

INTRODUCTION.....	1
CHAPITRE 1 : PRESENTATION DU LABORATOIRE ET DESCRIPTION DU SUJET	2
I. PRESENTATION DU LABORATOIRE CENTRAL D'ANALYSES MEDICALES (LCAM).....	2
1. Activités du laboratoire de pharmacotoxicologie	2
2. Les différentes méthodes d'analyses médicamenteuses du LCAM.....	3
II. DESCRIPTION DU SUJET	3
1. Introduction	3
2. Les phénothiazines	3
a. Définition	3
b. Utilisation.....	4
c. Structure chimique	4
3. La chlorpromazine (largartil)	4
a. Définition	4
b. Indications thérapeutiques	5
c. Effets secondaires	5
4. Protocole de validation d'une méthode analytique	6
a. Définition et objectif de la validation	6
b. Critères de validation	6
➤ Linéarité	6
➤ Fidélité	6
➤ Justesse.....	7
5. Notions de statistique	8
6. La Spectrophotométrie	11
a. Définition	11
b. Applications de la spectroscopie UV-visible	12
c. Loi de Beer-Lambert.....	12
CHAPITRE 2 - PARTIE PRATIQUE : MATERIELS ET METHODES	13
I. INTRODUCTION.....	13
II. DOSAGE DE LA CHLORPROMAZINE PAR SPECTROMETRE JASCO V 530.....	13
1. Principe	13
2. Appareillage	13
3. Matériels.....	13
4. Réactifs.....	14
III. PREPARATION DES SOLUTIONS	14

1. Préparation de 20ml de solution de quinydrone de 10 – 3M	14
2. Préparation d'une solution d'hydroxyde de sodium à 40%	14
3. Préparation de l'étalon largartil 5mg/ml	14
4. Préparation de la gamme d'étalonnage	15
IV. RESULTATS ET DISCUSSIONS.....	16
1. Vérification de linéarité	16
2. Vérification de la fidélité	17
a. Test de normalité.....	17
b. Test des valeurs aberrantes	18
c. Test d'homogénéité des variances	18
d. Test d'ANOVA-1.....	19
e. Fidélité	19
3. Vérification de la justesse	20
CONCLUSION	21
EEFERANCES ET WEBOGRAPHIE	
ANNEXES	

INTRODUCTION

Les phénothiazines sont des médicaments connus principalement pour ses propriétés neuroleptiques, ils sont indiqués pour le traitement des psychoses dont la plus représentative est la schizophrénie.

Ainsi, à dose thérapeutique, les phénothiazines présentent de puissantes actions sédatives, antihistaminiques et antipsychotiques, avec réduction de la tension émotionnelle, de l'agitation, de l'agressivité et des productions délirantes.

Le traitement par ces médicaments présente souvent une efficacité thérapeutique. Des effets indésirables sont observés notamment l'hépto-toxicité. Ces effets sont souvent liés aux doses administrées non adaptées de ces médicaments. Le suivi thérapeutique par le dosage de médicaments permet d'ajuster la posologie à chaque patient pour mieux optimiser le traitement et minimiser le risque d'effet indésirable.

Le dosage des phénothiazines qui s'inscrit dans le cadre du suivi thérapeutique adapté par laboratoire du Centre Hospitalier Hassan-II est réalisé par spectrophotomètre UV-visible

L'objectif de ce travail, est le dosage des phénothiazines pour le suivi thérapeutique afin d'offrir aux cliniciens un outil pratique pour améliorer l'efficacité du traitement. Ce projet porte essentiellement sur la validation du dosage des phénothiazines par spectrophotométrie.

Dans le présent rapport nous présentons d'abord, le laboratoire d'analyse (Lieu de stage) ensuite une étude bibliographique qui portera sur la méthodologie de validation analytique.

Dans la partie expérimentale, les critères de la validation sont vérifiés, pour pouvoir en fin de dire que la méthode choisie est convenable pour l'analyses médicales.

Chapitre 1 : Présentation du laboratoire et Description du sujet

I. Présentation du Laboratoire central d'analyses médicales (LCAM)

Le LCAM offre une gamme élargie d'analyses médicales introduites pour la première fois au niveau régional et national.

Le LCAM est constitué de trois niveaux : le rez de chaussée, le premier étage et le deuxième étage où on peut trouver l'accueil, les salles de prélèvements, les locaux administratifs et les laboratoires.

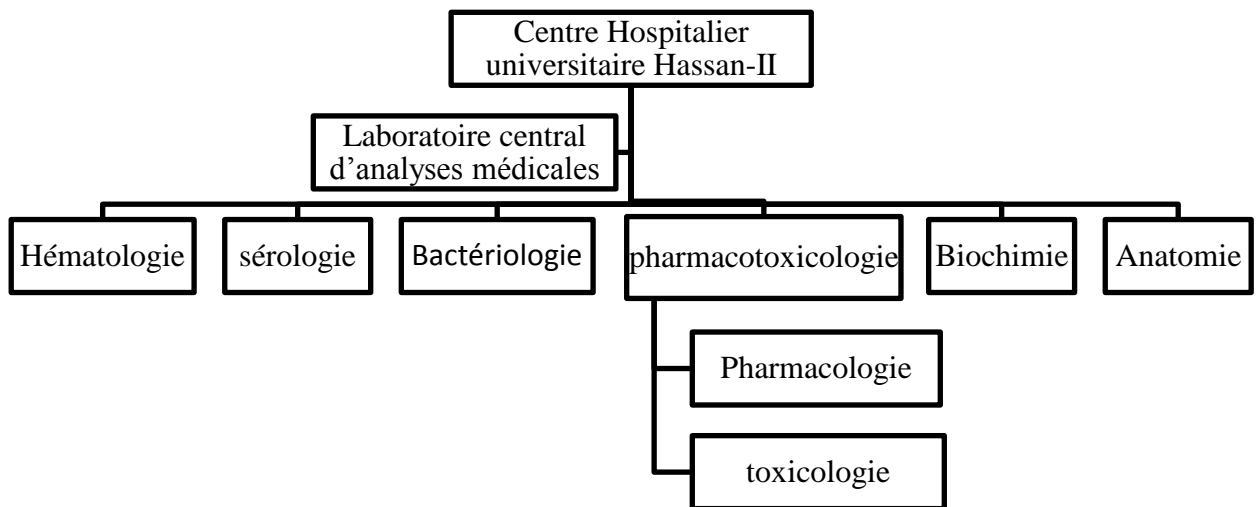


Figure 1 : Organigramme du LCAM-CHU Fès

1. Activités du laboratoire de pharmacotoxicologie

Le Laboratoire de pharmacotoxicologie effectue principalement de la recherche, de l'identification et du dosage des médicaments. Il a deux domaines principaux d'activité :

✓ **L'activité pharmacologique**

Le suivi thérapeutique pharmacologique consiste à adapter individuellement la posologie de certains médicaments dans des situations médicales à risque à partir de la mesure de paramètres d'exposition du patient au médicament. Ces activités sont assurées pour les patients hospitalisés au CHU de Fès ainsi que pour des hôpitaux, cliniques et laboratoires de la région.

✓ **L'activité toxicologique**

Elle vise à diagnostiquer les principales causes d'intoxication médicamenteuses ou autres tel que l'alcool, les produits stupéfiants, certains pesticides ou herbicides...

Des activités de recherche sont associées à ces activités de laboratoire:

✓ **L'activité de recherche et développement**

Les praticiens du laboratoire développent de nouvelles méthodes d'analyses permettant de suivre le progrès thérapeutique (nouveaux médicaments), de mesurer des concentrations de plus en plus faibles de toxiques ou médicaments avec des méthodes de plus en plus spécifiques.

2. Les différentes méthodes d'analyses médicamenteuses du LCAM

Le laboratoire dispose de nombreuses méthodes :

✓ **Méthodes chromatographiques**

- Chromatographie sur couche mince (CCM) : Les molécules à séparer sont entraînées par un fluide qui en montant dans la phase stationnaire, va entraîner le composé que l'on avait déposé. Il y a donc distribution ou partition des composants entre ces deux phases.
- Chromatographie en phase liquide à haute performance : l'HPLC est une méthode d'analyse physico-chimique, qui sépare les constituants d'un mélange par entraînement au moyen d'une phase mobile le long d'une phase stationnaire

✓ **Méthodes colorimétriques**

Elles se basent sur une recherche colorimétrique des médicaments dans les urines et/ou dans le liquide de lavage gastrique.

II. Description du sujet

1. Introduction

La chlorpromazine est un médicament anti-psychique. Indiqué pour le traitement de certaines affections du système nerveux central.

En cas de surdosage, ce médicament a des effets secondaires tolérables. Le suivi thérapeutique par le dosage de médicaments permet de minimiser le risque de ces effets.

La méthode de dosage de la chlorpromazine par spectrophotomètre est soumise à la validation analytique, pour la quantification de ce médicament dans l'urine de patient.

2. Les phénothiazines

a. Définition

Les phénothiazines sont des médicaments qui ont une action anti-psychiques, antiallergiques, ou hypnotiques.

b. Utilisation

Ces médicaments sont utilisés dans la fabrication de colorants, dans la synthèse des médicaments antipsychotiques et antihistaminiques, comme inhibiteurs de polymérisations, et comme antioxydants.

Ils sont utilisés aussi comme pesticides pour lutter contre les insectes, ils sont employés dans la médecine vétérinaire.

c. Structure chimique

Ces composés possèdent une structure tricyclique (figure 2) correspondant à la fusion d'un cycle thiazine -1,4 avec deux cycles benzéniques. Deux substituants se greffent sur cette structure de base :

R_1 : détermine la sous-classe de la substance.

R_2 : une chaîne azotée, l'amine latérale étant toujours séparée par trois carbones de l'azote intranucléaire.

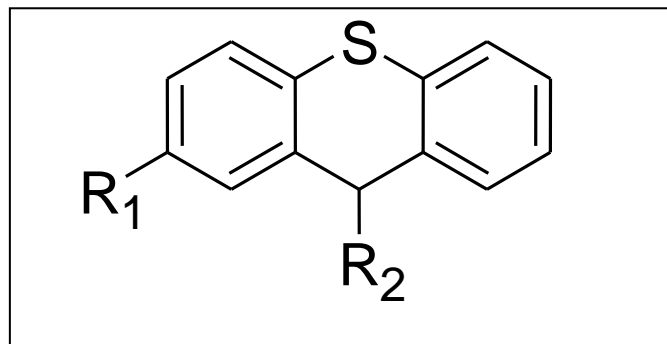
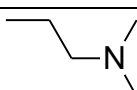



Figure 2: Structure chimique des phénothiazines

✓ Exemple

Tableau 1 : Classification des phénothiazines

Classe	Sous classe	R_1	R_2	Effet
phénothiazines	Chlorpromazine	Cl		Anti-psychique
	prométhazine	H		Antihistaminique

3. La chlorpromazine (largatil)

a. Définition

La chlorpromazine est un médicament neuroleptique de première génération anti-psychique de la phénothiazine famille. Ce médicament existe sous le nom commercial de largatil. Il s'utilise pour soigner la manie (état des troubles bipolaires) et les troubles psychotiques comme la schizophrénie.

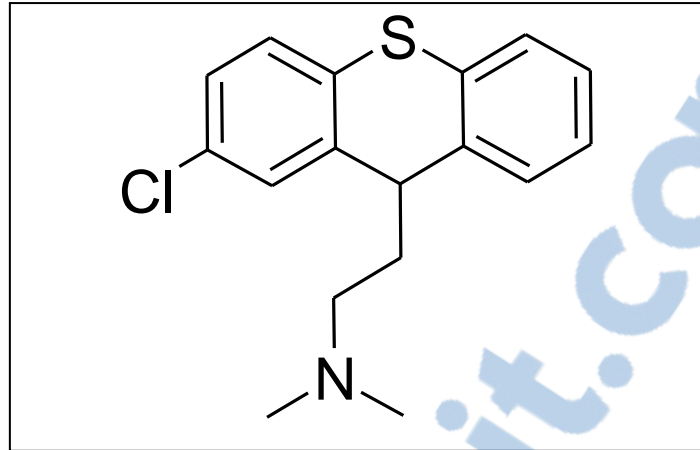


Figure 3 : Structure chimique de la chlorpromazine

b. Indications thérapeutiques

La chlorpromazine est un médicament qui agit sur les neurotransmetteurs sécrétés dans le cerveau.

L'indication première de la chlorpromazine est d'induire le calme, de réduire l'agitation et l'anxiété surtout lorsque celles-ci sont associées à un état psychotique (la schizophrénie par exemple), mais aussi dans d'autres états d'hyperactivité chez l'adulte. Elle est également utilisée pour traiter les nausées, les vomissements, l'anxiété avant une chirurgie et le hoquet chronique.

c. Effets secondaires

En cas de surdosage, La chlorpromazine présente des effets secondaires indésirable, ils ressemblent généralement aux signes d'une réaction allergique comme l'urticaire, difficulté à respirer et gonflement du visage.

D'autres effets peuvent apparaitre plus sévères :

- Contractions ou mouvements incontrôlables des yeux, des lèvres, de la langue, du visage, du bras ou des jambes;
- Tremblements incontrôlables, bave, difficulté à avaler, problèmes d'équilibre ou de marche.
- Sensation d'agitation et de nervosité.
- Nausées et douleurs d'estomac, éruption cutanée et jaunisse.
- Une forte fièvre, maux de gorge, symptômes de grippe, une raideur des muscles, une confusion, une transpiration, une tachycardie, une respiration rapide.
- Pathologies ophtalmologiques : diminution de la vision, yeux larmoyants, sensibilité accrue à la lumière.

4. Protocole de validation d'une méthode analytique

a. Définition et objectif de la validation

La validation d'une méthode est la procédure par laquelle on démontre, preuves expérimentales à l'appui, que les performances de la méthode permettent de répondre aux exigences de l'usage auquel elle est destinée. Elle a pour principal objectif de s'assurer qu'une méthode analytique donnée donnera des résultats suffisamment fiables et reproductibles.

b. Critères de validation

La validation d'une méthode en bio-analyse comprend une succession de procédures qui a pour objectif de démontrer que la méthode utilisée permet de quantifier un analyte dans une matrice particulière pour une application précise.

➤ **Linéarité**

La linéarité d'une méthode d'analyse est sa capacité à l'intérieur d'un certain intervalle, de donner des résultats qui sont directement proportionnels à la concentration (quantité) de la substance analysée dans un échantillon.

La linéarité d'une courbe d'étalonnage est vérifiée par le calcul du coefficient de détermination « R^2 ». Une valeur supérieure à 0,995 de ce coefficient permet d'affirmer avec quasi certitude que la droite d'étalonnage est linéaire.

L'équation de la droite d'étalonnage est : $y = \alpha x + b$

➤ **Fidélité**

La fidélité à un niveau donné correspond à l'étroitesse de l'accord entre les valeurs obtenues par des mesurages répétés de même objet ou d'objets similaires dans des conditions spécifiées. Selon les conditions d'exécution de l'essai, cette caractéristique s'exprime sous forme de fidélité intermédiaire, de répétabilité ou de reproductibilité pour une méthode.

✓ **Répétabilité**

La Répétabilité à un niveau donné correspond à l'étroitesse de l'accord entre les résultats individuels successifs obtenus sur le même échantillon soumis à l'essai dans le même laboratoire, exécuté par le même analyste, avec le même appareil, pendant le même jour.

Tableau 2 : les différents termes calculés pour la répétabilité

Variance de répétabilité (S_r^2)	Ecart type de répétabilité (S_r)	K (95%)	Limite de répétabilité	Coefficient de variation (CV)
$S_r^2 = CM_r$	$S_r = \sqrt{S_r^2}$	2	$k\sqrt{2} \times S_r$	$\frac{S_r}{\bar{X}} \times 100$

CM_r : carrée moyenne d'intergroupe (voir tableau d'ANOVA-1)

K : coefficient constant donné par la norme

✓ **La fidélité intermédiaire**

La fidélité intermédiaire à un niveau donné correspond à l'étroitesse de l'accord entre les résultats individuels obtenus sur le même échantillon soumis à l'essai dans le même laboratoire et dont au moins l'un des éléments suivants est différent : l'analyste, l'appareil, le jour.

Tableau 3 : les différents termes calculés pour la fidélité intermédiaire

Variance de fidélité intermédiaire (S_L^2)	Ecart type de fidélité intermédiaire (S_L)	K (95%)	Coefficient de variation
$S_L^2 = \frac{CM_F - CM_r}{n_i}$	$S_L = \sqrt{S_L^2}$	2	$\frac{S_L}{\bar{X}} \times 100$

CMr : carrée moyenne d'intragroupe (voir tableau d'ANOVA-1)

✓ **Reproductibilité**

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

Tableau 4 : les différents termes calculés pour la reproductibilité

Variance de la reproductibilité (S_R^2)	Ecart type de la reproductibilité (S_R)	K (95%)	Limite de reproductibilité	Coefficient de variation
$S_R^2 = S_L^2 + S_F^2$	$S_R = \sqrt{S_R^2}$	2	$k\sqrt{2} \times S_R$	$\frac{S_R}{\bar{X}} \times 100$

• **Règle de décision**

Une méthode est fidèle, si son coefficient de variation est inférieur à 2%.

➤ **Justesse**

La justesse à un niveau donné correspond à l'étroitesse de l'accord entre la moyenne d'un nombre infini de valeurs mesurées répétées et une valeur de référence.

• **Règle de décision**

La principale application de ce test est la comparaison d'une valeur ou d'une moyenne à une valeur de référence.

Dans ce test, on calculera le rapport suivant :

$$t_{\text{obs}} = \frac{|\bar{Y} - \bar{X}|}{S} \sqrt{n_i}$$

Avec : \bar{Y} = valeur de référence.

La valeur de t_{obs} est comparée avec la valeur critique indiquée dans la table de student :

–Si $t_{obs} < t_{crit}$: La moyenne observée \bar{Y} est conforme au standard m.

–Si $t_{obs} > t_{crit}$: la moyenne observée \bar{Y} est significativement différente du standard m.

La valeur de la justesse sera déterminée à partir de l'équation suivante :

Tableau 5 : statistique calculée pour la justesse

Erreur relative%	Justesse%
$\text{Erreur relative}\% = \frac{\bar{Y} - \bar{X}}{\bar{X}} \times 100$	$\text{Justesse}\% = 100 - \text{Erreur relative}\% $

Une valeur d'erreur relative inférieure à 2% permet d'affirmer que la méthode choisie est juste

5. Notions de statistique

✓ Moyenne

La moyenne est le rapport de la somme des valeurs trouvées par les mesures par rapport au nombre totale de mesures.

$$\bar{X} = \frac{\sum X_i}{n}$$

✓ La variance

La variance sert à caractériser la dispersion d'une distribution ou d'un échantillon. Sa valeur sera déterminée à partir de l'équation suivante :

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

✓ Ecart type

L'écart type mesure la dispersion d'une série de valeurs autour de leur moyenne.

Pour un nombre limité d'échantillon, la valeur d'écart type sera déterminée à partir de l'équation suivante :

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

✓ Coefficient de variation

Le coefficient de variation mesure la dispersion relative. Il est obtenu en divisant l'écart type par la moyenne et en multipliant par 100.

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

✓ Coefficient de détermination R^2

Le coefficient de détermination (R^2) est un indicateur qui permet de juger la qualité d'une régression linéaire. Il représente l'ajustement des points par rapport à la droite. Sa valeur est calculée à partir de l'équation suivante :

$$R^2 = \frac{[n \sum xy - (\sum x)(\sum y)]^2}{(n \sum x^2 - (\sum x)^2)(n \sum y^2 - (\sum y)^2)}$$

✓ Test de normalité

Un test simple nommé « Shapiro –Wilk » permet d'étudier la nature de distribution des valeurs autour de leur moyenne.

Dans ce test, on calculera le rapport suivant :

$$W_{\text{obs}} = \frac{(\sum a_j d_j)^2}{\sum (x_i - \bar{x})^2}$$

Avec : a_j = coefficient indiqué dans la table des coefficients pour n mesure.

d_j = différence entre deux moyennes.

La valeur de W_{obs} est comparée avec $W(\alpha, n)$ lue dans la table de Shapiro –Wilk.

- Si $W_{\text{obs}} > W(\alpha, n)$ on accepte, l'hypothèse de normalité de la série de mesure.
- Si $W_{\text{obs}} < W(\alpha, n)$ on rejette l'hypothèse de normalité de la série de mesure.

✓ Vérification des valeurs aberrantes

Un point aberrant provient d'une mesure pour laquelle un ou plusieurs paramètres sont hors contrôle.

Pour les expériences de chimie analytique, une méthode simple nommée « Test de Grubbs » permet le rejet de deux points aberrants dans une série de mesures ou le rejet d'une ou de deux moyennes par rapport à la moyenne générale.

Dans ce test, on calcule les deux résidus suivants :

$$G_b = \frac{\bar{X} - X_b}{S} \qquad G_a = \frac{X_a - \bar{X}}{S}$$

X_b : valeur minimale des mesures ou moyennes

X_a : valeur maximale des mesures ou moyennes

Ces résidus sont comparés aux résidus critiques à 5 %

- Si $G(\alpha = 5\%) < G_a$ ou G_b x_a ou x_b est douteux
- Si G_a ou $G_b < G(\alpha = 5\%)$ x_a ou x_b est non aberrant

✓ Test d'homogénéité des variances

Une méthode simple nommée « test de Cochran » permet de détecter la variance aberrante.

- **Méthode de comparaison**

On calculera d'abord le C_{obs} à l'aide de l'équation suivante :

$$C_{obs} = \frac{S_{max}^2}{\sum_{j=1}^p S_j^2}$$

S_{max}^2 : variance maximale

Ce rapport est comparé à la valeur critique C_{crit} donnée par la table de Cochran.

- Si $C_{obs} < C_{crit}$, les variances sont de même ordre de grandeur
- Si $C_{obs} > C_{crit}$, les deux variances diffèrent significativement.

- ✓ **Test d'homogénéité des moyennes (test d'ANOVA-1)**

Le test d'ANOVA-1 a pour objectif principal de tester l'hypothèse selon laquelle les moyennes de plusieurs groupes indépendants de distributions normales sont égales.

Tableau 6: analyse de la moyenne

Source	ddl	SCE	CM	$F_{cal}(v1, v2)$	F_{crit}
Intergroupe	P-1	SCE_f	CM_f	$F = \frac{CM_f}{CM_r}$	Inverse.loi.F ($\alpha, v1, v2$)
Intragroupe	N-P	SCE_r	CM_r		
Totale	N-1	SCE_t			

$$\text{somme des carrés et écarts intergroupes}(SCE_f) = \sum_{i=1}^p n_i (\bar{X}_i - \bar{X})^2$$

$$\text{somme des carrés et écarts intragroupes}(SCE_r) = \sum_{i=1}^p \sum_{j=1}^{n_i} (\bar{X}_{ij} - \bar{X})^2$$

$$\text{somme des carrés et écarts totale}(SCE_t) = SCE_r + SCE_f$$

$$\text{Carrée moyenne (CM)} = \frac{SCE}{ddl}$$

P : nombre d'échantillon

N : nombre total de mesures

- **Règle de décision**

- Si $F_{cal} < F_{crit}$, les moyennes sont de même ordre de grandeur.
- Si $F_{cal} > F_{crit}$, les deux moyennes diffèrent significativement.

6. La Spectrophotométrie

a. Définition

La spectrophotométrie est une méthode analytique, autant quantitative que qualitative, qui permet de déterminer l'absorbance ou la densité optique d'une substance donnée en solution.

L'étude des absorptions nécessite l'utilisation d'un appareil appelé spectromètre. La figure suivante représente le schéma de principe d'un spectromètre d'absorption UV- visible double faisceau.

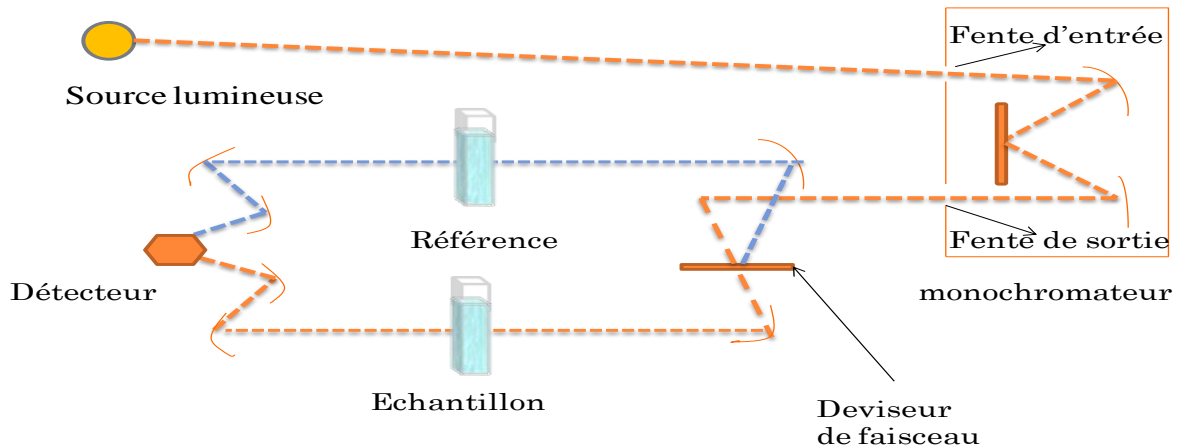


Figure 4 : principe d'un spectromètre d'absorption UV- visible double faisceau.

Le spectromètre au dessus constitué des éléments suivants :

✓ **Source**

Le rôle de la source est de fournir la radiation lumineuse.

✓ **Monochromateur**

Le monochromateur a pour rôle de disperser le rayonnement poly-chromatique provenant de la source et d'obtenir des radiations monochromatiques.

✓ **Diviseur de faisceau**

La lumière monochromatique qui émerge du monochromateur est séparée en deux faisceaux qui traversent les compartiments de l'échantillon et de la référence.

✓ **Détecteur**

Le détecteur est un tube photomultiplicateur qui convertit la lumière reçue en courant. Le détecteur est relié à un enregistreur qui permet de tracer un spectre d'absorption de l'échantillon analysé.

b. Applications de la spectroscopie UV-visible

✓ Analyse qualitative

Les spectres UV fournissent généralement peu de renseignements sur la structure moléculaire des composés comparés aux spectres RMN et IR. Néanmoins, on les utilise soit pour une confirmation soit pour une identification grâce aux règles empiriques.

✓ Analyse quantitative

L'analyse quantitative par la spectrométrie UV-visible est très employée (beaucoup plus que l'analyse qualitative) grâce à l'utilisation de la loi de Beer-Lambert.

Comme applications, on peut citer :

- _ Dosage du fer dans l'eau ou dans un médicament
- _ Dosage des molécules actives dans une préparation pharmaceutique

c. Loi de Beer-Lambert

Lorsqu'un faisceau de lumière blanche d'intensité I_0 traverse une solution absorbante. Une partie du faisceau sera absorbée par la solution et une partie sera transmise.

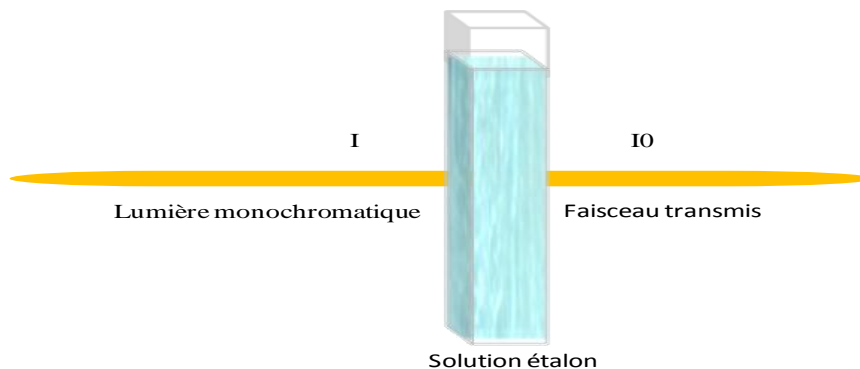


Figure 5: principe de la loi de Beer-Lambert

L'absorbance d'une solution alors est proportionnelle à sa concentration et à la longueur de la cuve comme indiqué la loi de Beer-Lambert

$$A = \epsilon c l$$

A : absorbance (aucune unité)

C : concentration molaire de la solution (mol.L^{-1})

L : épaisseur de la cuve (cm)

ϵ : Coefficient d'absorption molaire ($\text{L.mol}^{-1}.\text{cm}^{-1}$) qui dépend de la substance, mais aussi de la longueur d'onde.

Chapitre 2 - Partie Pratique : Matériels et Méthodes

I. Introduction

Dans cette partie nous visons à valider la méthode de dosage de la chlorpromazine par le spectromètre UV visible.

En effet, nous allons vérifier plus tard les différents critères de la validation.

Avant de vérifier ces critères. Il faut dans un premier temps vérifier que la distribution des données suit une loi normale, puis garantir l'absence des valeurs et moyennes aberrantes, ensuite tester l'homogénéité des variances et enfin celle des moyennes.

II. Dosage de la chlorpromazine par Spectromètre JASCO V 530

1. Principe

Après extraction en milieu alcalin, les phases aqueuses colorées sont soumises à l'analyse spectrale à 527nm.

2. Appareillage

- L'appareil de mesure utilisé est un Spectromètre JASCO V 530 double faisceau.
- L'appareil est réglé à une longueur d'onde de 570 nm.



Figure 6 : Spectromètre JASCO V 530 double faisceau

- Balance analytique
- Centrifugeuse
- Vortex

3. Matériels

- Tube à essai de 20ml
- Cuve photométrique de verre de 10 mm de diamètre
- Pipette de 5ml et 25ml
- micropipette de 1000µm

- L'ampoule à décanter
- Eprouvette de 100ml
- Bêcher de 100ml
- Fiole jaugée de 100ml
- Broyeur

4. Réactifs

- Etalon le largagtil 5mg/ml
- Dichlorométhane
- Solution de quinydrone $10^{-3}M$ dans le Dichlorométhane
- Solution aqueuse d'hydroxyde de sodium à 40%
- Acide ortho- phosphorique (d=1,71)
- Urine normale

III. Préparation des solutions

1. Préparation de 20ml de solution de quinydrone de $10^{-3}M$

- Peser à la balance avec précision la masse nécessaire pour préparer la solution de quinydrone de $10^{-3}M$
- Dissoudre cette masse dans 20 ml de Dichlorométhane. Bien agiter pour homogénéiser la solution.

✓ Calcule de la masse

$$m = nM$$

$$m = c v M$$

AN : $C = 10^{-3}M$

$$v = 20 \cdot 10^{-3}ml$$

$$M = 218,21g/mol$$

Or : $m = 43,64mg$

2. Préparation d'une solution d'hydroxyde de sodium à 40%

- À l'aide d'une balance analytique. Peser avec précision 40g d'hydroxyde de sodium.
- Dans une fiole jaugée de 100ml. Dissoudre cette quantité dans l'eau distillée, puis compléter le volume jusqu'au trait de jauge.

3. Préparation de l'étalon largagtil 5mg/ml

- À l'aide d'un broyeur. Écraser 3 comprimés de largagtil.

- Peser avec précision 1g de broyat.
- Introduire le broyat dans une fiole jaugée de 200ml. Ajouter un peu d'eau distillée.
- Agiter pour homogénéiser la solution. Puis compléter le volume jusqu'au trait de jauge.

4. Préparation de la gamme d'étalonnage

✓ Partie 1 : extractum organique

- Dans des ampoules à décanter placer respectivement comme suit :

Tableau 7 : préparation des solutions étalons

	Urine	Dichlorométhane	NAOH	chlorpromazine
Blanc	25ml	25ml	1ml	0ml
T ₁	25ml	25ml	1ml	15ml
T ₂	25ml	25ml	1ml	30ml
T ₃	25ml	25ml	1ml	45ml
T ₄	25ml	25ml	1ml	60ml
T ₅	25ml	25ml	1ml	90ml

- Agiter chaque ampoule pendant 10min
- Après décantation, les phases aqueuses sont éliminées et les phases organiques sont centrifugées à grande vitesse.
- Eliminer par aspiration la totalité des couches surnageantes.
- Les phases organiques sont conservées dans des fioles jaugées à température ambiante.

✓ Partie 2 : gamme d'étalonnage

- Dans des ampoules à décanter introduire respectivement 10 ml d'extractum organique, puis ajouter 1ml de Solution de quinhydrone ($10^{-3}M$) et 4ml d'acide ortho-phosphorique (d=1,71).
- Agiter pendant une minute.
- Après décantation, une grande partie des phases organiques supérieures sont éliminées et les liquides restants sont centrifugés.
- Après élimination des solvants surnageants, les phases aqueuses acides colorées sont soumises à l'analyse spectrale à 527nm.

IV. Résultats et discussions

Pour dire que notre méthode est convenable pour le dosage médical, on doit valider les différents critères de la validation.

1. Vérification de linéarité

Pour mettre en évidence un non linéarité au risque de 5%, il est recommandé de préparer au minimum 5 niveaux de concentration.

À l'aide du spectromètre (JASCO 530), nous avons mesuré les absorbances des solutions préparées. Les résultats obtenus sont représentés dans le tableau suivant :

Tableau 8: résultats de la linéarité

Tube	Concentration (mg/ml)	absorbance
T1	1,1363	0,9102
T2	1,8520	1,462
T3	2,3428	1,8532
T4	2,7027	2,1301
T5	3,1914	2,546

À partir du tableau au dessous, nous avons tracé la courbe d'étalonnage. La figure obtenue est présentée ci-dessous :

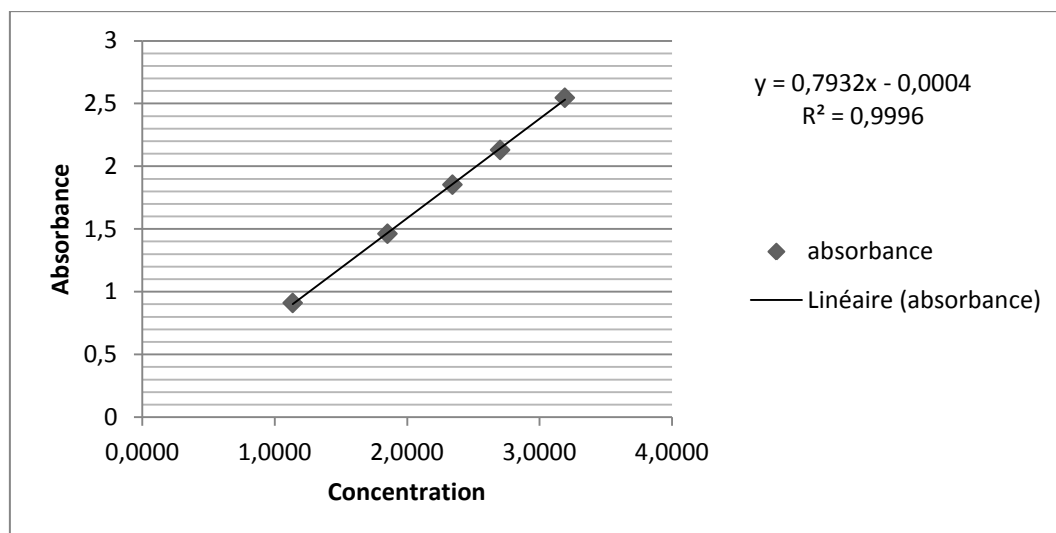


Figure 7: Courbe d'étalonnage de la chlorpromazine

✓ Interprétation

D'après la figure au dessus, on constate clairement que le coefficient de détermination est supérieur à 0,995. Cela explique que la droite d'étalonnage est linéaire.

2. Vérification de la fidélité

La vérification de la fidélité est basée sur l'application des différents tests statistiques. Pour notre étude on a choisi d'effectuer 6 mesures pendant 4 jours sur le même échantillon. Les résultats obtenus sont redressés dans le tableau suivant :

Tableau 9 : résultats de la fidélité

	Série 1	Série 2	Série 3	Série 4
abs 1	0,9098	0,9291	0,9196	0,9087
abs 2	0,9198	0,9121	0,9051	0,9063
abs 3	0,9177	0,9256	0,9074	0,9032
abs 4	0,9089	0,9203	0,9047	0,9021
abs 5	0,9041	0,9291	0,9156	0,9168
abs 6	0,9032	0,9162	0,9154	0,9011
Moyenne	0,9106	0,9221	0,9113	0,9064
moyenne générale	0,9126			
variance	0,00005	0,00005	0,00004	0,00003
écart type	0,0069	0,0070	0,0063	0,0058
écart type général	0,0065			

a. Test de normalité

Avant d'entamer une étude statistique et pour pouvoir utiliser un certain nombre de test, il faut s'assurer que la population étudiée suit une loi normale (gaussienne).

Dans ce test, on va calculer la valeur de W_{obs} et on la compare avec la valeur de $W(\alpha, n)$ lue dans la table de Shapiro –Wilk.

Les résultats obtenus sont présentés dans le tableau suivant :

Tableau 10 : résultats du test de Shapiro –Wilk

moyenne	Différences d_j	Coefficient a_j	W_{obs}	$W(\alpha, n)$
0,9221	$d_1 = 0,9221 - 0,9064$	$a_1 = 0,6872$	0,8866	0,748
0,9113	$d_1 = 0,0157$	$a_2 = 0,1677$		
0,9106	$d_2 = 0,9113 - 0,9106$			
0,9064	$d_2 = 0,0007$			

✓ **Interprétation**

La population étudiée suit une loi de distribution normale puisque W_{obs} est supérieur à $W(\alpha, n)$.

Alors on peut appliquer nos tests pour la comparaison des variances et des moyennes.

b. Test des valeurs aberrantes

Une fois qu'on a déterminé la nature de la distribution de la population étudié on passe au test des valeurs aberrantes. Ici on parle du test de grubbs.

Dans ce test, on va déterminer les valeurs max et min des moyenne et de la totalité des mesures, puis on calcule les deux résidus G_a et G_b et on compare ces derniers avec les deux résidus critiques retirés de la table de grubbs.

Les résultats obtenus sont représentés dans les tableaux ci-dessous :

Tableau 11 : résultats du test de grubbs

Test des moyennes		G_{obs}		$G_{crit} (5\%, 4)$
Max	0,9221	G_a	1,4544	1,46
Min	0,9064	G_b	0,9532	
Test des valeurs suspectes		G_{obs}		$G_{crit} (5\%, 24)$
Max	0,9291	G_a	2,5326	2,64
Min	0,9011	G_b	1,7597	

✓ **Interprétation**

Dans le test des moyennes et valeurs suspectes, on constate que les deux résidus calculés sont inférieurs à G_{crit} lue dans la table de grubbs avec un risque α de 5%. Cela signifié que la moyenne Maximale et Minimale et la valeur Maximale et minimale ne sont pas aberrantes.

c. Test d'homogénéité des variances

Maintenant qu'on a garanti l'Absence des valeurs aberrantes, on passera à la vérification de l'homogénéité des variances via le test de cochran.

Dans ce test, On déterminera d'abord la variance maximale, puis on calculera la somme totale des variances, après on calculera le rapport suivant :

$$C_{obs} = \frac{S_{max}^2}{\sum S_j^2}$$

Les résultats obtenus sont présentés dans le tableau suivant :

Tableau 12: résultats du test de Cochran

S_{\max}^2	$\sum S_j^2$	C_{obs}	C_{crit}
0,00005	0,00017	0,2902	0,59

✓ **Interprétation**

Puisque C_{obs} est inférieure à C_{crit} , donc les variances sont de même ordre de grandeur.

d. Test d'ANOVA-1

Pour la vérification de l'homogénéité des moyennes, on utilise le test d'ANOVA-1.

Dans ce test, on va déterminer le degré de liberté (ddl), après on calcule la somme des carrés et écarts et le carré moyen, puis on calcule le coefficient de Fischer (F) comme indiqué ci-dessous :

Tableau 13: résultats du test d'ANOVA-1

Source	ddl	SCE	CM	F_{cal}	F_{crit}
intergroupe	3	$SCE_F = 0,00053$	$CM_F = 0,00017$	4,18	3,10
intragroupe	20	$SCE_r = 0,00083$	$CM_r = 0,00004$		
Total	23	$SCE_T = 0,00139$			

✓ **Interprétation**

Puisque la valeur de F calculée est supérieure à la valeur critique indiquée dans la table de Fischer, l'hypothèse d'égalité des moyennes sera acceptée. On conclura donc que les données sont compatibles (à ce niveau de risque) avec l'hypothèse d'égalité des moyennes.

e. Fidélité

Après avoir vérifié les différents tests statistiques, on peut vérifier maintenant la répétabilité, fidélité intermédiaire et la reproductibilité de la méthode de référence, on utilise les résultats de test d'ANOVA-1.

✓ **Répétabilité**

Tableau 14 : résultats du test de la répétabilité

Variance (S_r^2)	Ecart type (S_r)	k ($\alpha=95\%$)	Limite de répétabilité	cv
0,00004	0,0065	2	0,0185	0,71

✓ **Fidélité intermédiaire**

Tableau 15 : résultats du test de la fidélité intermédiaire

variance S_L^2	écart type S_L	C V
0,00017	0,0129	1,42

✓ **Reproductibilité**

Tableau 16 : résultats du test de la reproductibilité

variance S_R^2	écart type S_R	K (a=95%)	Limite de reproductibilité	cv
0,00021	0,014	2	0,041	1,59

✓ **Interprétation**

Les coefficients de variation de répétabilité, fidélité intermédiaire et reproductibilité sont inférieurs à 2%. alors on peut dire que la méthode est fidèle.

3. Vérification de la justesse

Après avoir prouvé la fidélité de la méthode on va s'intéresser au test de justesse qui précise que : On effectue 10 mesures de l'absorbance sur un Matériaux de référence (MR) puis on calcule la moyenne et écart types. Les résultats obtenus sont :

Tableau 17 : Mesure de l'absorbance du MR

x1	x2	x3	x4	x5	x6	x7	x8	x9	x10	Moyenne	Ecart type
0,0958	0,0986	0,0956	0,0967	0,0973	0,0975	0,0982	0,0954	0,0976	0,0959	0,09686	0,3112

Après on passera à l'application du test comme suite :

Tableau 18 : résultats de la justesse

valeur vrai	t_{obs}	$t_{crit} (0,05;9)$
0,0975	0,0065	2,2620

Tableau 19 : Calcul de la justesse

erreur relative%	Justesse%
0,66	99,34

✓ **Interprétation**

Puisque $t_{obs} < t_{crit}$: la différence entre la moyenne des mesures et la valeur Vrai n'est pas significative.

L'erreur relative de la méthode est inférieure à 2%.

Alors, on peut dire que la méthode est juste.

CONCLUSION

Mon stage effectué au sein du laboratoire central d'analyses médicales de CHU. Durant ce stage j'ai eu l'occasion d'approfondir mes connaissances scientifiques et participer à l'optimisation et la validation de la méthode de dosage de la chlorpromazine par spectromètre UV-visible

Après avoir réalisé la validation analytique de la méthode d'analyse de la chlorpromazine Par spectromètre UV- visible, nous avons pu déduire les conclusions suivantes :

- La justesse de la méthode est vérifiée.
- La fidélité de la méthode est prouvée.
- La droite d'étalonnage est linéaire.

Les résultats obtenus nous permet de conclure que la méthode apte pour l'analyse des médicaments.

La mise en place de cette méthode de dosage de la chlorpromazine, offre au médecin des résultats rapides, fiables, et précieux pour le suivi de l'évolution ou l'évaluation du traitement instauré pour le patient, en diminuant la gravité des effets indésirables, et aussi pour une meilleure adaptation de la dose administrée.

Au cours du dosage de la chlorpromazine par spectromètre, nous avons constaté une variation permanente de l'absorbance, alors pour résoudre ce problème, il est recommandé d'ajouter un stabilisateur aux solutions étalons.

REFERANCES ET WEBOGRAPHIE

- [1] http://sante.canoe.ca/drug_info_details.asp?brand_name_id=4605
- [2] <http://www.docteurlic.com/encyclopedie/phenothiazine.aspx>
- [3] http://www.ceaeq.gouv.qc.ca/accreditation/pala/DR12VMM_protocole_val_micro.pdf
- [4] http://infochimie.u-strasbg.fr/master/Cours_stat_pdf/PT_ABERR.PDF
- [5] <http://webapps.fundp.ac.be/biostats/biostat/modules/module140/page4.html>
- [6] <http://www.laboratoireagdal.com/>
- [7] Jean-Jacques. D'après le chapitre 10 du livre Eléments de statistique. Ellipses Marketing.
- [8] <https://moodle.insa-rouen.fr/mod/resource/view.php?id=681>
- [9] http://infochimie.u-strasbg.fr/master/Cours_stat_pdf/ANOVA.PDF
- [11] Kremer (16/1/1984). Les phénothiazines en pharmacologie. Ouvrage
- [12] <http://www.fsr.ac.ma/cours/chimie/GUEDIRA/SMC4-cours%20de%20Spectroscopie-PDF/Chapitre%20III-Spectroscopie%20d%27absorption%20dans%20l%27UV-visible.pdf>

ANNEXES

Tableau 20 : valeurs de Coefficient a_j selon Shapiro-wilk

n =	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14
a1	0.7071	0.7071	0.6872	0.6646	0.6431	0.6233	0.6052	0.5888	0.5739	0.5601	0.5475	0.5359	0.5251
a2			0.1677	0.2413	0.2806	0.3031	0.3164	0.3244	0.3291	0.3315	0.3325	0.3325	0.3318
a3					0.0875	0.1401	0.1743	0.1976	0.2141	0.2260	0.2347	0.2412	0.2460
a4							0.0561	0.0947	0.1224	0.1429	0.1586	0.1707	0.1802
a5									0.0399	0.0695	0.0922	0.1099	0.1240
a6											0.0303	0.0539	0.0727
a7													0.0240

Tableau 21 : valeurs de $W(\alpha, n)$ selon Shapiro-wilk

n \ p	0.01	0.02	0.05	0.1	0.5	0.9	0.95	0.98	0.99
3	0.753	0.756	0.767	0.789	0.959	0.998	0.999	1.000	1.000
4	0.687	0.707	0.748	0.792	0.935	0.987	0.992	0.996	0.997
5	0.686	0.715	0.762	0.806	0.927	0.979	0.986	0.991	0.993
6	0.713	0.743	0.788	0.826	0.927	0.974	0.981	0.986	0.989
7	0.730	0.760	0.803	0.838	0.928	0.972	0.979	0.985	0.988
8	0.749	0.778	0.818	0.851	0.932	0.972	0.978	0.984	0.987
9	0.764	0.791	0.829	0.859	0.935	0.972	0.978	0.984	0.986
10	0.781	0.806	0.842	0.869	0.938	0.972	0.978	0.983	0.986

Tableau 22 : valeurs critiques de G_a et G_b selon grubbs

Grubbs' critical value table:

N	0.1	0.075	0.05	0.025	0.01
3	1.15	1.15	1.15	1.15	1.15
4	1.42	1.44	1.46	1.48	1.49
5	1.6	1.64	1.67	1.71	1.75
6	1.73	1.77	1.82	1.89	1.94
7	1.83	1.88	1.94	2.02	2.1
8	1.91	1.96	2.03	2.13	2.22
9	1.98	2.04	2.11	2.21	2.32
10	2.03	2.1	2.18	2.29	2.41
11	2.09	2.14	2.23	2.36	2.48
12	2.13	2.2	2.29	2.41	2.55
13	2.17	2.24	2.33	2.46	2.61
14	2.21	2.28	2.37	2.51	2.66
15	2.25	2.32	2.41	2.55	2.71
16	2.28	2.35	2.44	2.59	2.75
17	2.31	2.38	2.47	2.62	2.79
18	2.34	2.41	2.5	2.65	2.82
19	2.36	2.44	2.53	2.68	2.85
20	2.38	2.46	2.56	2.71	2.88
21	∅	∅	2.58	2.73	2.91
22	∅	∅	2.6	2.76	2.94
23	∅	∅	2.62	2.78	2.96
24	∅	∅	2.64	2.8	2.99
25	∅	∅	2.66	2.82	3.01
26	∅	∅	2.68	2.84	∅∅∅
27	∅	∅	2.7	2.86	∅∅∅
28	∅	∅	2.72	2.88	∅∅∅

Tableau 23 : valeurs de C critique selon cochran

n	2		3		4		5		6	
	1%	5%	1%	5%	1%	5%	1%	5%	1%	5%
2			0.995	0.975	0.979	0.939	0.959	0.906	0.937	0.877
3	0.993	0.967	0.942	0.871	0.883	0.798	0.834	0.746	0.793	0.707
4	0.968	0.906	0.864	0.768	0.781	0.684	0.721	0.629	0.674	0.590
5	0.928	0.841	0.788	0.684	0.696	0.598	0.633	0.544	0.588	0.506
6	0.883	0.781	0.722	0.616	0.626	0.532	0.564	0.480	0.520	0.445
7	0.838	0.727	0.664	0.561	0.568	0.480	0.508	0.431	0.466	0.397
8	0.794	0.680	0.615	0.516	0.521	0.438	0.463	0.391	0.423	0.360
9	0.754	0.638	0.573	0.478	0.481	0.403	0.425	0.358	0.387	0.329
10	0.718	0.602	0.536	0.445	0.447	0.373	0.393	0.331	0.357	0.303
11	0.684	0.570	0.504	0.417	0.418	0.348	0.366	0.308	0.332	0.281
12	0.653	0.541	0.475	0.392	0.392	0.326	0.343	0.288	0.310	0.262
13	0.624	0.515	0.450	0.371	0.369	0.307	0.322	0.271	0.291	0.243
14	0.599	0.492	0.427	0.352	0.349	0.291	0.304	0.255	0.274	0.232
15	0.575	0.471	0.407	0.335	0.332	0.276	0.288	0.242	0.259	0.220

Tableau 24 : valeurs de T_{crit} pour la justesse

ddl	0,01	0,02	0,05	0,1
1	63,657	31,821	12,706	6,314
2	9,925	6,965	4,303	2,920
3	5,841	4,541	3,182	2,353
4	4,604	3,747	2,776	2,132
5	4,032	3,365	2,571	2,015
6	3,707	3,143	2,447	1,943
7	3,499	2,998	2,365	1,895
8	3,355	2,896	2,306	1,860
9	3,250	2,821	2,262	1,833
10	3,169	2,764	2,228	1,812
11	3,106	2,718	2,201	1,796
12	3,055	2,681	2,179	1,782
13	3,012	2,650	2,160	1,771
14	2,977	2,624	2,145	1,761
15	2,947	2,602	2,131	1,753

Tableau 25 : valeurs de f critique selon ficher

	Degrés de liberté pour le numérateur														
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	15	20	25	30	
Degrés de liberté pour le dénominateur	1	161.4	199.5	215.8	224.8	230.0	233.8	236.5	238.6	240.1	242.1	245.2	248.4	248.9	250.5
	2	18.51	19.00	19.16	19.25	19.30	19.33	19.35	19.37	19.38	19.40	19.43	19.44	19.46	19.47
	3	10.13	9.55	9.28	9.12	9.01	8.94	8.89	8.85	8.81	8.79	8.70	8.66	8.63	8.62
	4	7.71	6.94	6.59	6.39	6.26	6.16	6.09	6.04	6.00	5.96	5.86	5.80	5.77	5.75
	5	6.61	5.79	5.41	5.19	5.05	4.95	4.88	4.82	4.77	4.74	4.62	4.56	4.52	4.50
	6	5.99	5.14	4.76	4.53	4.39	4.28	4.21	4.15	4.10	4.06	3.94	3.87	3.83	3.81
	7	5.59	4.74	4.35	4.12	3.97	3.87	3.79	3.73	3.68	3.64	3.51	3.44	3.40	3.38
	8	5.32	4.46	4.07	3.84	3.69	3.58	3.50	3.44	3.39	3.35	3.22	3.15	3.11	3.08
	9	5.12	4.26	3.86	3.63	3.48	3.37	3.29	3.23	3.18	3.14	3.01	2.94	2.89	2.86
	10	4.96	4.10	3.71	3.48	3.33	3.22	3.14	3.07	3.02	2.98	2.85	2.77	2.73	2.70
	11	4.84	3.98	3.59	3.36	3.20	3.09	3.01	2.95	2.90	2.85	2.72	2.65	2.60	2.57
	12	4.75	3.89	3.49	3.26	3.11	3.00	2.91	2.85	2.80	2.75	2.62	2.54	2.50	2.47
	13	4.67	3.81	3.41	3.18	3.03	2.92	2.83	2.77	2.71	2.67	2.53	2.46	2.41	2.38
	14	4.60	3.74	3.34	3.11	2.96	2.85	2.76	2.70	2.65	2.60	2.46	2.39	2.34	2.31
	15	4.54	3.68	3.29	3.06	2.90	2.79	2.71	2.64	2.59	2.54	2.40	2.33	2.28	2.25
	16	4.49	3.63	3.24	3.01	2.85	2.74	2.66	2.59	2.54	2.49	2.35	2.28	2.23	2.19
	17	4.45	3.59	3.20	2.96	2.81	2.70	2.61	2.55	2.49	2.45	2.31	2.23	2.18	2.15
	18	4.41	3.55	3.16	2.93	2.77	2.66	2.58	2.51	2.46	2.41	2.27	2.19	2.14	2.11
	19	4.38	3.52	3.13	2.90	2.74	2.63	2.54	2.48	2.42	2.38	2.23	2.16	2.11	2.07
	20	4.35	3.49	3.10	2.87	2.71	2.60	2.51	2.45	2.39	2.35	2.20	2.12	2.07	2.04
	22	4.30	3.44	3.05	2.82	2.66	2.55	2.46	2.40	2.34	2.30	2.15	2.07	2.02	1.98
	24	4.26	3.40	3.01	2.78	2.62	2.51	2.42	2.36	2.30	2.25	2.11	2.03	1.97	1.94
	26	4.23	3.37	2.98	2.74	2.59	2.47	2.39	2.32	2.27	2.22	2.07	1.99	1.94	1.90
	28	4.20	3.34	2.95	2.71	2.56	2.45	2.36	2.29	2.24	2.19	2.04	1.96	1.91	1.87
	30	4.17	3.32	2.92	2.69	2.53	2.42	2.33	2.27	2.21	2.16	2.01	1.93	1.88	1.84