Liste des Abréviations

AMM : Autorisation de Mise sur le Marche

CV : Coefficient de Variance

DDL : degré de liberté

DMP : Direction du Médicament et de la Pharmacie

DP : Division de la Pharmacie

EDQM : Direction Européenne de la qualité du Médicament

FPR : Forme Pharmaceutique Reconstituée

HPLC : Chromatographie Liquide à Haute Performance

ICH : International Conférence on Harmonisation

ISO : International Organisation for Standardisation

LNCM : Laboratoire National de Contrôle des Médicaments

LOD : Limite de détection

LOQ : Limite de Quantification

Nth : Nombre de plateaux Théoriques

OMS : Organisation Mondiale de la Sante

PA : Principe Actif

PAS : Principe Actif Seul

USP: United State Pharmacopoeia

SCE : somme des Carres des Ecarts

SPE : somme des Produits des Ecarts

Tm : Temps Mort

Tr : Temps de Rétention

Liste des Tableaux

Tableau 1: Caractéristiques à prendre en compte pour les différents types de méthodes analytiques [48] 16
Tableau 2: Quantités d'excipients utilisées et leurs fonctions. 19
Tableau 3: Conditions chromatographique de la méthode. 19
Tableau 4: Les pesées de paracétamol et caféine pour les PAS et les FPR pour l'étude de la linéarité, exactitude. 21
Tableau 5: Les pesées de paracétamol et caféine pour la FPR niveau 100% pour l'étude de la fidélité. 21
Tableau 6: les pesées des standards et les essais pour l'étude de la robustesse. 22
Tableau 7: les pesées des standards et des essais pour les différentes formes 22
Tableau 8: les données de la PAS pour la linéarité de paracétamol 26
Tableau 9: Les données de la FPR pour la linéarité de paracétamol 27
Tableau 10: Test de Cochran pour le calcul d'homogénéité des variances de paracétamol 27
Tableau 11: Les données de la PAS pour la linéarité de caféine. 28
Tableau 12: Les données de la FPR pour la linéarité de caféine 28
Tableau 13: Test de Cochran pour le calcul d'homogénéité des variances de caféine 28
Tableau 14: les données pour le calcul de la régression linéaires de paracétamol PAS 29
Tableau 15: Les données pour le calcul de la régression linéaires de Paracétamol FPR 30
Tableau 16: Les données pour le calcul de la régression linéaires de caféine (PAS) 32
Tableau 17: les données pour le calcul de la régression linéaires de caféine (FPR) 32
Tableau 18: Les données pour le calcul des variances S_1^2 et S_r^2 de paracétamol (PAS) 35
Tableau 19: Les données pour le calcul des variances S_1^2 et S_r^2 de paracétamol (FPR) 35
Tableau 20: Résultat du test de ficher pour le paracétamol (PAS) 36
Tableau 21: Résultat du test de ficher pour paracétamol (FPR) 36
Tableau 22: Les données pour le calcul des variances S_1^2 et S_r^2 pour la caféine PAS 36
Tableau 23: les données pour le calcul des variances S_1^2 et S_r^2 pour la caféine FPR 37
Tableau 24: Résultat du test de ficher pour la caféine (PAS) 37
Tableau 25: Résultat du test de ficher pour la caféine (FPR) 37
Tableau 26: les données pour le calcul des variances S_{1n}^2 et S_e^2 pour le paracétamol PAS 38
Tableau 27: Les données pour le calcul des variances S_{1n}^2 et S_r^2 pour le paracétamol FPR 39
Tableau 28: Test de Fisher pour la validité de la droite de régression PAS de paracétamol 39
Tableau 29: Test de Fisher pour la validité de la droite de régression FPR de paracétamol 39

Tableau 30: Les données pour le calcul des variances S_{1n}^2 et S_r^2 pou PAS de caféine..... 40
Tableau 31: Les données pour le calcul des variances S_{1n}^2 et S_r^2 pour FPR de caféine 41
Tableau 32: Test de Fisher pour la validité de la droite de régression PAS de caféine. 41
Tableau 33: Test de Fisher pour la validité de la droite de régression FPR caféine 41
Tableau 34: Résultats du test de Student pour PAS et FPR de paracétamol..... 43
Tableau 35: Résultats du test de Student pour PAS et FPR de caféine..... 43
Tableau 36: Les données brutes pour l'étude de l'exactitude pour le paracétamol 44
Tableau 37: les résultats du test de Cochran pour l'étude de l'homogénéité des variances paracétamol. 44
Tableau 38: Les résultats du test de Fischer pour l'étude de la validité des moyennes pour le paracétamol 45
Tableau 39: Les données brutes pour l'étude de l'exactitude pour la caféine 46
Tableau 40: les résultats du test de Cochran pour l'étude de l'homogénéité des variances pour la caféine 46
Tableau 41: les résultats du test de Fischer pour l'étude de la validité des moyennes pour la caféine 47
Tableau 42: Les résultats bruts de l'étude de la fidélité pour le paracétamol 48
Tableau 43: Les résultats des moyennes pour chaque série de paracétamol..... 49
Tableau 44: Les résultats du test de DIXON pour les valeurs aberrantes..... 49
Tableau 45: Les résultats du test de Cochran pour l'homogénéité des variances de paracétamol 49
Tableau 46: Les résultats du test de Fisher pour la validité des moyennes..... 49
Tableau 47: les résultats bruts de l'étude de la fidélité pour la caféine..... 51
Tableau 48: Les résultats des moyennes pour chaque série de caféine..... 51
Tableau 49: Les résultats du test de DIXON pour les valeurs aberrantes pour la caféine. 52
Tableau 50: Les résultats du test de Cochran pour l'homogénéité des variances de caféine... 52
Tableau 51: Les résultats du test de Fisher pour la validité des moyennes de caféine 52
Tableau 52: Les données de l'étude de la robustesse pour le paracétamol et la caféine..... 54
Tableau 53: les résultats de dosage des trois formes pharmaceutiques..... 55

Liste des figures

Figure 1: Schéma de la réaction d'acylation du para-aminophénol en paracétamol. 3

Figure 2: Schéma de la réaction d'acylation de l'aniline en acétanilide. 4

Figure 3: Structure chimique de paracétamol..... 4

Figure 4: Réaction de la synthèse da la caféine. 6

Figure 5: Structure chimique de la caféine..... 7

Figure 6: Principe de fonctionnement d'un appareil HPLC..... 9

Figure 7 : Superposition des chromatogrammes de PAS, FPR, placebo et le blanc..... 25

Avant-Propos

Le laboratoire National de contrôle des Médicaments (LNCM) est une division de la Direction des Médicaments et de la Pharmacie (DMP) du ministre de la sante crée en 1669. Membre associe à la commission de la pharmacopée européenne, inscrit sur la liste des laboratoires officiels de l'organisme mondiale de la santé (OMS). Il est considère comme le laboratoire de référence de la ligne arabe, membre du réseau des laboratoires officiels européennes de contrôle des médicaments (réseau OMCL).

LNCM a pour missions de contrôler les médicaments (matière première et produit fini), les dispositifs médicaux, les articles de puériculture et tout autre article destine à l'usage de la médecine humaine ; et l'évolution de la documentation chimique, biologique et pharmaceutique ; ainsi contribuer à la formation des stagiaires (ISO/IEC17025 ; 2007).

Les échantillons analysés au laboratoire proviennent :

- Des laboratoires pharmaceutiques dans le cadre d'une demande d'AMM ;
- De l'inspection du secteur pharmaceutique (produits finis prélevés lors de l'inspection des établissements pharmaceutiques de fabrication) ;
- Des appels d'offres du ministre de la sante (contrôle de livraison) ;
- Des réclamations suit a un défaut de qualité ;
- Des homologations des dispositifs médicaux et des articles de puériculture destines à l'enfant de 1ere âge ;
- Des études comparatives (essais inter-laboratoires) coordonnées par L'EDQM, OMS ;
- Libération de lot de vaccins (ISO/IEC17025 ; 2007).

Il est compose de 4 unités :

- Service d'assurance qualité,
- Service physico-chimie,
- Service de biologie,
- Service des dispositifs médicaux.

- **Accréditation du LNCM**

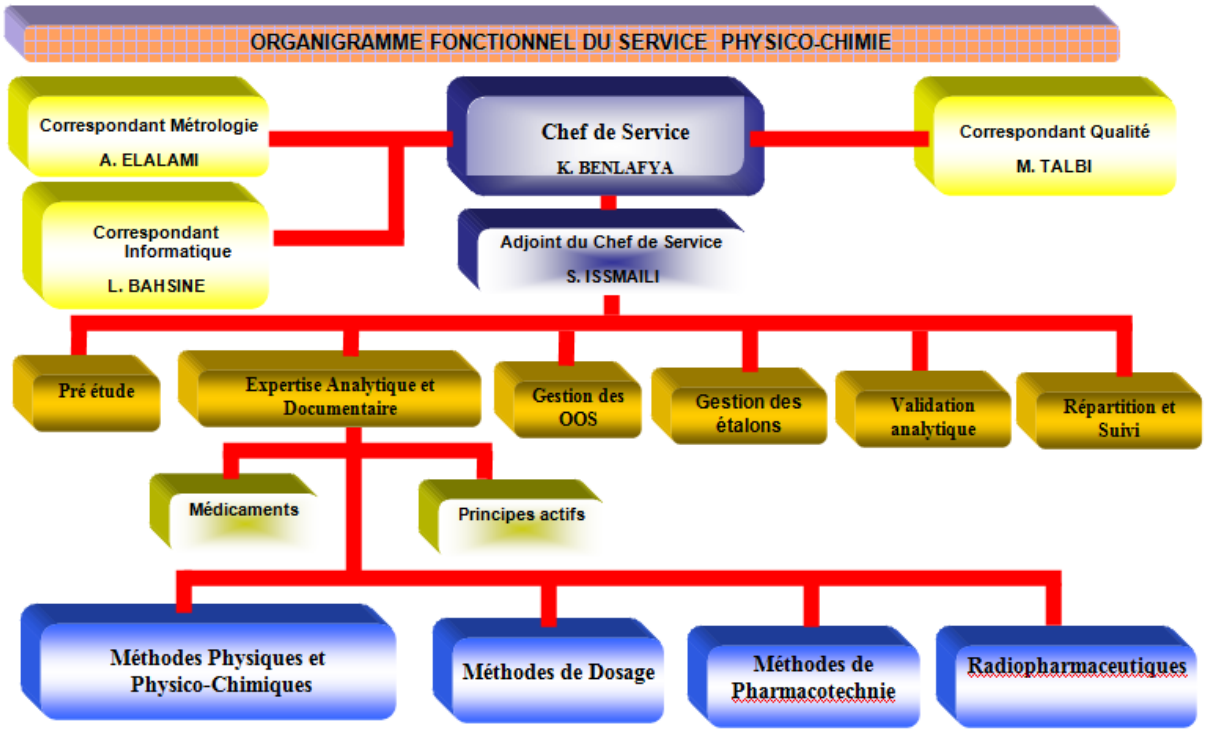
Le laboratoire national de contrôle des médicaments (LNCM) vient d'être référencé ISO 17025 et accrédite par la direction européenne de la qualité des médicaments (EDQM) – conseil de l'Europe. « Cela témoigne de la reconnaissance internationale de la qualité du médicaments marocain ».

- **Service physico-chimie**

Le service physico-chimie a pour objectif :

- ✓ Le contrôle physico chimique des médicaments : matière première, produit fini et conditionnement.
- ✓ La présentation des résultats des tests dans des procès-verbaux, 'analyse des anomalies constates et la rédaction de recommandations.
- ✓ Constitution et gestion d'une banque de données sur les médicaments à l'échelle nationale et internationale

Ce service utilise les différentes techniques d'analyse pour un contrôle stricte des médicaments : teste galéniques, les tests chimiques, les tests physico-chimiques….etc.



Organigramme du service physico-chimique

Sommaire

Introduction générale 1

Chapitre I:Synthèse bibliographique

I. Introduction 3

II. Généralités sur le paracétamol 3

II.1. Origine 3

II.2. Dénomination et formule chimique 4

II.3. Caractéristiques physico-chimiques du paracétamol 4

II.4. Caractéristiques pharmacocinétiques 4

II.5. Indication thérapeutique 5

III. Généralités sur la caféine 6

III.1. Origine 6

III.2. Dénomination et Formule chimique 6

III.3. Caractéristiques physicochimique 7

III.4. Caractéristique pharmacocinétique 7

IV. Généralités sur les médicaments 8

IV.1. Définition 8

IV.2. Composition d'un médicament 8

V. Chromatographie liquide à haute performance (HPLC) 8

V.1. Principe 9

V.2. Appareillage 9

V.3. Paramètres fondamentales de la chromatographie 12

VI. Validation d'une méthode d'analyse 13

VI.1. Définition 13

VI.2. Objectif 13

VI.3. Critères de la validation d'une méthode de dosage 13

VI.3.1. Spécificité 13

Rapport-Gratuit.com

VI.3.2. Linéarité 13

VI.3.3. Exactitude 14

VI.3.4. Fidélité 14

VI.3.5. Robustesse 14

VI.3.6. Limites de détection et de quantification 15

VI.3.7. Justesse 15

VI.4. Les caractéristiques analytiques applicables dans un cas particulier 15

Chapitre II :Matériau et conditions expérimentales

Introduction 17

I. Appareillage 18

II. Etalons, produits finis et réactifs 18

 Placebo 18

III. Conditions chromatographiques 19

IV. Optimisation de la méthode 19

V. Préparation des échantillons 20

V.1. Mode opératoire 20

V.2. Préparation des échantillons pour l'étude de la spécificité 20

V.3. Préparation des échantillons pour l'étude de la linéarité, exactitude et la fidélité 21

V.4. Préparation des échantillons pour l'étude de la robustesse 21

V.5. Préparation des échantillons pour l'application de la méthode 22

V.6. Les méthodes statistiques utilisées pour la validation 23

Chapitre III :Résultats et discussions

I. Conformité de système (A.I) 25

II. Sélectivité 25

III. La linéarité (A.II) 25

III.1 Homogénéité des variances 25

III.2. Régression linéaires (A.II) 29

III.3. Tests d'adéquation du modèle linéaire par analyse de variance 34

III.4. Comparaison des droites de progression 42

IV. Exactitude 43

IV.1. paracétamol 44

IV.2. Caféine 46

V. Fidélité 47

V.1. Paracétamol 48

V.2. Caféine 51

VII- Application de la méthode (A.III) 55

Conclusion générale 56

Rapport-gratuit.com
LE NUMERO 1 MONDIAL DU MÉMOIRES

Introduction générale

Le stage est un champ d'application des acquis théoriques qui permet d'acquérir des connaissances, des expériences pratiques et des compétences professionnelles mais aussi d'approfondir les connaissances dans les sciences et techniques. Ainsi, c'est une occasion de confronter et de se familiariser avec le domaine professionnel. Dans ce sens, j'ai eu l'occasion d'effectuer un stage pour une durée de 4 moins au sein du Laboratoire National de Contrôle des Médicaments (LNCM) à Rabat.

Dans ce cadre, le sujet traité concerne l'optimisation et la validation d'une méthode de dosage de paracétamol et de caféine par chromatographie liquide à haute performance (HPLC) dans les différentes formes pharmaceutiques : comprimé, sachet et gélule.

Des médicaments à base de paracétamol et de la caféine sont disponibles sous différentes formes pharmaceutiques. Actuellement, le dosage de ces molécules dans les produits finis se fait par des méthodes variées. [1-14]

Développer une méthode de dosage de principe actif dans les différentes formes pharmaceutiques ne peut être que bénéfiques pour les laboratoires de contrôle des médicaments ou pour les laboratoires de contrôle qualité dans l'industrie pharmaceutique.

L'objectif d'une telle démarche est d'aider les laboratoires de contrôle des médicaments et les spécialistes en industrie pharmaceutique, de réduire le temps et le coût de l'analyse et par la suite de minimiser les rejets chimiques.

Le but de ce travail est d'optimiser et valider une méthode analytique simple rapide et économique permettant le dosage simultané ou seuls du Paracétamol et de la Caféine dans les formes pharmaceutiques cité ci-dessus.

La validation de cette méthode repose sur une analyse statistique basée sur un certain nombre de critères aboutissant à une méthode analytique permettant de donner des résultats fiable et de montrer qu'elle correspond à l'utilisation pour laquelle elle est proposée.

Notre travail est présenté sous forme de trois chapitres:

- Le premier chapitre est consacré à une étude bibliographique :
  - Généralités sur les deux principes actifs,
  - Généralités sur les médicaments,
  - Technique de dosage par la chromatographie liquide à haute performance
  - Des notions sur la validation d'une méthode de dosage par HPLC.
- Le deuxième chapitre est consacré aux conditions expérimentales : matériel et méthode
- Le troisième chapitre est consacré au traitement des résultats et discutions.

Chapitre I

Synthèse bibliographique

I. Introduction

L'optimisation et la validation des méthodes d'analyse sont aujourd'hui un enjeu important pour les laboratoires. Elles découlent de la mise en place des systèmes d'assurance qualité.

Le paracétamol est utilisé comme antipyrétique, analgésique et anti-inflammatoire. Chimiquement, il est disponible sous différentes formulations. [1]

Il est indiqué en cas de la fièvre, maux de tête, douleur de l'arthrite, les douleurs, les rhumes, la grippe et les règles douloureuses.

La caféine est la drogue la plus utilisée au monde. Elle est utilisée comme stimulant, en raison de son action sur le système nerveux central.

Par fois le paracétamol est utilisé en association avec d'autres molécules par exemple la caféine pour le traitement des crises plus intense par exemple la migraine.

Le dosage de ces deux molécules a été étudié par diverses méthodes (spectrophotométrie UV-Visible, chromatographie liquide à haute performance [1-14]

Dans ce chapitre nous allons, tout d'abord, présenter des généralités sur les principes actifs, et les médicaments puis la technique de dosage par chromatographie liquide à haute performance (HPLC) et enfin nous présentons les critères de validation de cette méthode de dosage.

II. Généralités sur le paracétamol

II.1. Origine

Le paracétamol est un dérivé de l'aniline. C'est le principe actif du médicament le plus vendus au monde et le plus prescrit en France. Il est d'origine synthétique. Il peut être obtenu par l'acylation (Figure 1) du para-amino-phénol en solution dans l'acide éthanoïque (acide acétique), par l'action de l'anhydride acétique à 100°C [15,16]

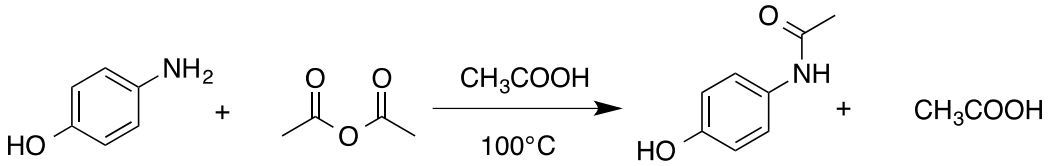


Figure 1: Schéma de la réaction d'acylation du para-aminophénol en paracétamol.

Le paracétamol peut être aussi obtenu suivant une autre voie comprenant d'abord une acylation de l'aniline (appelée aussi phénylamine) au moyen de l'anhydride acétique (ou anhydride éthanoïque) (Figure 2).

Suivie d'une hydroxylation de l'acétanilide obtenu sous l'action de l'acide ascorbique [16]

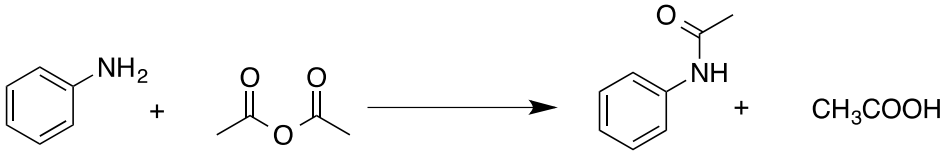


Figure 2: Schéma de la réaction d'acylation de l'aniline en acétanilide.

II.2. Dénomination et formule chimique

De nombreuses dénominations du paracétamol existent, les plus courantes sont [17]

- ✓ La dénomination commune internationale (DCI) recommandée par l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS) est : **Paracétamol**
- ✓ La dénomination anglo-saxone selon l'US Pharmacopeial Convention est :**Acetaminophen,**
- ✓ Le nom chimique est :**N-acétyl-para-aminophénol.**

La formule chimique du paracétamol est : CH_3-CO-NHC_6H_4-OH

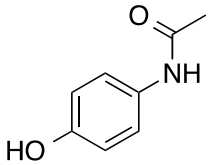


Figure 3: Structure chimique de paracétamol

II.3. Caractéristiques physico-chimiques du paracétamol

Le paracétamol est un acide organique faible (pKa = 9,5) très liposoluble, qui se présente sous forme de poudre cristalline, blanche, inodore et de saveur amère [18,19] Il est soluble dans l'eau froide et peut atteindre la limite de 14,3g/l, alors que dans l'eau chaude, les 50g/l, et dans l'éthanol, 140g/l [19] Il absorbe dans l'UV avec un maximum d'absorption à la longueur d'onde de 241 nm et sa masse molaire est de 151,17 g/mol.

II.4. Caractéristiques pharmacocinétiques

a. Absorption

Administré par voie orale, le paracétamol est rapidement et presque totalement absorbé au niveau du tractus gastro-intestinal par diffusion passive. L'absorption est beaucoup plus rapide dans l'intestin grêle que dans l'estomac [20].

Le paracétamol subit une biotransformation hépatique dès le premier passage hépatique, quant à sa biodisponibilité absolue, elle est satisfaisante et avoisine les 80% [19,21]

b. Distribution

La distribution du paracétamol est rapide et uniforme présente un volume de 0, 9L/Kg : il est diffusé dans tous les milieux liquidiens (sang, liquide céphalorachidien, salive, lait, liquide interstitiel) et tissus de l'organisme [22]

En cas de surdosage, l'absorption et la distribution complète du paracétamol sont obtenus au bout de quatre heures pour les comprimés et poudre et au bout de deux heures pour les sirops [23]

c. Métabolisme

Le paracétamol est métabolisé (c'est-à-dire transformé) essentiellement au niveau du foie.

Les deux voies métaboliques majeures sont la glycuroconjugaison et la sulfoconjugaison. Il existe une voie métabolique, moins importante, catalysée par le Cytochrome (plus précisément par les isoenzymes) [24]

d. Elimination

Comme le suggère sa demi-vie très courte (2 heures), le paracétamol est complètement éliminé dans les 24 heures qui suivent son ingestion.

Il est éliminé exclusivement dans les urines sous forme « inchangé » et sous forme de métabolites (dérivés conjugués).

La forme inchangée du paracétamol est filtrée au niveau glomérulaire, quant aux formes conjuguées, elles sont rapidement excrétées au niveau tubulaire [24]

II.5. Indication thérapeutique

Le paracétamol est le traitement symptomatique indiqué pour les affections douloureuses d'intensité légère, et/ou fébriles [26]

Par ces deux actions pharmacologiques (antalgique et antipyrétique), le paracétamol intègre plusieurs traitements dans diverses disciplines médicales : pneumologie, rhumatologie, gastro-entérologie, chirurgie.

En effet, les cliniciens et les thérapeutes préconisent le paracétamol dans des cas multiples et variés tels que : céphalées, migraines, douleurs dentaires, états grippaux, rhumatismes, algies musculaires, douleurs utérines, gastrites [27,28]

III. Généralités sur la caféine

III.1. Origine

La caféine a été isolée pour la première fois en 1820 par Runge et Von Giese, dans les grains de café. En 1827, Oudry isola dans les feuilles de thé une substance qu'il dénomma "théine", qui fut rapidement reconnue comme étant identique à la caféine. Par la suite, la présence de la caféine a été signalée dans le maté, dans les noix de cola et dans les noix de guarana [29-31]

Plus de soixante espèces végétales contenant de la caféine ont ainsi été référencées dans le monde. Les plus communes appartiennent aux genres : Coffea, Camellia, Cola, Paullina, Ilex et Theobroma [32,33]

De par la popularité de boissons telles que le café ou le thé, la caféine est considérée comme l'une des molécules pharmacologiquement actives, les plus consommées dans le monde [19,30,34].

Une synthèse récente de la caféine utilise l'uracile, une base azotée spécifique de l'ARN, comme molécule de départ. Comme montre la Fig 4.

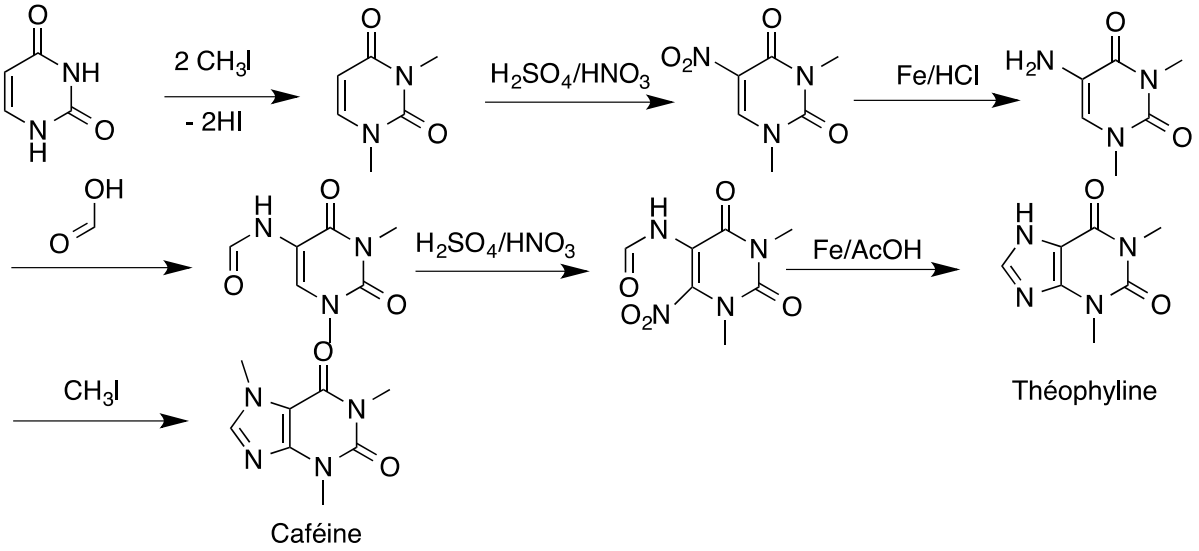


Figure 4: Réaction de la synthèse da la caféine.

III.2. Dénomination et Formule chimique

La caféine est une base faible de formule brute $C_8H_{10}N_4O_2$, deux dénominations du caféine existent : 1,3,7-triméthylxanthine ou encore 1, 3,7- trimethyl-1H-purine-2,6-dione [35]

La structure chimique de la caféine est présentée dans la figure-5.

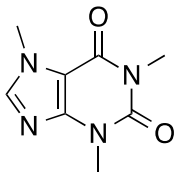


Figure 5: Structure chimique de la caféine.

III.3. Caractéristiques physicochimique

La caféine est une base faible et peut réagir avec des acides pour donner des sels, et se présente sous forme de poudre cristalline, blanche, inodore et de saveur amère [36]

Elle est soluble dans l'eau et les solvants organiques. À haute température, la solubilité de la caféine dans l'eau augmente. Elle absorbe dans l'UV avec un maximum d'absorption à la longueur d'onde de 274 nm, et sa masse moléculaire est de 194,2 g/mole.

III.4. Caractéristique pharmacocinétique

a. Absorption

La caféine est très rapidement absorbée par le tube digestif, et parvient au cerveau dès les 5minutes suivant l'ingestion. Dans une étude [37] chez 75 % des volontaires, une dose de 175 mg de caféine est absorbée par l'estomac après un quart d'heure.

b. Distribution

La caféine est distribuée via la circulation sanguine dans tous les tissus du corps [38]

c. Métabolisme

Le métabolisme de la caféine est essentiellement hépatique sous le contrôle du système microsomale oxydatif lié au cytochrome.

Chez l'adulte : la caféine est presque complètement métabolisée au niveau hépatique par oxydation, déméthylation et acétylation.

Chez le nouveau-né: la capacité métabolique étant réduite, la caféine est excrétée dans les urines, essentiellement sous forme inchangée [39]

d. Elimination

Chez l'adulte : 10% sous forme inchangée, le reste sous forme de métabolites.

Chez le nouveau-né : 85% de la dose administrée est éliminé sous forme inchangée, cette fraction diminue au cours des premiers mois de la vie pour atteindre 3% à l'âge de 8 mois [37]

III.5. Indication thérapeutique

Dans le domaine médical, la caféine est utilisée pour mettre en évidence certains troubles hépatiques [40] ainsi que l'hyperthermie maligne. Parallèlement, la caféine demeure une molécule modèle en recherche biomédicale et pharmacologique [30]

De par ses effets stimulants, la caféine a également été utilisée pour améliorer les performances sportives [31]

Elle est également utilisée en agro-alimentaire est le deuxième domaine d'application de la caféine [29] Son goût amer caractéristique en a fait une des principales substances de référence pour les tests organoleptiques.

IV. Généralités sur les médicaments

IV.1. Définition

Un médicament est toute substance ou composition présentée comme possédant des propriétés curatives ou préventives à l'égard des maladies humaines ou animales. Il est administré en vue d'établir un diagnostic médical ou de restaurer, de corriger ou de modifier leurs fonctions physiologiques en exerçant une action pharmacologique, immunologique ou métabolique [41]

IV.2. Composition d'un médicament

Un médicament est constitué de principe actif et les excipients

a. Principe actif

Le principe actif est la substance responsable de l'action pharmacologique. Son dosage est établi en fonction de la puissance et l'âge du patient [42]

b. Excipions

Les excipients désignent toute substances autre que le principe actif dans un médicament, destinée à faciliter la mise en forme du médicament, lui conférer un gout particulier et diminuer certains effets indésirables (conservateurs, aromatisants...) [42]

c. Additifs

D'après le comité FAO-OMS, un additif est défini comme une substance dotée ou non d'une valeur nutritionnelle, ajoutée internationalement à un aliment dans un but technologique, sanitaire, organoleptique ou nutritionnel. Son emploi doit améliorer les qualités du produit fini sans présenter de danger pour la santé, aux doses utilisées [43]

V. Chromatographie liquide à haute performance (HPLC)

La chromatographie liquide à haute performance (HPLC), est une technique de séparation chromatographique reposant sur la distribution différentielle des espèces entre deux phases non miscibles, une phase stationnaire contenue dans une colonne et une phase mobile qui traverse, par percolation, cette phase stationnaire. C'est une technique fondée sur les mécanismes d'adsorption, de distribution de masse, d'échange d'ions, d'exclusion, ou d'interaction stéréochimique.

Rapport-Gratuit.com

V.1. Principe

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

La phase mobile poussée par une pompe sous haute pression, parcourt le système chromatographique.

Le mélange à analyser est injecte puis transporte au travers du système chromatographique.

Les composes en solution se répartissent alors suivant leur affinité entre la phase mobile et la phase stationnaire.

En sortie de colonne grâce à un détecteur approprie les différents solutés sont caractérisé par un pic. L'ensemble des pics enregistres est appelé chromatogramme [44]

V.2. Appareillage

L' appareil HPLC comprend différents parties : un réservoir à solvant contenant la phase mobile, un système de pompage permettant d'effectuer des élutions graduées, un injecteur, une colonne, un four, un dégazeur, un détecteur et un système d'acquisition de données.

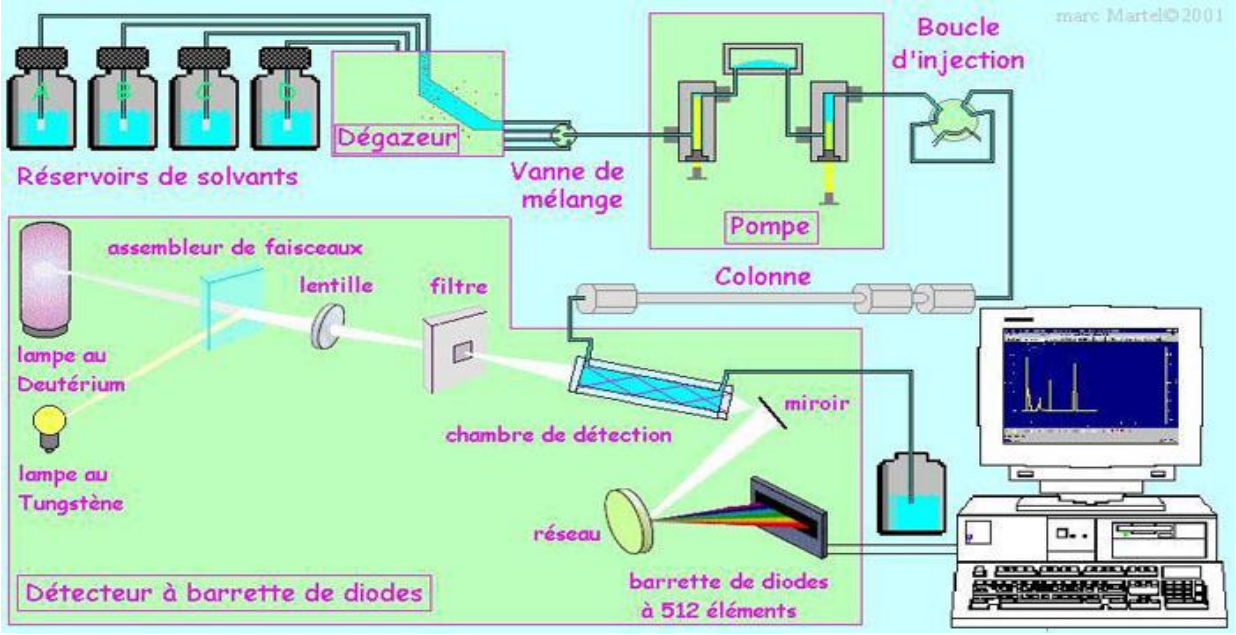


Figure 6: Principe de fonctionnement d'un appareil HPLC.

a. Réservoir de la phase mobile :

Le plus souvent ce réservoir est une bouteille en verre dans lequel plonge un tube avec extrémité filtrante en téflon [44]

Un réservoir de solvant (éluant) qui contient la phase mobile en quantité suffisante.

Plusieurs flacons d'éluant (solvants de polarités différentes) sont disponibles pour pouvoir réaliser des gradients d'élution (mélange de plusieurs solvants à des concentrations variables) à l'aide de la pompe doseuse. L'emploi d'un vase clos permet d'éviter l'évaporation, surtout si l'un des solvants est très volatil et lorsqu'il est nécessaire d'être en présence d'un gaz inerte [45]

Elle existe deux modes de travail isocratique et gradient :

- Mode isocratique, c'est-à-dire la composition de la phase mobil doit rester constante tout au long de l'analyse.
- Mode gradient, c'est-à-dire les constituants du mélange de la phase mobil change avec le temps.

- **Choix de la phase mobile :**

Il est recommandé de toujours employer des solvants traités spécifiquement (grade HLPC). Ils doivent être dégazés et filtrés avant usage. Le dégazage est effectué par ultra- sons ou par barbotage d'un gaz inerte chimiquement.

Si la phase stationnaire est polaire, on choisit une phase mobile peu polaire : la chromatographie est dite chromatographie en phases normales. Si la phase stationnaire est très peu polaire, on choisit une phase mobile polaire, le plus souvent un mélange méthanol/eau ou acétonitrile /eau : La chromatographie est dite chromatographie à polarité de phase inversée.

b. Pompe :

Elle délivre en continu la phase mobile. Elle est caractérisée par la pression qu'elle permet d'atteindre dans la colonne, le débit délivré et la stabilité du flux.

- Débit : 0.01 à 10 ml/min,
- stabilité < 1% (<0.2% pour des chromatographies d'exclusion diffusion)
- Pression maximum 5000 psi

b. Injecteur :

- **Injecteur manuel :**

Le type d'injecteur le plus couramment utilise comporte une vanne à boucle d'échantillonnage d'une capacité fixe (10, 20,50µl….).cette boucle permet d'introduire l'échantillonnage sans modifier la pression dans la colonne [44]

- **Injecteur automatique :**

Il permet de fixer automatiquement le volume d'injection le volume d'injection voulu à l'aide d'un ordinateur et l'injection se fait automatiquement [44]

Rapport-gratuit.com
LE NUMERO 1 MONDIAL DU MÉMOIRES

Rapport-gratuit.com
LE NUMERO 1 MONDIAL DU MÉMOIRES

d. colonne :

Les colonnes d'HPLC sont généralement courtes et droites en acier inoxydable capable de résister aux fortes pressions. La plupart des colonnes ont une longueur de 10 à 30 cm et un diamètre de 4 à 5 mm. Ces colonnes sont remplies de phase stationnaire, maintenue entre deux disques poreux situés aux extrémités et dont la taille des particules varie de 5 à 10 µm.

Ce type de colonne offre souvent de 40 000 à 60 000 plateaux par mètre. Le débit de la phase mobile ne peut dépasser quelques ml/min.

La colonne est souvent précédée par une pré-colonne pour augmenter sa durée de vie, dite colonne de garde, courte de 1cm, qui retient les composés indésirables. On change périodiquement cette pré-colonne, bien qu'il soit par ailleurs conseillé de filtrer les échantillons avant analyse à travers un filtre de porosité inférieure à 0,5µm.

e. Détecteurs :

Les détecteurs ont pour but de fournir un signal électrique reflétant en continu les variations de composition de l'éluant à la sortie de colonne ce qui permet de détecter les différents composés existant dans l'éluant. Dès lors, le dispositif utilisé dépend de la nature de l'échantillon.

IL existe plusieurs détecteurs:

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

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

f. Intégrateur :

Après la détection du signal sous forme d'un pic, l'intégrateur permet d'intégrer l'aire sous ce pic. L'aire sous le pic est proportionnelle à la quantité du produit à doser.

L'intégration du pic chromatographique, dépend de 2 paramètres : La largeur attendue des pics et le seuil d'intégration (sensibilité)

La largeur de pic est à peu près prévisible en fonctions de la technique d'analyse et des conditions opératoires.

Le seuil d'intégration est la valeur du signal à partir de laquelle le calculateur repère un début de pic [44]

V.3. Paramètres fondamentales de la chromatographie

- **Temps mort (Tm) :**

C'est le temps pour un compose non retenu par la phase stationnaire traverse la colonne.

- **Le Temps de rétention (Tr) :**

C'est une caractéristique de chaque soluté dans les conditions opératoires fixées ainsi que l'interaction la plus ou moins forte entre la phase mobile et la phase stationnaire (normale ou à polarité inversée) se répercute sur les temps de rétention des solutés. C'est le temps écoulé entre l'injection et le point maximal du pic.

Il dépond de plusieurs paramètres :

- Longueur de la colonne,
- La polarité et la composition de la phase mobile,
- La température de la colonne,
- Le débit,

- **Le facteur de capacité K' :**

Ce facteur s'apparente au coefficient de partage puisqu'il exprime le rapport de la quantité de soluté dans la phase stationnaire à la quantité de soluté dans la phase mobile. Ce facteur, sans dimension, peut être relié au temps de rétention. Il a l'avantage de ne dépendre ni du débit ni de la longueur de la colonne.

- **Facteur de sélectivité α :**

Ce facteur de sélectivité ou de séparation, sans dimension, est égal au rapport des facteurs de capacité de deux solutés dont on veut réaliser.

- **La résolution Rs:**

La résolution est une mesure de la quantité d'une séparation.

Deux caractéristiques déterminent le degré de recouvrement des pics :

a) La distance séparant les sommets de deux pics mesurée par t_{r2}-t_{r1}
b) La largeur des pics à la base I_1 et I_2

- **L'efficacité :**

La largeur d'un pic est caractéristique de l'efficacité de la séparation : plus le pic est fin plus la chromatographie est efficace. L'efficacité est mesurée par : le nombre de plateaux théoriques (Nth).

- **Nombre de plateaux théoriques N_{th} :**

C'est un paramètre qui sert à mesurer la performance d'une colonne à distillation fractionnée. Autant il est souhaitable dans une distillation fractionnée d'avoir le plus de distillations simples possibles pour obtenir la meilleure séparation des constituants d'un mélange autant-il souhaitable que le passage d'une substance de la phase mobile à la phase stationnaire et inversement se fasse sur la distance la plus courte possible. Le nombre de fois que ce phénomène se passe correspond à un plateau théorique.

VI. Validation d'une méthode d'analyse

VI.1. Définition

Selon la norme ICH (the International Conférence on Harmonisation), la validation d'une méthode est définie comme étant l'ensemble des opérations nécessaires pour prouver que le protocole est suffisamment exacte et fiable pour avoir confiance dans les résultats fournis et ceci pour un usage déterminé [45]

VI.2. Objectif

L'objectif de la validation d'une méthode analytique est de démontrer que chaque mesure réalisée ultérieurement en routine sera suffisamment proche de la valeur varie ou dans les limites acceptables selon le besoin de l'analyse. Les critères de la validation sont fixes en fonction de la finalité de la procédure analytique [46]

VI.3. Critères de la validation d'une méthode de dosage

Les critères de validation cités ci-dessous seront donc adaptés à ce type de démarche. Notons qu'il existe des logiciels qui permettent d'effectuer les tests statistiques de vérification de chacun de ces critères.

VI.3.1. Spécificité

Une méthode est dite spécifique lorsqu'on a la garantie que le signal mesuré provient uniquement de la substance à analyser.

La première partie de la validation est donc d'analyser ces différents composés de l'échantillon individuellement et de vérifier que l'on n'observe aucune interférence avec le signal du traceur [47]

VI.3.2. Linéarité

Il s'agit de la capacité, à l'intérieur d'un certain intervalle, d'obtenir des résultats directement proportionnels à la concentration en traceur à examiner dans l'échantillon.

L'intervalle de concentrations à valider est couvert par une série de 5 concentrations au minimum régulièrement espacées contenant le 100%,

VI.3.3. Exactitude

Elle exprime l'étroitesse de l'accord entre la valeur qui est acceptée soit comme une valeur conventionnellement vraie, soit comme une valeur de référence acceptée, et la valeur trouvée (valeur moyenne) obtenue en appliquant la procédure d'analyse sur un certain nombre de fois [47]

VI.3.4. Fidélité

La fidélité de la procédure exprime le degré de dispersion entre une série provenant de multiples prises d'un même échantillon homogène dans des conditions prescrites : les essais effectués sur des produits identiques dans des circonstances présumées identiques, ne conduisent généralement pas à des résultats identiques. Cela est dû à l'existence d'erreurs aléatoires, inhérentes à toute méthode d'essai.

Les facteurs contribuant à la variabilité d'une méthode analytique comprennent :

- L'opérateur,
- L'équipement utilisé
- L'étalonnage de l'équipement
- L'environnement (température, humidité, pollution de l'air,…)
- Les réactifs

La **fidélité** fournit une explication sur les erreurs liées au hasard. Elle s'exprime par la mesure de la reproductibilité et de la répétabilité. Ces deux mesures extrêmes de la variabilité sont suffisantes pour convenir à la plupart des cas courants :

La **répétabilité** se rapporte à des essais de la même grandeur, réalisés dans des conditions aussi stables que possible, dans de courts intervalles de temps, dans un même laboratoire, par le même opérateur employant le même équipement.

La **reproductibilité** à trait à des essais réalisés dans des conditions variables, par différents opérateurs et équipements, et à des jours différents.

Le protocole de détermination de ces critères peut être exprimé sous la forme d'un plan expérimental [47]

VI.3.5. Robustesse

L'étude de la robustesse permet de définir les variations admissibles de chacun des paramètres opératoires critiques qui sont sans effet sur la validité des résultats fournis, ces

paramètres étant étudiés séparément les uns des autres, ou regroupés. Comme pour l'étude de la linéarité, les essais de détermination de la robustesse sont regroupés sous la forme d'un plan d'expérience [38]

VI.3.6. Limites de détection et de quantification

La limite de détection (LD) est la plus petite quantité de la substance ciblée qui peut être détectée, mais pas exactement quantifiée dans un échantillon.

La limite de quantification (LQ) est la plus petite quantité de la substance ciblée dans un échantillon qui peut être déterminée dans des conditions expérimentales prescrites avec une exactitude bien définie.

VI.3.7. Justesse

Selon la norme NF ISO 3534, la justesse est définie comme l'étroitesse de l'accord entre la valeur moyenne obtenue à partir d'une large série de résultats d'essais et d'une valeur de référence acceptée. La justesse se mesure, à un niveau donné de concentration, dans la zone quantifiable pratique de la molécule. Elle s'exprime par l'erreur relative.

VI.4. Les caractéristiques analytiques applicables dans un cas particulier

Toutes les caractéristiques mentionnées ne doivent pas obligatoirement être prises en compte dans tous les cas; il faut donc déterminer dans chaque cas celles qui sont importantes. Toutefois, les principes ci-après sont généralement applicables [48]

Les méthodes utilisées pour examiner les produits pharmaceutiques peuvent être classées en quatre grandes catégories [48]:

• Classe A: Epreuves destinées à établir l'identité des substances pharmaceutiques en vrac ou d'un constituant d'une préparation pharmaceutique terminée.

• Classe B: Méthodes destinées à détecter et à doser des impuretés dans une substance en vrac ou dans une préparation terminée.

• Classe C: Méthodes utilisées pour déterminer quantitativement la concentration d'une substance en vrac ou d'un des principaux constituants d'une préparation pharmaceutique terminée.

• Classe D: Méthodes utilisées pour déterminer les caractéristiques des préparations pharmaceutiques terminées, par exemple le profil de dissolution ou l'uniformité de la teneur en principe actif.

Tableau 1: Caractéristiques à prendre en compte pour les différents types de méthodes analytiques [48]

	Classe A	Classe B		Classe C	Classe D
		Méthodes quantitatives	Méthodes qualitatives		
Exactitude		X		X	X
Précision		X		X	X
Robustesse	X	X	X	X	X
Linéarité et domaine d'utilisation		X		X	X
Sélectivité	X	X	X	X	X
Limite de détection	X		X		
Limite de dosage		X			

Le tableau 1 peut servir de guide pour déterminer les caractéristiques applicables dans chaque cas. Il y a évidemment des cas où certaines caractéristiques qui ne sont pas mentionnées peuvent être nécessaires, et vice versa. En outre, le but recherché peut influer sur le choix des caractéristiques et l'importance qui doit leur être accordée. Par exemple, le tableau 1 mentionne la précision parmi les caractéristiques exigées des méthodes des classes B, C et D, mais cette précision peut être plus ou moins grande selon le cas. Ainsi, il n'est peut-être pas nécessaire que l'estimation d'une impureté soit aussi précise que le dosage quantitatif d'une substance en vrac. De même, la précision d'une méthode de contrôle de l'uniformité de la teneur (classe D) pourrait être acceptable malgré une certaine erreur systématique, alors qu'une telle erreur serait inadmissible dans le dosage quantitatif d'une préparation pharmaceutique (classe C). Autre exemple: les caractéristiques exigées d'une méthode destinée à établir l'identité d'une nouvelle molécule active pour laquelle aucune donnée n'a encore été présentée devront probablement être beaucoup plus strictes que pour une méthode servant à vérifier l'identité d'une substance connue depuis longtemps en vue de son inclusion dans une pharmacopée [48]

L'importance des différentes caractéristiques n'est pas nécessairement la même selon qu'une méthode est destinée à figurer dans une pharmacopée ou à appuyer une demande d'homologation. Par exemple, la robustesse est une caractéristique essentielle des méthodes de la pharmacopée, mais elle peut être moins importante dans les spécifications établies par un fabricant pour le contrôle d'un de ses produits [48]

Chapitre II

Matériau et conditions expérimentales

Introduction

Dans la pratique courante, après l'étape d'optimisation, il devient de plus en plus évident et essentiel de démontrer à l'aide de la validation qu'une méthode optimisée correspond à l'usage attendu tout en fournissant, par ailleurs, des résultats fiables et reproductibles.

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, à l'usage futur de la méthode.

Dans ce volet, nous allons développer les différentes étapes à réaliser pour valider une méthode de dosage de paracétamol et caféine associés dans différentes formes pharmaceutiques par la technique de chromatographie liquide à haute performance (HPLC).

I. Appareillage

- Le système chromatographique HPLC-RP utilisé est constitué d'une pompe Waters 2695, un échantillonneur automatique Waters 2695, un mélangeur dégazeur Waters 2695, un détecteur à barrette d'iode (PDA) Water 2998, un logiciel Gestionnaire de Spectre et un enregistreur de données Empower Software.
- Balance : MettlerTolido AG 204
- pH-mètre : Schott Prolab 3000
- Bain à ultra son : SonicaSoltec

II. Etalons, produits finis et réactifs

- Standard de paracétamol (Etalon de travail d'une société pharmaceutique ayant un titre de 100.5% et la teneur en eau de 0.1%).
- Standard de caféine (Etalon de travail d'une société pharmaceutique ayant un titre de 99.8% et la teneur en eau de 0.11%).
- Produit finis ou médicaments a différente dosage sous forme de comprime (500mg /50mg), gélule (400mg/62.4mg) et sachet (500mg/50mg).
- Réactif : Méthanol (CH_3OH) grade HPLC (SEGMA ALDRICH).
- **Placebo**

Les excipients des 3 formes pharmaceutiques sont préparés selon la proportion de paracétamol et caféine déclarée par comprimé (500mg de paracétamol, 50mg de caféine).

Tableau 2: Quantités d'excipients utilisées et leurs fonctions.

INGREDIENTS	Pour un comprimé	Pour 10g P et de 1g de C	Fonctions
Povidone	10.5 mg	420 mg	Liant/Désagrégeant
Silicecolloïdaleanhydre	1mg	40 mg	Désintégrant/lubrifiant
Magnesiumstearate	5mg	200 mg	Lubrifiant
Saccharinatesodique	5 mg	200 mg	Edulcorant
Gélule en gélatine	5 mg	1760 mg	Liant
Lactose	112 mg	4480 mg	Diluant
Talc	2.5 mg	100 mg	Lubrifiant
Total	180 mg	7200 mg	

Peser les quantités de chaque excipient correspondant à 10g de Paracétamol et 1g de Caféine selon le tableau 2, puis broyer finement les excipients solide dans un mortier jusqu'à ce le mélange devient homogène.

III. Conditions chromatographiques

Tableau 3: Conditions chromatographique de la méthode.

Colonne	Colonne symétry RP C18, 150 mm×4,6mm, 3.5µm
Débit	1 ml/min
Température	Ambiante
Langueur d'onde	275 nm
Volume d'injection	10 µl
Phase mobile	(Méthanol /Eau distillé): (30% / 70%)
Temps d'acquisition	8Min
Milieu de dilution	Eau distillée

IV. Optimisation de la méthode

L'objectif principal de cette étude est d'optimiser et valider une nouvelle méthode de dosage simultané de paracétamol et caféine par HPLC sous différents formes pharmaceutiques conformément aux recommandations internationales de la conférence harmonisée (ICH) [50]

Pour mettre au point, nous avons effectué une recherche bibliographique sur le dosage du paracétamol et de la caféine [1-14], nous avons adopté les paramètres suivants :

- ✓ **Choix de la phase stationnaire**

Pour une bonne résolution et un gain en temps et réactifs nous avons choisi une colonne symétrique, RP C18, 150mm de longueur et 4,6 mm de diamètre interne avec une granulométrie d**e** 3.5µm**.**

- ✓ **Choix de la phase mobile**

La phase mobile choisie est simple et moins couteuse (30% méthanol, 70% eau distillé).

- ✓ **Choix du débit**

Plusieurs études ont été réalisées sur le débit de la méthode de 1ml/min à 2ml/min, pour réduire au maximum le temps de rétention (moins de rejet et plus d'économie) tout en gardant une bonne résolution, nous avons choisi un débit de 1ml/min.

- ✓ **Choix de la température**

L'étude de la température de la colonne a été testée sur trois gammes de températures 20°C, 25°C et 30°C on a constaté qu'il n'a pas de différence entre ces trois températures. Pour rendre la méthode plus simple nous avons choisi 25°C (température ambiante).

- ✓ **Choix du volume d'injection**

Pour une concentration de 0,5 mg/ml de Paracétamol et 0.05mg/ml de Caféine, Le volume d'injection choisi est de 10 µl et ce dans le but d'obtenir une bonne intégration des pics et avec moins d'erreurs**.**

- ✓ **Choix de la longueur d'onde (A.I)**

Le maximum d'absorption de paracétamol est à 246.5nm et celui de la caféine est à 272.6nm.

Nous avons choisi 275 nm comme valeur de la longueur d'onde de la méthode qui peut être utilisée pour le dosage simultané de ces deux principes actifs.

- ✓ **Choix du solvant de dilution**

Comme le paracétamol et la caféine sont assez solubles dans l'eau et pour rendre la méthode plus simple et plus économique nous avons adopté eau comme solvant de dilution.

V. Préparation des échantillons

V.1. Mode opératoire

Le mode opératoire utilisé pour la préparation de tous les échantillons est le suivant :

Une masse de l'échantillon (Principes Actifs Seule PAS, Placébo ou Forme Pharmaceutique Reconstituée FPR) est mise dans une fiole jaugée de 50 ml, 25 ml environ de l'eau distillée est ajoutée puis le mélange est passé à ultrason pendant 20 min jusqu'à ce que toute la substance soit dissoute (éviter une augmentation de la température) puis on complète au volume avec l'eau distillée. Faire une dilution au 1/5ème avec le même solvant. Enfin toute les solutions sont filtrée sur un filtre en polypropylène de cellulose de porosité 0,45 µm.

V.2. Préparation des échantillons pour l'étude de la spécificité

- Blanc: Eau distillée.
- Placebo: masse pesée environ 180 mg

Rapport-gratuit.com
LE NUMERO 1 MONDIAL DU MÉMOIRES

- Principe actif seul (PAS): masse pesée exactement 250 mg de paracétamol et 25 mg de caféine.
- Forme Pharmaceutique Reconstituée (FPR) : masse pesée exactement 250 mg de paracétamol, 25 mg de caféine et 180 mg de placébo.

V.3. Préparation des échantillons pour l'étude de la linéarité, exactitude et la fidélité

Selon l'ICH l'étude de la linéarité, exactitude et répétabilité est faite pour 3 séries sur cinq niveaux (70%,85%, 100%,115%,130%), et l'étude de la fidélité est faite 6 fois sur un seul niveau (100%) pour 3 séries de forme pharmaceutique reconstituée FPR.

La préparation des échantillons pour l'étude de la linéarité, exactitude et la fidélité se fait selon le mode opératoire indiqué ci-dessus.

Les pesées de paracétamol et la caféine pour chaque niveau de concentration pour les trois séries sont regroupées dans le tableau 3 et 4, la quantité du placebo ajoutée est constante pour chaque niveau de la forme pharmaceutique reconstitué (PFR), il est de 180 mg.

Tableau 4: Les pesées de paracétamol et caféine pour les PAS et les FPR pour l'étude de la linéarité, exactitude.

Séries	**Série 1**		**Série 2**		**Série 3**	
Niveaux	**PAS**en mg **(Par + Caf)**	**FPR** en mg **(Par + Caf)**	**PAS** en mg **(Par + Caf)**	**FPR** en mg **(Par + Caf)**	**PAS** en mg **(Par + Caf)**	**FPR** en mg **(Par + Caf)**
70%	175.26+17.47	175.15+17.56	175.30+17.42	175.60+17.37	175.91+17.76	175.42+17.99
85%	212.80+21.25	212.83+21.27	212.42+21.30	218.78+21.33	212.35+21.46	212.83+21.42
100%	250.44+25.17	250.61+25.05	250.57+24.84	250.74+24.46	250.56+25.21	250.30+25.44
115%	287.29+28.67	287.50+28.74	288.09+28.65	287.21+28.98	288.05+28.83	287.79+28.84
130%	324.95+32.25	324.97+32.57	325.78+32.48	325.58+32.45	325.31+32.76	324.89+32.78

Tableau 5: Les pesées de paracétamol et caféine pour la FPR niveau 100% pour l'étude de la fidélité**.**

Séries	**Série 1**		**Série 2**		**Série 3**	
Nombre de fois	Paracétamol	Caféine	Paracétamol	Caféine	Paracétamol	Caféine
1	250.04	24.97	249.91	25.25	250.04	24.71
2	250.03	25.41	249.87	25.45	250.46	25.68
3	250.35	25.21	250.82	25.69	250.52	25.05
4	249.44	25.65	249.50	25.66	250.19	24.91
5	249.30	24.73	249.96	25.56	249.80	24.95
6	250.02	25.21	250.56	25.39	249.76	25.37

V.4. Préparation des échantillons pour l'étude de la robustesse

Selon l'ICH l'étude de la Robustesse est faite sur un seul niveau (100%).

Rapport-gratuit.com
LE NUMERO 1 MONDIAL DU MÉMOIRES

Pour l'étude de la robustesse nous avons préparé deux standards (étalon de travail) et trois essais du produit fini (comprimé) selon le tableau 6.

Tableau 6: les pesées des standards et les essais pour l'étude de la robustesse.

Echantillons	Pesées (mg)	Solvant de dilution (ml)
STD1	250.27 (para)+25.30 (caf)	50ml
STD2	250.27 (para)+25.30 (caf)	50ml
Essais(E1)	425	50ml
Essais(E2)	424.80	50ml
Essais(E3)	425.10	50ml

V.5. Préparation des échantillons pour l'application de la méthode

Pour la vérification de la méthode nous avons procédé à son application pour le dosage du paracétamol et de la caféine dans ces trois formes pharmaceutiques :

- Comprime dosé à 500mg/50mg,
- Sachet dosé à 500mg/50mg,
- Gélule dosé à 400mg/64.5mg,

a. Préparation des solutions Standards

Les solutions standards sont préparées selon le mode opératoire décrit ci-dessus (250 mg paracétamol et 25 mg de caféine). La concentration du témoin en paracétamol est 0.5 mg/ml et celle de la caféine est de 0.05 mg/ml

b. Préparation des solutions Essais

- **Forme comprimé**

Peser 20 comprimés, déterminer leurs poids moyen et broyer les dans un mortier. Peser l'équivalent de 250 mg de paracétamol et 25 mg de caféine puis préparé les échantillons des 3 essais selon le mode opératoire décrit ci-dessus.

- **N.B** : le même mode opératoire et les mêmes standards sont utilisés pour les autres formes pharmaceutiques (sachet et gélule),

Les pesées des échantillons sont regroupées dans le tableau suivant:

Tableau 7: les pesées des standards et des essais pour les différentes formes

	Comprimé (mg)	Gélule (mg)	Sachet (mg)
STD1	250.90 (para)+25.75 (caf)	250.90 (para)+25.75 (caf)	250.90 (para)+25.75 (caf)
STD2	250.27 (para)+25.30 (caf)	250.27 (para)+25.30 (caf)	250.27 (para)+25.30 (caf)
Essais(E1)	425	271.90	371
Essais(E2)	424.80	271.80	371
Essais(E3)	425.10	271.60	371

V.6. Les méthodes statistiques utilisées pour la validation

Méthodes statistiques utilises pour la validation consiste uniquement :

- Premièrement à la validation des résultats, en s'assurant qu'il n'y a pas des résultats aberrants et que l'ensemble de ces résultats sont cohérent.
- Deuxièmement à estimer les limites de confiances.

Les tests statistiques les plus utilisés sont :

- Test de Dixon : pour éliminer les valeurs aberrantes.
- Test de Cochran : pour valider les variances.
- Test de Fisher : pour l'analyse des variances
- Test de Student : pour la construction d'un intervalle de confiance.

Chapitre III

Résultats et discussions

I. Conformité de système (A.I)

Les coefficients des variations (CV) de six injections de Paracétamol et de Caféine sont respectivement : 0,33% et 0,37%. Ils sont tous les deux inférieur à la norme fixée par la pharmacopée européenne (1%).

Les nombres de plateaux théoriques de Paracétamol et de Caféine sont respectivement : 21471,2 et 16733,9, est largement supérieur à 2000 et les facteurs d'asymétrie sont respectivement : 1.2% et 1,2%sont inférieur à 2%.

La résolution entre les deux pics (4.8) est largement supérieure à la norme fixée par la Pharmacopée Européenne (3,5).

Donc, la réponse du système est satisfaisante.

II. Sélectivité

La sélectivité de la méthode a été vérifiée en comparant des chromatogrammes types du blanc, du placebo, du PAS et de la FPR.

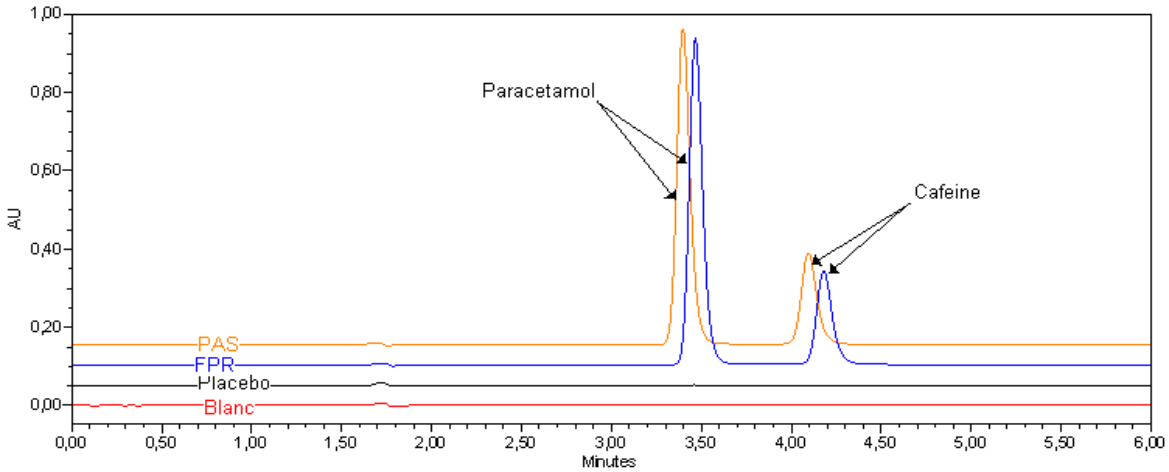


Figure 7 : Superposition des chromatogrammes de PAS, FPR, placebo et le blanc

D'après la superposition de ces chromatogrammes on remarque qu'il n'y a pas d'interférence des excipients avec les principes actifs. On peut conclure que cette méthode choisie est sélective pour le dosage simultané de ces deux principes actifs.

III. La linéarité (A.II)

La linéarité de la méthode permet de démontrer sa capacité d'obtenir des résultats directement proportionnels aux concentrations de Paracétamol et de Caféine á l'intérieur de l'intervalle de mesure choisi (70%, 85%, 100% ; 115%, 130%).

III.1 Homogénéité des variances

Avant d'effectuer des calculs de régression. Il convient de vérifier l'homogénéité des variances entre les différents niveaux selon le test Cochran.

- Calcul de la variance de chaque niveau :

$$S_i^2 = \frac{\sum_{j=1}^{n}(y_{ij}-\bar{Y}_i)^2}{n-1}$$ Avec $\bar{Y}_i$ la moyenne du niveau i

- La somme des variances des p niveaux : $\sum_{i=1}^{p} S_i^2$
- Recherche de la variance la plus élevée : S_{max}^2
- Le test de Cochran :$C = \frac{S_{max}^2}{\sum_{i=1}^{p} S_i^2}$
- Dans la table de Cochran on cherche $C_{(\alpha,n,p)}$ pour le risque α de 5%.

➢ p : le nombre de niveau (concentration) ; le niveau est repéré par l'indice i

➢ n : le nombre de série (mesure) ; la série est repérée par l'indice j

Nous avons reporté dans les tableaux 8 et 9, Les concentrations des différents niveaux et les aire correspondants, ainsi que la moyenne, et la variance $\mathbf{S_i^2}$ du PAS et FPR**.**

a. Paracétamol

Tableau 8: les données de la PAS pour la linéarité de paracétamol

Niveau	Xij	Yij	$\bar{Y}_{ij}$	S^2i
70%	175,26 175,30 175,91	131179 3031846 3031432	3064819	4,0985
85%	212,56 218,78 212,83	3764464 3679325 3613814	3685867,7	7,6125
100%	250,44 250,57 250,56	4431836 4326307 4305715	4354619,3	2,5466
115%	287,29 288,09 288,05	5018278 4896093 4887315	4933895,3	2,6650
130%	324,95 325,78 325,31	5606118 5593577 5549015	5582903,3	0,3213

Tableau 9: Les données de la FPR pour la linéarité de paracétamol

Niveau	Xij	Yij	$\bar{Y}_{ij}$	S^2i
70%	175,15 175,60 175,42	3025452 3009139 3026290	3020293,6	0,18251
85%	212,79 212,42 212,35	3640933 3598153 3617810	3618965,3	0,2488
100%	250,61 250,74 250,30	4301434 4245153 4244991	4263859,3	0,5429
115%	287,50 287,21 287,79	4924720 4877908 4840253	4880960,3	0,8164
130%	324,97 325,58 324,89	5542265 5515828 5530701	5529598	0,1154

Tableau 10: Test de Cochran pour le calcul d'homogénéité des variances de paracétamol

Test de cochran PAS			
S^2_{max}	$\sum S^2_i$	C_{cal}	$C_{(5\%, 3.5)}$
7,612	17,244	0,441	0,684

Test de cochran FPR			
S^2_{max}	$\sum S^2_i$	C_{cal}	$C_{(5\%, 3.5)}$
0,816	1,9061	0,428	0,684

D'après le test de Cochran on remarque que la valeur de C_{cal} est inférieure à $C_{(5\%, 3,5)}$, donc l'ensemble des variances des différents niveaux soit pour le PAS ou la FPR de Paracétamol sont homogènes au risque de 5%.

b. Caféine

Nous avons reporté dans les tableaux 11 et 12. Les concentrations des différents niveaux et les aire correspondants, ainsi que la moyenne, et la variance S_i^2 du PAS et FPR.

Tableau 11: Les données de la PAS pour la linéarité de caféine.

Niveau	Xij	Yij	Ȳ	S^2i
70%	17,47	1074714	1069018,3	2,8260
	17,42	1070977		
	17,76	1061364		
85%	21,25	1312787	1288654,0	4,2466
	21,30	1278121		
	21,46	1275054		
100%	25,17	1539620	1508968,3	4,4430
	24,84	1505752		
	25,21	1481533		
115%	28,67	1741010	1708595,3	4,7607
	28,65	1708787		
	28,83	1675989		
130%	32,45	1957081	1935540,3	2,4135
	32,48	1934194		
	32,76	1915346		

Tableau 12: Les données de la FPR pour la linéarité de caféine

Niveau	Xij	Yij	Ȳ	S^2i
70%	17,56	1064556	1067025,3	0,9210
	17,37	1039603		
	17,99	1096917		
85%	21,27	1289585	1265019,7	4,5402
	21,33	1260825		
	21,42	1244649		
100%	25,05	1477694	1477408,3	0,8526
	25,46	1479366		
	25,45	1475165		
115%	28,74	1715872	1691032	2,9425
	28,98	1694060		
	28,84	1663164		
130%	32,57	1946184	1929683,3	1,7183
	32,45	1931682		
	32,78	1911184		

Tableau 13: Test de Cochran pour le calcul d'homogénéité des variances de caféine

Test de Cochran (PAS)			
S^2_{max}	$\sum S^2_i$	C_{cal}	$C_{(5\%, 3.5)}$
4,761	18,690	0,255	0,684

Test de Cochran FPR			
S^2_{max}	$\sum S^2_i$	C_{cal}	$C_{(5\%, 3.5)}$
4,540	10,975	0,414	0,684

Rapport-Gratuit.com

D'après le test de Cochran on remarque que la valeur de C_{cal} est inférieure à $C_{(5\%,\ 3,5)}$, donc l'ensemble des variances des différents niveaux soit pour le PAS ou la FPR de Caféine sont homogènes au risque de 5%.

III.2. Régression linéaires (A.II)

La méthode statistique de régression des moindres carrés permet d'établir la droite d'étalonnage et de calculer les incertitudes associées à son usage ultérieur.

D : **y= ax+b** avec S^2_a variance de a, S^2_b variance de b, r coefficient de corrélation

- Nombre total des mesures : N= n*p= 5*3=15
- Moyenne générale des X_{ij} : $\bar{\bar{X}} = \frac{\sum\sum x_{ij}}{N}$
- Moyenne générale des Y_{ij} : $\bar{\bar{Y}} = \frac{\sum\sum y_{ij}}{N}$
- Somme des carrés des écarts pour X_{ij} : $SCE_x = \sum\sum (X_{ij}-\bar{\bar{X}})^2$
- Somme des carrés des écarts pour Y_{ij} : $SCE_Y = \sum\sum (Y_{ij}-\bar{\bar{Y}})^2$
- Somme des produits des écarts : $SCE_{xy} = \sum\sum (X_{ij}-\bar{\bar{X}})(Y_{ij}-\bar{\bar{Y}})$

a. Paracétamol :

Les calculs des pentes ($a_1$et a_2), des ordonnés à l'origine (b_1 et b_2), des variances associées (Sa_1^2, Sb_1^2, Sa_2^2, Sb_2^2) et les coefficients de corrélation (r_1 et r_2) sont effectuées a l'aide des tableaux 14 et 15

Tableau 14: les données pour le calcul de la régression linéaires de paracétamol PAS

Niveau	X_{ij}	Y_{ij}	$(X_{ij}-\bar{\bar{X}})$	$(X_{ij}-\bar{\bar{X}})^2$	$(Y_{ij}-\bar{\bar{Y}})$	$(Y_{ij}-\bar{\bar{Y}})^2$	$(X_{ij}-\bar{\bar{X}})(Y_{ij}-\bar{\bar{Y}})$
70%	175.26	3131179	75.52	5703.07	$1.193\ 10^6$	$1,424\ 10^{12}$	$9,011\ 10^7$
	175.30	3031846	75.48	5697.03	$1.293\ 10^6$	$1,671\ 10^{12}$	$9.756\ 10^7$
	175.91	3031432	74.87	5605.32	$1.293\ 10^6$	$1,672\ 10^{12}$	$9.680\ 10^7$
85%	212.50	3764464	38.22	1460.67	$5.599\ 10^5$	$3,135\ 10^{11}$	$2.140\ 10^7$
	218.78	3679325	32.00	1093.21	$6.451\ 10^5$	$4.161\ 10^{11}$	$2.064\ 10^7$
	212.83	3613814	37.95	1440.10	$7.106\ 10^5$	$5,096\ 10^{11}$	2.69710^7
100%	250.44	4431836	0.34	1333.08	$1.074\ 10^5$	$1,154\ 10^{10}$	$3.638\ 10^4$
	250.57	4326307	0.21	1392.14	$1.886\ 10^3$	$3,557\ 10^6$	$3.965\ 10^2$
	250.56	4305715	0.22	1389.15	$1.870\ 10^4$	$3.500\ 10^8$	$4.090\ 10^3$
115%	287.29	5018278	36.51	13333.08	$6.938\ 10^5$	$4,814\ 10^{11}$	$2.533\ 10^7$
	288.09	4896093	37.30	1392.14	$5.717\ 10^5$	$3.268\ 10^{11}$	$2.133\ 10^7$
	288.05	4887315	37.30	1389.15	$5.629\ 10^5$	$3.168\ 10^{11}$	$2.098\ 10^7$
130%	324.95	5606118	74.17	5501.39	$1.282\ 10^6$	$1,642\ 10^{12}$	$9.506\ 10^7$
	325.78	5593577	75.00	5625.20	$1.269\ 10^6$	$1,610\ 10^{12}$	$9.519\ 10^7$
	325.31	5549015	74.53	5554.92	$1.225\ 10^6$	$1,499\ 10^{12}$	$9.127\ 10^7$
	250.78	4324421		41726.10		$1.189\ 10^{13}$	7.02710^8
	$\bar{\bar{X}}$	$\bar{\bar{Y}}$		SCE_x		SCE_Y	SPE_{xy}

Tableau 15: Les données pour le calcul de la régression linéaires de Paracétamol FPR

Niveau	X_{ij}	Y_{ij}	$(X_{ij}-\bar{\bar{X}})$	$(X_{ij}-\bar{\bar{X}})^2$	$(Y_{ij}-\bar{\bar{Y}})$	$(Y_{ij}-\bar{\bar{Y}})^2$	$(X_{ij}-\bar{\bar{X}})(Y_{ij}-\bar{\bar{Y}})$
70%	175.15	3025452	75.07	$5.636\ 10^3$	$1.237\ 10^6$	$1,531\ 10^{12}$	$9,289\ 10^7$
	175.60	3009139	74.62	$5.569\ 10^3$	$1.253\ 10^6$	$1,572\ 10^{12}$	$9.355\ 10^7$
	175.42	3026290	74.80	$5.595\ 10^3$	$1.236\ 10^6$	$1,529\ 10^{12}$	$9.248\ 10^7$
85%	212.80	3640933	37.42	$1.401\ 10^3$	$6.218\ 10^6$	$3,866\ 10^{11}$	$2.327\ 10^7$
	218.42	3598153	37.80	$1.429\ 10^3$	$6.646\ 10^6$	$4,418\ 10^{11}$	$2.512\ 10^7$
	212.35	3617810	37.88	$1.435\ 10^3$	$6.449\ 10^6$	$4,159\ 10^{11}$	$2.443\ 10^7$
100%	250.61	4301434	0.39	0.150	$3.870\ 10^4$	$1,498\ 10^9$	$1.516\ 10^4$
	250.74	4445153	0.51	0.260	$1.758\ 10^4$	$3,091\ 10^6$	$9.053\ 10^3$
	250.30	4244991	0.08	0.006	$1.774\ 10^4$	$3.148\ 10^8$	$1.435\ 10^3$
115%	287.50	4924720	37.27	$1.389\ 10^6$	$6.620\ 10^5$	$4,382\ 10^{11}$	$2.467\ 10^7$
	287.21	4877908	36.99	$1.368\ 10^6$	$6.152\ 10^5$	$3.784\ 10^{11}$	$2.275\ 10^7$
	287.79	4840253	37.57	$1.411\ 10^3$	$5.775\ 10^5$	$3.335\ 10^{11}$	$2.170\ 10^7$
130%	324.97	5542265	74.74	$5.587\ 10^3$	$1.279\ 10^6$	$1,63710^{12}$	$9.564\ 10^7$
	325.58	5515828	75.36	$5.679\ 10^3$	$1.253\ 10^6$	$1,570\ 10^{12}$	$9.443\ 10^7$
	324.89	5560701	74.67	$5.575\ 10^3$	$1.268\ 10^6$	$1,60810^{12}$	$9.468\ 10^7$
	250.22	4262735		$4.207\ 10^4$		$1.184\ 10^{13}$	7.05610^8
	$\bar{\bar{X}}$	$\bar{\bar{Y}}$		SCE_x		SCE_Y	SPE_{xy}

D_1= a_1x+b_1 (droite du PAS) et **D_2= a_2x+b_2** (droite du FPR)

- **Calcul des pentes (a_1 et a_2)**

La pente de la droite de régression est calculée d'après la formule suivante :

$$a = \frac{SPExy}{SCEx}$$

Donc a_1= 16840.70 et a_2= 16771.26

- **Calcul des ordonnées à l'origine (b_1 et b_2)**

L'ordonnées à l'origine de régression est calculé d'après la formule suivante :

$b = \bar{\bar{Y}} - a\,\bar{\bar{X}}$ Donc **b_1 = 101143.45 et b_2 = 66179.01**

D'où l'équation de la droite de régression : (PAS) : **y_1= 16840.70x + 101143.45**

(FPR) : **y_2=16771.26x + 66179.01**

- **Calcul des coefficients de corrélation (r_1 et r_2)**

Coefficient de corrélation est calculé d'après la formule suivante :

$r = \frac{SPExy}{\sqrt{SCEx\ SCEY}}$ Donc **r_1= 0,995 et r_2= 0,999**

Rapport-gratuit.com
LE NUMERO 1 MONDIAL DU MÉMOIRES

- **Détermination des variances des pentes et des ordonnées a l'origine (S_a^2 et S_b^2)**
  - Les écart-type des résidus :

$$S_r = \sqrt{\frac{SCEy - aSCExy}{N-2}}$$ Donc : **Sr_1=66400,05** et **Sr_2=25481,67**

  - Les écart-type des pentes :

$$S_a = \sqrt{\frac{S_r^2}{SCEx}}$$ Donc **:** **Sa_1= 325,06** et **Sa_2= 124,23**

  - Les écart-type des ordonnées à l' origine :

$$S_b = \sqrt{S_r^2\left[\frac{1}{N} + \frac{\bar{\bar{X}}^2}{SCE_x}\right]}$$ Donc : **Sb_1= 83301,57 et Sb_2=31773,37**

- **Détermination des intervalles de confiance pour les pentes et les ordonnées a l'origine**

Les valeurs vraies de a et b sont donnés par les expressions suivantes :

  - Pour les pentes :

IC = $a_1 \pm t_{(0.975,\ N-2)}.S_a$, donc : **16264,97 < a_1 < 17416,34** et **16551,25 < a_2 < 16991,26**

  - Pour les ordonnées à l'origine :

IC= $b_1 \pm t_{(0.975,\ N-2)}.S_b$, donc : **-46383,64 < b1< 248670,54** et **9908,36 < b2 < 122449,69**

Avec $t_{(0.975,\ N-2)}$: est le coefficient de Student pour un seuil de confiance de 5% et N-2 degrés de liberté ($t_{(95\%,N-2)}$ = 1.771).

L'intervalle de confiance de l'ordonné à l'origine contient le zéro, donc on peut calibrer notre courbe par un seul point (le 100%).

b. Caféine

Les calculs des pentes (a_1 et a_2), des ordonnés à l'origine (b_1 et b_2), des variances associées (Sa_1^2, Sb_1^2, Sa_2^2, Sb_2^2) et les coefficients de corrélation (r_1 et r_2) sont effectuées à l'aide des tableaux 16 et 17.

Tableau 16: Les données pour le calcul de la régression linéaires de caféine (PAS)

Niveau	Xij	Yij	$(X_{ij}-\bar{\bar{X}})$	$(X_{ij}-\bar{\bar{X}})^2$	$(Y_{ij}-\bar{\bar{Y}})$	$(Y_{ij}-\bar{\bar{Y}})^2$	$(X_{ij}-\bar{\bar{X}})(Y_{ij}-\bar{\bar{Y}})$
70%	17.47	1074714	7.578	57.426	$4.274\ 10^5$	$1,827\ 10^{11}$	$3.239\ 10^6$
	17.42	1070977	7.628	58.186	$4.312\ 10^5$	$1,859\ 10^{11}$	$3.289\ 10^6$
	17.76	1061364	7.288	53.115	$4.408\ 10^5$	$1,943\ 10^{11}$	$3.212\ 10^6$
85%	21.25	1312787	3.798	14.425	$1.893\ 10^5$	$3,517\ 10^{10}$	$7.192\ 10^6$
	21.30	1278121	3.748	14.047	$2.240\ 10^5$	5.08110^{10}	$8.397\ 10^6$
	21.46	1275054	3.588	12.874	$2.271\ 10^5$	$5,152\ 10^{10}$	$8.148\ 10^6$
100%	25.17	1539620	0.122	0.015	$3.746\ 10^4$	$1,404\ 10^9$	$4.570\ 10^3$
	24.84	1505752	0.208	0.043	$3.597\ 10^3$	$1.294\ 10^8$	$7.481\ 10^2$
	25.21	1481533	0.162	0.026	$2.062\ 10^4$	$4.253\ 10^8$	$3.340\ 10^3$
115%	28.67	1741010	3.622	13.119	2.388	$5.705\ 10^{10}$	$8.651\ 10^5$
	28.65	1708787	3.602	12.974	2.066	$4.269\ 10^{10}$	$7.443\ 10^5$
	28.83	1675989	3.782	14.303	$1.738\ 10^5$	$3.022\ 10^{10}$	$6.574\ 10^5$
130%	32.45	1957081	7.402	54.789	$4.549\ 10^5$	$2.069\ 10^{11}$	$9.506\ 10^7$
	32.48	1934194	7.432	55.235	$4.320\ 10^5$	$1,867\ 10^{11}$	$9.519\ 10^7$
	32.76	1915346	7.712	59.475	$4.132\ 10^5$	$1,707\ 10^{11}$	$9.127\ 10^7$
	25.05	1502155.3		420.054		$1.397\ 10^{12}$	$2.415\ 10^7$
	$\bar{\bar{X}}$	$\bar{\bar{Y}}$		**SCEx**		**SCEy**	**SPExy**

Tableau 17: les données pour le calcul de la régression linéaires de caféine (FPR)

Niveau	Xij	Yij	$(X_{ij}-\bar{\bar{X}})$	$(X_{ij}-\bar{\bar{X}})^2$	$(Y_{ij}-\bar{\bar{Y}})$	$(Y_{ij}-\bar{\bar{Y}})$	$(X_{ij}-\bar{\bar{X}})(Y_{ij}-\bar{\bar{Y}})$
70%	17.56	1064556	7.588	57.580	$4.215\ 10^5$	$1,776\ 10^{11}$	$3.198\ 10^6$
	17.37	1039603	7.783	60.577	$4.464\ 10^5$	$1,993\ 10^{11}$	$3.475\ 10^6$
	17.99	1096917	7.163	51.310	$3.891\ 10^5$	$1,514\ 10^{11}$	$2.787\ 10^6$
85%	21.27	1289585	3.798	14.425	$1.964\ 10^5$	$3,5\ 10^{10}$	$7.192\ 10^6$
	21.33	1260825	3.748	14.047	$2.252\ 10^5$	$5.0\ 10^{10}$	$8.397\ 10^6$
	21.42	1244649	3.588	12.874	$2.414\ 10^5$	$5,1\ 10^{10}$	$8.148\ 10^6$
100%	25.05	1477694	0.098	0.009	$8.400\ 10^4$	$6.955\ 10^7$	$8.180\ 10^2$
	25.46	1479366	0.313	0.097	$6.667\ 10^3$	$4.446\ 10^7$	$2.086\ 10^3$
	25.45	1475165	0.295	0.087	$1.087\ 10^4$	$1.181\ 10^8$	$3.205\ 10^3$
115%	28.74	1715872	3.588	12.880	2.30010^5	$5.283\ 10^{10}$	$8.249\ 10^5$
	28.98	1694060	3.831	14.683	2.08010^5	$4.327\ 10^{10}$	$7.971\ 10^5$
	28.84	1663164	3.685	13.586	$1.771\ 10^5$	3.13710^{10}	$6.529\ 10^5$
130%	32.57	1946184	7.417	55.025	$4.601\ 10^5$	$2.117\ 10^{11}$	3.41310^6
	32.45	1931682	7.303	53.346	$4.456\ 10^5$	$1,986\ 10^{11}$	$3.255\ 10^6$
	32.78	1911184	7.632	58.245	$4.251\ 10^5$	$1,80710^{11}$	3.24510^6
	25.15	1486033		421.028		$1.395\ 10^{12}$	$2.418\ 10^7$
	$\bar{\bar{X}}$	$\bar{\bar{Y}}$		**SCEx**		**SCEy**	**SPExy**

D_1= a_1x+b_1 (droite du PAS) et **D_2= a_2x+b_2** (droite du FPR)

- **Calcul des pentes (a_1 et a_2)**

La pente de la droite de régression est calculée d'après la formule suivante :

$$a = \frac{SPExy}{SCEx}$$ Donc **a_1= 57503.90** et **a_2=57426.48**

- **Calcul des ordonnées a l'origine (b_1 et b_2)**

L'ordonnées à l'origine de régression est calculé d'après la formule suivante :

$$b = \bar{\bar{Y}} - a\,\bar{\bar{X}}$$ Donc b_1= **61798.28** et b_2= **41692.67**

D'où l'équation de la droite de régression :

(PAS) : $y_1 = 57503.60x + 61798.28$

(FPR) : $y_2 = 57426.48x + 41692.67$

- **Calcul des coefficients de corrélation (r_1 et r_2)**

Coefficient de corrélation est calculé d'après la formule suivante :

$$r = \frac{SPExy}{\sqrt{SCEx\ SCEY}}$$ Donc r_1= **0,994** **et** r_2= **0,995**

- **Détermination des variances des pentes et des ordonnées a l'origine (S_a^2 et S_b^2)**
  - Les écart-type des résidus :

$$S_r = \sqrt{\frac{SCEy - aSCExy}{N-2}}$$ Donc: Sr_1=**24343,73** et Sr_2=**21958,30**

  - Les écart-type des pentes :

$$S_a = \sqrt{\frac{S_r^2}{SCEx}}$$ Donc **:** Sa_1= **1187,78**et Sa_2= **1070,15**

  - Les écart-type des ordonnées à l' origine :

$$S_b = \sqrt{S_r^2\left[\frac{1}{N} + \frac{\bar{\bar{X}}^2}{SCE_x}\right]}$$ Donc : S_{b1}= **30408,13** et S_{b2}=**27506,06**

- **Détermination des intervalles de confiance pour les pentes et les ordonnées a l'origine**

Les valeurs vraies de a et b sont donnés par les expressions suivantes :

  - Pour les pentes :

$IC = a \pm t_{(0.975,N-2)} * S_a$, donc : **55400,32 < a_1 < 59607,42** et **55531,25<a_2<59321,71**

  - Pour les ordonnées à l'origine :

$IC = b \pm t_{(0.975,N-2)} * S_b$, donc : **7945,48 < b_1 < 115651,09** et **-7020,55 < b_2 < 90405,89**

Avec $t_{(0.975,N-2)}$*est le coefficient de Student pour un seuil de confiance de 5% et N-2 degrés de liberté $t_{(0.975,N-2)}$***1.771**.

L'intervalle de confiance de l'ordonné à l'origine contient le zéro, donc on peut calibrer notre courbe par un seul point (le 100%).

III.3. Tests d'adéquation du modèle linéaire par analyse de variance

L'analyse de variance peut être utilisée pour tester la validité du modèle linéaire. Deux tests de Fisher sont réalisés afin de s'assurer de :

- L'existence d'une pente significative (validité de la régression)
- Validité de la droite de régression (validité de la droite sur toute la gamme)

III.3.1. vérification de l'existence d'une pente significative

Ce test consiste à vérifier l'existence d'une pente (régression acceptable) c'est-à-dire de s'assurer que la pente provient bien de la régression et non pas des erreurs résiduelles.

- La moyenne des moyens (moyenne générale) : $\bar{\bar{Y}} = \sum Y_{ij}$
- Somme des carrés des écarts résiduels : $SCE_r = \sum_{i=1}^{p} \sum_{j=1}^{n_j} (Y_{ij} - \bar{Y}_{ij})^2$
- Somme des carrés des écarts dus à la régression : $SCE_l = \sum_{i=1}^{p} \sum_{j=1}^{n_j} (\bar{Y}_{ij} - \bar{\bar{Y}})^2$
- Variance résiduel : $S_r^2 = \frac{SCE_r}{N-2}$
- Variance dû à la régression : $S_l^2 = \frac{SCE_l}{1}$

Le facteur de Fischer est calculé selon la formule suivante :

$F_l = \frac{S_l^2}{S_r^2} > F_{(\alpha;1;N-2)}$ Avec : $\mathbf{F_{(\alpha;1;N-2)}}$ lu dans la table de Ficher

α: risque de première espèce (α=5%)

S_l^2: Variancede régression linéaire.

S_r^2: Variance résiduelle

a. Paracétamol

Les valeurs des variances S_l^2 et S_r^2 sont calculées à l'aide des tableaux suivants :

Tableau 18: Les données pour le calcul des variances S_1^2 et S_r^2 de paracétamol (PAS)

Niveau	X_{ij}	Y_{ij}	$\bar{Y}_{ij}$	$(\bar{Y}- Y_{ij})$	$(\bar{Y}- Y_{ij})^2$	$(\bar{Y}- \bar{\bar{Y}})^2$
70%	175,26	3131179		-66360,000	4403649600	
	175,30	3031846	3064819	32973,000	1087218729	1,5866E+12
	175,91	3031432		33387,000	1114691769	
85%	212,56	3764464		-78596,333	6177383613	
	218,78	3679325	3685867,7	6542,667	42806487,11	407750274371
	212,83	3613814		72053,667	5191730880	
100%	250,44	4431836		-77216,667	5962413611	
	250,57	4326307	4354619,33	28312,333	801588218,8	911943362,6
	250,56	4305715		48904,333	2391633819	
115%	287,29	5018278		-84382,667	7120434434	
	288,09	4896093	4933895,33	37802,333	1429016405	3,71459E+11
	288,05	4887315		46580,333	2169727453	
130%	324,95	5606118		-23214,667	538920748,4	
	325,78	5593577	5582903,33	-10673,667	113927160,1	1,58378E+12
	325,31	5549015		33888,333	1148419136	
	4324421				**3,9694E+10**	**3,9505E+12**
	$\bar{\bar{Y}}$				**SCEr**	**SCE_1**

Tableau 19: Les données pour le calcul des variances S_1^2 et S_r^2 de paracétamol (FPR)

Niveau	Xij	Yij	$\bar{Y}_{ij}$	$(\bar{Y}- Y_{ij})$	$(\bar{Y}- Y_{ij})^2$	$(\bar{Y}- \bar{\bar{Y}})^2$
70%	175,1500000	3025452		-5158,333	26608402,78	1,54366E+12
	175,6000000	3009139	3020293,67	11154,667	124426588,4	
	175,4240000	3026290		-5996,333	35956013,44	
85%	212,7990000	3640933		-21967,667	482578378,8	
	212,4250000	3598153	3618965,3	20812,333	433153218,8	414439812900
	212,3470000	3617810		1155,333	1334795,111	
100%	250,6150000	4301434		-37574,667	1411855575	
	250,7380000	4245153	4263859,33	18706,333	349926906,8	1263376,0
	250,3040000	4244991		18868,333	356014002,8	
115%	287,4960000	4924720		-43759,667	1914908427	
	287,2100000	4877908	4880960,33	3052,333	9316738,778	3,82202E+11
	287,7940000	4840253		40707,333	1657086987	
130%	324,9680000	5542265		-12667,000	160452889	
	325,5840000	5515828	5529598	13770,000	189612900	1,60494E+12
	324,8930000	5530701		-1103,000	1216609	
	4262735				**7154448433**	**3,94525E+12**
	$\bar{\bar{Y}}$				**SCEr**	**SCE_1**

Les résultats des tests de ficher pour la vérification de l'existence d'une pente significative sont présentes dans les tableaux 20 et 21.

Tableau 20: Résultat du test de ficher pour le paracétamol (PAS)

TEST DE FISHER					
origine de la variation	**Ddl**	**SCE**	**Variance**	**Fcal**	**$F_{(0,05,1,13)}$**
Variation due à la Régression	1	1,1851E+13	1,18515E+13	3881,47	4,67
Variation résiduelle	13	3,9694E+10	3053350928		
Total	14	1,1891E+13	8,4937E+11		

Tableau 21: Résultat du test de ficher pour paracétamol (FPR)

TEST DE FISHER					
origine de la variation	**Ddl**	**SCE**	**Variance**	**Fcal**	**$F_{(0,05,1,13)}$**
Variation due à la Régression	1	1,1836E+13	1,18357E+13	21506,14	4,67
Variation résiduelle	13	7154448433	550342187,1		
Total	14	1,1843E+13	8,45921E+11		

Selon le test de Fischer, $C_{alculé} > F_{(5\%, 1,13)} = 4,67$, nous pouvons conclure l'existence d'une pente significative pour le PAS et pour la FPR.

b. Caféine

Les valeurs des variances S_l^2 et S_r^2 sont calculées à l'aide des tableaux suivants (PAS, FPR) :

Tableau 22: Les données pour le calcul des variances S_1^2 et S_r^2 pour la caféine PAS

Niveau	**X_{ij}**	**Y_{ij}**	**$\bar{Y}_{ij}$**	**$(\bar{Y}- Y_{ij})$**	**$(\bar{Y}- Y_{ij})^2$**	**$(\bar{Y}- \bar{\bar{Y}})^2$**
70%	17.47	1074714		-5695,667	32440618,8	1,87608E+11
	17.42	1070977	1069018,33	-1958,667	3836375,1	
	17.76	1061364		7654,333	58588818,7	
85%	21.25	1312787		-24133,000	582401689	
	21.30	1278121	1288654,0	10533,000	110944089	45582790868
	21.46	1275054		13600,000	184960000	
100%	25.17	1539620		-30651,667	939524669,4	
	24.84	1505752	1508968,33	3216,333	10344800,1	42617501125
	25.21	1481533		27435,333	752697515,1	
115%	28.67	1741010		-32414,667	1050710615	
	28.65	1708787	1708595,33	-191,667	36736,11111	42617501125
	28.83	1675989		32606,333	1063172973	
130%	32.45	1957081		-21540,667	464000320,4	
	32.48	1934194	1935540,33	1346,333	1812613,4	1,87823E+11
	32.76	1915346		20194,333	407811098,8	
		1502155			**5663282933**	**4,63677E+11**
		$\bar{\bar{Y}}$			**SCEr**	**SCE_1**

Tableau 23: les données pour le calcul des variances S_1^2 et S_r^2 pour la caféine FPR

Niveau	Xij	Y_{ij}	$\bar{Y}_{ij}$	$(\bar{Y}- Y_{ij})$	$(\bar{Y}- Y_{ij})^2$	$(\bar{Y}- \bar{\bar{Y}})^2$
70%	17,56	1064556		2469,333	6097607,1	
	17,37	1039603	1067025,33	27422,333	751984365,4	1,75568E+11
	17,99	1096917		-29891,667	893511736,1	
85%	21,27	1289585		-24565,333	603455601,8	
	21,33	1260825	1265019,7	4194,667	17595228,4	48847217665
	21,42	1244649		20370,667	414964060,4	
100%	25,05	1477694		-285,667	81605,4	
	25,46	1479366	1477408,33	-1957,667	3832458,7	74397525,2
	25,45	1475165		2243,333	5032544,4	
115%	28,74	1715872		-24840,000	617025600	
	28,98	1694060	1691032	-3028,000	9168784	42024289336
	28,84	1663164		27868,000	776625424	
130%	32,57	1946184		-16500,667	272272000,4	
	32,45	1931682	1929683,33	-1998,667	3994668,4	1,96825E+11
	32,78	1911184		18499,333	342225333,8	
		1502155			**4717867019**	**4.63339 E+11**
		$\bar{\bar{Y}}$			SCE_r	SCE_l

Les résultats des tests de Fischer pour la vérification de l'existence d'une pente significative sont regroupés dans les tableaux suivants (PAS) et (FPR) :

Tableau 24: Résultat du test de ficher pour la caféine (PAS)

TEST DE FISHER					
Origine de la variation	**Ddl**	**SCE**	**Variance**	**Fcal**	$F_{(0,05,1,13)}$
Variation due à la Régression	1	1,391E+12	1,39103E+12	3193,09	4,67
Variation résiduelle	13	5663282933	435637148,7		
Total	14	1,3967E+12	99763862116		

Tableau 25: Résultat du test de ficher pour la caféine (FPR)

TEST DE FISHER					
Origine de la variation	**Ddl**	**SCE**	**Variance**	**Fcal**	$F_{(0,05,1,13)}$
Variation due à la Régression	1	1,39E+12	1,39002E+12	3830,17	4,67
Variation résiduelle	13	4717867019	362912847,6		
Total	14	1,3947E+12	99623900082		

selon le test de Fisher, $F_{cal} > F_{(5\%,1,13)}$ nous pouvons conclure l'existence d'une pente significative pour le PAS et pour la FPR.

III.3.2. vérification de la droite de régression

Ce test consiste à vérifier la validité de la droite de régression (c'est bien une droite dans tout le domaine choisi) c'est-à-dire de s'assurer que la variance caractérisant l'erreur dû à une erreur de modèle est bien inférieure à l'erreur expérimentale.

$F_{nl} = \frac{S^2_{nl}}{S^2_e} < F_{(\alpha;1;p-2;N-2))}$ Avec : $F_{(\alpha\,;1;p-2\,;N-2)}$ lu dans la table de Fischer

α: risque de première espèce (α=5%)

S^2_e : Variance expérimentale

S^2_{n1}: Variance du modèle (non linéaire)

a. Paracétamol

Les données pour le calcul des variances S^2_{n1} et S^2_e sont regroupées dans les tableaux 26 et 27.

Tableau 26: les données pour le calcul des variances S_{1n}^2 et S_e^2 pour le paracétamol PAS

Niveau	Xij	Yij	$\bar{Y}$	$((Y_{ij} - \bar{Y}_{i})$	$\hat{Y}$	SCE_{nl}
70%	175,26	3131179		4403649600	3052637	148401650
	175,30	3031846	3064819,0	1087218729	3053311	132443163
	175,91	3031432		1114691769	3063583	1526694,107
85%	212,56	3764464		6177383613	3680793	25747362,36
	218,78	3679325	3685867,7	42806487	3785542	9935045829
	212,83	3613814		5191730880	3685340	277948,8214
100%	250,44	4431836		5962413611	4318717	1288937027
	250,57	4326307	4354619,3	801588219	4320906	1136531560
	250,56	4305715		2391633819	4320738	1147914728
115%	287,29	5018278		7120434434	4939295	29164726,98
	288,09	4896093	4933895,3	1429016405	4952768	356188739
	288,05	4887315		2169727453	4952094	3312158
130%	324,95	5606118		538920748	5573514	88142494
	325,78	5593577	5582903,3	113927160	5587492	21061874
	325,31	5549015		1148419136	5579577	11060858
Somme				**39693562065**		**14653660522**

Avec $\hat{y}_{ij} = a_1 x_{ij} + b_1$ et $SCE_{1n} = (\bar{Y}_j - \hat{y}_{ij})^2$

Tableau 27: Les données pour le calcul des variances S_{1n}^2 et S_r^2 pour le paracétamol FPR

Niveau	Xij	Yij	$\bar{Y}$	$(Y_{ij} - \bar{Y}_i)$	$\hat{Y}$	SCE_{nl}
70%	175,15	3025452		26608402,8	3003664,5	276526981,5
	175,60	3009139	3020293,6	124426588,4	3011211,6	82483360,95
	175,42	3026290		35956013,4	3008259,9	144811769,4
85%	212,80	3640933		482578379.0	3635085,6	259862934,2
	212,42	3598153	3618965,3	433153219.0	3628813,1	96979456,65
	212,35	3617810		1334795.0	3627504,9	72925738,57
100%	250,61	4301434		1411855575,1	4269307,4	29681753,70
	250,74	4245153	4263859,3	349926906,8	4271370,2	56414533,24
	250,30	4244991		356014002,8	4264091,6	53933,37
115%	287,50	4924720		1914908427.0	4887848,1	47441833,53
	287,21	4877908	4880960,3	9316738,778	4883051,5	4373217,47
	287,79	4840253		1657086987	4892845,9	141268382
130%	324,97	5542265		160452889.0	5516300,6	176819357,2
	325,58	5515828	5529598.0	189612900.0	5526631,7	8798639,38
	324,89	5530701		1216609.0	5515042,8	211853504,1
Somme				**7154448433**		**1610295396**

Avec $\hat{y}_{ij} = a_2 x_{ij} + b_2$ $\quad SCE_{1n} = (\bar{Y}_j - \hat{y}_{ij})^2$

Les résultats des tests de Fischer pour la vérification de la validité de la droite de régression sont regroupés dans les tableaux suivants (PAS) et (FPR) :

Tableau 28: Test de Fisher pour la validité de la droite de régression PAS de paracétamol

TEST DE FISHER					
Origine de la variation	**ddl**	**SCE**	**Variances**	**$F_{calclé}$**	**$F_{(0,05,3,10)}$**
Erreurexpérimentale	10	3,9694E+10	3969356206	1,23	3,71
Erreur de la régression	3	1,4654E+10	4884553507		
Erreure total=Erre.Rési	13	5,4347E+10			

Tableau 29: Test de Fisher pour la validité de la droite de régression FPR de paracétamol

TEST DE FISHER					
Origine de la variation	**ddl**	**SCE**	**Variaces**	**$F_{calclé}$**	**$F_{(0,05,3´10)}$**
Erreur expérimentale	10	7154448433	715444843,3	0,75	3,71
Erreur modèle (non linéaire)	3	1610295396	536765131,8		
Erreur total=Erre.Rési	13	8764743828			

Selon le test de Fisher, F_{cl} est inférieur à $F_{(5\%, 3, 10)}$= 3.71 donc l'erreur dû au modèle est bien inférieur à l'erreur expérimentale, par conséquent le domaine de linéarité est considéré comme valide au seuil de 5% pour PAS et la FPR.

b. caféine

Les données pour le calcul des variances S^2_{n1} et S^2_e sont regroupées dans les tableaux (PAS et FPR) suivantes :

Tableau 30: Les données pour le calcul des variances S_{1n}^2 et S_r^2 pou PAS de caféine

Niveau	Xij	Yij	$\bar{Y}_i$	$(Y_{ij} - \bar{Y}_i)^2$	$\hat{Y}$	SCE_{nl}
70%	17,47	1074714		32440618	1066391	6903269
	17,42	1070977	1069018	3836375	1063516	30278616
	17,76	1061364		58588818	1083067,049	197366407
85%	21,25	1312787		582401689	1283755,561	23994699
	21,30	1278121	1288654,0	110944089	1286630,755	4093520
	21,46	1275054		184960000	1295831,375	51514705
100%	25,17	1539620		939524669	1509170,739	40968,06
	24,84	1505752	1508968,33	10344800	1490194,461	352458270
	25,21	1481533		752697515	1511470,894	6262809,39
115%	28,67	1741010		1050710615	1710434,29	3381763,11
	28,65	1708787	1708595,33	36736,11111	1709284,213	474555,15
	28,83	1675989		1063172973	1719634,91	121872250
130%	32,45	1957081		464000320	1927798,926	59929389
	32,48	1934194	1935540,33	1812613	1929524,042	36195760
	32,76	1915346		407811098	1945625,126	101703046
Somme			**5663282933**			**996470031**

Avec $\hat{y}_{ij} = a_2 x_{ij} + b_2$ $\quad SCE_{1n} = (\bar{Y}_j - \hat{y}_{ij})^2$

Rapport-gratuit.com
LE NUMERO 1 MONDIAL DU MÉMOIRES

Tableau 31: Les données pour le calcul des variances S_{1n}^2 et S_r^2 pour FPR de caféine

Niveau	Xij	Yij	$\bar{Y}_i$	$(Y_{ij} - \bar{Y}_i)^2$	$\hat{Y}$	SCE_{nl}
70%	17,56	1064556		6097607	1050273,943	280609067
	17,37	1039603	1067025,33	751984365	1039075,78	781177551
	17,99	1096917		893511736	1074680,197	58596945
85%	21,27	1289585		603455602	1262981,627	4153607
	21,33	1260825	1265019,7	17595228	1266829,201	3274413
	21,42	1244649		414964060	1271595,599	43242882
100%	25,05	1477694		81605	1480398,281	8939789
	25,46	1479366	1477408,33	3832458	1504000,565	707146775
	25,45	1475165		5032544	1502966,888	653239726
115%	28,74	1715872		617025600	1692129,715	1204977
	28,98	1694060	1691032	9168784	1706084,349	226573219
	28,84	1663164		776625424	1697700,083	44463333
130%	32,57	1946184		272272000	1912015,708	312144986
	32,45	1931682	1929683,33	3994668	1905469,089	586329619
	32,78	1911184		342225333	1924304,975	28926741
Somme				**4717867019**		**3740023635**

Avec $\hat{Y}_{ij} = a_2x_{ij}+b_2$ $\quad SCE_{1n}= (\bar{Y}_j-\hat{y}_{ij})^2$

Les résultats des tests de Fischer pour la vérification de la validité de la droite de régression sont présentés dans les tableaux suivants (PAS) et (FPR) :

Tableau 32: Test de Fisher pour la validité de la droite de régression PAS de caféine.

TEST DE FISHER					
Origine de la variation	Ddl	SCE	Variances	$F_{calclé}$	$F_{(0,05,3,10)}$
Erreurexpérimentale	10	5663282933	566328293,3		
Erreur de la régression	3	996470032	332156677,2		
Erreure total=Erre.Rési	13	6659752964		0,59	3,71

Tableau 33: Test de Fisher pour la validité de la droite de régression FPR caféine

TEST DE FISHER					
Origine de la variation	ddl	SCE	Variaces	$F_{calclé}$	$F_{(0,05,3,10)}$
Erreurexpérimentale	10	4717867019	471786701,9		
Erreurmodèle (non linéaire)	3	3740023635	1246674545	2,64	3,71
Erreure total=Erre.Rési	13	8457890654			

Selon le test de Fisher F_{nl} calculé est inférieur à $F_{(5\%, 3, 10)}$= 3.71 donc l'erreur dû au modèle est bien inférieur à l'erreur expérimentale, par conséquent le domaine de linéarité est considéré comme valide au seuil de 5% pour PAS et la FPR.

III.4. Comparaison des droites de régression

III.4.1. Test de comparaison des ordonnées à l'origine et les pentes

Calcul de coefficient de Student (t) selon la formule ci-après :

$$Ta = \frac{|a_1 - a_2|}{\sqrt{S_{a_1}^2 + S_{a_2}^2}} \qquad Tb = \frac{|b_1 - b_2|}{\sqrt{S_{b_1}^2 + S_{b_2}^2}}$$

Avec N= N_1+N_2= 15 + 15 = 30

a. Paracétamol

Y_1= a_1x+b_1 Equation de la linéarité du PAS

Y_2= a_2+b_2 Equation de la linéarité de la FPR

$(S_{a1})^2$ = 105664.3 $(S_{b1})^2$ = 6939152426

$(S_{a2})^2$ = 15432.594 $(Sb_2)^2$ = 1009547372 N=3*5=15

$T_{a\ test}$=0,7723992 $T_{a\ test,} < t_{(0.975,\ N+N-4)}$= 2,056

$T_{b\ test}$ = 1, 5188824 $T_{b\ test} < t_{(0.975,\ N+N-4)}$=2,056

$T_{a\ test}$ et **$T_{b\ test}$** sont inférieur à **T_{table}** donc pas d'écart significative entre a_1 et a_2, d'une part et entre $b_1$et b_2 d'autre part au risque de 5% donc il n'y a pas d'effet de matrice sur la méthode de dosage.

b- caféine

Y_1= a_1x+b_1 ; Equation de la linéarité du PAS

Y_2=a_2X+b_2 ; Equation de la linéarité de la FPR

$(S_{a1})^2$ = 1410812.2 $(S_{b1})^2$= 924654608

$(S_{a2})^2$ = 1145213.5 $(S_{b2})^2$ = 756583068 N=3*5=15

$T_{a\ test}$=0,7723992 $T_{a\ test,} < t_{(0,975,\ N+N-4)}$= 2,056

$T_{b\ test}$ = 1, 5188824 $T_{b\ test} < t_{(0,975,\ N+N-4)}$=2,056

$T_{a\ test}$ et $T_{b\ test}$ sont inférieur à **T_{table}** donc pas d'écart significative entre a_1 et a_2, d'une part et entre $b_1$et b_2 d'autre part au risque de 5% donc il n'y a pas d'effet de matrice sur la méthode de dosage.

III.4.2. Test de comparaison des ordonnées à l'origine (b1 et b_2) avec zéro

Calcul des coefficients de student (t_1 et t_2) selon la formule ci-après : N =15

$$\boldsymbol{t_1 = \frac{|b_1|}{\sqrt{S_{b_1}^2}} \quad \text{et} \quad t_2 = \frac{|b_2|}{\sqrt{S_{b_2}^2}}}$$

Les résultats du facteur de student pour la comparaison de l'ordonnée à l'origine avec zéro sont regroupés dans les tableaux 34,35.

a. paracétamol

Tableau 34: Résultats du test de Student pour PAS et FPR de paracétamol

TEST DE STUDENT		
$t_{1\ calculé}$	$t_{2\ calculé}$	$t_{(0.975,\ N-2)}$
1.2141841	2.0828448	2.16

$\mathbf{t_{1\ calculé}}$ **et** $\mathbf{t_{2calculé}}$ sont inférieurs à $t_{(0.975,\ N-2)}$ donc les ordonnées à l'origine de la droite (D_1 et D_2) ne sont pas significativement diffèrent de zéro au seuil de probabilité considéré (α=5%).

b. caféine

Tableau 35: Résultats du test de Student pour PAS et FPR de caféine

TEST DE STUDENT		
$t_{1\ calculé}$	$t_{2\ calculé}$	$t_{(0.975,N-2)}$
2.03	1.51	2.16

$\mathbf{t_{1\ calculé}}$ **et** $t_{2\ calculé}$ sont inférieurs à $\mathbf{t_{(0.975,\ N-2)}}$ donc les ordonnées à l'origine de la droite (D_1 et D_2) ne sont pas significativement diffèrent de zéro au seuil de probabilité considéré (α=5%).

Conclusion

Après vérification de tous les tests concernant la linéarité on peut conclure que la méthode est linéaire.

IV. Exactitude

Selon l'ICH l'exactitude a été étudiée sur 5 concentrations couvrant le 100% (70%- 85%- 100%- 115%- 130%) selon les données suivantes :

Rapport-gratuit.com
LE NUMERO 1 MONDIAL DU MÉMOIRES

IV.1. paracétamol

Tableau 36: Les données brutes pour l'étude de l'exactitude pour le paracétamol

Niveau	Xij	Yij	Recouvrement	Variance	Moyenne	$(\Delta \text{ intra})^2$	$(\Delta \text{ inter})^2$
70%	175.15	3025452	100.23			0.0950	0.9763
	175.60	3009139	99.43	0.1825	99.92	0.2378	
	175.42	3026290	100.10			0.0322	
85%	212.80	3640933	99.28			0.2222	
	212.42	3598153	98.29	0.2488	98.81	0.2728	0.0157
	212.35	3617810	98.86			0.0026	
100%	250.61	4301434	99.59			0.7146	
	250.74	4245153	98.24	0.5429	98.75	0.2560	0.0350
	250.30	4244991	98.40			0.1151	
115%	287.49	4924720	99.39			0.7811	
	287.21	4877908	98.55	0.8164	98.51	0.0014	0.1783
	287.79	4840253	97.59			0.8495	
130%	324.968	5542265	98.96			0.0791	
	325.58	5515828	98.30	0.1154	98.68	0.1426	0.0642
	324.89	5530701	98.78			0.0094	
		moyenne	**98.9345**				
		Ecart-type	**0.7378**				

IV.1.1. Test de l'homogénéité des variances

Avant d'effectuer les calculs de l'exactitude, il convient de vérifier l'homogénéité des variances entre les différents niveaux selon le test de Cochran.

Tableau 37: les résultats du test de Cochran pour l'étude de l'homogénéité des variances paracétamol**.**

TEST DE COCHRAN			
V_{max}	$\sum V_i$	C_{cal}	$C_{(5\%,3,5)}$
0.816432935	1.9061081	0.42832456	0.684

$\mathbf{C_{cal}}$ est inférieur à $\mathbf{C_{(5\%,\,3,5)}}$ donc les variances sont homogènes au risque de 5%.

IV.1.2. Test de validité des moyennes

Ce test consiste à comparer les moyennes des 5 niveaux.

Tableau 38: Les résultats du test de Fischer pour l'étude de la validité des moyennes pour le paracétamol

origine de variation	Ddl	SCE	Variances	$F_{calculé}$	$F_{(0,05,4,10)}$
Variation intergroupe	4	3.80865221	0.952163052	2.497662722	3.48
variation intragroupe	10	3.81221629	0.381221629		
variation totale	14	7.6208685	0.54434775		

Selon le test de Fisher $F_{alculé} < F_{tabulé}$ donc les variances sont homogène au risque de 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.

IV.1.3.Intervalle de confiance du recouvrement moyen

L'intervalle de confiance du pourcentage de recouvrement moyen est calculé à partir de formule suivante :

$IC_{RM} = \overline{X} \pm t_{(1-\alpha/2,\ N-1)}.S/\sqrt{N}$, avec t =2,145, N=15 et S= **0.7378**

$\overline{X}$ = 98.93447843%

Donc : 98.52% < $\overline{X}$ < 99.34%

Erreur moyenne de recouvrement : $\Delta = [t_{(0.975\%,\ 14)}.S/\sqrt{N}]/RM = 0.41\%$

Le recouvrement moyen de cette méthode est compris entre 98.525858% et 99.343099% avec un risque de 5% et l'erreur du recouvrement moyen est de ± 0,413%, qui rentre dans les limites fixées par la pharmacopée Européenne [95%-105%], donc on peut conclure que la méthode est exacte pour paracétamol.

IV.2. Caféine

Tableau 39: Les données brutes pour l'étude de l'exactitude pour la caféine

Niveau	Xij	Yij	Recouvrement	Variance	Moyenne	$(\Delta \text{ intra})^2$	$(\Delta \text{ inter})^2$
70%	17,5	1064556	101,57			0,0472	4,7466
	17,37	1039603	100,31	0,9210	101,36	1,1020	
	17,99	1096917	102,19			0,6927	
85%	21,27	1289585	101,61			5,1466	
	21,33	1260825	99,04	4,5402	99,35	0,0958	0,0283
	21,41	1244649	97,39			3,8379	
100%	25,05	1477694	98,84			1,1225	
	25,46	1479366	97,36	0,8526	97,78	0,1813	1,9496
	25,44	1475165	97,15			0,4015	
115%	28,74	1715872	100,04			3,3605	
	28,98	1694060	97,95	2,9425	98,21	0,0712	0,9264
	28,84	1663164	96,65			2,4534	
130%	32,57	1946184	100,14			0,8961	
	32,45	1931682	99,74	1,7183	99,19	0,3020	0,0001
	32,78	1911184	97,69			2,2384	
		Moyenne	99.178				
		Ecart type	1.791				

IV.2.1. Test de l'homogénéité des variances

Avant d'effectuer les calculs de l'exactitude, il convient de vérifier l'homogénéité des variances entre les différents niveaux selon le test de Cochran

Tableau 40: les résultats du test de Cochran pour l'étude de l'homogénéité des variances pour la caféine

TEST DE COCHRAN			
V_{max}	$\sum V$	C_{cal}	$C_{(5\%,3,5)}$
4,540232355	10,974703	0,414	0,684

C_{cal} est inférieur à $C_{(5\%, 3,5)}$ donc les variances sont homogènes au risque de 5%.

IV.2.2. Test de validité des moyennes

Ce test consiste à comparer les moyennes des 5 niveaux

Tableau 41: les résultats du test de Fischer pour l'étude de la validité des moyennes pour la caféine

Origine de variation	Ddl	SCE	Variances	$C_{calculé}$	$F_{(0.05, 4, 10)}$
Variation intergroupe	4	22,9531011	5,738275264	2,614319065	3,48
variation intragroupe	10	21,9494068	2,194940679		
variation totale	14	44,9025078	3,207321989		

Selon le test de Fisher $F_{alculé} < F_{tabulé}$ donc les variances sont homogène au risque de 5%.

Donc le facteur niveau n'a pas d'influence sur les moyennes et il n'y a pas de différence statistiquement significative.

IV.2.3. Intervalle de confiance du recouvrement moyen

L'intervalle de confiance du recouvrement moyen est calculé à partir de formule suivante :

$IC_{RM} = \overline{X} \pm t_{(1-\alpha/2,\ N-1)}.S/\sqrt{N}$, avec t =2,145 ; N=15 et S= **1.791**

$\overline{X}$ = 98.93447843% Donc : 98.186366% < $\overline{X}$ < 100.170099%

- Erreur moyenne de recouvrement :

$\Delta = [(t_{1-\alpha/2,\ N-1}).S/\sqrt{N}]/RM = 1.0001\%$

Le recouvrement moyen de cette méthode est compris entre 98.186366% et 100.170099% avec un risque d'erreur de 5% et l'erreur du recouvrement moyen est de ±1.0001%, qui rentre dans les limites fixées par la pharmacopée Européenne [95%-105%], donc on peut conclure que la méthode est exacte pour la caféine.

Conclusion

Après vérification de tous les tests concernant l'exactitude on peut conclure que la méthode est exacte pour le paracétamol et la caféine.

V. Fidélité

Selon l'ICH la fidélité de la méthode a été vérifiée par la répétabilité et la fidélité intermédiaire des trois séries pour le niveau de 100%.

V.1. Paracétamol

Les données brutes de l'étude de la fidélité sont regroupées dans le tableau suivant :

Tableau 42: Les résultats bruts de l'étude de la fidélité pour le paracétamol

Essai	$Qté_{introduite}$	Réponse	$Qté_{retrouvé}$	Variance	Moyenne	$(\Delta intra)^2$	$(\Delta\ inter)^2$
1	250,04	4348041	100,74	0,4337	99,93	0,6532	0,0007
1	250,03	4315999	100,00			0,00488	
1	250,35	4349076	100,64			0,5005	
1	249,44	4287415	99,57			0,1278	
1	249,30	4263073	99,062			0,7520	
1	250,02	4297234	99,56			0,13026	
2	249,91	4292616	99,50	0,1183	99,76	0,0635	0,0516
2	249,87	4303852	99,78			0,0005	
2	250,82	4341669	100,27			0,2703	
2	249,50	4278430	99,34			0,1746	
2	249,95	4298546	99,63			0,0170	
2	250,56	4325762	100,01			0,0656	
3	250,04	4305715	99,76	0,4348	100,18	0,1826	0,0517
3	250,46	4319193	99,90			0,0800	
3	250,52	4301434	99,48			0,5147	
3	250,19	4361072	100,98			0,6315	
3	249,80	4356573	101,03			0,7191	
3	249,76	4310046	99,97			0,0462	
				$\bar{\bar{X}}$	99.9577		
				L'écart type	0.5682		

V.1.1. Tests des valeurs aberrantes

Le test des valeurs aberrantes pour chaque série ont été vérifiée par le test de Dixon selon les étapes suivantes:

- Classer les valeurs dans l'ordre croissantes
- Calculer l'étendue R de l'échantillon : $R=Y_n-Y_1$
- Calculer la différence entre chacune des 2 valeurs voisin on retient la plus grande valeur qui correspond à la valeur la plus critique

Calculer le quotient de la différence la plus fort sur l'étendue : $\boldsymbol{Q}\text{test} = \frac{\mathbf{Max(Yn-Yi)}}{\boldsymbol{R}}$

Les données des moyennes pour chaque série sont regroupées dans le tableau suivant :

Tableau 43: Les résultats des moyennes pour chaque série de paracétamol

	Y1	Y2	Y3	Y4	Y5	Y6
Série 1	99,063	99,569	99,573	100	100,6376	100,7384
Série2	99,2779	99,3401	99,5006	99,7824	100,0142	100,2779
Série 3	99,4676	99,7577	99,9022	99,97	100,98	101,033

Tableau 44: Les résultats du test de DIXON pour les valeurs aberrantes

	Y_2-Y_1	Y_6-Y_5	R = Y_6-Y_1	Q_{test}	Q_{table}
Série 1	0,506	0,1008	1,6754	$Q_{test\ 1}$=**0.30**	**0.56**
Série2	0,0622	0,2637	1	$Q_{test\ 2}$=**0.26**	
Série 3	0,2901	0,053	1,5654	$Q_{test\ 3}$=**0.19**	

$Q_{test\ 1}$, $Q_{test\ 2}$ et $Q_{test\ 3}$ pour les trois séries sont inférieures à Q_{table}, donc il n'y a pas de valeur aberrante.

V.1.2. Test de l'homogénéité des variances :

Les données du test de Cochran pour l'homogénéité des variances de paracétamol sont regroupées dans le tableau suivant :

Tableau 45: Les résultats du test de Cochran pour l'homogénéité des variances de paracétamol

TEST DE COCHRAN			
Vmax	∑Vi	Ccal	$C_{(5\%3,6)}$
0,43482171	0,986896913	0,4405949	0,616

C_{cal} est inférieur à $C_{(5\%,\ 3,6)}$, donc les variances des différents groupes sont homogènes au risque de 5%.

V.1.3. Test de validité des moyennes

Les données du test de Fisher pour la validité des moyennes de paracétamol sont regroupées dans le tableau suivant :

Tableau 46: Les résultats du test de Fisher pour la validité des moyennes

origine de variation	Ddl	SCE	Variances	$F_{calculé}$	$F_{(0,05,2,15)}$
Variation intergroupe	2	0,55390709	0,276953545	1,187800785	3,68
variation intragroupe	15	4,93448457	0,328965638		
variation totale	17	5,48839165	0,322846568		

F_{cal} est inférieur à F_{tab}, donc le facteur groupe n'a pas d'influence sur les moyennes et il n'y a pas de différence statistiquement significative.

V.1.4. Répétabilité (A.III)

- Le coefficient de variation de la répétabilité (CVr) : CVr**%=** $\frac{S*100}{\bar{\bar{X}}}$

- Le recouvrement moyen : $\bar{\bar{X}}$ = 99.96%

L'écart type de la répétabilité, c'est la racine carré de la variation intragroupe S = 0.573

Compte tenu de la valeur du CVr = 0.574% qui inférieure à 2% (norme fixée par la pharmacopée Européenne), donc la répétabilité de la méthode est jugée satisfaisante.

V.1.5. Fidélité intermédiaire

- Le Coefficient de variation de la fidélité intermédiaire (CV_{FI}) : $\mathbf{CV_{FI}\%=} \frac{S*100}{\bar{\bar{X}}}$

- Le recouvrement moyen $\bar{\bar{X}}$ = 99.96 %

L'écart type de la répétabilité, c'est la racine carré de la variation intergroupe S = 0.526

Compte tenu de la valeur du CV_{FI}= 0.526% qui inférieure à 2% (norme fixée par la pharmacopée Européenne), donc la répétabilité de la méthode est jugée satisfaisante.

V.1.6. Estimation de la dispersion δ du recouvrement

- Intervalle de confiance de l'écart-type δ de la fidélité :

$\frac{S_T\sqrt{n-1}}{X_1^2} \leq \boldsymbol{\delta} \leq \frac{S_T\sqrt{n-1}}{X_2^2}$; Avec : n=6 et $X_1^2 = 12.8$ et X_2^2 = 0,831

$$0,35512 \leq \delta \leq 1.393743$$

Erreur moyenne est de 0.874433%

La dispersion du recouvrement moyen de cette méthode est comprise entre 0, 36 % et 1.39% avec un risque d'erreur de 5%.Soit une erreur moyenne de fidélité de ± 0.87 % (<2%), donc la fidélité de la méthode est jugée satisfaisante.

Rapport-gratuit.com
LE NUMERO 1 MONDIAL DU MÉMOIRES

V.2. Caféine

Les données brutes de l'étude de la fidélité sont regroupées dans le tableau suivant :

Tableau 47: les résultats bruts de l'étude de la fidélité pour la caféine

Essai	$Qté_{introduite}$	Réponse	$Qté_{retrouvé}$	Variance	Moy	$(\Delta intra)^2$	$(\Delta\ inter)^2$
1	24,97	1482412	102,45	1,31509	100,46	3,9287	0,0648
1	25,41	1465638	99,53			0,8667	
1	25,21	1467695	100,46			3,1913E-07	
1	25,64	1479542	99,58			0,7887	
1	24,73	1448616	101,08			0,3820	
1	25,21	1456300	99,68			0,6092	
2	25,25	1463241	100,00	0,1850	99,79	0,0421	0,1721
2	25,45	1465880	99,39			0,1614	
2	25,69	1489932	100,08			0,0814	
2	25,66	1474357	99,15			0,4161	
2	25,56	1479529	99,89			0,0085	
2	25,39	1475165	100,26			0,2155	
3	24,71	1418892	99,09	1,1996	100,37	1,6427	0,0257
3	25,68	1478838	99,37			0,9926	
3	25,05	1477694	101,79			2,0281	
3	24,91	1455748	100,84			0,2265	
3	24,95	1464346	101,28			0,8261	
3	25,37	1467828	99,84			0,2819	
				$\bar{\bar{X}}$	**100.21**		
				L'écart type	**0.9416**		

V.2.1. Tests des valeurs aberrantes

Le test des valeurs aberrantes pour chaque série ont été vérifiée par le test de Dixon selon la la formule suivante :

$$Q_{test} = \frac{Max(Yn - Yi)}{\bar{\bar{X}}}$$

Les données des moyennes pour chaque série sont regroupées dans le tableau suivant :

Tableau 48: Les résultats des moyennes pour chaque série de caféine

	Y_1	Y_2	Y_3	Y_4	Y_5	Y_6
Série 1	99,53	99,57	99,68	100,46	101,08	102,45
Série2	99,15	99,39	99,89	100,00	100,08	100,26
Série 3	99,09	99,37	99,84	100,84	101,28	101,79

Tableau 49: Les résultats du test de DIXON pour les valeurs aberrantes pour la caféine.

	Y2 – Y1	Y6-Y5	R= Y6-Y1	Qtest	Q_{table}
Série 1	0.04	1.36	12,91	**0,47**	**0.56**
Série2	0.24	0.18	1,11	**0,22**	
Série 3	0.28	0.51	2,70	**0,19**	

Les valeurs $Q_{test\ 1}$, $Q_{test\ 2}$ et $Q_{test\ 3}$ pour les trois séries sont inférieures à Q_{Table}, donc il n'y a pas de valeur aberrante.

V.2.2. Test de l'homogénéité des variances :

Les données du test de Cochran pour l'homogénéité des variances de caféine sont regroupées dans le tableau suivant :

Tableau 50: Les résultats du test de Cochran pour l'homogénéité des variances de caféine

TEST DE COCHRAN			
Vmax	∑Vi	Ccal	$C_{(5\%,3,6)}$
1,31509483	2,699670007	0,49	0,616

C_{cal} est inférieur à $C_{(5\%,\ 1,6)}$, donc les variances des différents groupes sont homogènes au risque de 5%.

V.2.3.Test de validité des moyennes

Les données du test de Fisher pour la validité des moyennes de caféine sont regroupées dans le tableau suivant :

Tableau 51: Les résultats du test de Fisher pour la validité des moyennes de caféine

origine de variation	ddl	SCE	Variances	$F_{calculé}$	$F_{(0.05,2,15)}$
Variation intergroupe	2	1,57525735	0,787628673	1,14	3,68
variation intragroupe	15	13,49835	0,899890002		
variation totale	17	15,0736074	0,886682787		

F_{cal} est inférieur à F_{tab}, donc le facteur groupe n'a pas d'influence sur les moyennes et il n'y a pas de différence statistiquement significative.

V.2.4 Répétabilité :

Elle est évaluée par le calcul du coefficient de variation de répétabilité (CVr):

Avec $CV_r\% = \frac{S*100}{\bar{\bar{X}}}$

Le recouvrement moyen $\bar{\bar{X}}$ =100.2096 %

L'écart type de la répétabilité, c'est la racine carré de la variation intragroupe S = 0.948

Compte tenu de la valeur du CVr = 0.947% qui inférieure à 2% (norme fixée par la pharmacopée Européenne), donc la répétabilité de la méthode est jugée satisfaisante.

V.2.5. La fidélité intermédiaire

- Coefficient de variation de la fidélité intermédiaire (CV_{FI})

Avec : $\mathbf{CV_{FI}\%= \frac{S*100}{\bar{\bar{X}}}}$

Le recouvrement moyen $\bar{\bar{X}}$= 100.21 %

L'écart type de la fidélité intermédiaire c'est la racine carré de la variation intergroupe

S = 0.8875

Compte tenu de la valeur du CV_{FI} = 0.886% qui inférieure à 2% (norme fixée par la pharmacopée Européenne), donc la répétabilité de la méthode est jugée satisfaisante.

V.2.6. Estimation de la dispersion δ du recouvrement

Intervalle de confiance de l'écart-Type δ de la fidélité

$\frac{S_T\sqrt{n-1}}{X_1^2} \leq \boldsymbol{\delta} \leq \frac{S_T\sqrt{n-1}}{X_2^2}$; Avec : n=6 et $X_1^2 = 12.8$ et X_2^2 = 0,831

$$0,58852 \leq \delta \leq 2.309769$$

Erreur moyenne est de 1.45%

La dispersion du recouvrement moyen de cette méthode est comprise entre 0, 59 % et 2.31% avec un risque d'erreur de 5%. Soit une erreur moyenne de fidélité de ± 1.45 %(inf 2%), donc la fidélité de la méthode est jugée satisfaisante.

VI- Robustesse

L'étude de la robustesse a été apportée sur une légère variation des paramètres suivants :

La température, la composition de la phase mobile, le débit, la longueur d'onde et la colonne. Les résultats de cette variation sont regroupés dans les tableaux suivants :

Tableau 52: Les données de l'étude de la robustesse pour le paracétamol et la caféine

	Nombre de plateaux théoriques N > 3000		**Facteurd'asymétrie 1.1%< F< 1.5%**		**Résolution > 3,5**	**Teneur (95% à 105%)**		**CV < 2.5%**	
	Para	**Caf**	**Para**	**Caf**		**Para**	**Caf**	**Para**	**Caf**
Température 20°C	9580	11080	1,19	1,18	4,9	99,51	99,35	0,2	1,4
Température 25°C	8980	10360	1,17	1,17	5,0	99,85	101,33		
Température 30°C	11900	11920	1,18	1,15	4,9	99,92	98,73		
Phase mobile 75/25%	10670	12070	1,15	1,14	7,5	99,17	97,73	0,4	2,2
Phase mobile 70/30%	11900	10360	1,17	1,17	5,0	99,85	101,33		
Phase mobile 65/35%	8930	9910	1,2	1,22	3,1	99,13	97,43		
Débit = 0,8 ml/min	10890	11030	1,16	1,15	5,0	98,82	99,54	0,6	1,1
Débit = 1,0 ml/min	11900	10360	1,17	1,17	5,0	99,85	101,33		
Débit = 1,2ml/min	10620	11290	1,15	1,15	5,0	100	99,35		
λ= 278nm	8990	10220	1,1	1,17	5,0	101,45	102,02	1,8	0,4
λ= 275nm	11900	10360	1,17	1,17	5,0	99,85	101,33		
λ= 272nm	8980	10240	1,1	1,18	5,0	103,53	102,07		
Colonne Waters	11900	10360	1,17	1,17	5,0	99,85	101,33	2,1	1,4
Colonne SunFire	10850	15785	1,05	1,15	16,8	103,39	99,62		
Colonne Kromasil	9990	11600	1.32	1,36	14,1	99,54	98,49		

Les résultats obtenus sont très satisfaisants pour le paracétamol et pour la caféine :

-La teneur : 95%< T(%) < 105% ;

-Le coefficient de variation : CV (%) < 2,5%

-Le nombre de plateaux théoriques : N >3000

-Le facteur d'asymétrie : 1,0% < F < 1,5% selon USP

-La résolution : R > 3,5 selon USP

Donc, on peut conclure que la méthode est robuste.

VII- Application de la méthode (A.III)

Apres avoir démontré tous les critères de la validation de la méthode de dosage de paracétamol et la caféine par HPLC, nous avons procédé ensuit a son application sur les trois formes pharmaceutiques : comprimé, gélule et sachets. Les résultats de cette application sont regroupés dans le tableau suivant :

Tableau 53: les résultats de dosage des trois formes pharmaceutiques.

	Masse (mg)		**Aires**		**% teneur**		**% teneur moy**		**CV%**	
	Para	**Caf**	**Para**	**Caf**	**Para**	**Caf**	**Para**	**Caf**	**Para**	**Caf**
STD_1	250,90	25,75	4090571	1313460						
STD_2	250,27	25,30	4027033	1303761						
CP_1	425,00	425,00	3893473	1248447	95,82	97.51	**99.85**	**103.33**	**0.33**	**0.37**
CP_2	424,80	424,80	4126769	1313331	101,60	102.62				
CP3	425,10	425,10	4150513	1329990	102,12	103.85				
Gel_1	271,90	271,90	3456842	1565253	106.26	97.73	**100.77**	**98.43**	**1.83**	**0.61**
Gel_2	271,80	271,80	3398383	1581487	104.50	98.78				
Gel_3	271,60	271,60	3266929	1580230	100.53	98.77				
$Sach_1$	371,00	371,00	4069171	1197275	100.22	94.28	**102.62**	**95.82**	**1.80**	**1.32**
$Sach_2$	371,00	371,00	4149420	1223155	102.20	96.32				
$Sach_3$	371,00	371,00	4317737	1226541	106.34	96.59				

Conclusion

Selon les normes de la Pharmacopée européenne, la teneur en principe actif des différentes échantillons est comprise entre 95% et 105%, et le CV des 3 essais est inférieure à 2.5 donc tous les produit Pharmaceutique analysés sont conforme, par conséquent la méthode peut être appliqué facilement au dosage du paracétamol et de la caféine pour ces trois formes pharmaceutiques.

Conclusion générale

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.

Ce travail qui a été réalisé au LNCM, a pour objectif l'optimisation et la validation analytique selon l'ICH, d'une méthode de dosage par HPLC-RP simple et rapide, capable de doser le paracétamol et la caféine dans le la matière première et dans les produits finis étudiées (comprimé, gélule et sachets).nous avons développé une méthode spécifique, linéaire, exacte, fidèle et robustesse.

L'optimisation des conditions de séparation par la méthode HPLC a été faite selon une approche multi-variantes. Il a été basé sur sept facteurs, le choix de la phase mobile, de la phase stationnaire, du débit, de la température, du volume d'injection, de solvant de dilution et de la longueur d'onde.

La validation de cette méthode est basée sur l'utilisation d'une méthodologie statistique (test Cochran, test de Student, test de Fisher, test de Dixon A.IV).

La deuxième étape a été consacrée à la validation analytique de cette méthode. La validation classique a été applique avec succès pour démonter la capacité de la méthode à identifier et à quantifier les deux principes actifs(le paracétamol et la caféine) dans la matière première et le produit fini. Les critères de la validation (spécificité, linéarité…) examines ont été acceptables.

Nous avons aussi procédé à son application sur les trois formes pharmaceutiques et nous avons obtenus des résultats très satisfaisants, donc cette méthode peut être facilement adoptée pour l'analyse de routine de ces principes actifs dans les formes pharmaceutique étudiées.

Références bibliographiques

[1] R. Chandra1, K.D. Sharma, quantitative determination of paracetamol and caffeine from formulated tablets by reversed phase-hplc separation technique, International journal of chromatographic science,2013 ;31.

[2] E. Dinc, A comparative study of the ratio spectra derivative spectrophotometry, Vierordt's method and high-performance liquid chromatography applied to the simultaneous analysis of caffeine and paracetamol in tablets, Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis, 1999;21;723–730.

[3] M. Sultan, simultaneous HPLC determination and validation of amphetamine, methamphetamine, caffeine, paracetamol and theophylline in illicit seized, International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences, 2014;6; issue 4.

[4] J.Avramova, simultaneous determination of propyphenazone, short communication paracetamol and caffeine in blood by highperformance liquid chromatography, Journal of Pharmaceutical & Biomedical Analysis, 1989; 7; 1221-1224;

[5] P. Mahesh, K. Swapnalee, M. Aruna, B. Anilchandra, S. Prashanti, Analytical Method Development And Validation Of Acetaminophen, Caffeine ,Phenylephrine Hydrochloride And Dextromethorphan Hydrobromide In Tablet Dosage Form By Rp- HPLC, International Journal of Pharmaceutical Science Invention, 2013; 2 ;09-15.

[6] A.P. Dewani , S.M. Dabhade, R.L. Bakal, C.K. Gadewar, A.V. Chandewar, S. Patra, Development and validation of a novel RP-HPLC method for simultaneous determination of paracetamol, phenylephrine hydrochloride, caffeine, cetirizine and nimesulide in tablet formulation, Arabian Journal of Chemistry, 2013

[7] M.Michael, E. EL-Kommos, K.M. Emara, determination of phenyltoloxamine salicylamide, caffeine, paracetamol, codeine and phenacetin by HPLC, Pharmaceutical Chemistry Department, Faculty of Pharmacy, University of Assiut, Assiut, Egypt, 1989 ; 36;678-679.

[8] J.T. Franeta, D. Agbaba, S. Eric, S. Pavkov, M. Aleksic, S. Vladimirov, HPLC assay of acetylsalicylic acid, paracetamol, caffeine and phenobarbital in tablets, Laboratory of Drug Control, Faculty of Pharmacy, Novi Sad, Serbia, Yugoslavia, 2002; 57; 709-713.

[9] M.Kartal, LC method for the analysis of paracetamol, caffeine and codeine phosphate in pharmaceutical preparations,] Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis, 2001; 26 ; 857–864.

[10] M.L.Altun, HPLC Method for the Analysis of Paracetamol, Cafeine and Dipyrone, Department of Pharmacognosy, Faculty of Pharmacy, Ankara University, 2002; 26; 521- 528.

[11] M.G. Mamolo, L. Vio, V. Maurich, Simultaneous quantitation of paracetamol, caffeine and propyphenazone by high-pressure liquid chromatography, Journal of Pharmaceutical & Biomedical Analysis, 1985;3;157-164.

[12] B.R. Thomas, X.G. Fang, P. Shen, S. Ghodbane, Mixed ion pair liquid chromatography method for the simultaneous assay of ascorbic acid, caffeine, chlorpheniramine maleate, dextromethorphan HBr monohydrate and paracetamol in FrenadolTM sachets, Journal of Pharmaceurical & Biomedical Analysis, 1994; 12; 85-90.

[13] USP30-NF25, 2007 :1266-1272.

[14]Pharmacopée Européenne 6.0 ; 2007 ;1470-1472, 2796-2797.

[15] J. Clayden, S. Waren, N. Greeves, P. Wothers, Chimie organique. De Boeck. 2ème Ed. Paris. 1999 ; 21 ; 723–730,

[16] J.**Mesplede, C. Saluzzo,** Cent manipulations en chimie organique et inorganique. Bréal. 1ère Ed. Paris, 2004.

[17] C.L**. Marec,** Histoire du paracétamol. Le praticien en anesthésie-réanimation. 2005 ;9 ; 321-328.

[18] Y. Driad, Stabilité du paracétamol : application à un sachet produit en industrie pharmaceutique, Th.Pharm., Alger, 2009.

[19] F. **Ellis,** Paracétamol - a curriculum ressource. Osborne. 1ére Ed., Londres, 2002.

[20] A. **Serrie, C. Thurel,** La douleur en pratique quotidienne : diagnostic et traitement. Arnette ; 2ème Ed., Paris.2002

[21] K.D.**Rainsford,** Aspirin and related drugs. CRC Press. 1ére Ed. New York, 2004

[22] A. **Ellrodt,** Urgences médicales. Estem. 5ème Ed. Paris, 2005

[23] H.P. R**ang, M. Dale,** Pharmacology. Churchill Livingstone. 5ème Ed. USA, 2003

[24] H. Kupferschmidt. Traitement de l'intoxication au paracétamol. Centre Suisse d'Information Toxicologique, 2004.

[25] M. **Pinaud, B. Vallet, V. Laudenbach, F. Kerbaul,** Conférences d'actualisation: 46e Congrès national d'anesthésie et de réanimation (*La collection de la SFAR*). Elsevier Masson. Paris **2004**.

[26] J. **Pelissier, E. Viel,** Douleur et médecine physique et de réadaptation (Volume 38 de Problèmes en médecine de rééducation). Elsevier Masson. Paris, 2000

Rapport-Gratuit.com

[27] G. Geraud, N. Fabre, Guide pratique des migraines et céphalées. Elsevier Masson. 1ère Ed. Paris, 2001

[28] M.J. Arnaud, The pharmacology of caffeine. Prog. Drag Res, 1987 ; 31 ;273-313.

[29] J.E. James, Caffeine and health. Academic Press, London, San Diego, New-York, Boston, Sydney, Tokyo, Toronto.1991

[30] G. Debry, Le café et la santé. John Libbey Eurotext, Paris. 1993

[31] T. Suzuki, G.R. Waller, Metabolism and analysis of caffeine and other methylxanthines in coffee, tea, cola, guarana and cacao. 186220, 1988

[32] G.R. Waller, H. Ashihara, T, Suzuiu . (1993) Updated review of purine and purine alkaloid metabolism in Coffea and Camellia plants. 141-154. ASIC, 15e Coll. Sci. Int. sur le Caf, , Montpellier, France, 1993

[33] P.J. Rogers, N.J. Richardson, Why do we lie drinks that contain caffeine. Tremis FoodSci. Technol, 1993 ; 4; 108-I 11.

[34] A. Mumin, K.F.Akhter, Z. Abedin, Z Hossain, Determination and characterization of caffeine in tea, coffee and soft drinks by solid phase extraction and high performance liquid chromatography (SPE-HPLC).Malaysian J. Chem, 2006; 8; 45-51.

[35] M. Windholz, S. Budavari, (1983) The Merck index. 20th Edition. Merck & CO., Inc.,Rahway, New Jersey, 1983.

[36] R. Macrae, R.J. Clarjle (1985) Nitrogenous components, Coffee, Elsevier Applied Science, London, New-York, 1985 ;115-152.

[37] A.N. Kotake, D.A Schoeller., G.H. Lambert., A.L. Baker, D.D. Schaffer, H. Josephs, The caffeine CO 2 breath test: dose response and route of Ndemethylation in smokers and non-smokers. Clin. Pharmacol. Ther, 1982; 22;261-269.

[38] A. Liguori et al., « Absorption and subjective effects of caffeine from coffee, cola and capsules », Pharmacol Biochem Behav, 1997; 58; 721-726.

[39] M. Berode, M.A Boillat , MP. Guillemin, M.M. Savolainen (1990)Demethylation pathways in caffeine metabolism as indicators of variability in l,l,l-trichloroethane oxidation in man. Pharmacol. Toxicol, 1990;67;41-46.

[40] E.Tanaka, A.Ishikawa, S. Misawa, Simplified test for determination of drugoxidizing capacity in rata with chemical-induced liver injury using caffeine and trimethadione as mode1 dtugs, Pharmacol. Toxicol., 1992 ;70; 177-180.

[41] Meunier, C. Opinion vis-à-vis des médicaments génériques : enquête auprès de 300 patients de pharmacies seinomarines ; mise en évidence du rôle joué par le médecin traitant. Rouen : Faculté mixte de médecine et de pharmacie, 2013, p116.

[42] G. Dutau, F. Rancé, S. Fejji, A. Juchet, F. Brémont, P.Nouilhan, Intolérance aux additifs alimentaires chez l'enfant : mythe ou réalité. Rev FR Allergol, 1996 ;36 ; 129-42.

[43] Touraine, M. Ministère des affaires sociales, de la santé et des droits des femmes.2013. diponible sur « médicaments. Gouv.fr », 2013

[44] Douglas A. Skoog, F.James Holler, Tiothy A. Nieman-Principes d'analyse instrumentale. 5éme edition.Amerique: de boeck, 2003; 725.

[45]] R. Chandra1, K. Dutt, Sharma Department of Pharmaceutical Chemistry, Dolphin P.G. Institute of Biomedical and Natural Sciences, Dehradun-248001, Uttarakhand, INDIA, 2013

[46] S. Nussbaumer, Analyse de medicament produits en milieu hospitalier : application aux omposé non-UV absorbant cytotoxique. Centre d'edition des hopitaux universitaire de Genève, N°4332/20011-217.

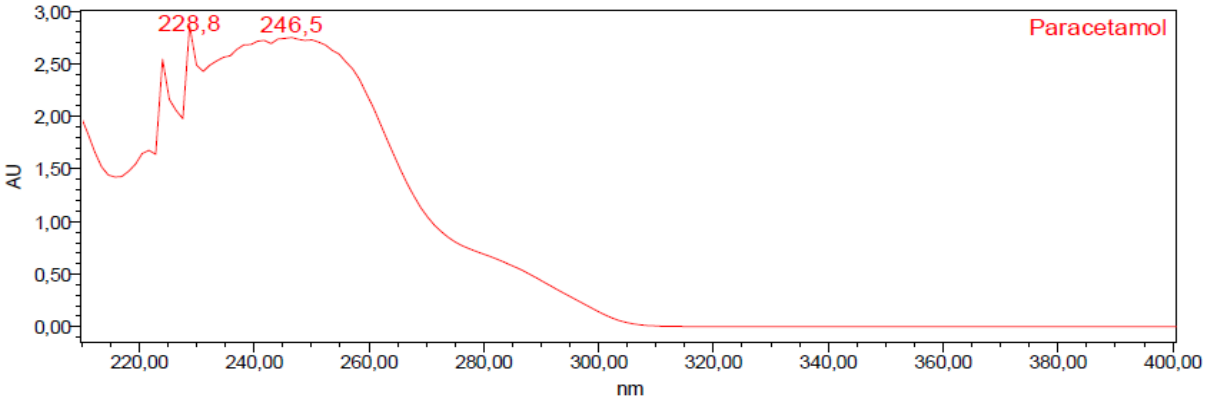
[47] H. Reginald, M. Charles, Biochimie. 2éme edition.Amerique: de boeck, 2000; 157.

[48] organisation mondial de la santé Genève : assurance de la qualité des produits pharmaceutique. Recueil de directives et autres ducuments, 1989 ; 1 ;278 ;1989.

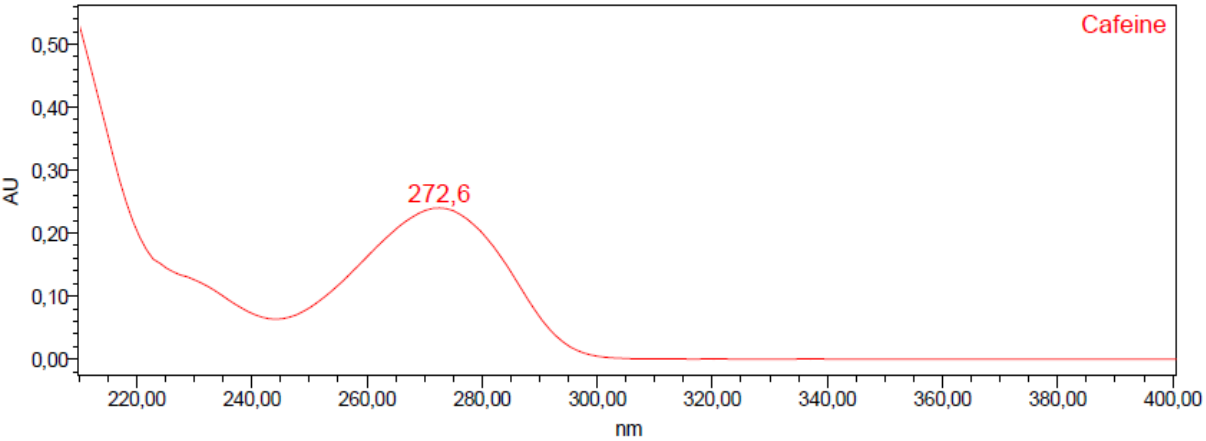
[49] International conference on harmonization. Q1A (R-2) stability testing of new drug substances and products international, conference on harmonization. IFPMA, Geneva, 2003.

Rapport-gratuit.com
LE NUMERO 1 MONDIAL DU MÉMOIRES

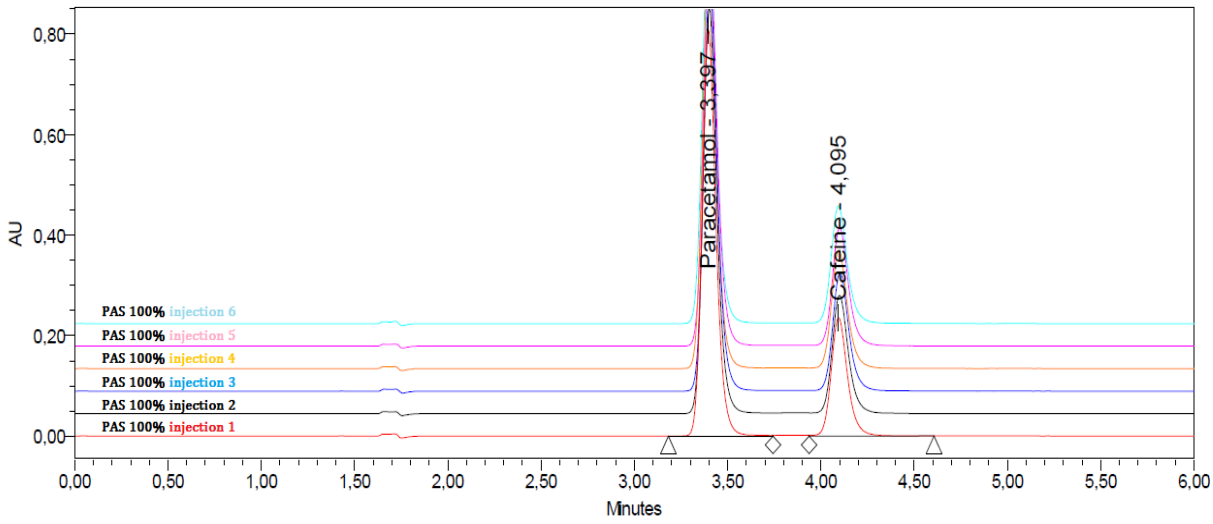
Annexes I



Spectre UV de paracétamol

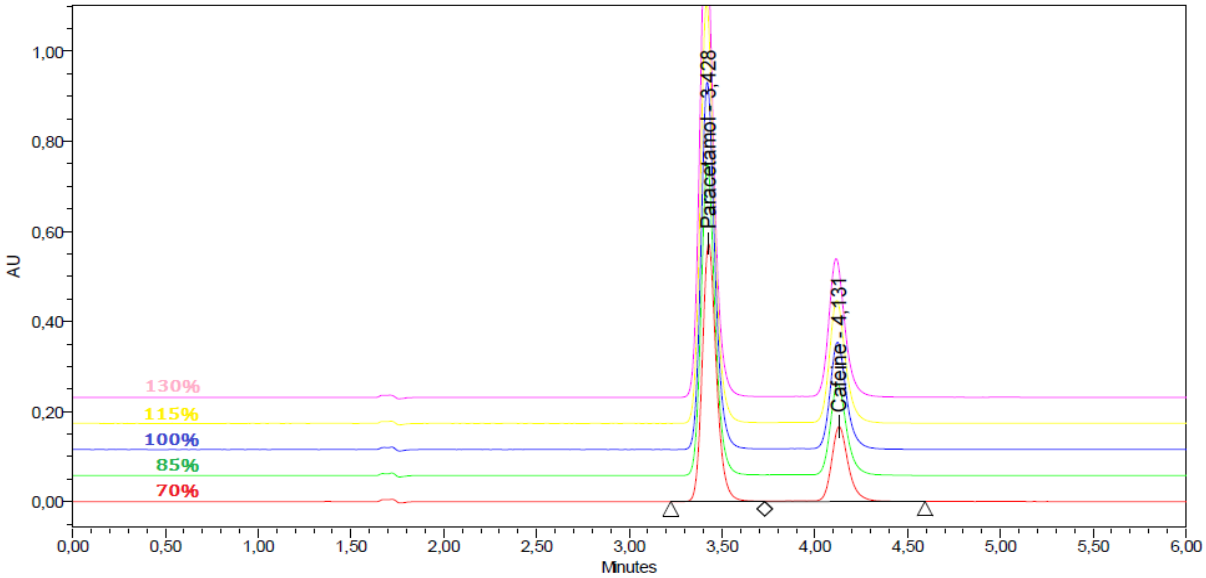


Spectre UV de caféine



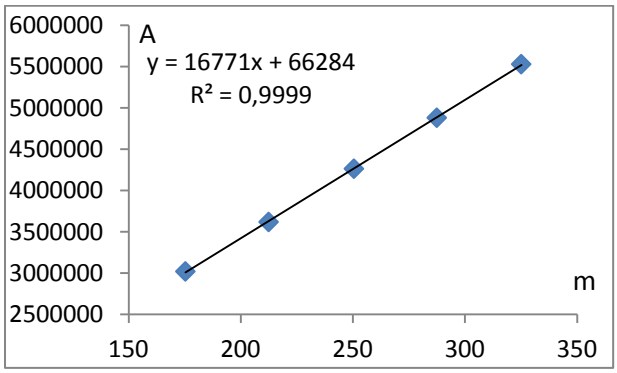
Chromatogramme pour l'étude de conformité de système

ANNEXE II

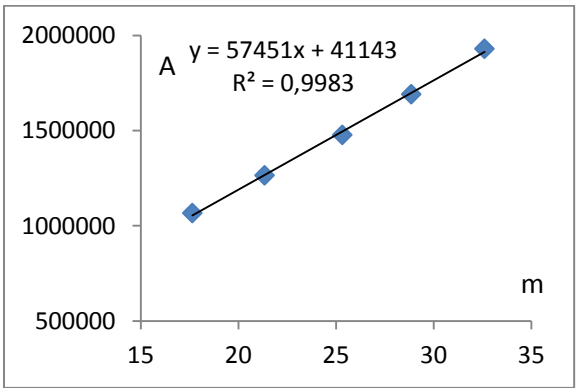


Chromatogramme pour l'étude de la linéarité PAS

Paracétamol

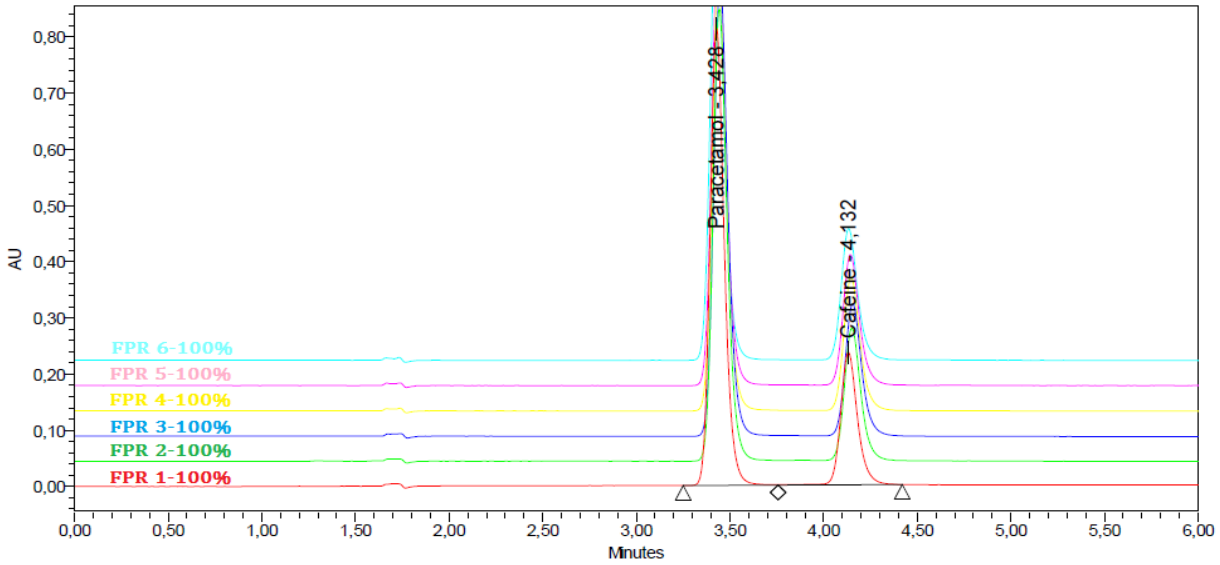


Caféine

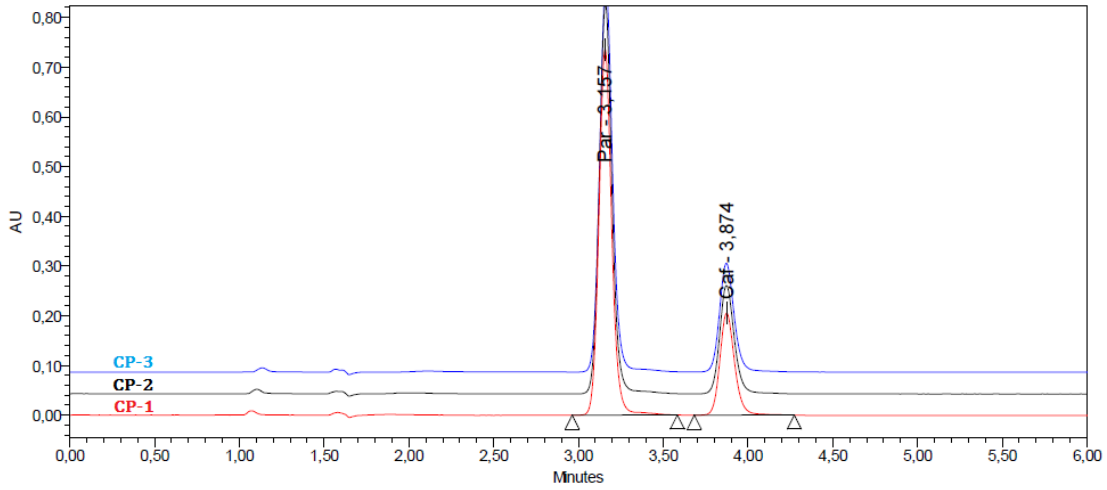


Droite de régression FPR de paracétamol et la caféine

ANNEXE III



Chromatogramme pour l'étude de la répétabilité



Chromatogramme pour l'application de la méthode

ANNEXE IV

Table de Cochran

n	2		3		4		5		6	
p	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	0.676	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

Teste de Dixon

	Level of Significance α		
n	0.10	0.05	0.01
3	0.886	0.941	0.988
4	0.679	0.765	0.889
5	0.557	0.642	0.780
6	0.482	0.560	0.698
7	0.434	0.507	0.637
8	0.479	0.554	0.683
9	0.441	0.512	0.635
10	0.409	0.477	0.597
11	0.517	0.576	0.679
12	0.490	0.546	0.642
13	0.467	0.521	0.615
14	0.492	0.546	0.641
15	0.472	0.525	0.616
16	0.454	0.507	0.595
17	0.438	0.490	0.577
18	0.424	0.475	0.561
19	0.412	0.462	0.547
20	0.401	0.450	0.535
21	0.391	0.440	0.524
22	0.382	0.430	0.514
23	0.374	0.421	0.505
24	0.367	0.413	0.497
25	0.360	0.406	0.489

Table de Fisher

$\nu_2 \downarrow$ / $\nu_1 \rightarrow$	1	2	3	4	5	6	8	12	24	∞
1	161,4	199,5	215,7	224,6	230,2	234,0	238,9	243,9	249,0	254,3
2	18,51	19,00	19,16	19,25	19,30	19,33	19,37	19,41	19,45	19,50
3	10,13	9,55	9,28	9,12	9,01	8,94	8,84	8,74	8,64	8,53
4	7,71	6,94	6,59	6,39	6,26	6,16	6,04	5,91	5,77	5,63
5	6,61	5,79	5,41	5,19	5,05	4,95	4,82	4,68	4,53	4,36
6	5,99	5,14	4,76	4,53	4,39	4,28	4,15	4,00	3,84	3,67
7	5,59	4,74	4,35	4,12	3,97	3,87	3,73	3,57	3,41	3,23
8	5,32	4,46	4,07	3,84	3,69	3,58	3,44	3,28	3,12	2,93
9	5,12	4,26	3,86	3,63	3,48	3,37	3,23	3,07	2,90	2,71
10	4,96	4,10	3,71	3,48	3,33	3,22	3,07	2,91	2,74	2,54
11	4,84	3,98	3,59	3,36	3,20	3,09	2,95	2,79	2,61	2,40
12	4,75	3,88	3,49	3,26	3,11	3,00	2,85	2,69	2,50	2,30
13	4,67	3,80	3,41	3,18	3,02	2,92	2,77	2,60	2,42	2,21
14	4,60	3,74	3,34	3,11	2,96	2,85	2,70	2,53	2,35	2,13
15	4,54	3,68	3,29	3,06	2,90	2,79	2,64	2,48	2,29	2,07
16	4,49	3,63	3,24	3,01	2,85	2,74	2,59	2,42	2,24	2,01
17	4,45	3,59	3,20	2,96	2,81	2,70	2,55	2,38	2,19	1,96
18	4,41	3,55	3,16	2,93	2,77	2,66	2,51	2,34	2,15	1,92
19	4,38	3,52	3,13	2,90	2,74	2,63	2,48	2,31	2,11	1,88
20	4,35	3,49	3,10	2,87	2,71	2,60	2,45	2,28	2,08	1,84
21	4,32	3,47	3,07	2,84	2,68	2,57	2,42	2,25	2,05	1,81
22	4,30	3,44	3,05	2,82	2,66	2,55	2,40	2,23	2,03	1,78
23	4,28	3,42	3,03	2,80	2,64	2,53	2,38	2,20	2,00	1,76
24	4,26	3,40	3,01	2,78	2,62	2,51	2,36	2,18	1,98	1,73
25	4,24	3,38	2,99	2,76	2,60	2,49	2,34	2,16	1,96	1,71
26	4,22	3,37	2,98	2,74	2,59	2,47	2,32	2,15	1,95	1,69
27	4,21	3,35	2,96	2,73	2,57	2,46	2,30	2,13	1,93	1,67
28	4,20	3,34	2,95	2,71	2,56	2,44	2,29	2,12	1,91	1,65
29	4,18	3,33	2,93	2,70	2,54	2,43	2,28	2,10	1,90	1,64
30	4,17	3,32	2,92	2,69	2,53	2,42	2,27	2,09	1,89	1,62
40	4,08	3,23	2,84	2,61	2,45	2,34	2,18	2,00	1,79	1,51
60	4,00	3,15	2,76	2,52	2,37	2,25	2,10	1,92	1,70	1,39
120	3,92	3,07	2,68	2,45	2,29	2,17	2,01	1,83	1,61	1,25
∞	3,84	2,99	2,60	2,37	2,21	2,09	1,94	1,75	1,52	1,00

Rapport-gratuit.com
LE NUMERO 1 MONDIAL DU MÉMOIRES

Table de Student

v \ P	0,90	0,80	0,70	0,60	0,50	0,40	0,30	0,20	0,10	0,05	0,02	0,01	0,001
1	0,158	0,325	0,510	0,727	1,000	1,376	1,963	3,078	6,314	12,706	31,821	63,657	636,619
2	0,142	0,289	0,445	0,617	0,816	1,061	1,386	1,886	2,920	4,303	6,965	9,925	31,598
3	0,137	0,277	0,424	0,584	0,765	0,978	1,250	1,638	2,353	3,182	4,541	5,841	12,929
4	0,134	0,271	0,414	0,569	0,741	0,941	1,190	1,533	2,132	2,776	3,747	4,604	8,610
5	0,132	0,267	0,408	0,559	0,727	0,920	1,156	1,476	2,015	2,571	3,365	4,032	6,869
6	0,131	0,265	0,404	0,553	0,718	0,906	1,134	1,440	1,943	2,447	3,143	3,707	5,959
7	0,130	0,263	0,402	0,549	0,711	0,896	1,119	1,415	1,895	2,365	2,998	3,499	5,408
8	0,130	0,262	0,399	0,546	0,706	0,889	1,108	1,397	1,860	2,306	2,896	3,355	5,041
9	0,129	0,261	0,398	0,543	0,703	0,883	1,100	1,383	1,833	2,262	2,821	3,250	4,781
10	0,129	0,260	0,397	0,542	0,700	0,879	1,093	1,372	1,812	2,228	2,764	3,169	4,587
11	0,129	0,260	0,396	0,540	0,697	0,876	1,088	1,363	1,796	2,201	2,718	3,106	4,437
12	0,128	0,259	0,395	0,539	0,695	0,873	1,083	1,356	1,782	2,179	2,681	3,055	4,318
13	0,128	0,259	0,394	0,538	0,694	0,870	1,079	1,350	1,771	2,160	2,650	3,012	4,221
14	0,128	0,258	0,393	0,537	0,692	0,868	1,076	1,345	1,761	2,145	2,624	2,977	4,140
15	0,128	0,258	0,393	0,536	0,691	0,866	1,074	1,341	1,753	2,131	2,602	2,947	4,073
16	0,128	0,258	0,392	0,535	0,690	0,865	1,071	1,337	1,746	2,120	2,583	2,921	4,015
17	0,128	0,257	0,392	0,534	0,689	0,863	1,069	1,333	1,740	2,110	2,567	2,898	3,965
18	0,127	0,257	0,392	0,534	0,688	0,862	1,067	1,330	1,734	2,101	2,552	2,878	3,922
19	0,127	0,257	0,391	0,533	0,688	0,861	1,066	1,328	1,729	2,093	2,539	2,861	3,883
20	0,127	0,257	0,391	0,533	0,687	0,860	1,064	1,325	1,725	2,086	2,528	2,845	3,850
21	0,127	0,257	0,391	0,532	0,686	0,859	1,063	1,323	1,721	2,080	2,518	2,831	3,819
22	0,127	0,256	0,390	0,532	0,686	0,858	1,061	1,321	1,717	2,074	2,508	2,819	3,792
23	0,127	0,256	0,390	0,532	0,685	0,858	1,060	1,319	1,714	2,069	2,500	2,807	3,767
24	0,127	0,256	0,390	0,531	0,685	0,857	1,059	1,318	1,711	2,064	2,492	2,797	3,745
25	0,127	0,256	0,390	0,531	0,684	0,856	1,058	1,316	1,708	2,060	2,485	2,787	3,725
26	0,127	0,256	0,390	0,531	0,684	0,856	1,058	1,315	1,706	2,056	2,479	2,779	3,707
27	0,127	0,256	0,389	0,531	0,684	0,855	1,057	1,314	1,703	2,052	2,473	2,771	3,690
28	0,127	0,256	0,389	0,530	0,683	0,855	1,056	1,313	1,701	2,048	2,467	2,763	3,674
29	0,127	0,256	0,389	0,530	0,683	0,854	1,055	1,311	1,699	2,045	2,462	2,756	3,659
30	0,127	0,256	0,389	0,530	0,683	0,854	1,055	1,310	1,697	2,042	2,457	2,750	3,646
40	0,126	0,255	0,388	0,529	0,681	0,851	1,050	1,303	1,684	2,021	2,423	2,704	3,551
80	0,126	0,254	0,387	0,527	0,679	0,848	1,046	1,296	1,671	2,000	2,390	2,660	3,460
120	0,126	0,254	0,386	0,526	0,677	0,845	1,041	1,289	1,658	1,980	2,358	2,617	3,373
∞	0,126	0,253	0,385	0,524	0,674	0,842	1,036	1,282	1,645	1,960	2,326	2,576	3,291

Mémoire de fin d'études pour l'obtention du Diplôme de Master Sciences et Techniques

Nom et prénom: EL BOURAKADI Khadija

Année Universitaire : 2015/2016

Titre: Optimisation et validation d'une méthode de dosage simultané de paracétamol et la caféine dans différentes formes pharmaceutiques : comprimé, sachet, et gélule

Résumé

Des médicaments à base de paracétamol et de la caféine sont disponibles sous différentes formes pharmaceutiques. Actuellement, le dosage de ces molécules dans les produits finis se fait par des méthodes variées, nous proposons une méthode analytique simple et rapide permettant le dosage de ces principes actifs dans toutes ses formes pharmaceutiques. L'objectif d'une telle démarche est d'aider les laboratoires de contrôle des médicaments et les spécialistes en industrie pharmaceutique, de réduire le temps et le coût de l'analyse et par la suite de minimiser les rejets chimiques.

Ce manuscrit est repartie en trois chapitres, la première est consacrée à une étude bibliographique sur les substances actives (paracétamol et la caféine),les médicaments, chromatographie liquide à haute performances (HPLC) et la validation analytique d'une méthode de dosage par HPLC, la deuxième chapitre est consacrée à l'étude expérimentale de l'optimisation et la validation analytique d'une méthode de dosage de paracétamol et la caféine par HPLC dans les différents formes pharmaceutiques (Comprime, gélule et sachets), et la troisième chapitre consacré au traitement des résultats et discutions.

Dans le cadre de ce travail, nous avons pu optimiser les conditions chromatographiques, qui nous ont permis d'identifier, de quantifier et de séparer les principes actifs. Ensuite, nous avons validé la méthode chromatographies. La méthode a été appliquée avec succès au LNCM, pour le dosage de PA dans les différentes formes pharmaceutiques (Comprime, gélule et sachets). Les résultats obtenus ont été dans les normes.

Mots clés : Validation analytique, conditions chromatographiques HPLC, paracétamol, caféine...

Rapport-Gratuit.com