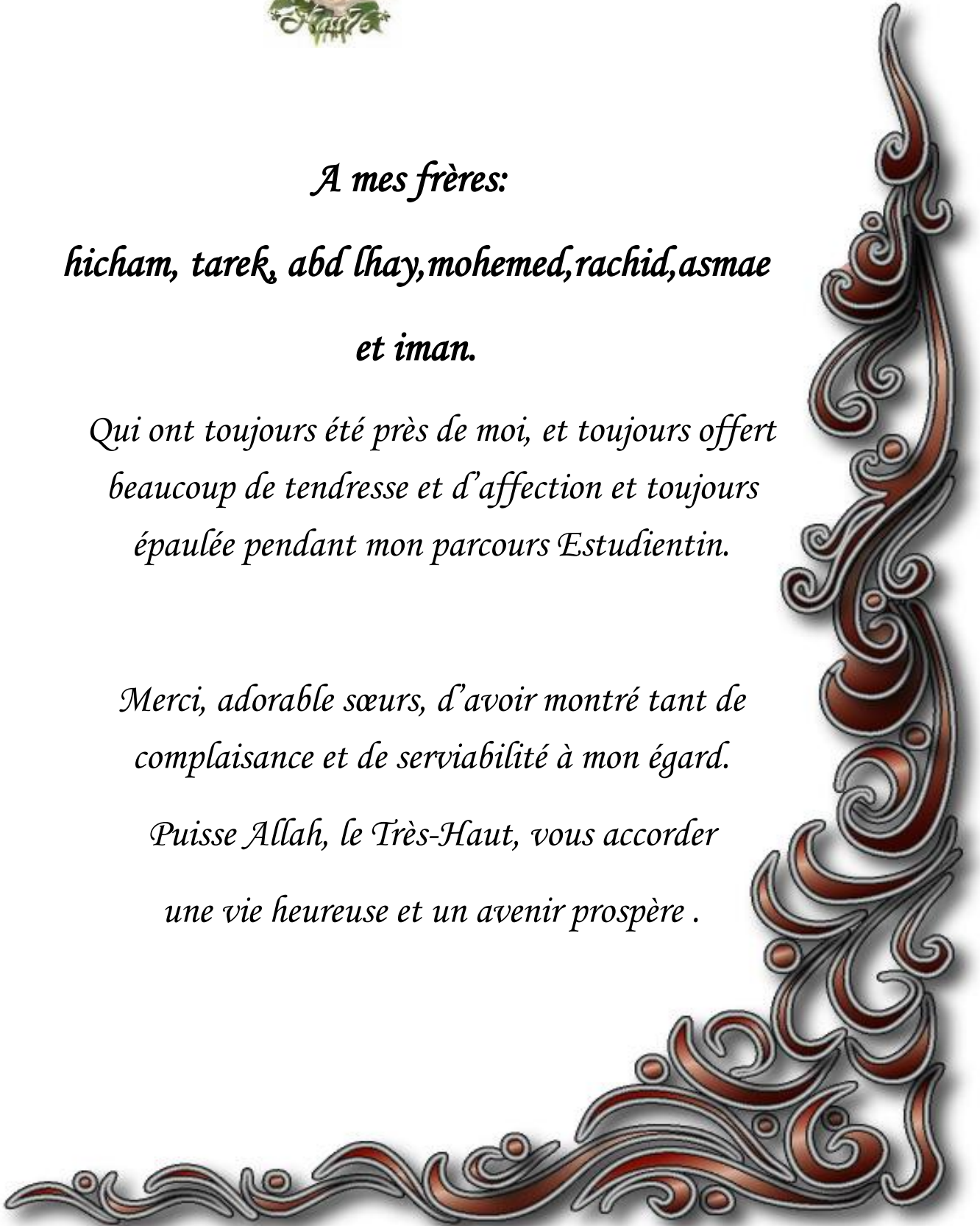
hicham, tarek, abd lhay, mohemed, rachid, asmae

et iman.

*Qui ont toujours été près de moi, et toujours offert
beaucoup de tendresse et d'affection et toujours
épaulée pendant mon parcours Etudiantin.*

*Merci, adorable sœurs, d'avoir montré tant de
complaisance et de serviabilité à mon égard.*

*Puisse Allah, le Très-Haut, vous accorder
une vie heureuse et un avenir prospère .*





A la famille de abdnbi bentaher :

Abdnbi ,Sabah ,Sara ,Meriem ,zineb ,et lkatkota

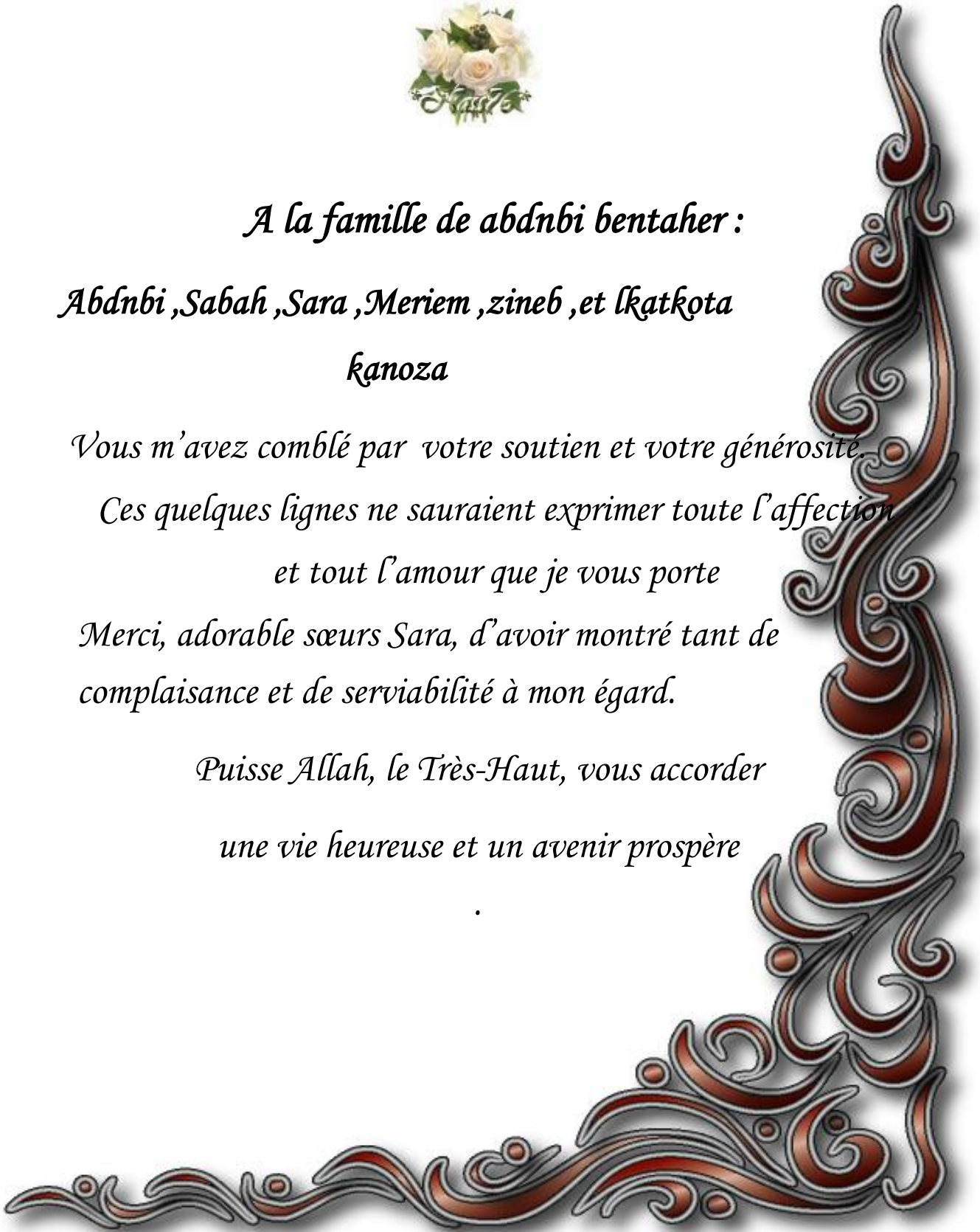
kanoza

Vous m'avez comblé par votre soutien et votre générosité.

*Ces quelques lignes ne sauraient exprimer toute l'affection
et tout l'amour que je vous porte*

*Merci, adorable sœurs Sara, d'avoir montré tant de
complaisance et de serviabilité à mon égard.*

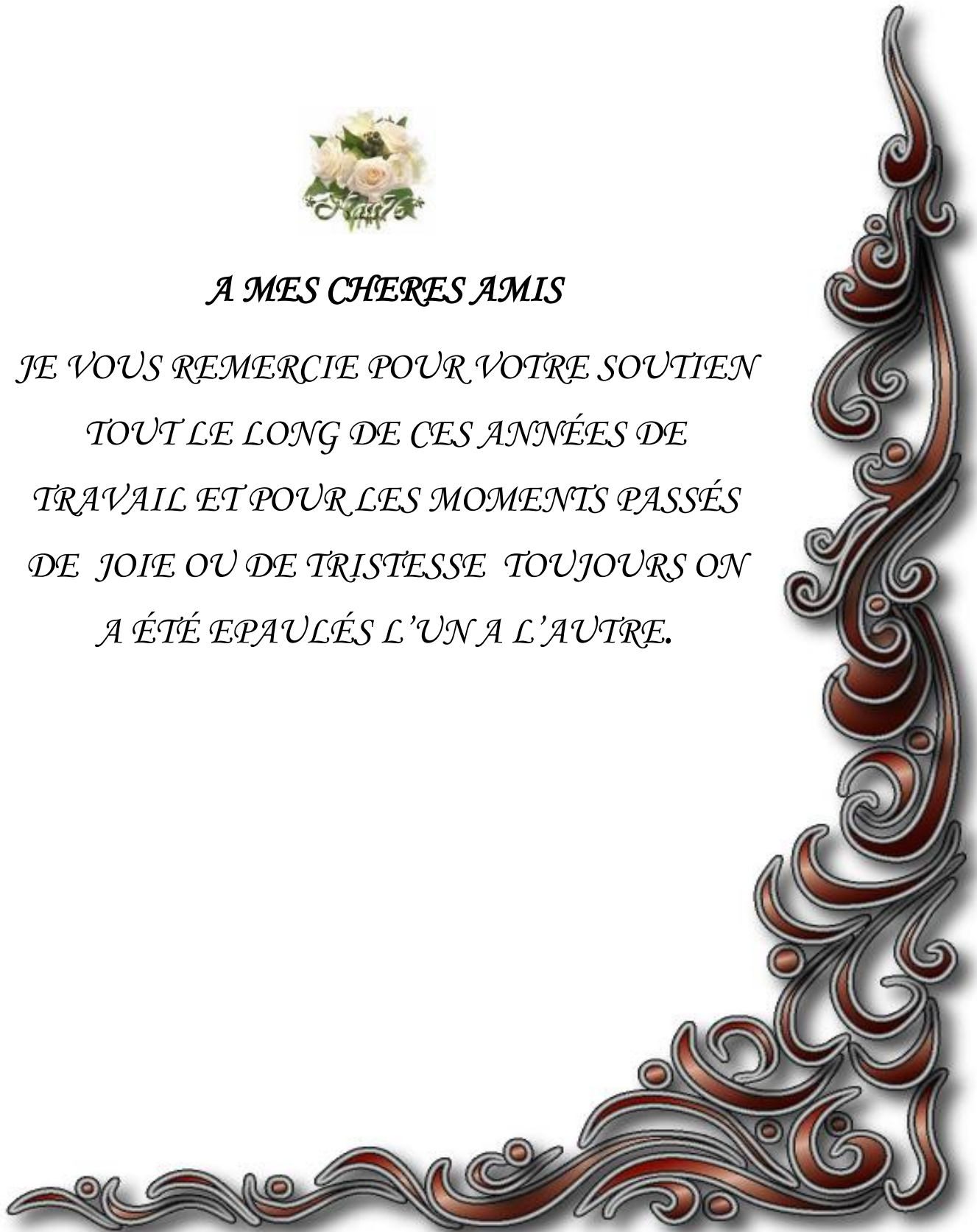
*Puisse Allah, le Très-Haut, vous accorder
une vie heureuse et un avenir prospère*





A MES CHERES AMIS

*JE VOUS REMERCIE POUR VOTRE SOUTIEN
TOUT LE LONG DE CES ANNÉES DE
TRAVAIL ET POUR LES MOMENTS PASSÉS
DE JOIE OU DE TRISTESSE TOUJOURS ON
A ÉTÉ EPAULÉS L'UN A L'AUTRE.*





À toute ma famille .

*À tous ceux qui me sont trop chers et que j'ai
omis de citer.*

*À tous ceux qui ont contribué, de près ou de loin
à l'élaboration de ce travail.*

À tous mes maîtres.



Remerciements





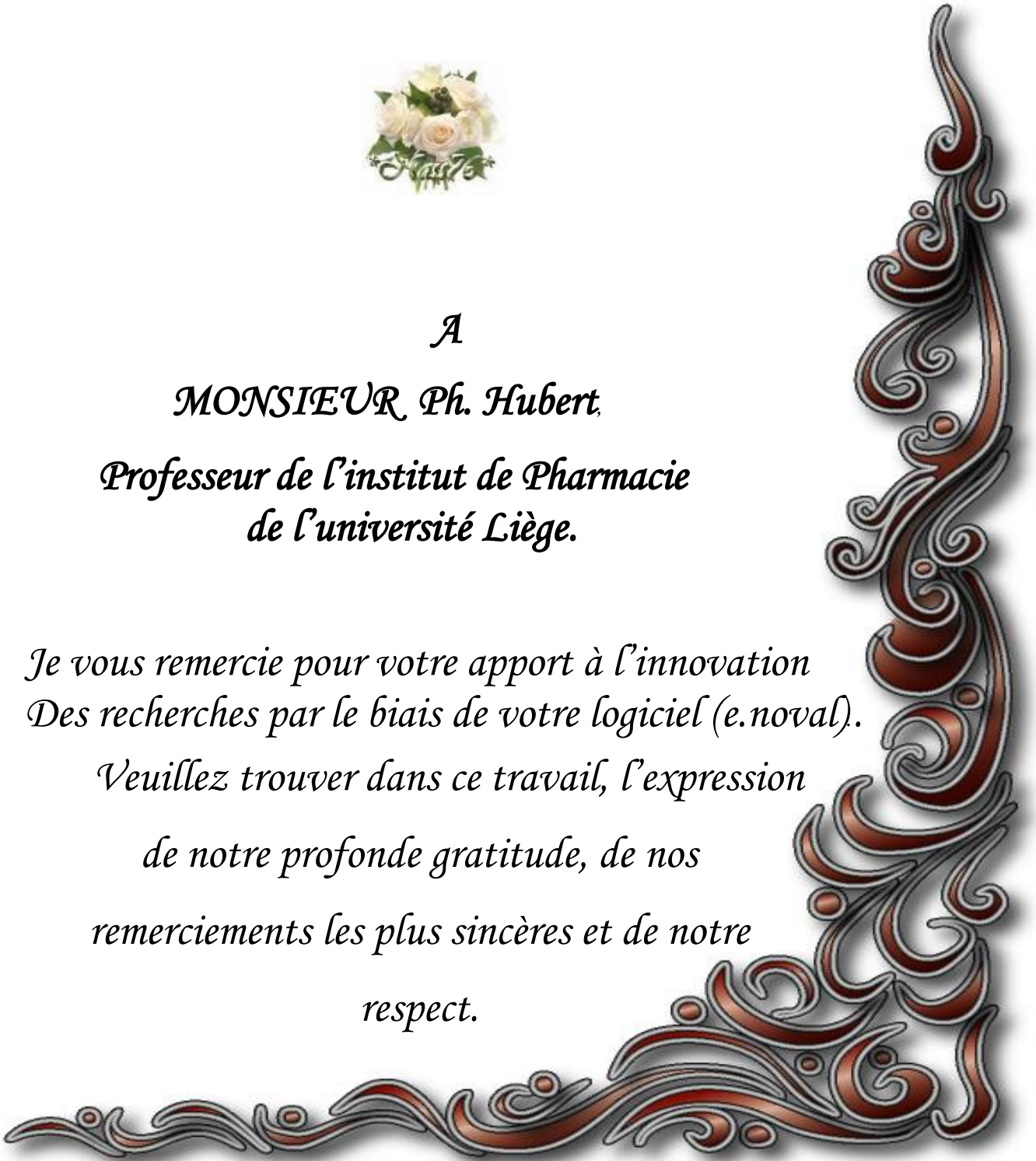
A

MONSIEUR Ph. Hubert,

*Professeur de l'institut de Pharmacie
de l'université Liège.*

*Je vous remercie pour votre apport à l'innovation
Des recherches par le biais de votre logiciel (e.noval).*

*Veillez trouver dans ce travail, l'expression
de notre profonde gratitude, de nos
remerciements les plus sincères et de notre
respect.*



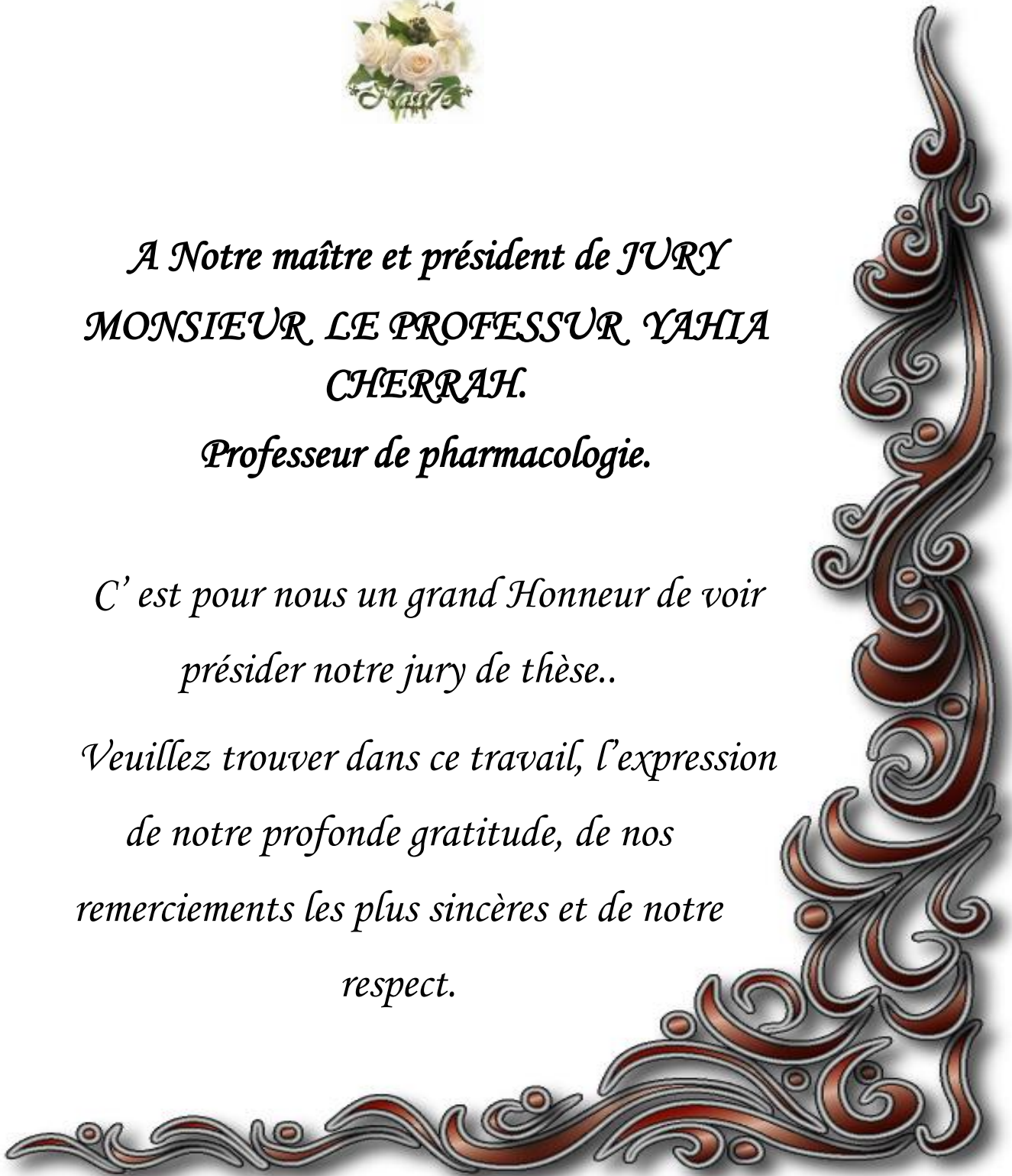


*A Notre maître et président de JURY
MONSIEUR LE PROFESSEUR YAHIA
CHERRAH.*

Professeur de pharmacologie.

*C' est pour nous un grand Honneur de voir
présider notre jury de thèse..*

*Veillez trouver dans ce travail, l'expression
de notre profonde gratitude, de nos
remerciements les plus sincères et de notre
respect.*





A Notre maître et rapporteur de thèse

MONSIEUR LE PROFESSEUR

AZIZ BOUKLOUZE

Professeur Des applications pharmaceutiques.

*Vous nous avez confié ce travail et vous nous
avez aidé minutieusement avec compétence,
amabilité et patience.*

*Votre gentillesse, votre modestie et vos qualités
humaines n'ont d'égal que votre compétence..*

*Veillez, Monsieur, accepter l'expression
de notre dévouement, notre profond respect et notre
reconnaissance.*





À Notre maître et juge de thèse
MONSIEUR LE PROFESSEUR
MOSTAPHA DRAOUI
Professeur de la chimie analytique

*Nous vous remercions vivement pour
l'honneur que vous nous faites en acceptant de
juger ce travail.*

*Nous sommes très sensibles à votre gentillesse
et à votre accueil très aimable.*

*Veillez croire en nos sentiments les plus
respectueux.*





A Notre maître et juge de thèse
MONSIEUR LE PROFESSEUR
ABOUKAL RADWANE
Professeur de réanimation
Médical.

Nous sommes très sensibles à l'honneur que
vous nous faites en acceptant de juger notre
travail.

Veillez accepter nos remerciements ainsi que
le témoignage de notre respect et notre gratitude.



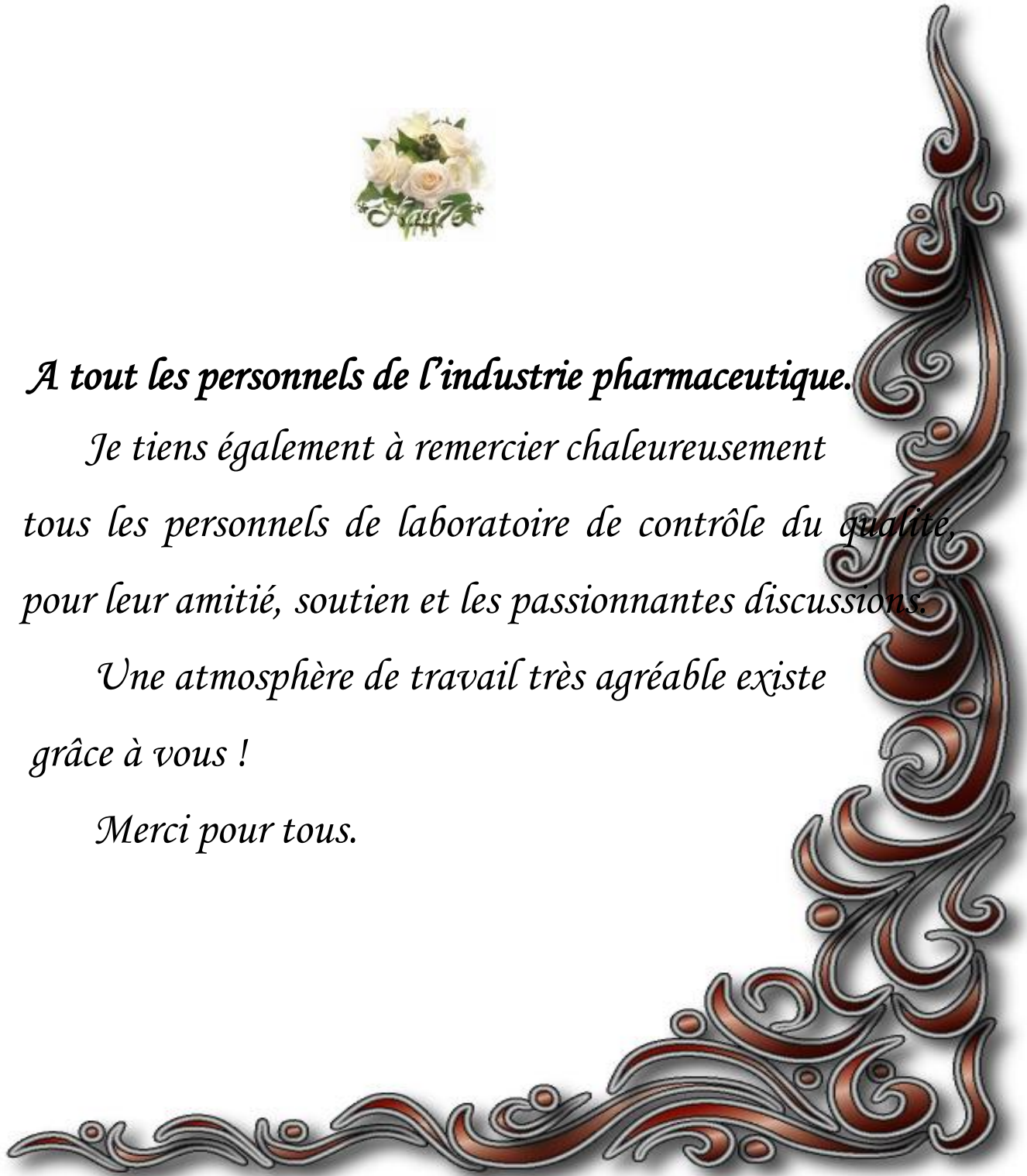


A tout les personnels de l'industrie pharmaceutique.

*Je tiens également à remercier chaleureusement
tous les personnels de laboratoire de contrôle du qualité,
pour leur amitié, soutien et les passionnantes discussions.*

*Une atmosphère de travail très agréable existe
grâce à vous !*

Merci pour tous.





SOMMAIRE

LISTE DES ABREVIATIONS

- a** : Ordonnée à l'origine
- AFNOR** : Association Française de Normalisation.
- AQ** : Assurance Qualité.
- b** : Pente de la droite.
- BPF** : Bonnes Pratiques de Fabrication.
- BPL** : Bonnes Pratiques du laboratoire.
- CV** : coefficient de variation.
- ddl** : degré de liberté.
- FDA** : Food and Drug Administration
- ICH** : International Conference on Harmonisation.
- ISO** : International Organization for Standardization
- m [X_{ij}]** : moyenne de la quantité pesée.
- m[Y_{ij}]** : moyenne des aires.
- P.A** : principe actif.
- P.E** : pharmacopée européenne
- r** : Coefficient de corrélation

S²E : la variance expérimentale.

S_j²max : variance maximum.

∑S_j² : la somme des variances des aires de chaque groupe.

SCR : La Somme des carrés des résidus.

SFSTP : Société Française des Sciences Techniques et Pharmaceutiques.

S²L : la variance d'ajustement.

Sr : Ecart type.

USP : **United States Pharmacopeia.**

Var x_{ij} : variance de toutes les concentrations.

VT : variance totale des aires.

VK : variance des moyennes des aires de chaque groupe.

\bar{x} : la concentration moyenne

[X_{ij}] : la quantité pesée.

[Y_{ij}] : aire.

Yr m : recouvrement moyen.

$\hat{\mu}$: la moyenne des concentrations introduites.

LISTE DES TABLEAUX

Tableau I	les critères de validation analytique	Page : 19
Tableau II	Lien entre le guide SFSTP 92 et les exigences ICH.	Page : 21
Tableau III	illustration de l'interprétation de la notion d'exactitude.	Page : 29
Tableau IV	plan d'expériences des Standards de calibration.	Page : 47
Tableau V	plan d'expérience standard de Validation.	Page : 48
Tableau VI	les temps de rétention de P.A, placebo, impureté et la phase mobile.	Page : 49
Tableau VII	Données brutes de l'étude de la linéarité.	Page : 50
Tableau VIII	le test de COCHRON.	Page : 51
Tableau IX	Critères de la droite de régression.	Page : 52
Tableau X	Test de l'existence d'une pente significative.	Page : 53
Tableau XI	Test de validité de la droite de régression.	Page : 54
Tableau XII	test de student.	Page : 55
Tableau XIII	les données brutes d'une procédure d'exactitude.	Page : 56
Tableau XIV	Test de Fischer : Test de validité des moyennes.	Page : 57
Tableau XV	les données brutes de l'étude de la fidélité.	Page : 58

Tableau XVI	Test de validité des moyennes (fidélité).	Page : 59
Tableau XVII	Le test post-hoc.	Page : 60
Tableau XVIII	Modèles d'étalonnage triés par 'Indice d'Exactitude'5%.	Page : 61
Tableau XIX	Paramètres de régression5%.	Page : 64
Tableau XX	Justesse5%.	Page : 65
Tableau XXI	Répétabilité et Fidélité intermédiaire relatives 5%	Page : 66
Tableau XXII	Test de Levène.	Page : 70
Tableau XXIII	Test de manque d'ajustement du modèle de régression linéaire sélectionné pour l'étalonnage	Page : 71
Tableau XXIV	Modèles d'étalonnage triés par 'Indice d'Exactitude'10%.	Page : 73
Tableau XXV	Paramètres de régression 10%.	Page : 74
Tableau XXVI	Justesse 10%.	Page : 75
Tableau XXVII	Répétabilité et Fidélité intermédiaire relatives 10%.	Page : 75

LISTE DES FIGURES

Figure 1	Concept de l'erreur total.	Page : 8
Figure 2	Structure de la validation.	Page : 11
Figure 3	Cycle de vie d'une méthode analytique.	Page : 14
Figure 4	Arbre de décision proposée par le guide SFSTP 92 sur la validation des méthodes analytiques.	Page : 18
Figure 5	paramètre de performance d'une méthode d'analyse.	Page : 30
Figure 6	Profil d'exactitude comme outil de décision pour quatre méthodes	Page : 32
Figure 7	Illustration du profil d'exactitude comme outil de décision.	Page : 33
Figure 8	droite de calibration	Page : 52
Figure 9	courbe d'étalonnage (5%).	Page : 64
Figure 10	Profil d'exactitude (5%).	Page : 66
Figure 11	Relation entre les concentrations introduites et calculées (5%).	Page : 67
Figure 12	Graphe de linéarité (5%).	Page : 68
Figure 13	graphe des résidus standardisés.	Page : 71
Figure 14	Courbes d'étalonnages (10%).	Page : 74
Figure 15	Profil d'exactitude obtenu en considérant modèle (10%).	Page : 76
Figure 16	Relation entre les concentrations introduites et calculées (10%).	Page : 77

SOMMAIRE



INTRODUCTION GENERALE	1
PARTIE THEORIQUE	5
1. Introduction	6

Chapitre I :

Généralités sur la validation analytique

1. Définition de la validation analytique	6
2. Validation et qualité.	7
2.1 Notion de qualité	7
2.2 Le système d'assurance qualité	8
3. Réglementation de la validation analytique et sa structure.	
3.1 La réglementation de la validation analytique	9
3.2 La structure de la validation analytique	11
4. Domaine d'application de la validation analytique.....	13
5. Cycle de vie de la validation analytique	14
6. Objectif de la validation analytique	15

Chapitre II :

Validation analytique selon SFSTP 1992-ICH 1994

1. Les recommandations ICH 1994 :.....	17
2. Les recommandations de SFSTP 1992	18
3. Les critères de la validation analytique	20
4. Stratégie statistique pour valider d'une procédure analytique :.....	24

Chapitre III :
L'harmonisation des démarches (SFSTP 2003)

1. Recadrer les critères de validation : harmonisation de la terminologie	28
2. Notion d'exactitude	31
3. Profils d'exactitude SFSTP 2003	34

Chapitre IV :
L'amlodipine besilate

1. Structure et propriété de l'amlodipine besilate	38
2. Mode d'action et pharmacologie clinique d'amlodipine besilate	39
3. Pharmacocinétique et métabolisme	40
4. Indication et usage clinique.....	42
5. Contre indication	42

PARTIE EXPERIMENTALE 43

1. Introduction	44
2. Matériels et Méthodes	44
2.1 Matériel	44
2.2 Réactif.....	45
2.2 Méthodes	45
a. Préparation des solutions de travail	45
b. Méthodologie expérimentale pour le dosage d'amlodipine besilate selon ICH94-SFSTP92	46
c. Méthodologie expérimentale pour le dosage d'amlodipine besilate par HPLC selon l'approche SFSTP 2003.....	48
3. Résultats et Discussion.....	51

3.1 Validation de la méthode selon SFSTP92-ICH94	51
a. Spécificité.....	51
b. Linéarité	51
c. Limite de détection et de quantification	57
d. L'exactitude	58
e. Fidélité.....	60
3.2 Validation de la méthode de dosage d'amlodipine besilate par HPLC selon la nouvelle approche SFSTP 2003(profil d'exactitude) :	64
3.2.1. Stratégie du profil d'exactitude	64
3.2.2. Validation avec les limites d'acceptations ($\lambda= 5\%$)	64
a. Analyse de la fonction de réponse et le choix du modèle de régression appropriée	64
b. Justesse.....	67
c. Fidélité	67
d. Exactitude	68
e. Linéarité	69
f. Limite de détection.....	71
g. Limite de quantification.....	71
h. Diagnostic	72
3.2.3. Validation avec les limites d'acceptations ($\lambda= 10\%$)	74
a. Analyse de la fonction de réponse et le choix du modèle de régression appropriée	74
b. Justesse.....	76
c. Fidélité	77
d. Exactitude	78

e. Linéarité	79
f. Limites de détections et de quantification	80
3.3 Conclusion	81
CONCLUSION GENERALE	83
RESUME	
REFERENCES	
ANNE	



*INTRODUCTION
GENERALE*

INTRODUCTION GENERALE

Avec la mise en place des systèmes d'assurance qualité dans les laboratoires, la validation des méthodes d'analyse est aujourd'hui un objectif important et omniprésent, les méthodes analytiques sont les yeux et les oreilles pour tous produits manufacturés .Le résultat d'analyse est l'indicateur visible et le dernier verrou permettant de garantir la sécurité du patient.

C'est pourquoi, Aujourd'hui, l'effort se porte plutôt vers la qualité métrologique des mesures ce qui se traduit par des exigences de validation des méthodes et d'estimation de l'incertitude accrues. De nombreux documents ont été publiés sous la forme de normes, de guides, de guidances ou même de textes réglementaires pour essayer de définir des procédures de validation et de calcul de l'incertitude.

La validation est défini dans plusieurs guides réglementaires internationaux comme la FDA, ICH, ISO et les BPL.

Malgré tout ces exigences il existe encore de nombreuses zones d'ombre dans la définition, et en conséquence comment évaluer, les critères de performance de la validation analytique.

Le meilleur exemple est celui des démarches statistiques alors qu'il existe plusieurs dizaines de mode de calcul qui conduisent tous sur des valeurs différentes. Ces critères soulèvent aussi des problèmes statistiques complexes qui n'ont pas toujours reçu de solutions satisfaisantes. C'est aux analystes qu'il incombe de poser correctement ces questions afin d'obtenir des réponses claires. C'est pourquoi, nous pensons que l'harmonisation des modes de calcul des critères de validation des méthodes représente une approche qui, à l'heure actuelle, permettra de mieux poser ces problèmes à savoir.

Donc Comment concevoir une procédure de validation de manière rationnelle, permettant non seulement de maîtriser la qualité du produit fini, mais également de mieux connaître les équipements et d'anticiper les éventuels problèmes pouvant subvenir ?

Quelle est alors la meilleure façon d'approcher la validation analytique et quels sont les points critiques à considérer afin d'aboutir à la réussite ?

L'objectif principal de notre travail est donc de comparer les méthodologies de validation proposée par le guide ICH 94 et SFSTP 2003 ces guides ont été appliqués au dosage d'amlodipine besilate dans une forme pharmaceutique, basé sur l'erreur total. Ce concept a été introduit récemment par la SFSTP en 2003 et pratiqué par l'ensemble de l'union européenne pour valider leurs méthodes analytiques quelques soient les natures des matrices utilisées.

C'est dans ce contexte que se situe notre travail. C'est d'améliorer la fiabilité des décisions prises au moyen des résultats obtenus par des méthodes analytiques quantitatives lors de ces deux étapes de leur cycle de vie.

Afin atteindre cette fiabilité de la prise de décision, nous avons adopté le profil d'exactitude.

Cette nouvelle approche est basée sur l'utilisation d'une méthodologie statistique utilisant un intervalle de tolérance de type « β -expectation tolérance intervalles ». Cet intervalle, permet de garantir qu'une proportion définie des futurs résultats qui seront fournis par la méthode lors de son utilisation en routine, sera bien incluse dans des limites d'acceptation fixées à priori en fonction des besoins des utilisateurs (par Ex: 1% ou 2% sur des matières

premières, 5% sur des spécialités pharmaceutiques, 15% en bio-analyse, environnement, etc.).

D'autre part, par le biais de ce travail, Nous avons voulu à sensibiliser les acteurs de l'industrie pharmaceutique à appréhender cette démarche et de l'introduire comme outil de décision pour évaluer la validité de leur méthode analytique en routine



PARTIE THEORIQUE

Introduction

Valider c'est avant tout maîtriser.

A tort et pendant fort longtemps, la validation analytique a été dissociée du procédé de fabrication et considéré comme moins important que le reste du procédé.

Par contre à l'heure actuelle, dans notre société, le contrôle de qualité devient de plus en plus fréquent et les exigences sur les résultats rendus sont de plus en plus importantes. Il suffit de considérer les domaines où interviennent les résultats des méthodes de dosage pour s'en rendre compte: développement et contrôle de qualité des médicaments, détermination de paramètres de biologie clinique, analyses toxicologiques et médico-légales, contrôles antidopage, analyses de dioxines et de polychlorobiphényles (PCB), d'additifs dans les aliments, etc.

Chapitre : Généralité sur la validation analytique.

1 .Définition de la validation analytique :

Nous avons retenu comme définitions de la validation analytique celle de BPF, FDA et la norme ISO :

- FDA : valider c'est l'établir à l'évidence, avec un degré de confiance élevée et sous une forme documentée, qu'un procédé déterminé permet d'obtenir un produit (ou service) qui atteint des spécifications définies à l'avance. ^[1]
- BPF : la validation c'est l'établissement de la preuve, en conformité avec les principes de bonne pratique de fabrication ; que la mise en œuvre ou l'utilisation de tout processus, procédure, matériel, matière première, article de conditionnement ou produit, ou produit ; activité ou système permet réellement d'atteindre les résultats escomptés. ^[2]
- Pour la norme ISO : elle définit la validation comme étant la confirmation par examen et fourniture de preuves réelles que les

exigences particulièrement d'un usage projeté donné sont remplies.^[3]

2. Validation et qualité :

2.1 Notion de qualité.

La Qualité est définie par l'AFNOR (Association Française de Normalisation) comme étant :

« L'ensemble des propriétés et caractéristiques d'un produit ou service qui lui confèrent l'aptitude à satisfaire les besoins explicites ou implicites d'un client ou des utilisateurs ».

Ce concept général s'applique à tous les secteurs d'activité et concourt au satisfecit du consommateur ou du patient. Appliquée au domaine pharmaceutique, cette notion équivaut à l'ensemble des facteurs qui contribuent à la sécurité, l'efficacité et l'acceptabilité des médicaments. Chaque entreprise pharmaceutique se doit donc de concevoir et de mettre en œuvre une politique de qualité visant à garantir que les médicaments fabriqués présentent la qualité requise. Le patient est ainsi assuré de la qualité, à défaut d'être assuré par la qualité.

Ce système ainsi mis en place couvre toutes les phases de développement du médicament : de sa conception à sa commercialisation.

Rappelons que pour la FDA « la validation représente pour une société une mesure de la compréhension qu'elle possède de son propre procédé et à le maintenir sous contrôle ». ^[1]

2.2 Le système d'assurance qualité :

Au sens général, pour assurer le maintien de la Qualité, l'Assurance Qualité peut se résumer en une démarche qui tend vers le zéro défaut ou Qualité totale.

Cette démarche prévient l'erreur ou le défaut, plutôt que d'avoir à le constater à posteriori. Selon le guide des Bonnes Pratiques de Fabrication (BPF), l'Assurance Qualité est définie comme « un large concept qui couvre tout ce qui, individuellement et collectivement, peut influencer la qualité d'un produit. Elle représente l'ensemble des mesures prises pour s'assurer que les médicaments fabriqués sont de la qualité requise pour l'usage auquel ils sont destinés. »

Cette constatation a donné naissance au concept de « Qualité totale ». ^[4]

$$\begin{array}{l} \text{Assurance Qualité} \\ \text{(mesures préventives)} \\ + \\ \text{Contrôle qualité} \\ \text{(mesures des actions passées)} \end{array} = \text{Zéro Défaut}$$

Figure 1 : Concept de qualité totale

Par ce biais, le champ d'application du système d'AQ s'est élargi à la recherche, au développement, à la distribution, à l'approvisionnement et à la sous-traitance.

La validation analytique doit être considérée comme partie intégrante du procédé de fabrication puisqu'ils' agit d'une étape indispensable qui se trouve à la fin de la fabrication et au début de celle ci. De plus, son rôle étant de rendre que les performances de la méthode permettent de répondre aux exigences de l'usage auquel elle est destinée, il contribue à la qualité du produit final. Il sera

donc couvert par l'AQ qui devra s'assurer de son efficacité et de sa reproductibilité à travers sa validation.

3. Réglementation de la validation et sa structure.

3.1. Réglementation de la validation analytique:

Le principe de la validation des procédures analytiques quantitatives est aujourd'hui largement répandu dans tous les domaines d'activité où des mesures sont réalisées. Cependant, cette question simple de l'acceptabilité ou non d'une procédure analytique pour une application donnée - reste toutefois inégalement et incomplètement résolue dans bien des cas, et ce malgré les diverses réglementations relatives aux Bonnes Pratiques (BPF, GMP...) et autres documents à caractère normatif (ISO, ICH, FDA...) :

1985 : Préoccupation commune Autorités/Industrie pour la formalisation des validations analytiques ^[5].

1989 : USP XXI, supplément n°9, sous la rubrique « 1225 validation of compendial méthode » ^[6].

1989 : Note explicative européenne III /844/87 FR. ^[7]

1990 : Conférence de Washington (Arlington). ^[8]

1992 : Publication STP PHARMA - Guide de validation des méthodes analytiques. ^[9]

1994:Textes ISO 5725. ^[10-14]

1994: Recommandations ICH « Text on validation of analytical procedures» ^[15]

1996: Recommendations ICH « Text on validation of analytical procedures:methodology». ^[15]

1997 : Publication STP PHARMA – Guide de validation des méthodes bioanalytiques.^[16]

1998: FDA guidance for Industry, Bioanalytical Method Validation. ^[17]

2000: Conférence de Washington. ^[18]

Tous ces nombreux documents officiels décrivent les critères de validation à tester, mais ils ne proposent pas de protocole expérimental et se limitent le plus souvent aux concepts généraux. C'est pourquoi deux commissions SFSTP ont élaboré successivement des guides de validation (en 1992 pour les analyses des spécialités pharmaceutiques ^[19] et en 1997 pour les analyses en milieu biologiques ^[20]) dans le but d'aider concrètement les industriels du médicament à appliquer les recommandations réglementaires. Si ces premiers guides ont largement contribué à faire appliquer et progresser les validations analytiques, ils présentent toutefois des faiblesses quant aux conclusions des tests réalisés et quant à l'aide à la prise de décision au regard de limites d'acceptation définies pour l'usage d'une procédure analytique.

Le guide SFSTP 2003 a été rédigé par une nouvelle commission SFSTP et propose de revoir les bases mêmes de la validation analytique pour une démarche harmonisée, en distinguant notamment les règles de diagnostic et les règles de décision. Ces dernières reposent sur l'utilisation du profil d'exactitude, basé sur la notion d'erreur totale (biais + écart-type), permettant de simplifier l'approche de la validation d'une procédure analytique tout en contrôlant le risque associé à son utilisation.

3.2 Structure de la validation analytique:

La validation analytique, s'inscrit comme les autres validations, dans un cadre global de politique de validation. L'entreprise doit définir une politique générale de validation et d'orientation, ayant pour objectif premier l'assurance de la qualité et une meilleure maîtrise et compréhension de ses procédés. La validation analytique intervient donc après que la validation du matériel (qualification) et du procédé ait été effectuée. Il est à noter cependant que la validation analytique peut être concomitante à la validation du procédé de fabrication, la validation analytique faisant partie intégrante du procédé. Cependant pour des raisons de gestion documentaire, notamment dans le cas de sites multi-produits, la validation de l'analytique peut faire l'objet de documents séparés (plan, protocole, rapport).

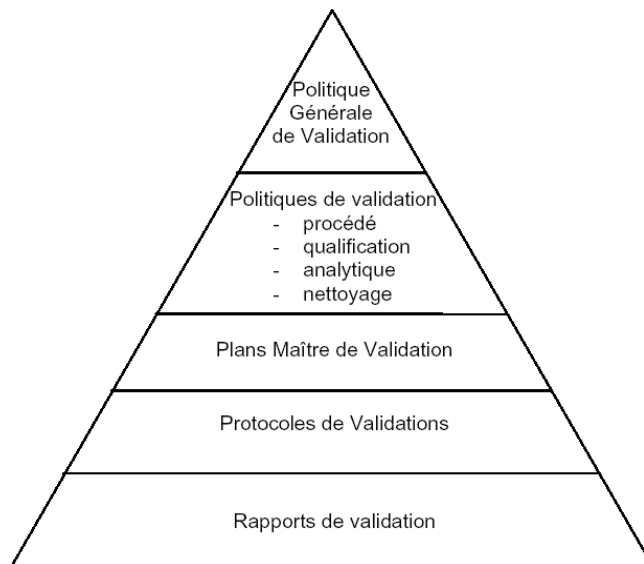


Figure 2 : Structure de la validation

- Protocole de validation :
 - Un document opérationnel interne préparé conjointement par les opérateurs et les responsables.
 - Un contrat technique .

- Un document maître, daté, référencé et approuvé.
- Un document initié avant le début de l'étude et connu par les différents opérateurs avant le début.
- Un document évolutif.
- Contenu d'un protocole :
 - Un titre explicite (univoque).
 - La référence à une étude (codification).
 - Objectifs définis.
 - Introduction (liens à un projet) à des études antérieures à des études préliminaires .
 - Des références réglementaires.
 - Plan expérimental.
 - Chronologique.
 - Structure.
 - Préparation des échantillons.
 - Variables mesurées.
 - Critères calculés.
 - méthodes (Option) \Leftrightarrow monographie, \Leftrightarrow méthodes d'analyses procédures.

Des précisions ou modifications spécifiques ou vérification

- Résultats.
 - quel support ?
 - quelle analyse statistique ?
 - outils de traitement ?

- principe dans les arrondies.
- quelle synthèse /rapport.
- Archivage.
- critères d'acceptabilité des résultats.
- rôle AQ/CQ.

4. domaine d'application la validation analytique :

- Domaine **environnemental** (polluants dans les eaux, les sols...).
- Domaine **agro-alimentaire** (sécurité des aliments...).
- Domaine **pharmaceutique** (contrôle qualité).
- Domaine **médicolégal** (cf. les experts...).
- **Industrie** en général (Qualité des résultats).

L'objectif du guide est donc de proposer une démarche harmonisée de validation applicable aux différentes procédures analytiques quantitatives, et ce indépendamment du secteur d'activité.

5. cycle de vie d'une méthode analytique :

Une méthode analytique est un moyen visant à exprimer concrètement un besoin bien exprimé, ou encore c'est la réponse matérialisée à un problème donné, Dans le domaine analytique, deux types de méthodes sont mentionnées, les méthodes qualitatives et les méthodes quantitatives. Par rapport à cette dernière, l'objectif d'une méthode analytique peut se résumer en sa capacité à quantifier chacune des quantités inconnues présentes dans un échantillon. La

mise en œuvre d'une méthode de dosage peut se décomposer en quatre grandes phases généralement successives telles qu'illustrées dans la figure 3:

- une phase de Sélection où des objectifs et des conditions opératoires initiales sont définis.
- une phase de Développement, avec ou sans optimisation au moyen de plans d'expériences.
- une phase de Validation (Validation Interne/Externe) précédée, selon les cas, d'une Phase de pré validation.
- une phase d'application en routine (Usage en routine), incluant le plus souvent une validation en routine et parfois une validation partielle ou une revalidation. ^[21]

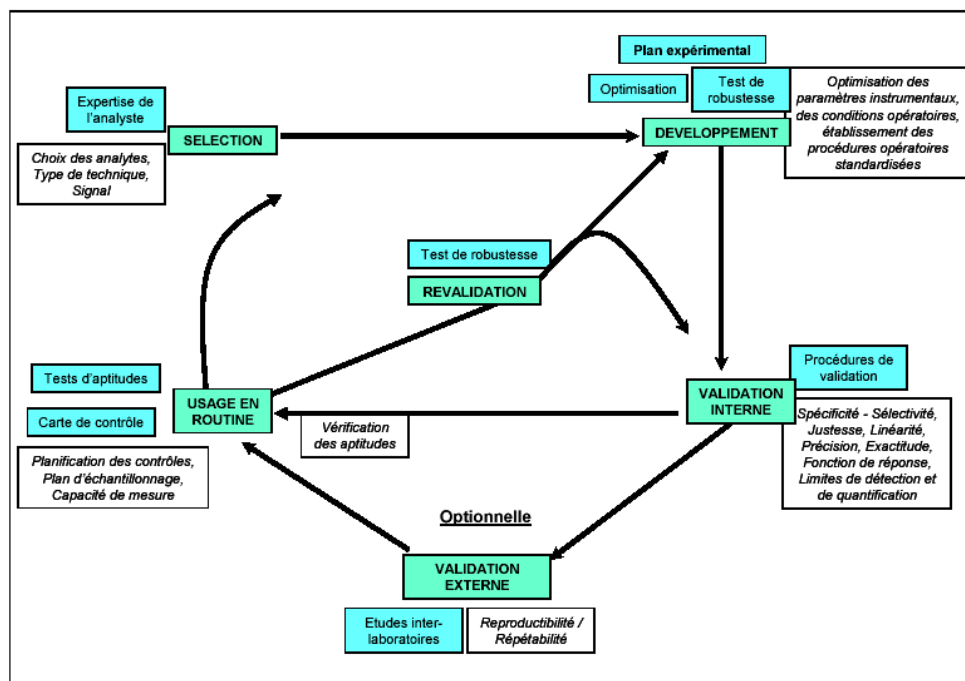


Figure 3. – Cycle de vie d'une méthode analytique

Légendes : Les étapes sont reprises dans un rectangle vert (gras), les tests associés dans un rectangle bleu et les critères pour l'évaluation dans un rectangle non colorié (italique).

6. objectif de la validation analytique :

Objectif de la validation est de donner des **garanties** suffisantes que chacune de ces mesures qui seront réalisées en routine avec cette méthode seront suffisamment proches de la « vérité ».

$$|x_i - \mu_T| < \lambda \quad \text{Eq :1}$$

Avec λ , qui peut être variable selon les exigences de l'analyste (par exemple 5 % sur des spécialités pharmaceutiques, 15 % en bio analyse et environnement).^[23]

Chapitre II : validation analytique selon SFSTP

1992-ICH 1994.

1. Les recommandations ICH 94 :

- types de procédures analytiques devant être validées : ^[15]
 - Tests d'identification :
 - Sont conduits pour s'assurer de l'identité d'un analyte dans un échantillon.
 - Peuvent être effectués par comparaison d'une propriété de l'échantillon (spectre, comportement chromatographique, réactivité chimique,.....).
 - Tests quantitatifs pour le dosage des impuretés :
 - Sont conduits pour vérifier avec exactitude la caractéristique de pureté de l'échantillon.
 - Les critères de validation sont différents selon qu'il s'agit d'un essai limite ou d'un test de dosage.
 - Essais limites pour le contrôle des impuretés.
 - Tests quantitatifs pour le dosage d'un principe actif :
 - Sont conduits pour mesurer la quantité d'un analyte dans l'échantillon.
 - Le dosage représente :
 - soit la mesure quantitative du composé majoritaire de la substance.
 - soit la mesure quantitative du composé actif dans le produit.

- Les critères de validation, avec ou sans association avec une autre procédure (test de dissolution, ...), sont similaires.
- Les critères de validation.
- La revalidation doit être effectuée lorsque :
 - Le protocole de synthèse du principe actif est modifié.
 - La composition du produit fini est modifiée
 - La procédure analytique est modifiée
- Appliquer une méthodologie statistique.

2 .Les recommandations de SFSTP 1992 :

Le guide de validation analytique publié en 1992 par une commission SFSTP était le premier document qui permettait à l'analyste de disposer d'une méthodologie concrète pour :

- Préparer un protocole de validation.
- Appliquer une méthodologie statistique.
- Aider à la décision.

Et ainsi répondre, aux différents critères de validation. En effets, les objectifs de ce guide étaient de minimiser le nombre d'essais, maximaliser les chances de succès tout en diminuant les coûts d'utilisation. Il était proposé à l'analyste pour un produit pharmaceutique d'effectuer une gamme d'étalonnage du principe actif seul ou du principe actif dans la forme reconstituée du produit, permettant ainsi d'évaluer un effet de matrice potentiel et l'exactitude (justesse) de la méthode. La fidélité était quant à elle évaluée dans la forme reconstituée du produit au niveau 100% de la teneur nominal en principe actif. Plusieurs tests statistiques permettaient de prendre la décision quant au type de fonction de

réponse, à l'existence d'un effet de matrice, à l'acceptation de l'exactitude (justesse).

Le principe de décision du guide SFSTP 92, Peut être résumé par un arbre de décision illustré par la Figure 4:

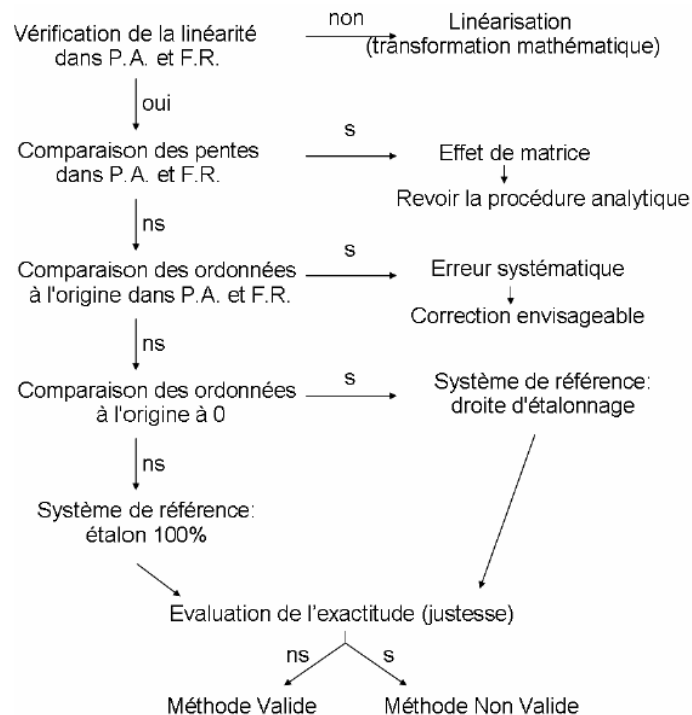


Figure 4: Arbre de décision proposée par le guide SFSTP 92 sur la validation des méthodes analytiques.

P.A. = Principe actif seul ; F.R. = Forme reconstituée ; ns = test statistique non Significatif ; s = test statistique significatif.

Notons, d'une part que lorsque l'effet de matrice était significatif, il fallait revoir la procédure et donc ré optimiser le développement de la méthode analytique. D'autre part, si les ordonnées à l'origine des droites d'étalonnage du

principe actif seul et de la forme reconstituée étaient différentes, il est possible de corriger la droite du principe actif seul afin de l'utiliser pour la suite de la validation. Enfin la conclusion quant à l'exactitude et donc la validité de la méthode analytique était basée sur le résultat d'un test statistique.

Bien que ce guide ait été rédigé avant les textes ICH Q2R₁, la méthodologie proposée n'en était pas moins applicable, permettant ainsi de répondre à ces exigences réglementaires. Le Tableau 1 montre ce lien avec les textes ICH.

3. Les critères de validation analytique :

Tableau I : les critères de validation analytique

Type de tests Caractéristiques	Dosage	Impuretés		Identification	Dosage bioanalyse
		Quantitatif	Essais limites		
Justesse	✓	✓			✓
Fidélité répétabilité	✓	✓			✓
Fidélité fidélité intermédiaire	✓	✓		✓	✓
Spécificité Sélectivité	✓	✓	✓	✓	✓
Limite de détection		✓	✓		✓
Limite de quantification		✓			✓
Linéarité	✓	✓			Fonction de réponse
Gamme	✓	✓			✓
Robustesse	✓	✓	✓		✓

La spécificité : ICH-SFSTP

La spécificité d'une procédure analytique est sa capacité d'évaluation de façon univoque la substance à analyser, en présence d'autres composés

susceptibles de l'accompagner .ces composés comprennent typiquement les impuretés, les produits de dégradation et la matrice.

Selon la note explicative CEE/844/87 EN-FINAL aout 1989 SFSTP .Un procédure d'analyse est dite spécifique lorsqu'elle permet de mesurer quantitativement un paramètre physico-chimique ou un groupement fonctionnel d'une ou plusieurs substances présentes dans l'échantillon.

La linéarité : ICH-SESTP

La linéarité d'une procédure d'analyse est sa capacité, à l'intérieure d'un certain intervalle, à fournir des résultats directement proportionnels à la concentration (quantité) en substance à examiner dans l'échantillon.

L'exactitude :

SFSTP considère que l'exactitude d'une procédure analytique exprime l'étroitesse de l'accord entre la valeur qui est acceptée, soit en valeur conventionnellement vraie (étalon de référence utilisé au sein d'une firme), soit comme valeur de référence (étalon international, substance de référence **SCR** par exemple), et la valeur moyenne qui est trouvée, obtenue en appliquant la procédure d'analyse un certain nombre de fois.

Selon **ICH** l'exactitude d'une procédure analytique exprime l'étroitesse de l'accord entre la valeur qui est acceptée comme conventionnellement vraie ,ou comme valeur de référence, et la valeur trouvée.

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

- **La répétabilité** exprime la fidélité sous les conditions identiques : même analyste, même équipement, même réactif, court intervalle de temps.
- **La reproductibilité** exprime la fidélité sous des conditions différentes : analystes, appareillage, laboratoires, réactifs et jours.

La sensibilité : La sensibilité est la capacité de la procédure d'analyse à enregistrer de faibles variations de la concentration.

La limite de détection (LOD) : La limite de détection d'une procédure d'analyse est la plus petite quantité à examiner dans un échantillon pouvant être détectée, mais non quantifiée comme une valeur exacte dans les conditions expérimentales décrites de la procédure.

Plusieurs approches sont possibles pour déterminer la limite de détection (LD) :

- ✓ Méthode de la ligne de base :

$$LD = 3h_{\max} \times R.$$

R=rapport signal /bruit

- ✓ Méthode de l'écart type :

$$LD=3.3\sigma/b.$$

Où σ est :

Soit l'écart-type sur l'ordonnée à l'origine dans le tableau AVA des coefficients de régression.

Soit la racine carrée de la variance résiduelle indiquée dans le tableau AVA du test de l'existence d'une pente significative.

Où b est la pente de la droite de régression.

- ✓ Méthode du blanc :

On mesure la réponse correspondant au « bruit de fond » analytique

en analysant un nombre approprié d'échantillons à blanc et en calculant l'écart type des réponses obtenues.

$$LD=3.3\sigma_{\text{blanc}}/b.$$

σ_{blanc} : l'écart type du blanc.

La limite de quantification (LOQ) : La limite de quantification est la plus petite quantité de l'analyse dans échantillon pouvant être dosée dans les conditions expérimentales décrites avec une exactitude définie.

Plusieurs approches sont possibles pour déterminer la limite détection (LD) :

- ✓ Méthode de la ligne de base :

$$LQ = 10h_{\text{max}} \times R .$$

R=rapport signal /bruit

- ✓ Méthode de l'écart type :

$$LQ=10\sigma/b.$$

Où σ est :

Soit l'écart-type sur l'ordonné à l'origine dans le tableau AVA des coefficients de régression.

Soit la racine carrée de la variance résiduelle indiquée dans le tableau AVA du test de l'existence d'une pente significative.

Où b est la pente de la droite de régression.

- ✓ Méthode du blanc :

On mesure la réponse correspondant au « bruit de fond » analytique en analysant un nombre approprié d'échantillons à blanc et en calculant l'écart type des réponses obtenues.

$$LQ=10\sigma_{\text{blanc}}/b.$$

σ_{blanc} : l'écart type du blanc.

La robustesse : C'est la capacité d'une méthode d'analyse à rendre des résultats exacts en présence de faibles changements de conditions expérimentales susceptibles de se produire dans l'utilisation de cette procédure.

Elle donne une indication de la fiabilité de la procédure dans les conditions normales d'application.

Tableau II: Lien entre le guide SFSTP 92 et les exigences ICH.

<u>CRITERES</u>	<u>Guide STP PHARMA</u>	<u>ICH</u>
Spécificité	Vérification de la non interférence des excipients	Idem
Intervalle	± 40% de la valeur théorique	± 20% de la valeur théorique
Etalonnage	5 niveaux de concentration sur 3 séries	minimum 5 niveaux de concentration
Exactitude	5 niveaux de concentration sur 3 séries (donc 3 valeurs par niveau de concentration)	Minimum 3 niveaux de Concentration avec 3 valeurs par niveau
Fidélité	<u>Répétabilité</u> : 6 valeurs à la concentration de 100 % <u>Fidélité intermédiaire</u> : sur 3 séries	<u>Répétabilité</u> : minimum 3 niveaux de concentration avec 3 valeurs par niveau ou 6 valeurs à 100%

4. Stratégie statistique pour valider d'une procédure analytique :

La validation est fondée sur une analyse statistique basée sur un certain nombre de critères aboutissant à des méthodes analytiques permettant de donner des résultats fiables. Donc, elle a pour but de démontrer qu'elles correspondent à l'utilisation pour laquelle elles sont proposées.

Afin d'aider concrètement les spécialistes du à appliquer les recommandations réglementaires concernant la validation.

Le présent document présente donc une synthèse des deux guides communément admises et appliquées dans l'industrie pharmaceutique nationale (ICH et SFSTP) et une démarche statistique pour la validation d'une procédure analytique permettant de minimiser les essais effectués et minimiser les deux risques de 1^{ère} et 2^{ème} espèces c.à.d. le risque d'accepter une procédure qui ne serait pas suffisamment exact ou, au contraire, de rejeter une procédure qui serait capable. ^[22]

➤ **Linéarité : K=5 ; n=3 :**

Avant de commencer l'estimation des critères il faut

- S'assurer qu'il n'y a pas un résultat aberrant entre les 5 groupes ; entre les 3 répétitions.
- Test de Cochran détecte le double souci.
- Test de Dixon précise.
- Si contradiction – Cochran et Dixon, l'anvar (Fisher) pour lever le doute
- calcul des coefficients : b ; a ; r .
- alignement (si nécessaire) des valeurs des Quantité introduite → coefficient correcteur → changement de variable.
- cohérence des données alignées → test de Cochran.
- calcul de la variance résiduelle Sr^2 de régression et validité de la pente b → test de Fisher Anova.
- validité de la régression – comparaison de la variance d'ajustement $S2L$ et celle expérimentale $S2E$ → test Fisher.

- comparaison du coefficient a avec 0 \rightarrow test t.
 - **Exactitude : $K=5$; $n=3$:**
- Calcul du recouvrement des 15 résultats.
- Homogénéité des 5 variances Test de COCHRON.
- Validité des moyennes Test de FISHER.
- Comparaison de la variance inter et variance moyenne intra.
- Estimation de recouvrement moyen Y_{rm} et de ses limites de confiance au risque de 5%.

➤ **Fidélité :**

Deux possibilités :

- 1^{er} possibilité : $K=1$, $n=6$, $N= K*N =6$

(milieu de l'intervalle de mesure).

- 2^{ème} possibilité: $K=3$; $n=3$; $N = 9$ (Utilisation de 3 groupes de valeurs de l'exactitude (mini; milieu; maxi de l'intervalle de mesure).
 - Test d'homogénéité de variance des valeurs brutes de la quantité trouvée (COCHRON).
 - Test de recherche de valeurs aberrantes (DIXON).

➤ **Répétabilité :**

- Calcul de la variance.
- Calcul du coefficient de variation ($C.Vr\% = (Sr / Y \text{ moy}) \times 100$).

➤ **Fidélité Intermédiaire:**

- Calcul de la variance et étude de l'effet du facteur (jour, opérateur etc.)
Par l'anova.
- Calcul du coefficient de variation : $CVR = 100 \text{ SR/ m.}$

Chapitre III : l'harmonisation des démarches

(SFSTP 2003)

Récemment, une nouvelle stratégie de validation basée sur le profil d'exactitude a été introduite. Elle est en parfait accord avec l'objectif d'une méthode analytique, à savoir sa capacité de quantifier le plus exactement possible chacune des quantités inconnues qu'un laboratoire aura à déterminer. A ce stade, il est important de définir certains termes fréquemment rencontrés en validation.

1. recadrer les critères de validation : harmonisation de la terminologie.

Il est important de préciser qu'à l'heure actuelle il n'y a pas toujours une convergence entre les différents documents réglementaires (ISO, ICH, AFNOR, FDA, Conférence de Washington, ...) quant à la définition des critères de validation à tester. C'est ainsi que la notion de linéarité apparaît ou non et que son interprétation peut être différente d'un document à l'autre. Il en va de même avec la justesse qui, selon les documents, est confondue avec l'exactitude. C'est pourquoi, dans un souci d'harmonisation mais aussi de cohérence, le guide SFSTP 2003 a retenu la norme ISO comme principal référentiel pour la définition des critères de validation.

Les critères de validation sont : ^[21]

- **Fonction de réponse** (courbe de d'étalonnage) : La fonction de réponse

d'une méthode analytique est, à l'intérieur de l'intervalle de dosage, la relation existante entre la réponse (signal) et la concentration de la substance à examiner dans l'échantillon. La fonction de réponse monotone la plus simple qui exprime cette relation est appelée "courbe d'étalonnage".

- **Justesse:** La justesse exprime l'étroitesse de l'accord entre la valeur moyenne obtenue à partir d'une large série de résultats d'essais et une valeur de référence acceptée comme telle. La justesse donne une indication sur les erreurs systématiques.

La justesse est exprimée en termes de biais absolu (mg/ml), de biais relatif (%) ou de taux de recouvrement (%) pour chaque niveau de concentration des standards de validation.

Si pour un niveau de concentration, $\hat{\mu}$ est la moyenne des concentrations introduites et que \bar{x} est l'estimation de la concentration moyenne obtenue par les concentrations calculées alors nous avons:

$$\text{Biais absolu} = \bar{x} - \hat{\mu} \quad \text{Eq: 2}$$

$$\text{Biais relatif (\%)} = 100 \times \frac{\bar{x} - \hat{\mu}}{\hat{\mu}} \quad \text{Eq: 3}$$

$$\text{Taux de recouvrement (\%)} = 100 \times \frac{\bar{x}}{\hat{\mu}} \quad \text{Eq: 4}$$

- **Fidélité** (répétabilité et précision intermédiaire) : 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 donne des informations sur l'erreur aléatoire et est évaluée à deux niveaux: la répétabilité et la fidélité intermédiaire.

La fidélité (répétabilité et fidélité intermédiaire) peut être exprimée en écart type (SD) et en termes de coefficient de variation (CV).

• **Exactitude** : L'exactitude exprime l'étroitesse de l'accord entre le résultat d'essai et la valeur de référence acceptée comme telle, appelée également "valeur conventionnellement vraie". L'exactitude prend en compte l'erreur totale, c'est à dire l'erreur systématique et l'erreur aléatoire liées au résultat. Par conséquent, l'exactitude est l'expression de la somme de la justesse et de la fidélité.

Les limites d'acceptation ont été fixées à $\pm 5\%$, et ceci en accord avec l'objectif de la procédure analytique.

Le profil d'exactitude est obtenu en reliant entre elles d'une part les bornes inférieures et d'autre part les bornes supérieures de l'intervalle de tolérance, bornes calculées pour chaque niveau de concentration.

La méthode est considérée comme valide pour l'intervalle de dosage où le profil d'exactitude est compris dans les limites d'acceptation fixées a priori.

Cette approche garantit que seules 5.0% des futures mesures d'échantillons inconnus seront en dehors de ces limites.

• **Linéarité** : La linéarité d'une méthode analytique est sa capacité à l'intérieur d'un certain intervalle de dosage d'obtenir des résultats directement proportionnels à la concentration en analyte dans l'échantillon.

• **Limites de détection (LD)** : La limite de détection d'une procédure d'analyse est la plus petite quantité de l'analyte dans un échantillon pouvant être détectée, mais non quantifiée comme une valeur exacte dans les conditions expérimentales décrites de la procédure.

- **La limite de quantification (LQ):** La limite inférieure de quantification est la plus petite quantité de l'analyte dans un échantillon pouvant être dosée dans les conditions expérimentales décrites, avec une exactitude définie. La définition peut également être appliquée pour la limite supérieure de quantification, qui est la plus grande quantité de l'analyte dans l'échantillon pouvant être dosée dans les conditions expérimentales décrites, avec une exactitude définie.

Les limites de quantification sont obtenues en calculant la plus petite et la plus grande concentration pour lesquelles les limites d'exactitude, c'est à dire les limites de l'intervalle de tolérance attendu au niveau β sortent des limites d'acceptation.

- **Intervalle de dosage:** L'intervalle de dosage est l'intervalle compris entre les limites inférieure et supérieure de quantification où la procédure analytique atteint l'exactitude souhaitée.

2. Notion d'exactitude :

Comme nous l'avons vu, un certain nombre d'ambiguïtés entourent toujours la validation des procédures analytiques. C'est ainsi qu'il existe une distorsion autour des notions de justesse, exactitude et linéarité.

Pour cela, il faut tout d'abord recadrer la notion d'exactitude en termes d'erreur totale liée au résultat, c à d la résultante de la somme des erreurs systématique et aléatoire.

L'exactitude est donc l'expression de la somme de la justesse et de la fidélité (cf. tableau 3).

Tableau III : illustration de l'interprétation de la notion d'exactitude

	<u>Français</u>	<u>Anglais</u>
Statistique	Erreur totale = erreur systématique + erreur aléatoire = biais + écart-type	Total error = systematic error + random error = biais + standard déviation
ISO	Erreur totale = justesse + fidélité = exactitude	Total error = trueness + precision = accuracy
ICH	Erreur totale = ? ? = exactitude + fidélité Exactitude = justesse	Total error = ? ? = accuracy + precision Accuracy = trueness

Exactitude (ISO 5725 :1994)

Étroitesse de l'accord entre le résultat d'essai et la valeur de référence acceptée.

NOTE. Le terme «exactitude», appliqué à un ensemble de résultats d'essai,

Implique une combinaison de composantes aléatoires et d'une erreur systématique commune ou d'une composante de biais.

Justesse (ISO 5725 :1994)

Étroitesse de l'accord entre la valeur moyenne obtenue à partir d'une large série de résultats d'essais et une valeur de référence acceptée.

NOTE. La mesure de la justesse est généralement exprimée en termes de biais.

NOTE. La justesse a été également appelée «exactitude de la moyenne». Cet usage n'est pas recommandé.

Dans sa définition de 1994, l'exactitude est très proche de la justesse. Cependant, la note montre qu'il s'agit d'un mélange entre la justesse (un biais) et la fidélité (un écart-type).

C'est pourquoi le terme exactitude est toujours accompagné de justesse et fidélité dans le titre même de la norme ISO 5725. En fait, on ne peut pas mesurer en un seul paramètre, un écart à une valeur de référence et une dispersion des résultats. C'est pourquoi, le guide SFSTP 2003 préfère parler, d'une part, d'incertitude qui est caractérisée par un écart-type composé (dont une des composantes est la composante aléatoire du biais de justesse), d'autre part, de justesse. Signalons encore que le seul intérêt de l'incertitude par rapport à la fidélité est de se rapprocher du vocabulaire classique de la métrologie.

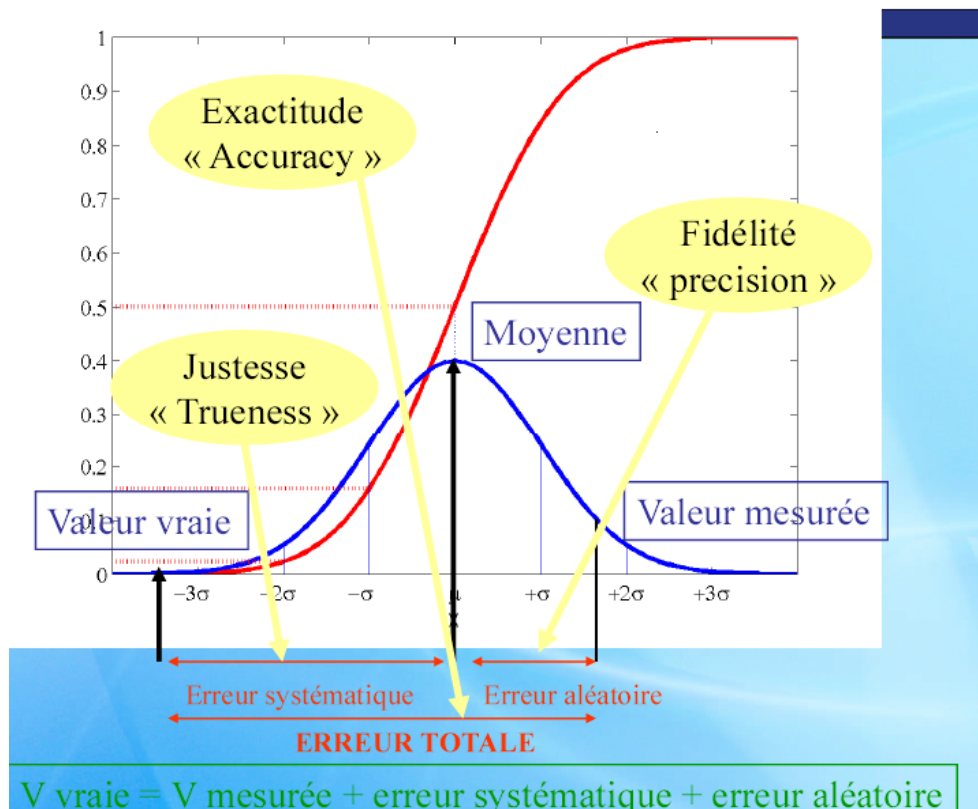


Figure5 : paramètre de performance d'une méthode d'analyse.

3. profil d'exactitude SFSTP 2003 :

La nouvelle stratégie de validation permet d'associer les deux éléments fondamentaux de la validation que sont la justesse et la fidélité au résultat final d'une mesure, et par conséquent de tenir compte de l'erreur totale de mesure (erreur systématique + erreur aléatoire). Le principe de cette stratégie de validation peut être traduit par l'équation 6 qui stipule que la différence entre une mesure (x) et sa vraie valeur (μ) doit être inférieure à la limite d'acceptation (λ) définie *a priori*.

$$-\lambda < x - \mu < \lambda \Leftrightarrow |x - \mu| < \lambda$$

Eq: 5

La notion de limite d'acceptation introduit donc un premier critère permettant à l'analyste de prendre des décisions basé sur l'objectif de la méthode analytique. Communément, la limite d'acceptation est de 1% ou 2 % pour le dosage de principes actifs dans une matière première, de 5 % pour les formes pharmaceutiques et de 15 % pour les analyses dans les matrices biologiques ou environnementales.

Pour la détermination des impuretés, une limite d'acceptation minimale de 10 % est communément admise.

Le profil d'exactitude est construit à partir des estimés de l'intervalle de tolérance d'espérance à de mesures attendues à chaque niveau de concentration.

Une autre notion importante définie est celle de « bonne procédure analytique » avec un risque connu qui peut se traduire par la relation suivante :

$$\Pr[|x - \mu| > \lambda] \leq \beta$$

Eq : 6

avec β la proportion de mesures dans les limites d'acceptation, et λ la grandeur définissant les limites d'acceptation fixées *a priori* en fonction des contraintes du secteur d'activité. Le risque associé d'une procédure s'évalue par la proportion attendue de mesures en dehors des limites d'acceptation.

Le risque associé dépend des estimés du biais et de la précision de la procédure analytique obtenus en phase de validation comme le montre la figure 6. Précisons dès à présent que dans le cadre de notre travail nous avons considéré qu'une « estimation » est un moyen par lequel on obtient une valeur qui est « l'estimé ». La formule qui est appliquée pour obtenir cet estimé est quant à elle l'« estimateur ».

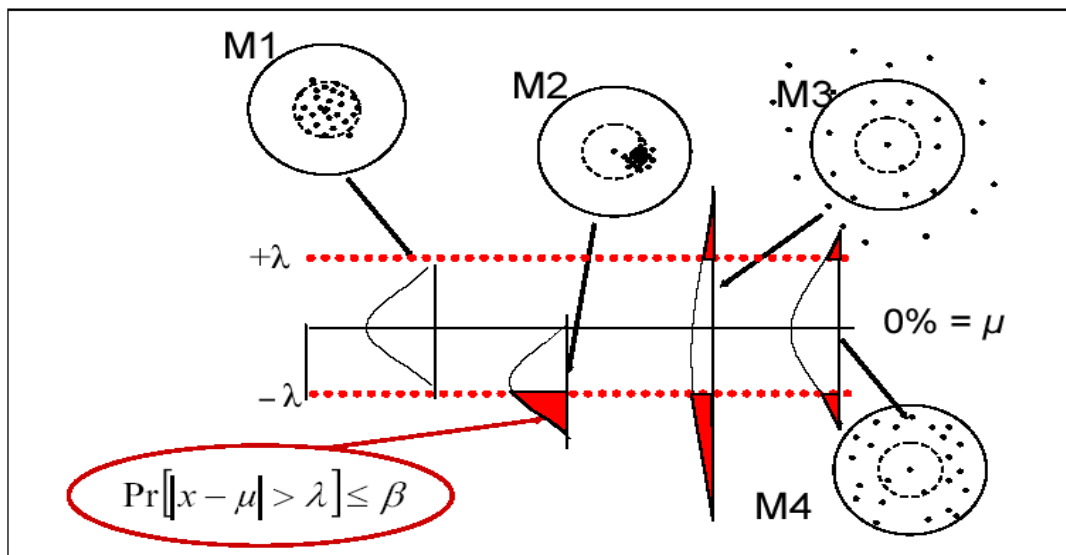


Figure 6 – Profil d'exactitude comme outil de décision pour quatre méthodes M1 (fidèle et juste), M2 (fidèle mais non juste), M3 (non fidèle et non juste) et M4 (non fidèle mais juste)

Ainsi, le profil d'exactitude est un outil de décision basée sur le risque associé à la méthode.

La notion de risque est liée à la garantie concernant la future analyse des échantillons inconnus tout en appliquant la méthode validée. Par conséquent, le profil d'exactitude peut servir à accepter ou rejeter une méthode analytique suivant l'usage attendu. Par ailleurs, le profil peut également être utilisé comme outil de diagnostique.

Par exemple, il peut être utilisé pour sélectionner le modèle de régression le plus approprié pour la calibration et pour déterminer les limites de quantification supérieure et inférieure et à sélectionner ainsi que l'intervalle de dosage.

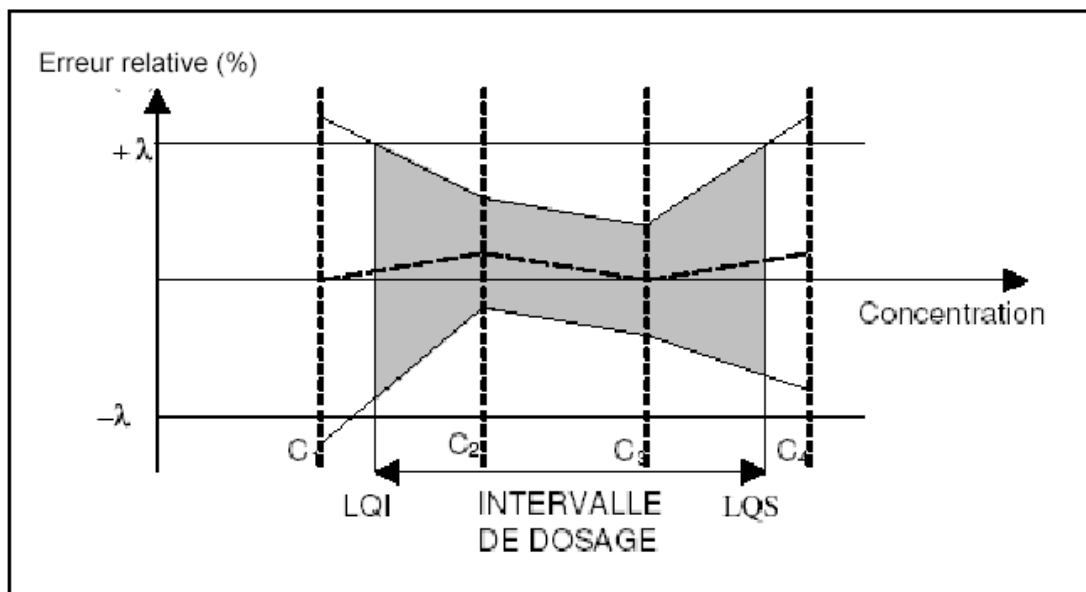


Figure 7 : Illustration du profil d'exactitude comme outil de décision.

LQI: limite de quantification inférieure; LQS: limite de quantification supérieure
Le profil d'exactitude est également représenté dans la Figure 7. Il s'obtient en reliant les limites de confiance basses et hautes estimées pour chaque niveau de concentration. Si, sur une partie de l'intervalle de dosage sous épreuve, les

limites de confiance devaient sortir des limites d'acceptation, comme dans l'exemple de la Figure 7 pour les niveaux de concentration C1 et C4, alors de nouvelles limites de quantification seraient définies et par la même un nouvel intervalle de dosage. La Figure 7 représente ces nouvelles limites LQS (limite de quantification supérieure) et LQI (limite de quantification inférieure) qui sont en parfait accord avec la définition de ce critère, à savoir la plus petite quantité de la substance à analyser qui peut être dosée avec une exactitude (justesse + fidélité) définie. ^[21]

Chapitres IV : Amlodipine besilate.

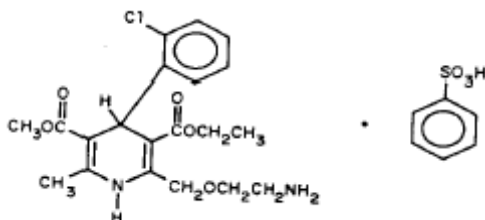
Notre travail a porté sur la validation de la méthode de dosage d'amlodipine besilate par HPLC/UV ; dans une spécialité pharmaceutique.

1. structure et propriété de l'amlodipine besilate.

Dénomination commune : besilate d'amlodipine

Dénomination chimique : ((amino-2 éthoxy) méthyl)-2 (chloro-2 phényl)-4 méthyl-6 dihydro-1,4 pyridinedicarboxylate-3,5- (RS) de (3) éthyle et de (5) méthyl benzène sulfonate . [24]

Formule développée :



Formule moléculaire : C₂₀H₂₅ClN₂O₅.C₆H₆O₃S

Poids moléculaire : 567,1

Description :

Le besilate d'amlodipine est une poudre cristalline blanche, légèrement soluble dans l'eau et peu soluble dans l'éthanol. [26]

Point de fusion (et de décomposition) : 203 ° C.

pKa = 9,02 à 23,5°C.

Classes Chimiques : DIHYDROPYRIDINE

2. Mode d'action et pharmacologique clinique d'amlodipine besilate :

Besilate d'amlodipine est un inhibiteur de l'entrée des ions calcium dans la cellule (antagoniste du calcium ou inhibiteur calcique). L'amlodipine est un antagoniste du calcium de la classe des dihydropyridines. ^[25]

2.1 Mode d'action :

On croit que l'effet thérapeutique de ce groupe de médicaments est relié à leur action spécifique sur la cellule qui consiste à inhiber de façon sélective le passage transmembranaire des ions calcium dans le muscle lisse vasculaire et dans le muscle cardiaque. Or, la contractilité de ces tissus dépend de l'entrée des ions calcium extracellulaires dans ces cellules musculaires, par la voie de canaux ioniques spécifiques. L'amlodipine inhibe de façon sélective le passage des ions calcium à travers la membrane cellulaire, plus particulièrement celle du muscle lisse vasculaire plutôt que celle du muscle cardiaque. L'amlodipine n'altère pas la concentration plasmatique du calcium. A pH physiologique, l'amlodipine est un composé ionisé; son interaction cinétique avec les récepteurs des canaux calciques se caractérise par sa fixation graduelle aux récepteurs suivie de sa dissociation de ces derniers. Les données expérimentales nous permettent de croire que l'amlodipine se fixe à la fois aux récepteurs spécifiques des dihydropyridines et aux autres récepteurs. ^[26]

2. Pharmacologique clinique d'amlodipine besilate :

Hypertension L'amlodipine abaisse la tension artérielle en entraînant une vasodilatation artérielle périphérique et en réduisant la résistance vasculaire.^[26]

Angine de poitrine On n'a pas entièrement élucidé le mode d'action de l'amlodipine pour soulager l'angine de poitrine. L'amlodipine est un vasodilatateur des artères et des artéioles périphériques. Elle abaisse donc la résistance vasculaire totale, réduisant ainsi le travail du cœur (post charge). On croit que cette réduction de la post charge atténue l'ischémie et soulage l'angine d'effort en diminuant les besoins en oxygène du myocarde ainsi que sa consommation d'oxygène.^[26]

3. Pharmacocinétique et métabolisme :

L'amlodipine subit une biotransformation sous la médiation du cytochrome P450, principalement par l'intermédiaire de l'iso enzyme CYP 3A4. Après l'administration orale de doses thérapeutiques d'amlodipine, l'absorption se fait graduellement; la concentration plasmatique maximale est atteinte en 6 à 12 heures. On a estimé que la biodisponibilité absolue du médicament se situerait entre 64 et 90 %. Elle n'est pas altérée par les aliments.

L'amlodipine est en grande partie transformée en métabolites inactifs (90 % environ) par le foie; 10 % de la molécule-mère et 60 % des métabolites sont excrétés dans l'urine. Des études ex vivo ont révélé qu'environ 93 % du

médicament circulant se lie aux protéines plasmatiques chez l'hypertendu. L'élimination plasmatique se déroule en 2 phases; la demi-vie d'élimination terminale se situe entre 35 et 50 heures. La concentration plasmatique de l'amlodipine atteint l'état d'équilibre après 7 à 8 jours de traitement quotidien.

Une atteinte rénale n'altère pas de façon marquée la pharmacocinétique de l'amlodipine. Chez des patients atteints d'insuffisance rénale modérée ou grave, la concentration plasmatique était plus élevée que celle des sujets sains. Chez tous les patients, le degré d'accumulation et la demi-vie d'élimination moyenne se sont révélés semblables à ce que l'on a observé à l'issue d'autres études sur la pharmacocinétique de l'amlodipine chez des sujets sains.

Chez des hypertendus âgés (69 ans en moyenne), on a observé une baisse de l'élimination plasmatique de l'amlodipine comparativement à ce que l'on a observé chez des volontaires plus jeunes (36 ans en moyenne) avec pour résultat, une hausse d'environ 60 % de l'aire sous la courbe (ASC).

Après l'administration orale d'une dose unique de 5 mg d'amlodipine à des patients atteints d'une insuffisance chronique, légère ou modérée, de la fonction hépatique, on a observé une hausse de 40 % environ de l'aire sous la courbe (ASC) de l'amlodipine, comparativement à des volontaires sains. Cette hausse s'explique probablement par une baisse du coefficient d'élimination de l'amlodipine, étant donné que la demi-vie d'élimination du médicament est passée de 34 heures chez de jeunes sujets sains à 56 heures chez des patients âgés atteints d'insuffisance hépatique . ^[26]

4. Indication et usage clinique :

Hypertension :

Besilate d'amlodipine est indiqué pour le traitement de l'hypertension essentielle légère ou modérée.

On a constaté que l'on peut associer **amlodipine** à un diurétique, à un bêtabloquant ou à un inhibiteur de l'enzyme de conversion de l'angiotensine et que cette association produit un effet antihypertenseur additif. ^[26]

Angine chronique stable :

L'amlodipine est indiqué pour le traitement de l'angine chronique stable (angine d'effort) chez les patients qui demeurent symptomatiques malgré l'administration de doses suffisantes d'un bêtabloquant ou d'un dérivé nitré ou encore, chez ceux qui ne peuvent tolérer ces agents.

On peut faire l'essai d'amlodipine en association avec un bêtabloquant pour traiter les patients atteints d'angine chronique stable dont la fonction ventriculaire est normale. Quand on établit un tel traitement, on doit prendre soin de surveiller de près la tension artérielle, car une telle association peut causer de l'hypotension. ^[26]

5. Contre indication :

Besilate d'amlodipine est contre-indiqué chez les patients qui se sont révélés hypersensibles à ce médicament ou aux autres dihydropyridines ainsi qu'en présence d'une hypotension grave (moins de 90 mmHg en systolique). ^[26]

*PARTIE
EXPERIMENTAL*



1. introduction

Ainsi que nous l'avons déjà signalé, la validation est une étape importante du cycle de vie d'une procédure analytique qui permet de démontrer la fiabilité des résultats.

La validation d'une telle méthode d'analyse, est nécessaire à la prise de décision en rapport avec les résultats fournis et en considérant des limites d'acceptation prédéfinies, ainsi que le risque relatif à l'usage future de la méthode.

Dans cette partie, nous allons développer les différentes étapes à réaliser pour valider une méthode de dosage d'amlodipine besilate dans une spécialité pharmaceutique par la chromatographie liquide à haute performance HPLC ,par une étude comparative entre la validation (ICH-SFSTP 1992) et la nouvelle approche de la validation profil d'exactitude (SFSTP 2003).

Ce travail de validation a été entrepris au sein d'un laboratoire de contrôle de la qualité dans une industrie pharmaceutique.

2 .Matériels et Méthodes.

2.1. Matériel:

- Le système de chromatographie liquide à haute performance(HPLC) est le modèle waters, constitué une pompe, un injecteur automatique 2695 water (séparation module) un détecteur à barrette de diode array le tout provenant de la maison de waters France.
- La colonne de type Luna (Phenomenex), de longueur (5 μ mC18, 150×4,6mm).

- La hotte à flux laminaire horizontale.
- Les balances mettler.
- PH-mètre multical^R.

2.2 Réactifs :

- L'eau purifiée est filtrée sur membrane 0.45 µm.
- L'amlodipine besilate.
- Méthanol.
- Acétonitrile.
- Triéthylamine.
- l'acide phosphorique

N.B : les réactifs sont de qualité de principe actif.

Les solvants de qualité HPLC.

2.3. Méthodes :

a -Préparation des solutions de travail :

- Tampon pH3 : Dissoudre 7 ml de triéthylamine dans 800ml d'eau déminéralisée.

Ajuster le pH à $3,0 \pm 0,1$ avec l'acide phosphorique puis compléter à 1l avec l'eau déminéralisée.

- Phase mobile: Tampon pH 3* / Méthanol / Acétonitrile (50/35/15 : v/v).

- Solution de placebo : Dans une fiole jaugée de 50 ml, dissoudre une quantité équivalente de placebo1931, 56 mg, dans la phase mobile. Diluer 5 ml de cette solution dans une fiole de 100 ml avec le même solvant.

- **Solution Essai :**

Dans une fiole jaugée de 50 ml, dissoudre une quantité 69.5 mg d'amlodipine besilate, dans la phase mobile. Diluer 5 ml de cette solution dans une fiole de 100 ml avec le même solvant.

- **Solution de blanc :** phase mobile.

- **Solution des impuretés :** Dans une fiole jaugée de 50 ml, dissoudre une quantité 12,5mg de l'impureté D dans la phase mobile, diluer 1ml de cette solution dans une fiole de 100 ml avec le même solvant.

b. Méthodologie expérimentale selon ICH 94-SFSTP92 :

- **Spécificité :**

Elle sera évaluée en analysant en parallèle, et selon les conditions opératoires de la technique, une solution d'amlodipine, une solution essai, solution de l'impureté D et une solution placebo (le placebo est un mélange de tous les excipients de la formulation).

La spécificité est satisfaisante si :

- Le témoin de P.A et l'essai présentent le même profil du chromatogramme
- le placebo ne présente aucun pic dans le temps de rétention de P.A.

- **Linéarité :**

En ce qui concerne le protocole d'étude de la linéarité, on se réfère sur ICH qui demande au minimum de travailler sur Cinq concentrations réparties sur l'intervalle d'étude (70 à 130 pour 100) seront préparées selon la technique :

- Chaque concentration sera pesée trois fois.
- Dans une fiole jaugée de 50 ml, dissoudre chaque pesée de P.A dans la phase mobile.
- Diluer 5 ml de cette solution dans une fiole de 100 ml avec le même solvant.
- A partir de chaque fiole On remplit les Viaux.

La linéarité se détermine donc sur au moins 15 résultats couvrant tout le domaine.

▪ Exactitude :

L'exactitude sera évaluée par la préparation des échantillons reconstitués du placebo et d'amlodipine dans une gamme de concentrations égale à 60,80, 100 ,120et 140% de la teneur théorique de P.A. Pour chaque concentration, nous préparons trois essais.

Les séries seront dosées par rapport à deux solutions témoins dont le CV des facteurs de réponses doit être inférieur à 2 %.

L'exactitude doit être indiquée en termes de pourcentage de recouvrement d'une quantité connue de substance ajoutée à l'échantillon, ou en termes de différence entre la moyenne obtenue et la valeur conventionnellement vraie, avec les intervalles de confiance correspondants.

Pourcentage de recouvrement = [quantité retrouvée/quantité introduite] x100

L'intervalle de confiance :
$$m \pm \frac{t \times Sr}{\sqrt{n}}$$

- **Fidélité (répétabilité, fidélité intermédiaire) :**

La fidélité sera effectuée par l'analyse de 6 essais préparés sur la forme pharmaceutique reconstituée contenant 100 % de la quantité théorique d'amlodipine pendant trois jours.

- **Le traitement statistique :**

Les traitements statistiques de cette partie ont été réalisés à l'aide du logiciel Excel : Celui-ci nous a permis de programmer la totalité des formules mathématiques qui correspondent aux tests utilisés.

c. Méthodologie de validation le dosage de P.A par HPLC selon l'approche SFSTP 2003 :

Dans cette démarche, deux types solutions ont été préparés de façon indépendante: les standards de calibration et les standards de validation.

- **Les standards de calibration :**

Sont des échantillons, de concentrations connues, préparés hors de la matrice et qui permettent d'établir la courbe de réponse.

- **Préparation de standards de calibration :**

Dans une fiole jaugée de 50 ml, dissoudre la quantité d'amlodipine besilate correspond à chaque concentration trois répétition (n=3) ont été préparés pour chaque niveau de concentration (k=5) dans la phase mobile. Diluer 5 ml de cette solution dans une fiole de 100 ml avec le même solvant.

L'analyse a été réalisée pendant 3 jours (séries).

Tableau IV: plan d'expériences des Standards de calibration.

Séries	Niveaux de concentration %	Nb. de répétitions
Series_1	60.0	3
Series_1	80.0	3
Series_1	100.0	3
Series_1	120.0	3
Series_1	140.0	3
Series_2	60.0	3
Series_2	80.0	3
Series_2	100.0	3
Series_2	120.0	3
Series_2	140.0	3
Series_3	60.0	3
Series_3	80.0	3
Series_3	100.0	3
Series_3	120.0	3
Series_3	140.0	3

Le nombre total d'essais est 45.

▪ **Les standards de validation :**

Sont les échantillons reconstitués dans la matrice contenant une concentration connue et dont la valeur est considérée comme vraie par consensus. C'est une similitude de la réalité en routine.

- **Préparation de standards de validation :**

Les standards de validation ont été préparés selon la même méthodologie d'expérience des standards de calibration.

La série sera effectuée par la préparation des échantillons reconstitués du placebo et d'amlodipine besilate dans une gamme de concentrations égale à 80,100 et 120% de la teneur théorique de P.A .pour chaque concentration, nous préparons trois essais qui seront réalisés selon le tableau suivant :

L'analyse sera réalisée pendant 3 jours (séries).

Tableau V: plan d'expérience standard de Validation

Série	Niveau de concentration %	Nb. de répétitions indépendants
Series_1	80.0	3
Series_1	100.0	3
Series_1	120.0	3
Series_2	80.0	3
Series_2	100.0	3
Series_2	120.0	3
Series_3	80.0	3
Series_3	100.0	3
Series_3	120.0	3

Le nombre total d'essais est 27.

▪ **Le traitement statistique :**

Les traitements de données ont été réalisés par le Logiciel e.noval® version 3.1 (Arlenda s.a, Liège, Belgique). Permet de construire le profil d'exactitude basé sur l'erreur totale comme outil de décision.

3. Résultat et discussion :

3.1 Validation de la méthode selon ICH-SFSTP.

a. Spécificité :

Le blanc et le placebo n'interfèrent pas au temps de rétention t_r , d'amlodipine besilate cette méthode permet donc, l'analyse univoque du P.A même en présence de la matrice qui constitue la spécialité pharmaceutique ce qui justifie sa spécificité. (Voir l'annexe)

- Le témoin de P.A de 0.05mg/ml et l'essai présentent le même profil du chromatogramme
- La solution mélange des impuretés présentes une bonne sélectivité.
- le placebo ne présente aucun pic ni dans le temps de rétention de P.A ni dans celui des autres impuretés.

Le tableau VI : les temps de rétention de P.A, placebo, impureté et la phase mobile.

	Temps de rétention
Principe actif	18.4min
Impureté D	9.24min
placebo	2.5min

Nous pouvons conclure que la spécificité est acceptable.

b. Linéarité :

Le but de cette étude de définir si cette méthode est linéaire et sur des domaines de dosage Prédéfini selon ICH et confirmé par les tests statistiques adéquat selon la stratégie SFSTP 92.

Le tableau VII: Données brutes de l'étude de la linéarité.

Essai	Pesée (mg)[Xij]	conc (mg/ml)	m [Xij]	SURF [Yij]	m [Yij]	VAR
1	40,8	0,0408	40,366666	754658	740533	152166409
2	40	0,04		731880		
3	40,3	0,0403		735061		
1	54,8	0,0548	54,466666	1016846	1015099,33	5382214,33
2	54	0,054		1012467		
3	54,6	0,0546		1015985		
1	69	0,069	69,2266667	1310034	1312297,33	6505432,33
2	69,48	0,06948		1315061		
3	69,2	0,0692		1311797		
1	82,24	0,08224	82,28	1559832	1557749,33	174025749
2	82,4	0,0824		1569776		
3	82,2	0,0822		1543640		
1	95,821	0,095821	95,847	1825815	1829127,67	16490196,3
2	95,82	0,09582		1827910		
3	95,9	0,0959		1833658		
	68,4374	0,0684374		1,58692^E+11	1,8508^E+11	354570001
Var xij	412,9170471	0,00041292		VT	VK	

1 ,2,3, désignent successivement les jours 1,2 et 3ou bien les séries 1,2,3.

Traitement statistique :

Avant de commencer l'estimation des différents critères il faut, tout d'abord s'assurer qu'il y a une homogénéité de variance entre les 5 niveaux, avec les 3 répétitions.

Ceci est réalisé par le test de COCHRON :

H_0 pas d'écart significatif entre les différentes variances.

Tableau VIII : le test de COCHRON

$S_{j \max}^2$	$\sum S_j^2$	$C_{\text{calculé}} = S_{j \max}^2 / \sum S_j^2$	$C_{(0,05 ; k ; n-1)}$
5382214,333	354570001,3333	0,0152	0,6838

$C_C=0,0152$ et $C_t(\alpha=5\%)=0.684$; on constate que $C_C < C_T$ on rejette donc l'hypothèse nulle et on conclut que les variances sont considérées comme homogène au risque 5%.

Conclusion : les variances des différents groupes sont homogènes au risque de 5%.

Étant donné que la cohérence des résultats d'essais est prouvée et qu'il n'existe pas de variance aberrante entre les 5 niveaux, on peut procéder à la courbe de calibration et la validité de linéarité.

Détermination de l'équation de la droite de régression linéaire :

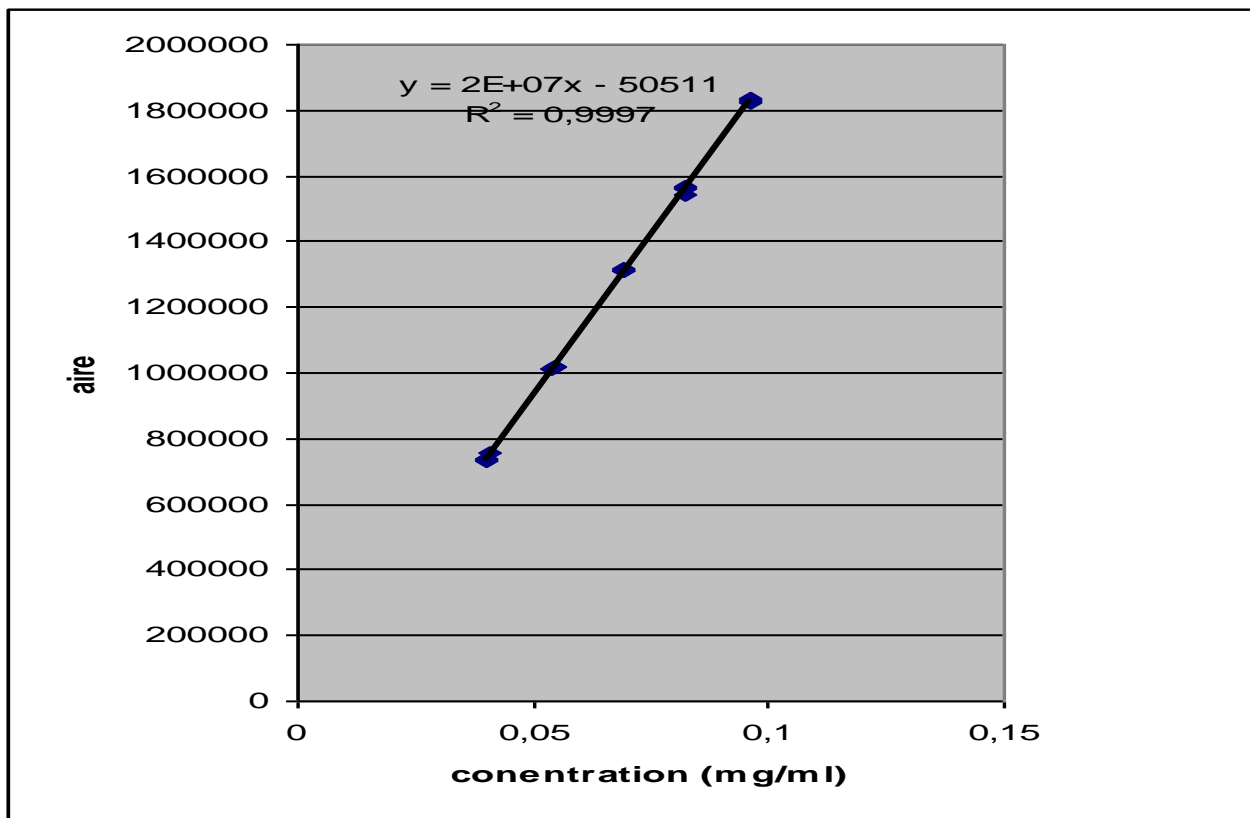


Figure 8: droite de calibration

L'équation de la droite a été calculée par la méthode des moindres carrés.

Tableau IX: Critères de la droite de régression.

Pente de la droite	b	2.10^7
Ordonnée à l'origine	a	-50511
Coefficient de corrélation	R^2	0,9997
Equation de la droite de régression	$y=2.10^7x-50511$	

Le coefficient de corrélation $r=0.9997$ est satisfaisant et nous permet, dans un premier temps, de pouvoir affirmer qu'il existe bien une liaison hautement significative « de type croissante » entre l'aire et la concentration.

RESTE à dire que même si la technique présente un comportement linéaire, et donne des « signaux » directement proportionnels à la quantité mesurée ; elle peut ne pas suivre exactement l'équation de la droite théorique dont on a calculé l'équation (droite de régression).

C'est pour cette raison que le test de validité de la régression (test de FISHER) s'impose dans la démarche statistique adoptée.

Afin de s'assurer que l'équation de la droite obtenue par la méthode des moindres carrés, il est judicieux de vérifier la significativité de la pente et l'ajustement du modèle.

Test de l'existence d'une pente significative :

Analyse de variance (Test de Fisher) Ce test consiste à vérifier l'hypothèse nulle:

$$H_0 : b = 0 \text{ contre } H_1 : b \neq 0.$$

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

Origine de la variation	ddl	SCE	Variances	F_{calculé}	F_(0,05 ; 1 ; 13)
Variation due à la régression	1	2221018406589,7100	2,22102^E+12	43320,33333	4,67
Variation résiduelle	13	666505473,6	51269651,82		
Variation totale	14	2,22168^E+12			
F_{calculé} > F_{Tabulé (0,05 ; 1 ; N-2) ; p <<< 0,05}					
C/C: L'existence d'une pente est significative					

En utilisant le test de Fischer, a partir des résultats brutes, $F_{\text{calculé}} > F_{\text{tabulé}}$ avec $p < 0,05$ nous pouvons conclure l'existence d'une pente significative, donc à une dépendance linéaire au seuil de risque 5%.

Test de validité de l'ajustement :

Ce test permet de comparer les erreurs d'ajustement et les erreurs expérimentales.

Tableau XI: Test de validité de la droite de régression

Origine de la variation	ddl	SCE	Variances	$F_{\text{calculé}}$	$F_{(0,05 ; 3 ; 10)}$
Erreur expérimentale	(N-k) 10	709140002,6619	70914000,26619	-0,2004	3,71
Erreur de la régression	(k-2) 3	-42634529,0430	-14211509,68		
<p>$F_{\text{calculé}} < F_{\text{tabulé}} (0,05 ; k-2 ; N-5) ; p > 0,005$</p> <p>C/C: L'ajustement est valide au seuil de probabilité considéré</p>					

L'ajustement est valide au seuil de probabilité considéré 5%.

Test de comparaison de l'ordonnée à l'origine avec zéro :

Comparaison de l'ordonnée à l'origine avec zéro :

H0 : pas de différence significative entre a et 0.

Tableau XII : test de student

 a 	S_a	t_{calculé} = a / S_a	t_{tabulé} (0,05 ; N-2)
50511	6704,99987	7,5333	2,16

t tabulé < t calculé

On rejette l'hypothèse nulle la droite ne passe pas par l'origine.

L'ordonnée à l' origine est significativement différente de 0, au seuil de probabilité $\alpha=5\%$.

c.Limite de détection(LD) et de quantification

(LQ) :

Selon ICH :

LD =0.00068mg/ml.

L.Q=0.002 mg/ml.

d. Exactitude:

Le modèle qui a été choisi, vérifier la significativité de la pente, l'ajustement sur l'ordonnée à l'origine :

donc l'équation qui sera utilisé pour calcul ultérieur est : $y=2.10^7x-50511$

càd, cette équation va nous permettre de calculer la quantité retrouvée.

Tableau XIII: les données brutes d'une procédure d'exactitude

essai	Quantité introduite	surface	Quantité retrouvée	recouvrement%	
1	0,0408	754658	0,04025845	98,67267157	97,9790184
1	0,04	731880	0,03911955	97,798875	
1	0,0403	735061	0,0392786	97,46550868	
2	0,0548	1016846	0,05336785	97,38658759	97,8249818
2	0,054	1012467	0,0531489	98,42388889	
2	0,0546	1015985	0,0533248	97,66446886	
3	0,069	1310034	0,06802725	98,59021739	98,4312486
3	0,06948	1315061	0,0682786	98,27086931	
3	0,0692	1311797	0,0681154	98,43265896	
4	0,08224	1559832	0,08051715	97,90509484	97,7304344
4	0,0824	1569776	0,08101435	98,31838592	
4	0,0822	1543640	0,07970755	96,96782238	
5	0,095821	1825815	0,0938163	97,90786988	98,0540708
5	0,09582	1827910	0,09392105	98,01821123	
5	0,0959	1833658	0,09420845	98,23613139	
			C.V	0,235442017	0,07313954
			Recouvrement moy	98,00395079	

Test de validité des moyennes : ANOVA

Ce test consiste à comparer les moyennes des 5 niveaux.

Tableau XIV : Test de Fischer

Origine de la variation	ddl	SCE	Variances	F _{calculé}	F _(0,05 ; 4 ; 10)
Variation intragroupe	(N - k) 10	2,418513781	0,241851378	$F = S_C^2 / S_E^2$ 0,9072	3,42
Variation intergroupe	(k - 1) 4	0,877674458	0,219418614		
Variation totale	(N - 1) 14	3,296188239			

F_{calculé} < F_{Tabulé} (0,05 ; k-1 ; N -k) ; p>0,05
C/C : L'hypothèse d'homogénéité des variances est acceptée au risque $\alpha = 5\%$

Au seuil de probabilité de 5 %, le facteur niveau n'a pas d'influence sur les moyennes et il n'y a pas de différence statistiquement significative.

Estimation de l'intervalle de confiance :

L'intervalle de confiance du pourcentage de recouvrement moyen est calculé à partir des résultats de l'application numérique de la formule. L'intervalle de confiance est : [98,0039% ± 0,2688%] qui peut être écrit sous la forme.

$$I_{Rm} = (97,7352, 98,2727).$$

On peut conclure qu'il existe 95% de chance que la vraie valeur (100%) ne soit pas incluse dans cet intervalle. La méthode est donc **n'est pas exacte selon l'exigence de ICH94-SFSTP92.**

e. Fidélité

Tableau XV: les données brutes de l'étude de la fidélité

essai	pesée	aire	Quantité retrouvée (mg/ml)	Pourcentage de recouvrement%
1	0,0684	1242389	0,065	94,5102339
1	0,0684	1249826	0,065	95,0538743
1	0,0684	1267441	0,066	96,3415205
1	0,0684	1263343	0,066	96,0419591
1	0,0684	1253540	0,065	95,3253655
1	0,0684	1252642	0,065	95,2597222
2	0,0684	1290109	0,067	97,998538
2	0,0684	1302841	0,068	98,9292398
2	0,0684	1296320	0,067	98,4525585
2	0,0684	1284997	0,067	97,6248538
2	0,0684	1317764	0,068	100,020102
2	0,0684	1305788	0,068	99,1446637
3	0,0684	1330670	0,069	100,963523
3	0,0684	1332630	0,069	101,106798
3	0,0684	1331376	0,069	101,015132
3	0,0684	1332143	0,069	101,071199
3	0,0684	1332205	0,069	101,075731
3	0,0684	1343897	0,070	101,930409

Les coefficients de variation de répétabilité et la fidélité intermédiaire :

CV répétabilité	$CV_r = 0,674\%$
CV fidélité intermédiaire	$CV_R = 3,004\%$

Conforme si $CV < \text{ou} = 2,0 \%$

•**La répétabilité :**

Elle est évaluée par le calcul du coefficient de variation.

Compte tenu de la valeur du $CV_r = 0,674\%$ ($< 2\%$ valeur fixée par les normes pharmaceutiques), la répétabilité de la méthode est jugée très satisfaisante.

•**La fidélité intermédiaire :**

Le calcul du $CV_{FI} = 3,004\%$. Cette valeur est supérieure à 2% , la fidélité intermédiaire n'est satisfaisante.

Test de validité des moyennes : ANOVA

Ce test consiste à évaluer l'effet du facteur séries ou jours.

Tableau XVI : Test de validité des moyennes

	DDL	SCE	VARIANCE	$F_{\text{calculé}}$	F théorique
Variation intergroupe	2	100,536274	50,268137	114,272274	3.68 à 4.77
Variation intragroupe	15	6,59846901	0,43989793		
Variation totale	17	107,134743			

$F_{\text{calculé}} > F_{\text{Tabulé}} (0,05 ; k-1 ; N - k) ; p < 0,05.$

Le test de la validité des moyennes à l'aide du test du Fischer a permis de mettre en évidence l'effet du facteur jour (série), il y a une différence statistiquement significative.

Ce facteur jour (série) est à l'origine d'une grande variabilité inter.

Un test de Post –hoc de Bonferroni et Tukey a été réalisé pour mettre en évidence la série ou (les séries) qui sont à l'origine de la significativité.

Le test post-hoc

Tableau XVII : Le test post-hoc.

	(I) séries	(J) série	p. value
Tukey HSD	1	2	1,0831.10⁻⁶
		3	6,2922.10⁻⁹
	2	1	1,0831.10⁻⁶
		3	2,7066.10⁻⁵
	3	1	6,2922.10⁻⁹
		2	2,7066.10⁻⁵
Bonferroni	1	2	1,1334.10⁻⁶
		3	5,4401 .10⁻¹⁰
	2	1	1,1334 .10⁻⁶
		3	2,8786 .10⁻⁵
	3	2	5,4401 .10⁻¹⁰
		1	2,8786 .10⁻⁵

Il est à noter que les 3 séries diffèrent d'une manière statistiquement significative, ce qui corrobore les résultats obtenus de la fidélité intermédiaire (C.V = 3,004%).

Nous pourrions confirmer que la méthode n'est pas fidèle.

Cette absence de fidélité ne peut pas être inhérente à des erreurs de manipulation, mais plus probablement à la dégradation d'amlodipine besilate d'une part, dans les conditions chromatographiques (phase mobile ; PH=3,...) ou d'autre part à sa sensibilité à la lumière.

Il est probablement aussi, due aux mauvais choix de modèle, car la méthode linéaire n'est pas toujours l'outil adéquat. Ce que nous allons essayer de démontrer par la nouvelle démarche.

3.2 Validation de la méthode de dosage d'amlodipine besilate par HPLC selon la nouvelle approche SFSTP 2003 (profil d'exactitude) :

3.2.1. Stratégie du profil d'exactitude :

La stratégie, couramment utilisée pour la validation d'une procédure analytique que nous avons adoptée précédemment, est basée sur les critères d'acceptation qui considèrent de manière dissociée le biais et la variance.

La raison d'introduire la nouvelle approche SFSTP 2003 basée sur le profil d'exactitude qui prend en compte l'erreur totale d'une mesure : la justesse (biais) + la fidélité intermédiaire (écart-type). Le profil d'exactitude peut être considéré comme un outil de décision très utile pour sélectionner le modèle de régression le plus approprié pour la calibration. La détermination des limites de quantification supérieur et inférieur et pour sélectionner l'intervalle de concentration pour le dosage.

Dans cette étude, nous avons testé deux limites d'acceptation $\lambda = 5\%$ (PE) et $\lambda = 10\%$ (selon USP).

3.2.2. Validation avec les limites d'acceptations

($\lambda = 5\%$) :

a. Analyse de la fonction de réponse et le choix du modèle de régression appropriée avec $\lambda = 5\%$:

La fonction de réponse d'une méthode analytique est, à l'intérieur de l'intervalle de dosage, la relation existante entre la réponse (signal) et la concentration de la substance à examiner dans l'échantillon. Cette relation est

appelée "courbe d'étalonnage». Ces modèles ont été triés en fonction de leur "indice d'exactitude" .Celui-ci doit être voisin de l'unité.

Tableau XVIII: Modèles d'étalonnage triés par 'Indice d'Exactitude'

Modèle	Indice d'Exactitude	Limite inférieure et supérieure de quantification (mg/ml)	Indice d'Intervalle de Dosage	Indice de Fidélité	Indice de Justesse
Régression linéaire passant par 0 ajustée en utilisant uniquement le niveau 140	0		0	0	0
Regression linéaire ponderee (1/X)	0	ND	0	0	0
Regression linéaire pondérée (1/X ²)	0	ND	0	0	0
Régression linéaire après transformation logarithmique	0	ND	0	0	0
Régression linéaire après transformation racine carrée	0	ND	0	0	0
Regression quadratique	0	ND	0	0	0
Regression quadratique ponderee (1/X)	0	ND	0	0	0
Regression quadratique ponderee (1/X ²)	0	ND	0	0	0
Régression linéaire passant par 0 ajustée en utilisant uniquement le niveau 60.0	0	ND	0	0	0

Aucun des modèles du tableau XVIII, ne répond aux critères de l'indice d'exactitude, pour souci de comparaison, nous avons opté pour le modèle linéaire. Les courbes d'étalonnage obtenues pour ce modèle de régression, sont représentées par les équations suivantes:

$$Y = a + bX$$

Où Y = réponse analytique (en aire) et X = concentration introduite (en mg/ml).

Tableau XIX: Paramètres de régression

Série	Ordonnée à l'origine	Pente	r ²	d.d.l. résiduels	SCR
Series_1	-5.0511E+04	1.9601E+07	0.9997	13	5.8873E+08
Series_2	-6.0532E+04	1.9757E+07	0.9996	13	9.9995E+08
Series_3	-3.1715E+04	1.9253E+07	0.9996	13	9.4608E+08

Voir l'annexe (pour les autres courbes des séries 2 et séries 3)

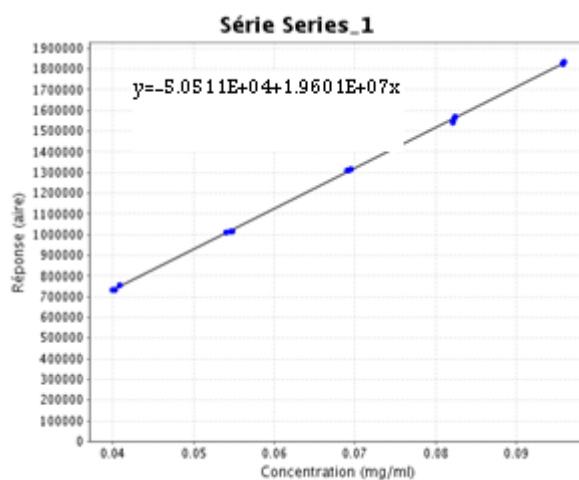


Figure 9: courbe d'étalonnage (5%).

La droite ne passe pas par l'origine.

b. justesse

Comme précédemment mentionné, la justesse fournit une indication sur les erreurs systématiques de la procédure analytique. Elle s'exprime en termes de biais (mg/ml) ou de biais relatif(%) et a été estimée au moyen des standards de validation dans la matrice à 5 niveaux de concentration.

Comme le montre le tableau XX, les biais relatifs de la méthode ont été trouvés Inacceptables puisqu'ils sont relativement très loin de zéro(entre 5 et 7).

Tableau XX: Justesse

Niveau de concentration (mg/ml)	Moyenne des concentrations introduites (mg/ml)	Moyenne des concentrations calculées (mg/ml)	Biais absolu (mg/ml)	Biais relatif (%)	Taux de recouvrement (%)	Intervalle de confiance à 95% des Recouvrements (%)
80.0	0.05323	0.05701	0.003778	7.098	107.1	[106.6 , 107.6]
100.0	0.06860	0.07275	0.004152	6.053	106.1	[105.8 , 106.3]
120.0	0.08159	0.08595	0.004359	5.342	105.3	[105.1 , 105.6]

c. fidélité :

La fidélité fournit une indication sur les erreurs dues au hasard. Elle a été estimée en calculant la répétabilité et la fidélité intermédiaire à chaque niveau de concentration utilisé en standards de validation.

Ainsi que le montre le tableau XXI, les coefficients de variation de répétabilité qui reflète la fidélité intra jour pour chaque niveau de concentration ne dépassent pas 0.6702%.pour la fidélité intermédiaire, les coefficients de variation ne dépassent pas 0.607% ce qui montre l'excellente fidélité de la méthode HPLC.

Tableau XXI: Répétabilité et Fidélité intermédiaire relatives

Niveau de concentration (mg/ml)	Moyenne des concentrations introduites (mg/ml)	Répétabilité (CV%) ¹	Fidélité Intermédiaire (CV%) ¹
80.0	0.05323	0.6702	0.6702
100.0	0.06860	0.3078	0.3425
120.0	0.08159	0.1617	0.3317

d. exactitude :

L'exactitude tient compte de l'erreur totale liée au résultat. C'ad des erreurs systématiques et aléatoires .l'exactitude de la méthode est représentée par le profil d'exactitude comme indiqué sur la figure 10. Selon les résultats obtenus ceci montre que la méthode non validé pour l'intervalle de dosage où le profil d'exactitude n'est compris pas dans les limites d'acceptation fixées a priori 5%.

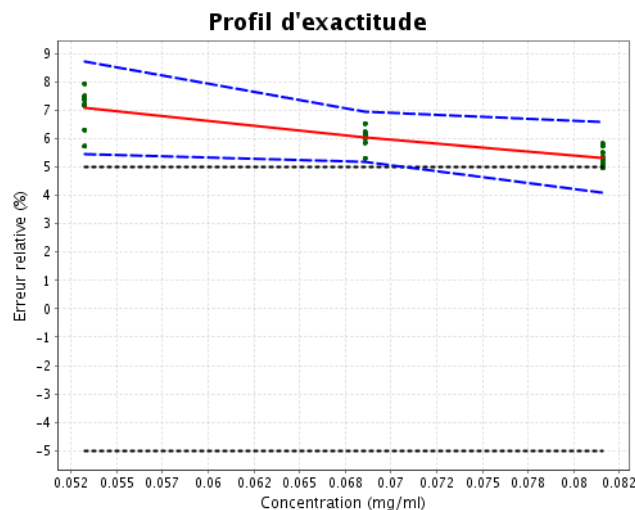


Figure10: Profil d'exactitude (5%).

La ligne rouge continue représente le biais, les lignes discontinues bleues définissent les limites de l'intervalle de tolérance attendues au niveau β et les

lignes pointillées noires sont les limites d'acceptation. Les points sont quant à eux l'erreur relative des concentrations calculées et sont représentées en fonction de leurs concentrations cibles.

e.linéarité

La linéarité d'une méthode analytique est sa capacité à l'intérieur d'un certain intervalle de dosage d'obtenir des résultats directement proportionnels à la concentration en analyte dans l'échantillon.

Un modèle de régression linéaire a été ajusté sur les concentrations calculées en fonction des concentrations introduites dans le but d'obtenir l'équation suivante:

$$Y = 0.0001500 + 0.9982 X$$

où Y = concentrations calculées (mg/ml) et X = concentrations introduites (mg/ml). Le coefficient de détermination (r^2) est égal à 0.9976.

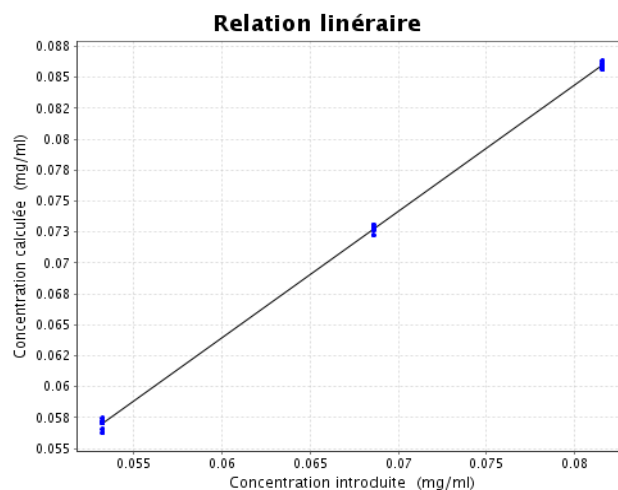


Figure11: Relation entre les concentrations introduites et calculées

Dans le but de démontrer la linéarité de la méthode, l'approche basée sur l'intervalle de tolérance attendu au niveau β exprimé en valeur absolue.

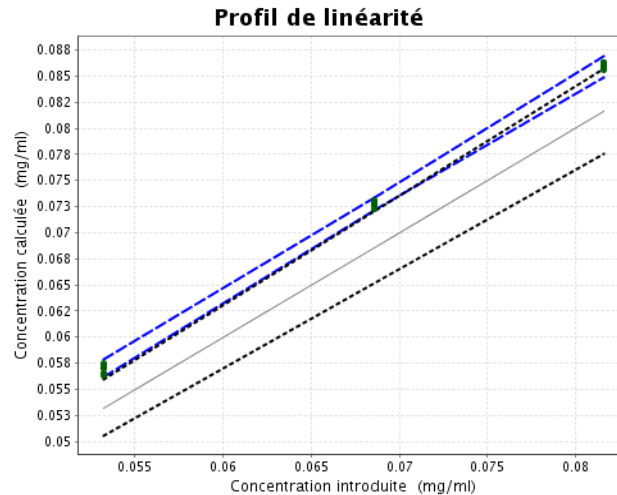


Figure12: Graphe de linéarité(5%).

La ligne continue est la droite d'identité ($Y=X$). Les limites représentées par les lignes discontinues bleues sur le graphique correspondent au profil d'exactitude c'est à dire les limites de tolérance " β -expectation" exprimées en valeur absolue.

Les lignes pointillées noires représentent les limites d'acceptation exprimées dans l'unité de la concentration.

La méthode est considérée comme valide là où l'intervalle de tolérance représenté par les lignes discontinues bleues est à l'intérieur des limites d'acceptation définies par les lignes pointillées noires.

La linéarité du modèle est démontrée quand les limites de l'intervalle de tolérance exprimées en absolu sont incluses dans les limites d'acceptation. Mais malheureusement l'intervalle de tolérance représenté par les lignes discontinues

bleues est à l'extérieur des limites d'acceptation définies par les lignes pointillées noires. Donc la méthode est non valide au risque de 5%.

f. limites de détection(LD) :

en appliquant la méthode de calcul décrite dans la partie relative à la validation de la méthode HPLC.

L'application choisit la plus petite valeur: **LD (mg/ml) = 0.003660**

g. limites de quantification (LQ) :

Les limites de quantification sont obtenues en calculant la plus petite et la plus grande concentration pour lesquelles les limites d'exactitude, c'est à dire les limites de l'intervalle de tolérance attendu au niveau β sortent des limites d'acceptation.

L'intervalle de dosage est l'intervalle compris entre les limites inférieure et supérieure de quantification où la procédure analytique atteint l'exactitude souhaitée.

Limite inférieure de quantification (LQ_{inf}) (mg/ml) = ND

Limite supérieure de quantification (LQ_{sup}) (mg/ml) = ND

Les limites de quantification supérieure et inférieure ne sont pas définies ce qui montre que la méthode est non validé

Conclusion : Même si la fidélité a été jugée satisfaite, le profil d'exactitude n'est pas validé dans les limites d'acceptation fixé à 5%, en conséquence nous pourrions conclure que la méthode n'est pas validée. Dans ces

conditions il est judicieux de diagnostiquer les résultats par le biais des tests statistiques :

h. Diagnostic

Evaluation de l'homogénéité des variances (test de Levène)

Le test de Levène commence par calculer les écarts absolus des réponses pour le modèle d'étalonnage sélectionné. Pour tester l'hypothèse d'homogénéité des variances, une analyse des variances (ANOVA) est ensuite réalisée sur les écarts absolus. Toutes les données ont été utilisées pour déterminer l'homogénéité des variances.

Tableau XXII: Test de Levène

Source	SS	df	MS	Fcalc	Fcrit,95%	p-value
Modèle	1.4990E+08	4.0	3.7475E+07	3.164	2.612	0.02407
Erreur	4.6187E+08	39.0	1.1843E+07			

$p=0.024 < 0.05$, on conclut qu'il n'y a pas d'homogénéité de variance.

Test de manque d'ajustement du modèle de régression sélectionné pour l'étalonnage.

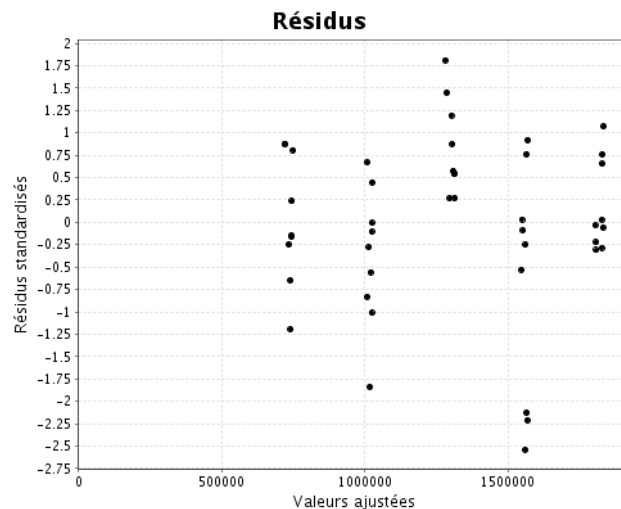
Dans le but de vérifier l'adéquation du modèle de régression de l'étalonnage, un test de manque d'ajustement peut être réalisé en comparant l'erreur d'ajustement à l'erreur expérimentale ou erreur pure. Toutes les données ont été utilisées pour le test de manque d'ajustement.

Tableau XXIII: Test de manque d'ajustement du modèle de régression linéaire sélectionné pour l'étalonnage

Source	SS	df	MS	F calc	Fcrit,95%	p-value
Erreur d'ajustement	1.1290E+09	9.0	1.2544E+08	2.729	2.223	0.01940
Erreur pure	1.3331E+09	29.0	4.5969E+07			

$p=0.0194 < 0.05$, on conclut qu'il n'y a pas d'ajustement.

Résidus Standardisé



La figure 13: graphe des résidus standardisés.

***l'hétérogénéité des résidus.**

Nous avons diagnostiqué qu'il n'y a pas de d'homogénéité de variance et d'ajustement ,avec hétérogénéité des résidus.

La méthode est non valide dans la limite d'acceptation 5%.

Ce diagnostic nous permis en deuxième fois de confirmer les résultats obtenues par la démarche classique.

3.2.3. Validation avec les limites d'acceptation

10% (USP):

a. Analyse de la fonction de réponse et le choix du modèle de régression appropriée avec $\lambda=10\%$ (selon USP) :

cette étape est l'une des plus importantes du fait que la fiabilité des résultats de validation qui seront obtenus, dépend du modèle de régression sélectionné. la fonction de réponse a été évaluée au moyen de trois courbes de calibration (fig. 14) Construites à partir des standards de calibration et utilisant 5 niveau de concentration. ensuite, plusieurs modèles de régression ont été testés au moyen du logiciel de e.noval vue d'analyse la relation entre la concentration de principe actif (mg /ml) et la réponse analytique (aire). le meilleur modèle de calibration qui a été choisi; est celui qui a le meilleur indice d'exactitude avec le meilleur profil d'exactitude (fig. 15) et qui correspond à la droite de régression linéaire passant uniquement par le niveau de concentration le plus élevé et l'origine.

Tableau XXIV: Modèles d'étalonnage triés par 'Indice d'Exactitude' 10%.

Modèles	Indices d'Exactitude	Limite inférieure et supérieure de quantification (mg/ml)	Indices d'Intervalle de Dosage	Indices de Fidélité	Indices de Justesse
Régression linéaire passant par 0 ajustée en utilisant uniquement le niveau 140	0.8536	[0.05323 , 0.08159]	1.000	0.8350	0.7450
Regression quadratique ponderee (1/X^2)	0.8180	[0.05323 , 0.08159]	1.000	0.8927	0.6133
Regression linéaire ponderee (1/X^2)	0.8165	[0.05323 , 0.08159]	1.000	0.8856	0.6147
Regression quadratique ponderee (1/X)	0.8162	[0.05323 , 0.08159]	1.000	0.8836	0.6153
Regression linéaire pondérée (1/X)	0.8160	[0.05323 , 0.08159]	1.000	0.8836	0.6148
Regression linéaire	0.8157	[0.05323 , 0.08159]	1.000	0.8828	0.6148
Regression quadratique	0.8126	[0.05323 , 0.08159]	1.000	0.8704	0.6165
Régression linéaire après transformation racine carrée	0.8102	[0.05323 , 0.08159]	1.000	0.8760	0.6071
Régression linéaire après transformation logarithmique	0.8042	[0.05323 , 0.08159]	1.000	0.8677	0.5995

Les courbes d'étalonnage obtenues pour ce modèle de régression sont représentées par les équations suivantes: $Y = bX$.

Tableau XXV : Paramètres de régression 10%

Series	Pente	r^2	d.d.l. résiduels	SCR
Series 1	1.9084E +07	ND	2	2.0809 E+07
Series 2	1.9179 E+07	ND	2	5.2632 E +07
Series 3	1.8904 E +07	ND	2	2.7414 E +06

où Y = réponse analytique (en aire) et X = concentration introduite (en mg/ml)
 r^2 = coefficient de détermination; d.d.l. = degrés de liberté; SCR = somme des carrés des résidus

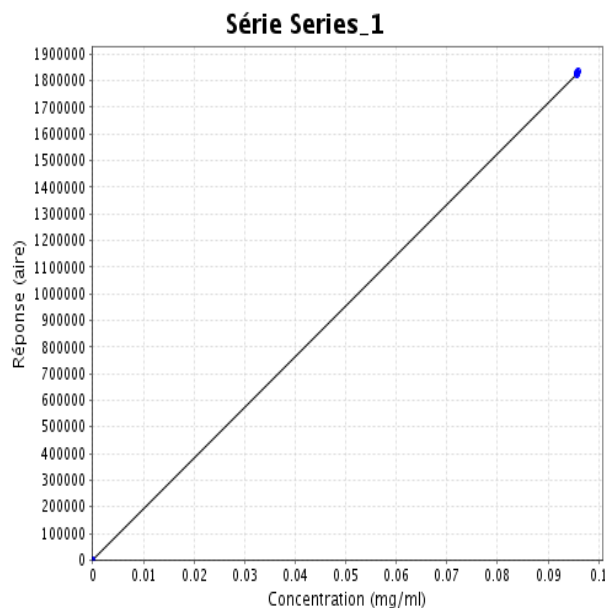


Figure 14: Courbes d'étalonnages Régression linéaire passant par 0 ajustée en utilisant uniquement le niveau 140 .

Voir l'annexe (pour les autres courbes).

b. justesse :

Tableau XXVI: Justesse 10%

Niveau de concentration (mg/ml)	Moyenne des concentrations introduites (mg/ml)	Moyenne des concentrations calculées (mg/ml)	Bbiais absolu (mg/ml)	Biais relatif (%)	Taux de recouvrement (%)	Intervalle de confiance à 90% des Recouvrements (%)
80.0	0.05323	0.05596	0.002722	5.114	105.1	[104.6 , 105.7]
100.0	0.06860	0.07209	0.003494	5.093	105.1	[104.8 , 105.4]
120.0	0.08159	0.08562	0.004032	4.942	104.9	[104.6 , 105.3]

c.fidélité :

La fidélité fournit une indication sur les erreurs dues au hasard. Elle a été estimée en calculant la répétabilité et la fidélité intermédiaire à chaque niveau de concentration utilisé en standards de validation.

Ainsi que le montre le tableau XXVII, les coefficients de variation de répétabilité qui reflète la fidélité intra jour pour chaque niveau de concentration ne dépassent pas 0.69%.pour la fidélité intermédiaire, les coefficients de variation ne dépassent pas 0.718% ce qui montre l'excellente fidélité de la méthode HPLC.

Tableau XXVII: Répétabilité et Fidélité intermédiaire relatives 10%.

Niveau de concentration (mg/ml)	Moyenne des concentrations introduites (mg/ml)	Répétabilité (CV%)¹	Fidélité Intermédiaire (CV%)¹
80.0	0.05323	0.6909	0.7184
100.0	0.06860	0.3044	0.4480
120.0	0.08159	0.1643	0.4793

d. exactitude :

La méthode est considérée comme valide pour l'intervalle de dosage où le profil d'exactitude est compris dans les limites d'acceptation fixées a priori à 10%.

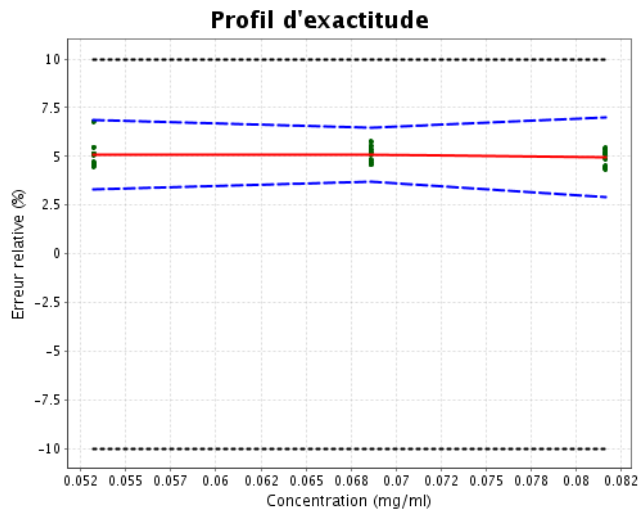


Figure 15: Profil d'exactitude obtenu en considérant le modèle: Régression linéaire passant par 0 Ajustée en utilisant uniquement le niveau le plus haut.

La ligne rouge continue représente le biais, les lignes discontinues bleues définissent les limites de l'intervalle de tolérance attendues au niveau β et les lignes pointillées noires sont les limites d'acceptation. Les points sont quant à eux l'erreur relative des concentrations calculées et sont représentées en fonction de leurs concentrations cibles.

e.linéarité

Un modèle de régression linéaire a été ajusté sur les concentrations calculées en fonction des concentrations introduites dans le but d'obtenir l'équation suivante:

$$Y = 0.0002747 + 1.046 X$$

Où Y = concentrations calculées (mg/ml) et X = concentrations introduites (mg/ml).

Le coefficient de détermination (r^2) est égal à 0.9993.

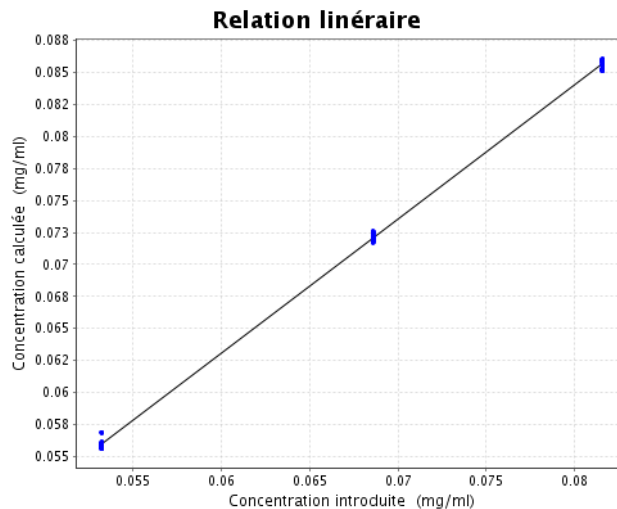


Figure16: Relation entre les concentrations introduites et calculées.

Dans le but de démontrer la linéarité de la méthode, l'approche basée sur l'intervalle de tolérance attendu au niveau β exprimé en valeur absolue peut-être utilisé et est illustré.

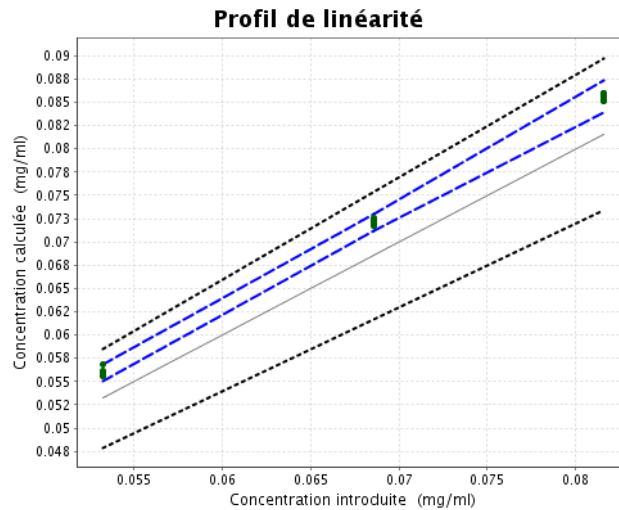


Figure 17: Graphe de linéarité (10%).

La méthode est considérée comme valide là où l'intervalle de tolérance représenté par les lignes discontinues bleues est à l'intérieur des limites d'acceptation définies par les lignes pointillées noires.

La linéarité du modèle est démontrée que les limites de l'intervalle de tolérance exprimées en absolu sont incluses dans les limites d'acceptation, donc la méthode est validée.

f. limites de détection et de quantification :

$$\mathbf{LD \text{ (mg/ml)} = 0.0004980}$$

$$\mathbf{\text{Limite inférieure de quantification (LQ}_{\text{Inf}}) \text{ (mg/ml)} = 0.05323}$$

$$\mathbf{\text{Limite supérieure de quantification (LQ}_{\text{Sup}}) \text{ (mg/ml)} = 0.08159}$$

On conclut que la méthode est validée (dans les limites d'acceptation 10%) selon USP.

3. 3 Conclusion:

La validation de méthode selon ICH94-SFSTP92 a permis de conclure que celle –ci n'est pas exacte (le 100% du recouvrement n'est pas compris dans l'intervalle de confiance) et n'est pas fidèle .Le biais et l'écart type ont été étudiés séparément donc la méthode peut être jugée non valide.

Le choix de la validation selon la nouvelle démarche SFSTP 2003, basée sur le profil d'exactitude qui prend en compte, de façon associée, l'erreur totale : le biais +l'écart type.

Cette nouvelle démarche nous a permis de donner des résultats immédiatement en commençant par la décision la limite d'acceptation .Dans notre travail nous avons traité les résultats avec deux limites d'acceptation 5%(pharmacopée européenne) et 10%(USP).

A partir des deux résultats on constate que si la méthode est validée le modèles d'étalonnage triés par 'Indice d'Exactitude' montre immédiatement la fiabilité de résultat par exemple dans la limite d'acceptation 5% toutes les indice sont nuls et la limite inférieure et supérieure de quantification (mg/ml) sont non détecté (ND) .

Pour $\lambda=10\%$, L'explication des indices d'Exactitude, d'Intervalle de Dosage sont proche de l'unité et la Fidélité sont donnée les limites d'acceptation. et la Limite inférieure et supérieure de quantification (mg/ml) sont quantifié(D) .

le diagnostic statistique nous a permis de confirmer que les premiers résultats sont non valide ($\lambda=5\%$), étant donné qu'il n'y a pas d'homogénéité de variance, ni d'ajustement, avec une hétérogénéité des résidus.

Normalement vu le diagnostic, il est conseillé d'optimiser la méthode de dosage d'amlodipine besilate et de chercher des paramètres qu'ont un impact sur la fidélité et l'exactitude de la méthode, par l'usage de la méthodologie des plans d'expérience.

*CONCLUSION
GENERALE*



CONCLUSION GENERALE

Les résultats issus des méthodes analytiques ont un rôle essentiel dans de nombreux domaines suite aux décisions qui sont prises sur leur base telles que la détermination de la qualité des principes actifs, des spécialités pharmaceutiques, des nutriments ou autres échantillons tels que ceux d'origine biologique impliqués dans les études pharmacocinétiques ou de biodisponibilité et bioéquivalence. La fiabilité des résultats analytiques est primordiale dans ce contexte, et surtout ils doivent être en accord avec les besoins des utilisateurs finaux. Pour s'assurer de la fiabilité des résultats qui seront fournis lors des analyses de routine, la validation des méthodes analytiques est un élément crucial du cycle de vie d'une méthode analytique.

Cette nouvelle approche pour évaluer la validité des méthodes analytiques quantitatives a été proposée et détaillée d'un point de vue statistique. Elle se base sur l'utilisation d'une méthodologie statistique utilisant un intervalle de tolérance de type « β expectation tolérance intervalle » qui a été transposée en un outil de décision final appelé profil d'exactitude.

Ce profil permet de garantir qu'une proportion définie des futurs résultats qui seront fournis par la méthode lors de son utilisation en routine, sera bien incluse dans des limites d'acceptation fixées a priori en fonction des besoins des utilisateurs. De cette manière, l'objectif de la validation est parfaitement cohérent avec celui de toute méthode quantitative : obtenir des résultats exacts.

Les résultats expérimentaux montrent que les conditions décrites par ICH 94-SFSTP 92 n'ont pas satisfait les exigences, et nous avons pu montrer que la

méthode non validé, cela nous a incité à appliquer la nouvelle approche SFSTP 2003 pour la validation de la méthode HPLC.

Cette approche montre aussi que la méthode n'est pas validée ce qui est confirmé par les résultats précédentes, l'étape de diagnostic va nous démontrer les raisons de la non-conformité de ses résultats, Normalement vu le diagnostic, il est conseillé d'optimiser la méthode de dosage d'amlodipine besilate et de chercher des paramètres qu'ont un impact sur la fidélité et l'exactitude de la méthode, par l'usage de la méthodologie des plans d'expérience

RESUME



Résumé

La validation des méthodes figurent parmi les mesures universellement reconnues comme étant une partie indispensable d'un système exhaustif d'assurance qualité dans le domaine de l'industrie pharmaceutique.

Valider une méthode d'analyse consiste à apporter la preuve qu'elle est adaptée aux objectifs que l'on s'est fixé. Il ne suffit donc pas de calculer quelques critères de validation, tels que la répétabilité ou la justesse, il faut aussi interpréter les valeurs trouvées pour déboucher sur une conclusion claire et sans ambiguïté.

A travers ce travail, nous avons effectuée une étude comparative entre La validation de méthode classique ICH94-SFSTP92 et la nouvelle approche SFSTP 2003 ,pour la validation de la méthode HPLC d'amlodipine besilate dans une spécialité pharmaceutique.

D'après la nouvelle approche le profil d'exactitude est un outil de décision basée sur le risque associé,(l'erreur totale : le biais +l'écart type) à la méthode.

La notion de risque est liée à la garantie concernant la future analyse des échantillons inconnus tout en appliquant la méthode validée. Par conséquent, le profil d'exactitude peut servir à accepter ou rejeter une méthode analytique suivant l'usage attendu. Par ailleurs, le profil peut également être utilisé comme outil de diagnostique. Par exemple, il peut être utilisé pour sélectionner le modèle de régression le plus approprié pour la calibration et pour déterminer les limites de quantification supérieure et inférieure et à sélectionner ainsi que L'intervalle de dosage.

Cet étude consiste en une présentation détaillée des aspects expérimentaux pour une collecte optimisée des données, des méthodes

statistiques nécessaires à leur traitement et interprétation, avec les procédures classiques de validation, de la méthode du profil d'exactitude, où il est démontré avec cet étude à l'appui, que cette méthode n'est pas seulement un outil de décision mais aussi un outil de diagnostic révélant les défauts de la méthode, comme un problème de justesse ou une inadaptation aux objectifs recherchés.

Normalement vu le diagnostic, il est conseillé d'optimiser la méthode de dosage d'amlodipine besilate et de chercher des paramètres qu'ont un impact sur la fidélité et l'exactitude de la méthode, par l'usage de la méthodologie des plans d'expérience.

Abstract

The validation of the methods appears among the measures universally recognized as being an indispensable part of an exhaustive system of quality assurance in the field of the pharmaceutical industry.

To validate a method of analysis consists in bringing the proof that it is adapted to the objectives that we settled. It is not thus enough to calculate some criteria of validation, such as the repeatability or the correctness, it is also necessary to interpret the values found to result in a clear conclusion and without ambiguity.

Through this work, we made a comparative study between the validation of classic method ICH94-SFSTP92 and the new approach SFSTP on 2003 for the validation of the method HPLC of a principle activates in a pharmaceutical speciality..

According to the new approach the profile of exactness is a tool of decision based on the risk associated with the method.

The notion of risk is connected to the guarantee concerning the future analysis of the unknown samples while applying the validated method. Consequently, the profile of exactness can serve to accept or to throw to reject an analytical method following the expected custom. Besides, the profile can be also used as tool of diagnostic. For example, he can be used to select the model of regression the most suited for the calibration and to determine the limits of superior and lower quantification and to select so that The interval of dosage.

This study consists of a detailed display of the experimental aspects for a collection optimized by the data, the statistical methods necessary for their treatment and interpretation, with the classic procedures of validation, of the method of the accury profile , where he is demonstrated with this study to the support, where this method is not only a tool of decision but also a tool of diagnosis revealing the defects of the method, as a problem just or a maladjustment in the popular objectives.

Finally seen the diagnosis, preferably to re-optimize the assay method and look for parameters which influence (the chromatographic conditions: PH, mobile phase) by the usage of the methodology of the plans of experiment.

ملخص

أساليب التحقق هي من بين التدابير المعترف بها عالميا بوصفها جزءا لا يتجزأ من نظام شامل لضمان الجودة في صناعة الأدوية التحقق من صحة الطريقة التحليلية هو أن تثبت أنها هي المناسبة لتحقيق الأهداف التي وضعناها. فإنه لا يكفي لحساب بعض معايير التحقق من صحة مثل دقة أو التكرار ، يجب علينا أيضا أن تفسر القيم وجدت أن تؤدي إلى نتيجة واضحة لا لبس فيها .

في ظل النهج الجديد لمحة دقة هو أداة قرار بناء على المخاطر المرتبطة الأسلوب مفهوم المخاطر المتصلة ضمان المستقبل لتحليل عينات غير معروفة أثناء تطبيق التحقق من صحة الأسلوب. ولذلك، يمكن استخدام دقة النمط يكون في قبول أو رفض هذا الأسلوب التحليلي .

من خلال هذا العمل، اجرينا مقارنة دراسية ما بين المصادقة التحليلية التقليدية(التي نص عليها المؤتمر العالمي للتلاؤم في سنة ١٩٩٤- والجمعية الفرنسية للعلوم التقنية الصيدلانية للسنة ١٩٩٢ (م.ع.ت.٩٣ - ج.ف.ع.ت.ص.٩٢ ونهج جديد) للجمعية الفرنسية للعلوم التقنية الصيدلانية للسنة (٢٠٠٣)ج.ف.ع.ت.ص.٢٠٠٣ من أجل المصادقة على صحة الطريقة الكروماتوغرافي السائل عالية الأداء .

وعلاوة على ذلك ، يمكن أن تستخدم أيضا لمحة كأداة تشخيصية. على سبيل المثال، فإنه يمكن استخدامها لتحديد نموذج الانحدار هو الأكثر ملائمة لمعايرة وتحديد حدود الكمي أعلى وأسفل وتحديد مجال المعايرة. هذه الدراسة عرضا مفصلا الجوانب تجريبية لتحسين جمع البيانات ، الأساليب الإحصائية لمعالجة وتفسير للإجراءات التقليدية للمصادقة عليه ، وطريقة دقة الوضع ، مع أنها أثبتت هذه الدراسة إلى أن دعم هذه الطريقة ليست سوى أداة لاتخاذ قرار ولكن أيضا أداة تشخيصية للكشف عن عيوب في طريقة باعتبارها مشكلة كفاية أو عدم كفاية إلى الأهداف المنشودة.

أخير حسب التشخيص ،يفضل إعادة الأمتل للمعلومات البحث التي تؤثر على صحة النتائج (شروط الكروماتوغرافي : الرقم الهيدروجيني، متنقلة المرحلة....) من خلال استخدام منهجية تصاميم تجريبية



REFERENCE

- 1-Code of Federal Regulations – Parts 210 and 211, FDA, <http://www.fda.gov/cder/dmpq/cgmpregs.htm>, 2 janvier 2004.
- 2- la réglementation des médicaments dans l'union européenne vol.4bonne pratique de fabrication .médicament à usage humains et médicament vétérinaire édition1998.
- 3- NF EN ISO 17025 (2005) Prescriptions générales concernant la compétence des laboratoires d'étalonnage et d'essais, ISO, Genève.
- 4-R. GNASSOU, La validation des procédés de nettoyage dans l'industrie pharmaceutique : Méthodologie et application. Th D Pharm, Toulouse 3 ; 2003.
- 5-Validation of compendial assays - Guidelines, Pharmacopeial Forum, The United States Pharmacopeia Inc., Rockville, MD, USA, p. 4129, 1986.
- 6-United States Pharmacopeia XXVI, general information <1225>, Validation of compendial methods, The United States Pharmacopeia Inc., Rockville, MD,USA, p. 2439-2442, 2003.
- 7-Commission des communautés européennes, Groupe de travail du comité des spécialités pharmaceutiques, note explicative III/844/87-FR, final, Août 1989.
- 8-Ph. Hubert, P. Chiap, J. Crommen, B. Boulanger, E. Chapuzet, N. Mercier, S. Bervoas-Martin, P. Chevalier, D. Grandjean, P. Lagorce, M. Lallier, M.C. Laparra, M. Laurentie, J.C. Nivet, The SFSTP guide on the validation of chromatographic methods for drug bioanalysis : from the Washington Conference to the laboratory, Anal. Chim. Acta, 391, 135-148 (1999).
- 9-J. Caporal-Gautier, J.M. Nivet, P. Algranti, M. Guilloteau, M. Histe, M. Lallier, J.J. N'guyen-Huu, R. Russoto, Guide de validation analytique : Rapport d'une commission SFSTP, STP Pharma Prat., 2, 205-226 (1992).
- 10-ISO 5725- 1, Application de la statistique-exactitude (justesse et fidélité) des résultats et méthodes de mesure- Partie 1 :Principes généraux et définition.
- 11-ISO 5725-2, Application de la statistique - Exactitude (justesse et fidélité) des résultats et méthodes de mesure - Partie 2 : Méthodes de base pour la détermination de la répétabilité et de la reproductibilité d'une méthode de mesure normalisée.

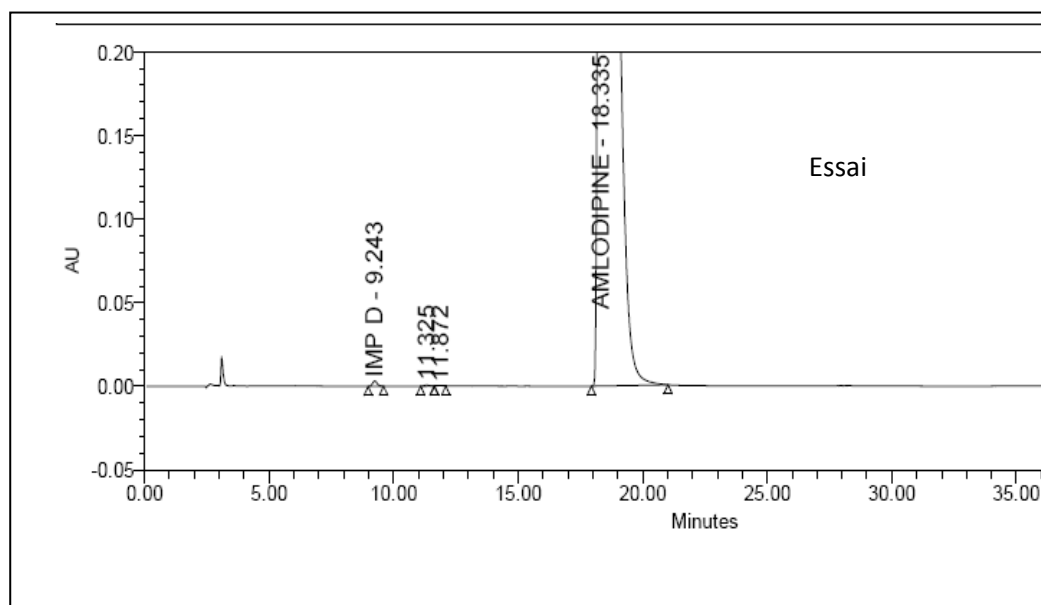
- 12- ISO 5725-3, Application de la statistique - Exactitude (justesse et fidélité) des résultats et méthodes de mesure - Partie 3 : Mesures intermédiaires de la Fidélité d'une méthode de mesure normalisée.
- 13- ISO 5725-4, Application de la statistique - Exactitude (justesse et fidélité) des résultats et méthodes de mesure - Partie 2 : Méthodes de base pour la détermination de la justesse d'une méthode de mesure normalisée.
- 14-ISO 5725-6, Application de la statistique - Exactitude (justesse et fidélité) des résultats et méthodes de mesure - Partie 6 : Utilisation dans la pratique des valeurs d'exactitude.
- 15- Food and Drug Administration: International Conference on Harmonization: Guideline on validation of analytical procedures: definitions and terminology, Fed. Regist. 60, 11260-11262 (1995).
- 16- Guidance for Industry: Bioanalytical Methods Validation for Human Studies (Draft guidance), U.S. Department of Health and Human Services, Food and Drug Administration, Center for Drug Evaluation and Research (CDER), Décembre 1998.
- 17-Guidance for Industry : Bioanalytical Methods Validation for Human Studies (Draft guidance), U.S. Department of Health and Human Services, Food and Drug Administration, Center for Drug Evaluation and Research (CDER), Décembre 1998.
- 18-B. Boulanger, Ph. Hubert, P. Chiap, W. Dewé. Objectives of pre-study validation and decision rules. AAPS APQ Open forum, Washington (2000).
- 19- J. Caporal-Gautier, J.M. Nivet, P. Algranti, M. Guilloteau, M. Histe, M. Lallier, J.J. N'guyen-Huu, R. Russoto, Guide de validation analytique : Rapport d'une commission SFSTP, STP Pharma Prat., 2, 205-226 (1992).
- 20- E. Chapuzet, N. Mercier, S. Bervoas-Martin, B. Boulanger, P. Chevalier, P. Chiap, D. Grandjean, Ph. Hubert, P. Lagorce, M. Lallier, M.C. Laparra, M. Laurentie, J.C. Nivet, Méthodes chromatographiques de dosage dans les milieux biologiques : stratégie de validation. Rapport d'une commission SFSTP, STP Pharma Prat., 7, 169-194 (1997).
- 21-P.Hubert et all, Validation des procédures analytiques quantitatives. Harmonisation des démarches, *STP Pharma Pratiques*, 2003, 13, May-June 101-138.

- 22-A. Bouklouze, K. Digua, démarche statistique de la validation analytique dans le domaine pharmaceutique (Méthodologie et exemple pratique), Les technologies de laboratoire 2006.
- 23-A. Bouklouze, Y. Cherrah, validation des procédures analytiques selon la nouvelle approche basée sur l'erreur total (profil d'exactitude), les technologies de laboratoires – N° 14 Mars-Avril 2009.
- 24-J-P. Giraud, C. Hagece, le guide GIRAUD-HAGECE de tous les médicaments, édition 2001-350.
- 25- M. Talbert, G. Willoquet, Guide pharmaco ; édition 2006, 341-344.
- 26-Monographie ; bésilate amlodipine, PFIZER CANADA INC. 17300, autoroute Transcanadienne Kirkland (Québec) H9J 2M5 NUMÉRO DE CONTRÔLE : 064478 DATE DE RÉDACTION : le 23 juin 1992 DATE DE RÉVISION : le 8 juin 2005

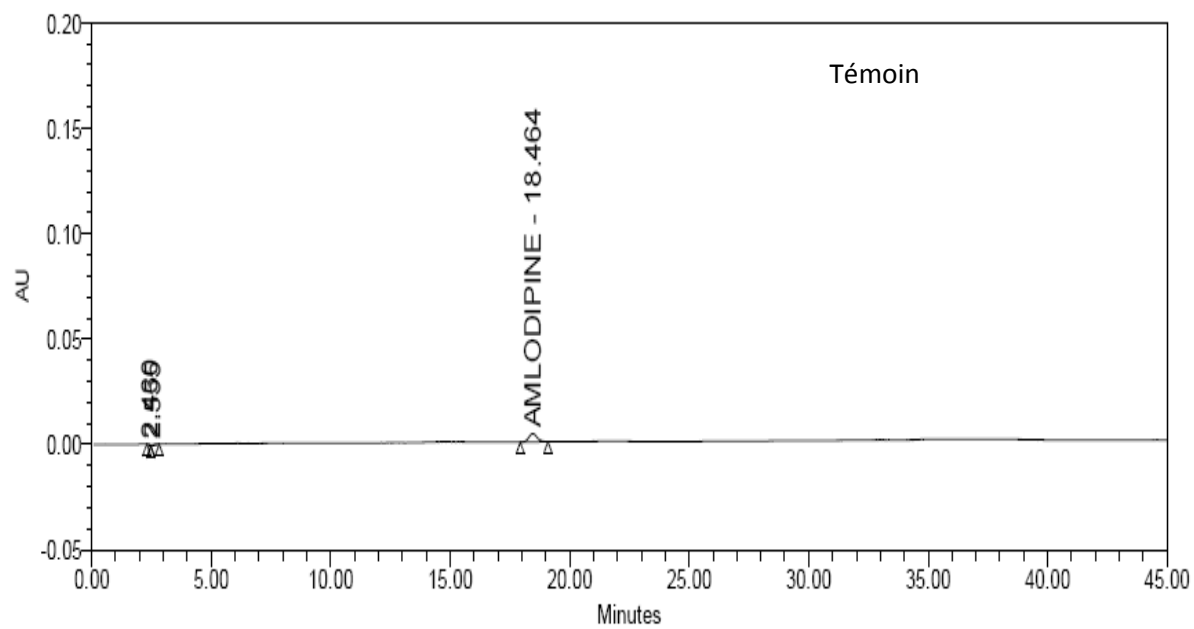
ANNEXES



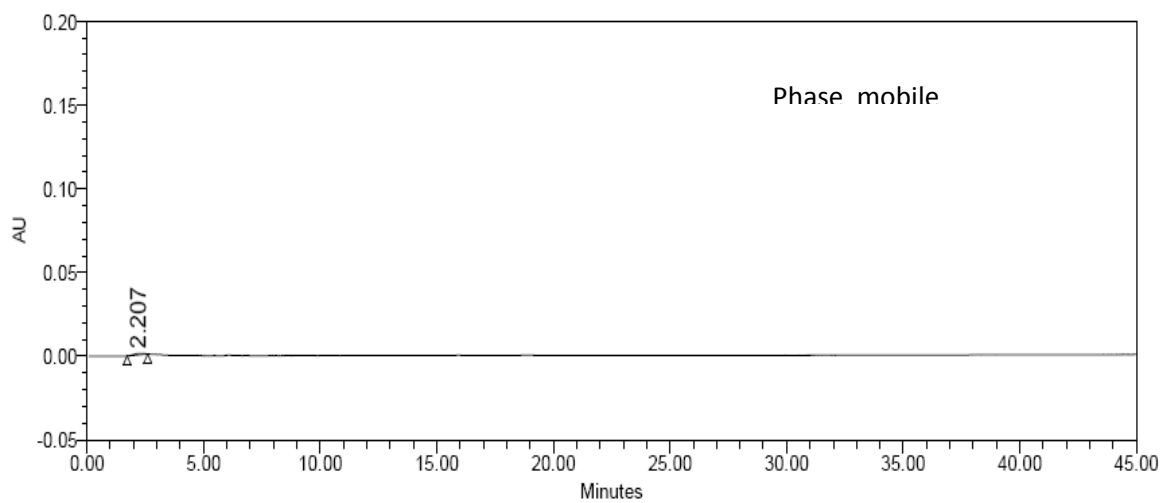
a)



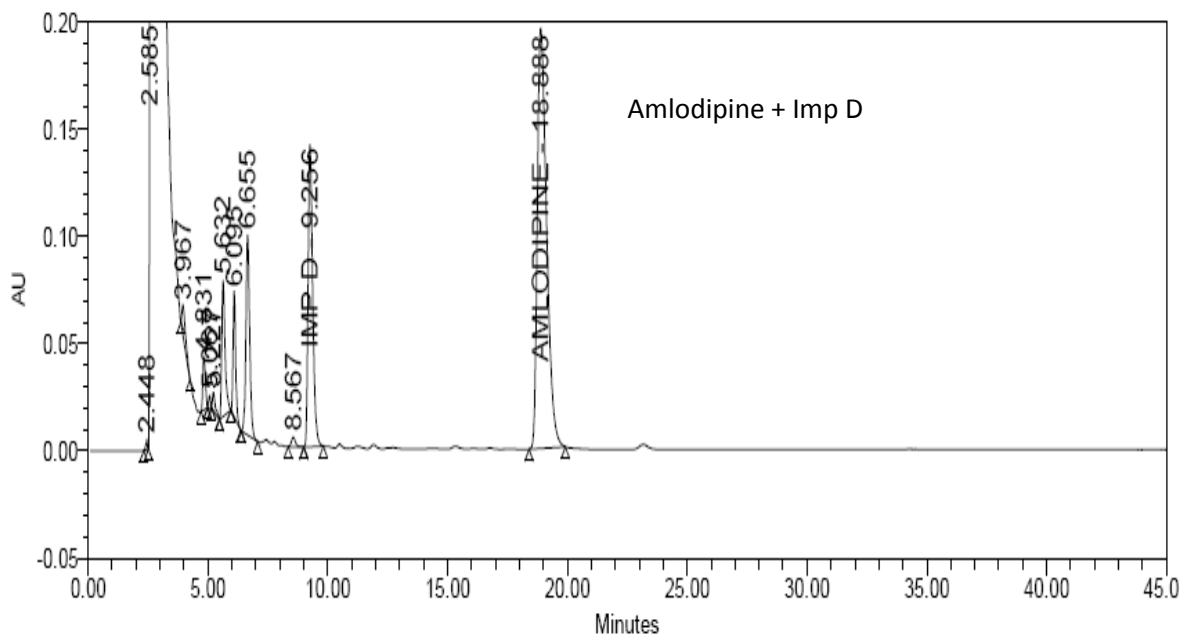
b)



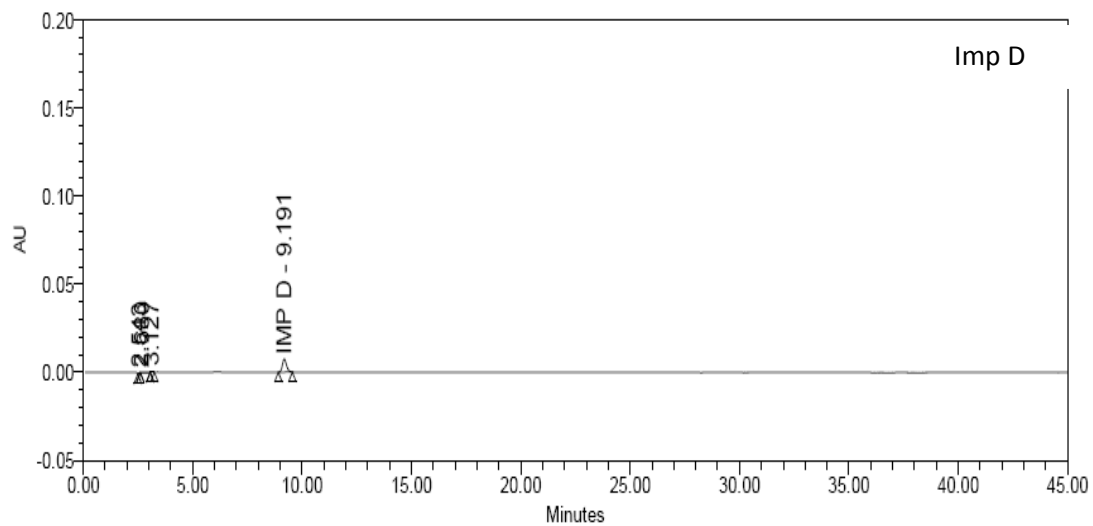
c)



d)



e)



f)

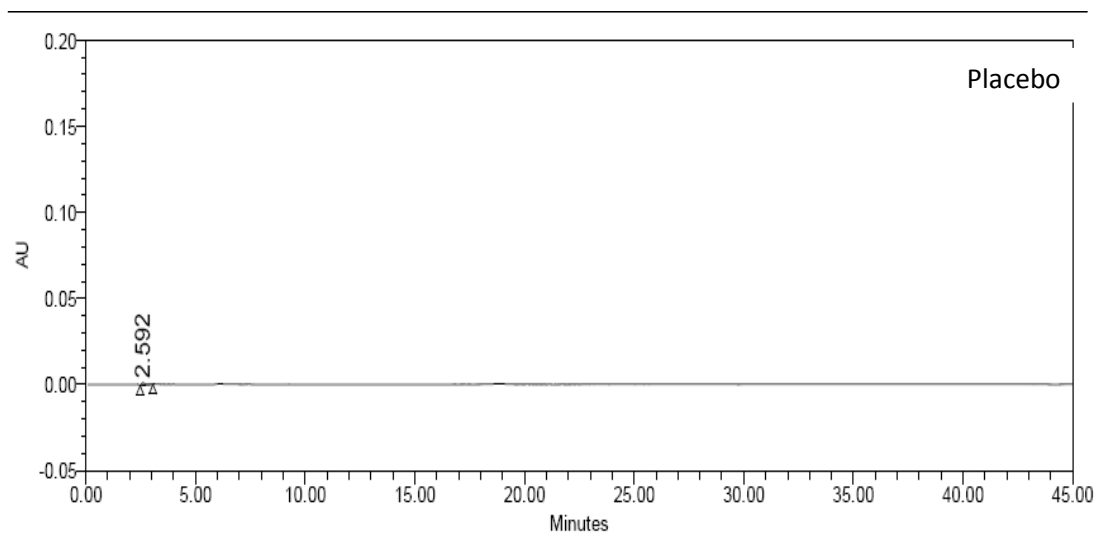


Figure A— a : Chromatogrammes de l'essai
b : Chromatogrammes principe actif.
c : Chromatogrammes de la phase mobile
d : Chromatogrammes de l'principe actif et les impuretés.
e : Chromatogrammes de l'impureté
f : Chromatogrammes de placebo.

Donnée de la nouvelle démarche SFSTP (2003)

Standards d'étalonnage

Tableau 0:1. Standards d'étalonnage

Référence échantillon	Série	Niveau de concentration (mg/ml)	Concentration introduite (mg/ml)	Réponse (aire)
Calib01	Series_1	60.0	0.0408	754658
Calib02	Series_1	60.0	0.04	731880
Calib03	Series_1	60.0	0.0403	735061
Calib04	Series_1	80.0	0.0548	1016846
Calib05	Series_1	80.0	0.054	1012467
Calib06	Series_1	80.0	0.0546	1015985
Calib07	Series_1	100.0	0.069	1310034
Calib08	Series_1	100.0	0.06948	1315061
Calib09	Series_1	100.0	0.0692	1311797
Calib10	Series_1	120.0	0.08224	1559832
Calib11	Series_1	120.0	0.0824	1569776
Calib12	Series_1	120.0	0.0822	1543640
Calib13	Series_1	140.0	0.095821	1825815
Calib14	Series_1	140.0	0.09582	1827910
Calib15	Series_1	140.0	0.0959	1833658
Calib16	Series_2	60.0	0.04072	746028
Calib17	Series_2	60.0	0.04066	741365
Calib18	Series_2	60.0	0.0406	740271
Calib19	Series_2	80.0	0.05488	1022799
Calib20	Series_2	80.0	0.0549	1024046
Calib21	Series_2	80.0	0.05497	1029409
Calib22	Series_2	100.0	0.0693	1313680
Calib23	Series_2	100.0	0.06942	1315715
Calib24	Series_2	100.0	0.0696	1316923
Calib25	Series_2	120.0	0.08248	1577049
Calib26	Series_2	120.0	0.0824	1548025
Calib27	Series_2	120.0	0.0823	1546786
Calib28	Series_2	140.0	0.0958	1831653
Calib29	Series_2	140.0	0.0957	1836832
Calib30	Series_2	140.0	0.0959	1843536
Calib31	Series_3	60.0	0.039	726646

Tableau 0:1. Standards d'étalonnage

Référence échantillon	Série	Niveau de concentration (mg/ml)	Concentration introduite (mg/ml)	Réponse (aire)
Calib32	Series_3	60.0	0.0401	730150
Calib33	Series_3	60.0	0.039	726646
Calib34	Series_3	80.0	0.054	1000864
Calib35	Series_3	80.0	0.0545	1001885
Calib36	Series_3	80.0	0.0543	1011343
Calib37	Series_3	100.0	0.0682	1296793
Calib38	Series_3	100.0	0.069	1299030
Calib39	Series_3	100.0	0.06842	1297916
Calib40	Series_3	120.0	0.0821	1549232
Calib41	Series_3	120.0	0.082	1542517
Calib42	Series_3	120.0	0.0823	1552051
Calib43	Series_3	140.0	0.0956	1806214
Calib44	Series_3	140.0	0.0954	1804725
Calib45	Series_3	140.0	0.09555	1805999

La matrice est : none.

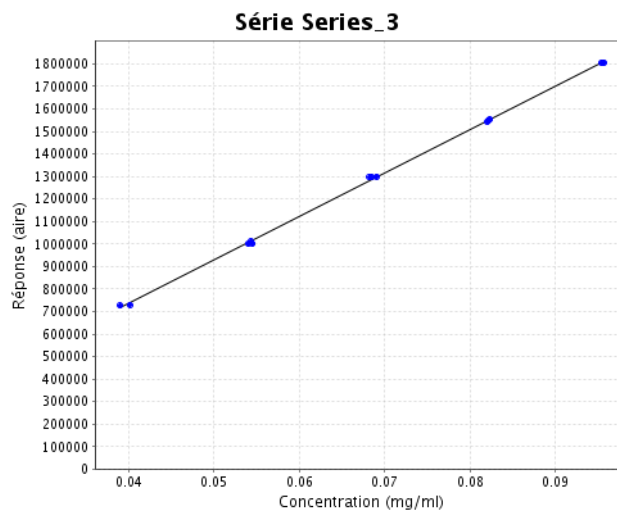
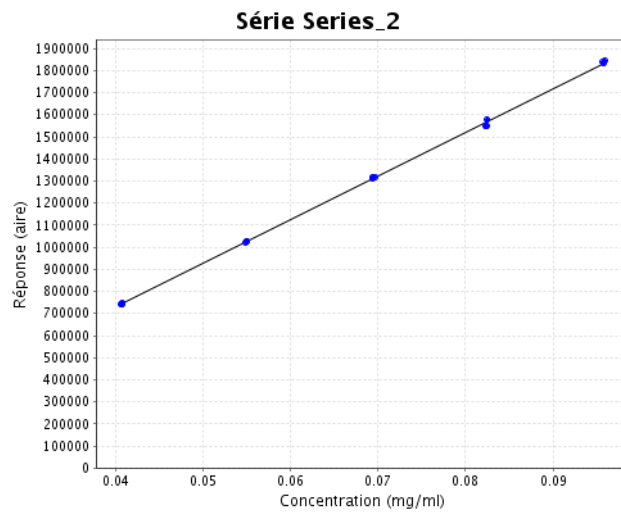
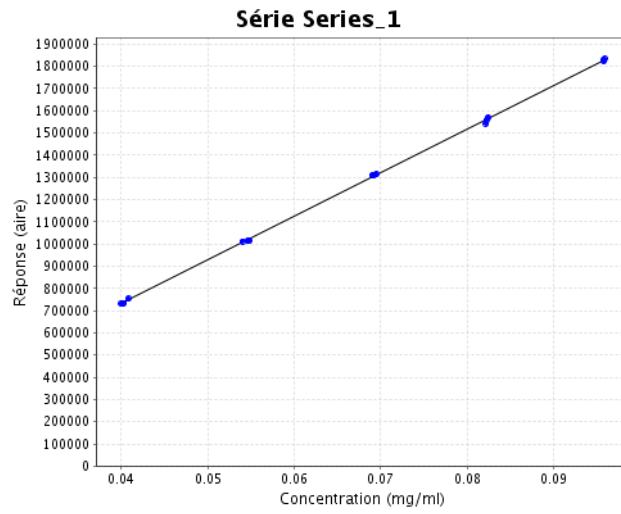
Standards de Validation

Tableau 0:2. Standards de Validation

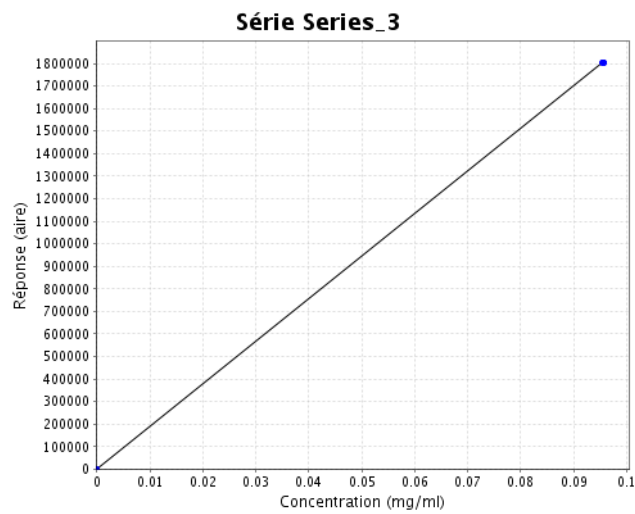
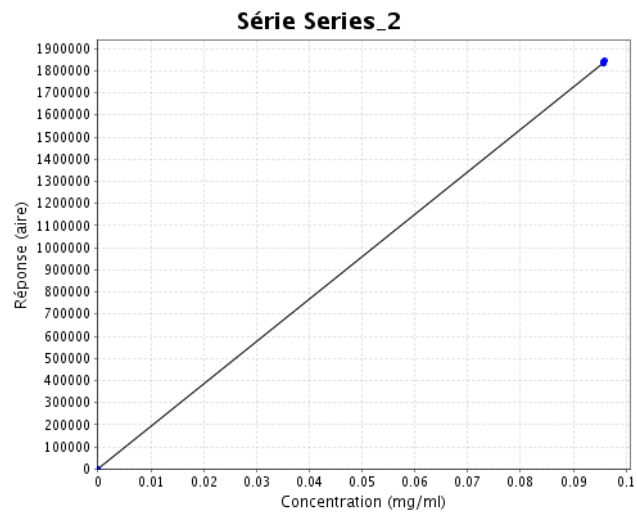
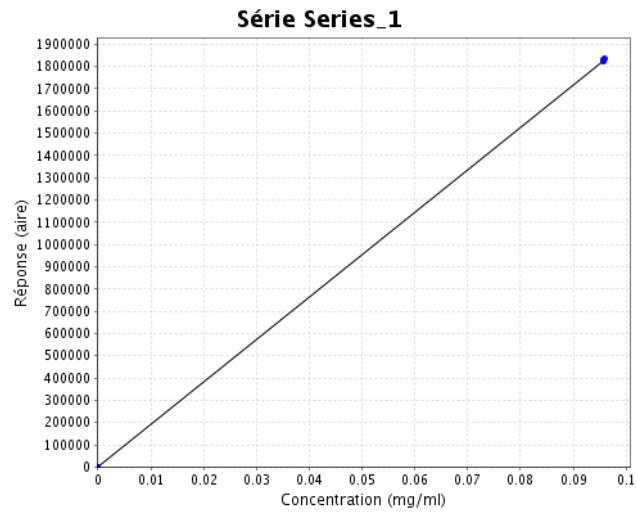
Référence échantillon	Série	Niveau de concentration (mg/ml)	Concentration introduite (mg/ml)	Réponse (aire)
VAL01	Series_1	80.0	0.0527	1057352
VAL02	Series_1	80.0	0.0532	1067365
VAL03	Series_1	80.0	0.0533	1072636
VAL04	Series_1	100.0	0.0687	1379476
VAL05	Series_1	100.0	0.0687	1377797
VAL06	Series_1	100.0	0.0684	1378010
VAL07	Series_1	120.0	0.0813	1631179
VAL08	Series_1	120.0	0.0816	1640787
VAL09	Series_1	120.0	0.0814	1638255
VAL10	Series_2	80.0	0.0526	1054619
VAL11	Series_2	80.0	0.053	1064711
VAL12	Series_2	80.0	0.0529	1062162
VAL13	Series_2	100.0	0.0681	1367778
VAL14	Series_2	100.0	0.0683	1370298
VAL15	Series_2	100.0	0.0682	1369974

Tableau 0:2. Standards de Validation

Référence échantillon	Série	Niveau de concentration (mg/ml)	Concentration introduite (mg/ml)	Réponse (aire)
VAL16	Series_2	120.0	0.0809	1622403
VAL17	Series_2	120.0	0.0815	1630884
VAL18	Series_2	120.0	0.0812	1626490
VAL19	Series_3	80.0	0.0536	1058950
VAL20	Series_3	80.0	0.054	1089271
VAL21	Series_3	80.0	0.0538	1068720
VAL22	Series_3	100.0	0.0685	1369630
VAL23	Series_3	100.0	0.0689	1372259
VAL24	Series_3	100.0	0.0696	1378349
VAL25	Series_3	120.0	0.0821	1627005
VAL26	Series_3	120.0	0.0821	1633060
VAL27	Series_3	120.0	0.0822	1633428



Les Courbes d'étalonnages ($\lambda=5\%$)

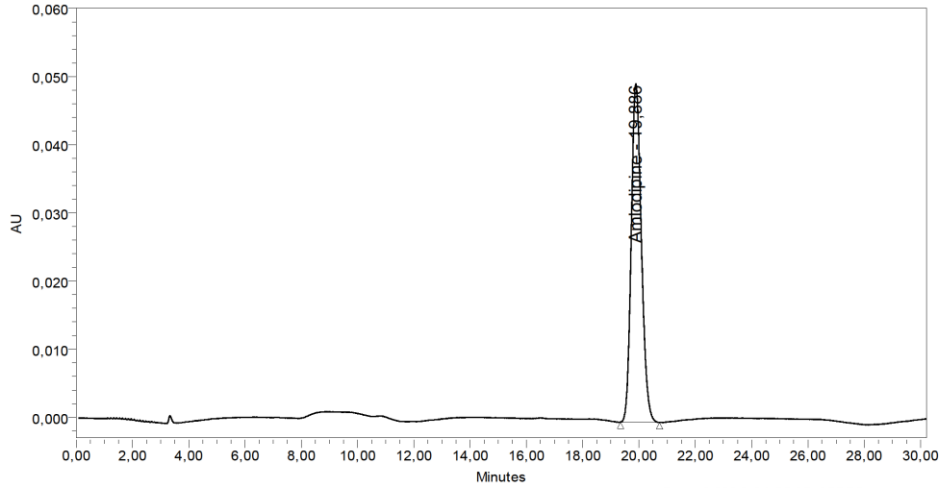


Les Courbes d'étalonnages ($\lambda=10\%$)

*Exemples des chromatogrammes
de fidélité*

SAMPLE INFORMATION

Sample Name:	AMLODIPINE 5 MG FIDELITE J1 E1	Acquired By:	System
Sample Type:	Unknown	Sample Set Name:	FIDELITE J1 AMLOD
Vial:	4	Acq. Method Set:	Amlodipine cp dosage PDA
Injection #:	2	Processing Method:	Amlodipine dosage
Injection Volume:	10,00 ul	Channel Name:	237.0nm
Run Time:	30,0 Minutes	Proc. Chnl. Descr.:	PDA 237,0 nm
Date Acquired:	01/10/2009 00:02:20 WET		
Date Processed:	05/11/2009 09:06:55 WET		



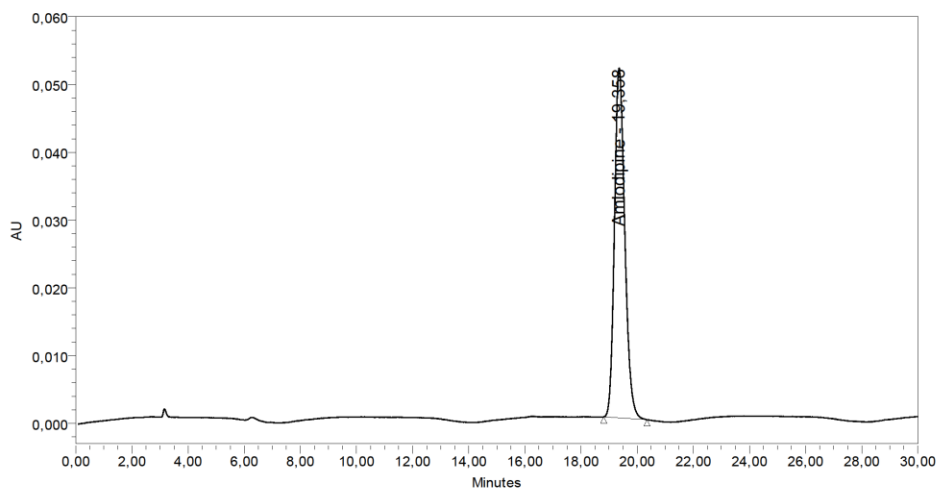
SampleWeight 2010,10000

Dilution 147,46680

Peak Name	RT	Area	% Area	Height	Amount
1 Amlodipine	19,886	1249826	100,00	49658	4,906

SAMPLE INFORMATION

Sample Name:	AMLODIPINE 5 MG FIDELITE J2 E1	Acquired By:	System
Sample Type:	Unknown	Sample Set Name:	FIDELITE J2 AMLOD
Vial:	4	Acq. Method Set:	Amlodipine cp dosage PDA
Injection #:	2	Processing Method:	Amlodipine dosage
Injection Volume:	10,00 ul	Channel Name:	237.0nm
Run Time:	30,0 Minutes	Proc. Chnl. Descr.:	PDA 237,0 nm
Date Acquired:	02/10/2009 00:58:02 WET		
Date Processed:	05/11/2009 17:07:12 WET		



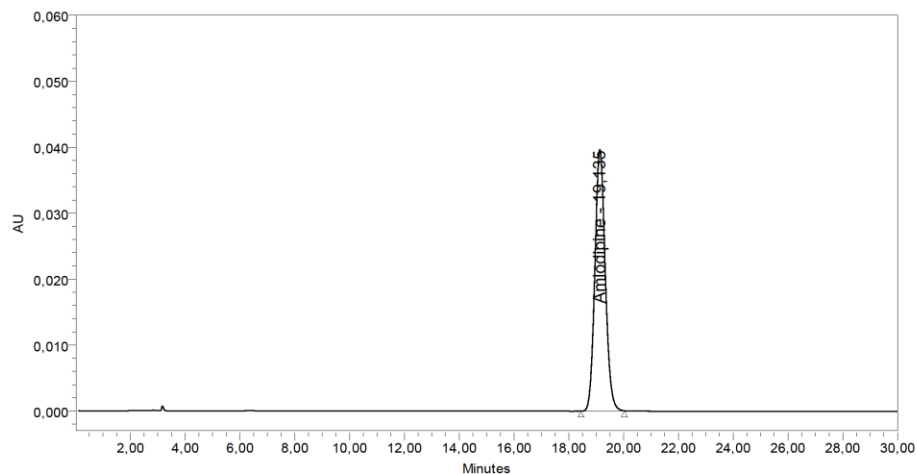
SampleWeight 2012,00000

Dilution 146,61000

	Peak Name	RT	Area	% Area	Height	Amount
1	Amlodipine	19,358	1320914	100,00	51618	5,029

SAMPLE INFORMATION

Sample Name:	STANDARD2	Acquired By:	System
Sample Type:	Standard	Sample Set Name:	Amlodipine unif teneur
Vial:	3	Acq. Method Set:	Amlodipine cp HPLC 5
Injection #:	2	Processing Method:	Amlodipine dosage
Injection Volume:	10,00 ul	Channel Name:	2487Channel 1
Run Time:	30,0 Minutes	Proc. Chnl. Descr.:	
Date Acquired:	15/10/2009 23:39:51 WET		
Date Processed:	09/11/2009 08:54:32 WET		



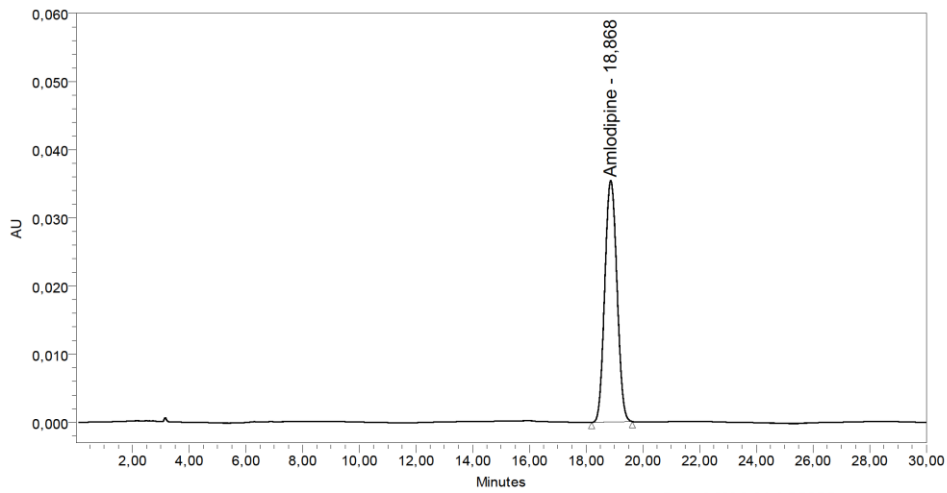
SampleWeight 1,00000
Dilution 1,00000

Peak Name	RT	Area	% Area	Height	Amount	Units
1 Amlodipine	19,135	1038311	100,00	39658	52,800	MG

Exemples des chromatogrammes
De standard de validation

SAMPLE INFORMATION

Sample Name:	Standard Validation 80%-1	Acquired By:	System
Sample Type:	Unknown	Sample Set Name:	STD VAL harmonisation_1
Vial:	4	Acq. Method Set:	Amlodipine cp HPLC 5
Injection #:	1	Processing Method:	Amlodipine dosage
Injection Volume:	10,00 ul	Channel Name:	2487Channel 1
Run Time:	30,0 Minutes	Proc. Chnl. Descr.:	
Date Acquired:	22/10/2009 23:16:41 WET		
Date Processed:	23/10/2009 09:18:01 WET		

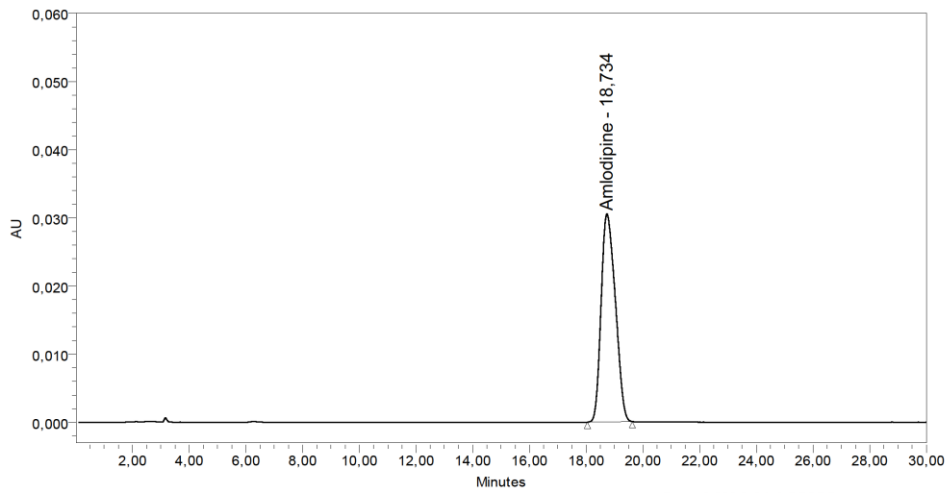


SampleWeight 1,00000
Dilution 1,00000

	Peak Name	RT	Area	% Area	Height	Amount	Units
1	Amlodipine	18,868	1057352	100,00	35467	52,591	MG

SAMPLE INFORMATION

Sample Name:	Standard Validation 80%-3	Acquired By:	System
Sample Type:	Unknown	Sample Set Name:	STD VAL harmonisation_2
Vial:	6	Acq. Method Set:	Amlodipine cp HPLC 5
Injection #:	1	Processing Method:	Amlodipine dosage
Injection Volume:	10,00 ul	Channel Name:	2487Channel 1
Run Time:	30,0 Minutes	Proc. Chnl. Descr.:	
Date Acquired:	23/10/2009 19:13:48 WET		
Date Processed:	26/10/2009 10:21:13 WET		



SampleWeight 1,00000

Dilution 1,00000

	Peak Name	RT	Area	% Area	Height	Amount	Units
1	Amlodipine	18,734	1062162	100,00	30535	52,774	MG

Serment de Galien

Je jure en présence des maîtres de cette faculté :

- *D'honorer ceux qui m'ont instruit dans les préceptes de mon art et de leur témoigner ma reconnaissance en restant fidèle à leur enseignement.*
- *D'exercer ma profession avec conscience, dans l'intérêt de la santé public, sans jamais oublier ma responsabilité et mes devoirs envers le malade et sa dignité humain.*
- *D'être fidèle dans l'exercice de la pharmacie à législation en vigueur aux règles de l'honneur, de la probité et du désintéressement.*
- *De ne pas dévoiler à personne les secrets qui m'auraient été confiés ou dont j'aurais eu connaissance dans l'exercice de ma profession, de ne jamais consentir à utiliser mes connaissances et mon état pour corrompre les mœurs et favoriser les actes criminels.*
- *Que les hommes m'accordent leur estime si je suis fidèle à mes promesses, que je sois méprisé de mes confrères si je manquais à mes engagements.*



جامعة محمد الخامس
كلية الطب والصيدلة
- الرباط -

قسم الصيدلي

بسم الله الرحمن الرحيم

وأقسم بالله العظيم

- أن أراقب الله في مهنتي
- أن أبجل أساتذتي الذين تعلمت على أيديهم مبادئ مهنتي وأعترف لهم بالجميل وأبقى دوما وفيا لتعاليمهم.
- أن أزاول مهنتي بوزع من ضميري لما فيه صالح الصحة العمومية، وأن لا أقصر أبدا في مسؤوليتي وواجباتي تجاه المريض وكرامته الإنسانية.
- أن ألتزم أثناء ممارستي للصيدلة بالقوانين المعمول بها وبأدب السلوك والشرف، وكذا بالاستقامة والترفع.
- أن لا أفشي الأسرار التي قد تعهد إلي أو التي قد أطلع عليها أثناء القيام بمهامي، وأن لا أوافق على استعمال معلوماتي لإفساد الأخلاق أو تشجيع الأعمال الإجرامية.
- لأحضى بتقدير الناس إن أنا تقيدت بعهودي، أو أحتقر من طرف زملائي إن أنا لم أف بالتزاماتي.

"والله على ما أقول شهيد"

جامعة محمد الخامس

كلية الطب والصيدلة بالرباط

أطروحة

سنة 2010

رقم: 14

المقارنة الدراسية ما بين المصادفة التحليلية التقليدية ونهج
الجديد من أجل المصادقة على صحة الطريقة
الكروماتوغرافية السائل عالية الأداء للاملوديبين
في التركيبة الدوائية

أطروحة

قدمت ونوقشت علانية يوم:

من طرف

الآنسة: كاوني الحسنية

المزودة في 13 يناير 1983 بفاس

لنيل شهادة الدكتوراه في الصيدلة

الكلمات الأساسية: المصادقة التحليلية – مراقبة الجودة – لمحة الدقة – ك.س.ع.أ / ف.ب.

تحت إشراف اللجنة المكونة من الأساتذة

رئيس

السيد: يحيى الشراح

أستاذ في علم الصيدلة

مشرف

السيد: عبد العزيز بوكلوز

أستاذ في التطبيقات الصيدلانية

السيد: مصطفى ادراوي

أعضاء

أستاذ في الكيمياء التحليلية

السيد: رضوان أبو قال

أستاذ في الإنعاش الطبي