

REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE

Ministère de l'Enseignement Supérieur
et de la Recherche Scientifique

وزارة التعليم العالي و البحث العلمي

Université Mouloud Mammeri
FACULTE DE MEDECINE
DE TIZI OUZOU



جامعة مولود معمور
كلية الطب
تيزي وزو

ⵜⴰⵎⴰⵣⵓⵔⵉⵜ ⵏ ⵏⵓⵔⵓⵣⵓ ⵏ ⵏⵓⵔⵓⵣⵓⵔⵉⵜ ⵏ ⵏⵓⵔⵓⵣⵓⵔⵉⵜ

Département de Pharmacie

N° D'ORDRE :

MEMOIRE DE FIN D'ETUDES

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

Présenté et soutenu publiquement

Le 18 JUILLET 2017

Thème

Mise au point et validation d'une méthode de dosage du
Diclofénac sodique dans des comprimés gastro-résistants de
50 mg par HPLC, en vue d'une étude du profil de dissolution

Promoteur: Dr BEN SI SAID Hacene

Réalisé par :

M^r TAMAZIRT Boussad

Membres du jury :

Dr. MAMOU Marzouk	MAHU	Faculté de Médecine	UMMTO	Président de jury
Dr. BEN SI SAID Hacene	AHU	Faculté de Médecine	UMMTO	Promoteur
Pr. BOUDIS Hakim	MCAHU	Faculté de Médecine	UBYBKA	Examineur
Dr. KESSAL Fetta	MAHU	Faculté de Médecine	UMMTO	Examinatrice

ANNEE UNIVERSITAIRE : 2016/2017

DEDICACES

Dédicaces

C'est avec profonde gratitude et sincères mots, que je dédie ce
modeste travail à

Ma très chère mère, à qui je dois tout dans la vie, celle qui m'a élevé et
inculqué en moi les bonnes valeurs de la vie, celle que tous les mots ne
suffisent pour lui exprimer mon amour et ma gratitude, je lui souhaite
longue vie, santé, tranquillité, et bonheur inchalah. J'espère que jamais
je ne la décevrais et que dieu m'aide à lui rendre au moins un peu de ce
qu'elle m'a donné.

Mon défunt père que j'aurais aimé qu'il soit présent pour voir ce que je
suis devenu aujourd'hui. Puisse dieu lui réserver une place dans le
paradis comme celle qu'il a dans mon cœur.

C'est avec une grande tristesse et les larmes aux yeux que je dédie ce
travail à ma grand-mère qui est décédée récemment, que dieu ait pitié
de son âme et l'accueille dans son vaste paradis.

Je dédie aussi mon travail à mes très chères frères et sœurs
(FADHILA, FATIMA, ARAB, MAHMOUD, FAIROUZ, KAHINA
et ABDERRAZAK) que dieu puisse exaucer tous leurs vœux dans la
vie.

Sans oublier mes petits neveux ; le grand IDIR, AKSELUS
ABAHANUS et les moutchoutchous de Kahina ADAM et INES que
Dieu les garde et les bénisse.

Je ne peux clôturer la page des dédicaces sans évoquer mes amis avec
qui j'ai partagé mon cursus et toute l'équipe de Pharmavenir à qui je
souhaite la réussite dans leurs vies professionnelle et privée et plus
spécialement Maha à qui je souhaite tout le bonheur du monde.

Boussad

REMERCIEMENTS

Remerciement

Je tiens tout d'abord à remercier Dieu le tout puissant et miséricordieux qui m'a donné la force et la patience d'aboutir à ce travail fructueux.

La concrétisation de ce travail n'est rendue possible que grâce au soutien et à la bonne volonté de certaines personnes à qui je juge nécessaire de témoigner ma gratitude.

Au Docteur BEN SI SAID.H

Assistant hospitalo-universitaire en Chimie Analytique

Je tiens à vous remercier d'avoir accepté de diriger ce travail, pour la qualité de l'encadrement, pour votre aide précieuse, votre accessibilité, votre disponibilité et les conseils que vous m'avez prodigués tout au long de ce travail.

Au Docteur MAMOU.M

Maitre-assistant hospitalo-universitaire en Chimie Analytique

Je vous témoigne ma gratitude pour votre large contribution à la réussite de ce modeste travail en assurant la disponibilité et l'accès à l'ensemble du matériel utilisé au cours de cette étude.

En votre qualité de chef de département ;

Votre sérieux, votre compétence et votre dévouement pour la pharmacie méritent mes louanges et mes encouragements pour une bonne continuité.

Je vous remercie Monsieur pour l'honneur que vous me faites en acceptant de présider la soutenance de cette thèse.

Au Professeur BOUDIS.H

Maitre de conférences hospitalo-universitaire au département de pharmacie de la faculté de médecine d'Alger en Chimie Analytique

Je vous remercie Monsieur pour l'honneur que vous me faites en acceptant d'être membre de jury et d'examiner ce travail. Veuillez trouver ici l'expression de mes plus vifs remerciements.

Au Docteur KESSAL.F

Maitre-assistante hospitalo-universitaire en Pharmacie Galénique

Merci d'avoir eu la gentillesse d'accepter d'être membre de jury et d'examiner ce travail.

Je vous témoigne également ma gratitude pour votre large contribution en me permettant de réaliser l'étape de la formulation du placebo au sein de votre laboratoire.

Je tiens à remercier spécialement ma famille pour votre présence et votre soutien très utiles afin de progresser et d'atteindre mes objectifs. Le succès de ce travail est aussi le vôtre.

Ma profonde reconnaissance est destinée à toute personne ayant contribué de près ou de loin à la réalisation de ce projet de fin d'études.

Boussad TAMAZIRT

TABLE DES MATIERES

TABLES DES MATIERES

Introduction générale..... 1

Objectifs 2

Partie théorique

Chapitre I : Diclofénac sodique

1. Définition 3

2. Caractéristiques physicochimiques 3

3. Propriétés pharmacologiques 4

3.1. Propriétés Pharmacocinétiques..... 4

3.1.1. Absorption..... 4

3.1.2. Distribution..... 4

3.1.3. Métabolisme 5

3.1.4. Excrétion 5

3.2. Propriétés Pharmacodynamiques et mécanisme d'action 5

4. Indications thérapeutiques 5

5. Effets indésirables 6

6. Contre-indications 6

7. Interactions médicamenteuses 7

ChapitreII : Comprimés et cinétique de dissolution

A. Comprimés

1. Définition du comprimé 8

2. Classification des comprimés..... 8

2.1. Classification selon l'enrobage 8

2.1.1. Comprimés non enrobés..... 8

2.1.2. Comprimés enrobés..... 9

2.2. Comprimés spéciaux 9

2.3. Comprimés à libération modifiée 9

3. Les comprimés gastro-résistants 9

4. Fabrication des comprimés..... 9

5. Contrôle qualité des comprimés : 11

TABLE DES MATIERES

B. Cinétique de dissolution

1. Définition	12
2. Mécanisme de la dissolution	12
3. Facteurs intervenant dans la dissolution.....	13
3.1. Facteurs liés aux propriétés physicochimiques de la molécule.....	13
3.2. Facteurs liés à la formulation	13
3.3. Facteurs liés aux processus de fabrication	14
4. Le système de classification biopharmaceutique (BCS)	15
5. Essai de dissolution des formes solides.....	15
5.1. Intérêt de l'essai de dissolution	16
5.2. Appareillage	16
6. Comparaison des profils de dissolution in vitro.....	17
6.1. Méthodes de comparaison	17
6.1.1. Les approches statistiques	17
6.1.2. La méthode modèle dépendant.....	17
6.1.3. La méthode modèle indépendant.....	17

Chapitre III : Validation analytique

1. Contexte réglementaire	20
2. Cycle de vie d'une méthode	21
3. Définition et objectifs de la validation	22
3.1. Définition	22
3.2. Objectifs de la validation.....	22
4. Critères de validation	23
5. Le choix des critères de validation	25
6. Protocoles en phase de validation	26
7. Démarches statistiques de la validation	28
7.1. Spécificité.....	28
7.2. Fonction de réponse	29
7.3. Alignement des observations	31
7.4. Prédiction inverses.....	32
7.5. Calcul de la justesse et de la fidélité	33
7.5.1. Modèle.....	33

TABLE DES MATIERES

7.5.2. Justesse	34
7.5.3. Fidélité.....	35
7.6. Calcul de l'exactitude.....	35
7.6.1. Erreur totale et profil d'erreur totale	35
7.6.2. Calcul de l'intervalle de tolérance.....	36
7.6.3. Le profil d'exactitude	37
7.7. Le choix de la fonction de réponse.....	38
7.8. Linéarité	38
7.9. Limites de quantification.....	38
8. Outils de calculs pour la validation	39

Partie pratique

Matériel et méthode

1. Matériels.....	42
1.1. Appareillage	42
1.2. Verreries et autres.....	43
1.3. Matières premières	43
1.4. Réactifs.....	44
2. Méthode.....	44
2.1. Méthodologie de la validation analytique	44
2.2. Choix du Protocole de validation.....	45
2.3. Le choix des paramètres de la validation	45
2.3.1. Domaine d'application et les niveaux de concentration.....	45
2.3.2. Limites d'acceptabilité (λ).....	45
2.3.3. Probabilité de confiance (β)	45
2.4. Conditions expérimentales	46
2.4.1. Le choix de la dilution.....	46
2.4.2. Le choix du diluant.....	46
2.4.3. Préparation des solutions.....	46
2.4.3.1. Préparation du diluant (tampon à pH 6,8)	46
2.4.3.2. Préparation des standards d'étalonnage	46
2.4.3.3. Préparation du placebo	47
2.4.3.4. Préparation des standards de validation	48

TABLE DES MATIERES

2.4.3.5. Préparation de la phase mobile.....	49
2.4.4. Conditions chromatographiques.....	50
2.5. Préparation de la feuille de calcul	50
Résultats	
1. Spécificité et effet matrice.....	51
1.1. Comparaison des chromatogrammes	51
1.2. Confirmation de la spécificité sur les deux gammes d'étalonnage et de validation.....	52
1.3. Vérification de l'absence d'effet matrice et d'erreur systématique	55
2. Fonctions de réponse	55
2.1. Critères de choix de la fonction de réponse	59
3. Alignement des observations	61
4. Prédiction inverses.....	63
5. Justesse	63
6. Fidélité	64
7. Exactitude.....	65
8. Erreur totale.....	67
9. Intervalle de tolérance	67
10. Profil d'exactitude	69
11. Linéarité	69
12. Limites de quantification.....	71
Discussions	
1. Spécificité.....	73
1.1. Comparaison des chromatogrammes	73
1.2. Confirmation de la spécificité sur les deux gammes d'étalonnage et de validation.....	73
1.3. Comparaison des deux pentes des deux droites de régression	73
2. Test d'homogénéité des variances.....	74
3. Le choix de la fonction de réponse.....	74
4. Critères de performance de la fonction de réponse choisie.....	74
4.1. Justesse	74
4.2. Fidélité.....	74
5. Critère de décision sur la validité de la méthode	75
5.1. Erreur totale.....	75

TABLE DES MATIERES

5.2.Profil d'exactitude	75
5.3.Limites de quantification et intervalle de validité	75
5.4.Linéarité	75
Conclusion	
1.Synthèse des résultats	77
2.Commentaire sur le protocole de validation choisi	77
Conclusion générale	78
Références bibliographiques	
Annexes	
Résumé	

LISTE DES ABREVIATIONS

ACN :	Acétonétrile
AINS :	Anti Inflammatoire Non Stéroïdien
AMM :	Autorisation de Mise sur le Marché
ANOVA :	ANalyse Of VAriance
ARA II :	Antagoniste des récepteurs de l'Angiotensines II
BCS :	Biopharmaceutical Classification System
BPF :	Bonnes Pratiques de Fabrication
CAS :	Chemical Abstract Service
CEI :	Commission électrotechnique internationale
COX :	Cyclo OXYgénase
Cp :	comprimé
CV :	Coefficient de variation
DCI :	Dénomination Commune Internationale
FDA :	Food and Drug Administration
HPLC :	High Performance Liquid Chromatography
ICH :	Internationale Conference of Harmonization
ISO :	International Standard Organisation
IUPAC :	International Union of Pure and Applied Chemistry
IV :	Intra Veineuse
LD :	Limite de Détection
LOX :	Lipo Oxygénase
LP :	Libération prolongée
LQ :	Limite de Quantification
LQ_{inf} :	Limite de Quantification inférieure
LQ_{sup} :	Limite de Quantification supérieure
MeOH :	Méthanol
NF :	Normes Françaises
PA :	Principe Actif
QSP :	Quantité Suffisante Pour
SCE :	Somme des Carrés des Ecart
SE :	Standard d'Etalonnage
SFSTP :	Société Française des Sciences et Techniques Pharmaceutiques
SV :	Standard de Validation
UV :	Ultra-Violet

LISTE DES TABLEAUX

Tableau I : Propriétés physicochimiques du diclofénac sodique	4
Tableau II: Interactions du Diclofénac sodique avec d'autres médicaments	7
Tableau III : Essais de contrôle qualité des comprimés	11
Tableau IV : Facteurs liés aux propriétés physicochimiques de la molécule.....	13
Tableau V : Facteurs liés à la formulation intervenant dans la dissolution.....	14
Tableau VI : Facteurs liés au processus de fabrication influençant la dissolution.....	14
Tableau VII : Les principaux critères de validation	24
Tableau VIII : Critères de performance à déterminer pour les méthodes qualitatives et les méthodes quantitatives.	25
Tableau IX : Choix du nombre de standards d'étalonnage et de validation en fonction du protocole choisi.	28
Tableau X : Exemple de fonctions de réponse	30
Tableau XI : Règles d'alignement pour différentes fonctions de réponses.....	32
Tableau XII : Calcul des prédictions inverses pour différentes fonctions de réponse	32
Tableau XIII : Appareillages utilisés dans ce présent travail.....	42
Tableau XIV : Verreries et autres matériels utilisés dans ce présent travail.....	43
Tableau XV : Matières premières utilisées dans le présent travail	43
Tableau XVI : Réactifs utilisés dans le présent travail	44
Tableau XVII : Montage expérimental des SE	47
Tableau XVIII : Formulation du placebo des comprimés 50 mg gastro-résistants du Diclofenac sodique	47
Tableau XIX : Montage expérimental des SV	49
Tableau XX : Conditions chromatographiques de la méthode de dosage.....	50
Tableau XXI : Résultats de la comparaison des chromatogrammes	52
Tableau XXII : Résultats obtenus sur la gamme sans matrice	53
Tableau XXIII : Comparaison de la pente et l'ordonnée à l'origine avec 0 sur la gamme sans matrice.....	53
Tableau XXIV : Résultats obtenus sur la gamme avec matrice	54
Tableau XXV : Comparaison de la pente et l'ordonnée à l'origine avec 0 sur la gamme sans matrice.....	54
Tableau XXVI : Comparaison des deux pentes	55
Tableau XXVII : Résultats obtenus pour la fonction $y = ax + b$	56
Tableau XXVIII : Résultats obtenus avec la fonction $\ln y = f \ln x$	57

LISTE DES TABLEAUX

Tableau XXIX : Résultats obtenus pour la fonction $y = f(x)$	58
Tableau XXX : Résultats obtenus pour la fonction $y = ax$	59
Tableau XXXI : Critères de choix de la fonction de réponse	60
Tableau XXXII : Tableau d'alignement des réponses observées avec les trois séries de validation	62
Tableau XXXIII : Prédiction inverses obtenus avec les SV	63
Tableau XXXIV : Calcul de la justesse pour chaque niveau des SV	64
Tableau XXXV : Calcul de fidélité pour chaque niveau des SV	64
Tableau XXXVI : Résultats du calcul de l'exactitude relative	66
Tableau XXXVII : Calcul de l'erreur totale pour chaque niveau de concentration des SV	67
Tableau XXXVIII : Calcul des limites de tolérance pour chaque niveau de concentration	68
Tableau XXXIX : Calcul des différents paramètres de la linéarité.....	70
Tableau XL : calcul de la limite de quantification	72
Tableau XLV : Signification des résultats de la comparaison des pentes et des ordonnées à l'origine avec 0.....	73
Tableau XLVI : signification des résultats de la comparaison des deux pentes et des deux ordonnées à l'origine entre elles.....	73

LISTE DES FIGURES

Figure 01 : Diagramme illustrant des étapes de la fabrication de comprimés	10
Figure 02 : Phase biopharmaceutique du devenir d'un PA à partir d'une forme sèche (Cp)...	12
Figure 03 : schéma des quatre types d'appareils de dissolution.....	16
Figure 04 : Exemple d'un graphe représentant le profil de dissolution du Diclofénac.....	18
Figure 05: Cycle de vie d'une méthode d'analyse.	21
Figure 06: Logigramme permettant de sélectionner un protocole de validation.....	27
Figure 07 : Représentation schématique des composantes de l'erreur	36
Figure 08 : Chromatogramme du standard d'étalonnage, niveau 105%	51
Figure 09 : Chromatogramme du standard de validation, niveau 105%	51
Figure 10 : Chromatogramme du diluant non chargé de PA.....	52
Figure 11 : Chromatogramme du diluant avec placebo non chargé de PA.....	52
Figure 12 : Courbes d'étalonnage obtenues avec la fonction $y = ax + b$	56
Figure 13 : courbes d'étalonnage obtenues avec la fonction $\ln y = f \ln x$	57
Figure 14 : Courbes d'étalonnage obtenues avec la fonction $y = f(x)$	58
Figure 15 : courbes d'étalonnage obtenues avec la fonction $y = ax$	59
Figure 16 : Profil d'erreur relative totale.....	67
Figure 17 : Profil d'exactitude	69
Figure 18 : Droite de régression linéaire entre les quantités prédites et les quantités introduites.	71

INTRODUCTION GENERALE

De nos jours, le concept de l'assurance qualité devient de plus en plus une nécessité inexorable dans le domaine de l'industrie pharmaceutique, et cela se généralise dans tous les secteurs.

Pour étayer les différentes garanties qu'un produit pharmaceutique est d'une qualité optimale, l'approche la plus utilisée est la validation de toute méthode de dosage mise au point dans l'ensemble des tests de contrôle, des procédés de fabrication, des procédés de nettoyage et toute autre procédure industrielle nécessitant un dosage, avant sa mise en routine. Cette approche péremptoire se base sur un ensemble de mesures expérimentales formulées en tests statistiques prouvant ainsi mathématiquement la fiabilité et l'exactitude de la méthode, par conséquent une garantie sur les résultats fournis pour le laboratoire ainsi que pour les autorités compétentes.

C'est dans ce cadre que s'inscrit le travail réalisé au cours de ce mémoire de fin d'études ; en vue de l'étude du profil de dissolution du Diclofénac sodique dans des comprimés gastro-résistants de 50 mg, une nouvelle méthode de dosage par chromatographie liquide à haute performance (HPLC) est mise au point, pour augmenter l'intervalle du dosage et offrir une meilleure sélectivité, et de là une meilleure sensibilité que la méthode proposée par la pharmacopée qui est la spectrophotométrie (UV-VISIBLE).

Pour s'assurer de la fiabilité de cette méthode, elle doit faire l'objet d'une validation. Le choix de la méthode de validation s'est vite porté sur la validation par un profil d'exactitude vu qu'il est basé sur une application directe des principes décrits dans les normes de la série ISO 5725, en plus seule l'évaluation de l'exactitude des résultats qui prend en compte la notion d'erreur totale, ce qui donne des garanties à la fois aux laboratoires et aux autorités réglementaires sur la capacité de la méthode d'atteindre son objectif.

En effet notre travail est scindé en deux parties. Une est une revue de la littérature comportant trois chapitres : Diclofénac sodique, comprimés et cinétique de dissolution, et validation analytique. L'autre partie de ce mémoire concerne la mise au point et la validation d'une méthode de dosage du Diclofenac sodique dans des comprimés gastro-résistants de 50 mg par HPLC.

OBJECTIFS

L'objectif de notre étude est de proposer une méthode de dosage du Diclofenac sodique, dans les comprimés dits gastro-résistants de 50 mg par HPLC, fiable et exacte avec un intervalle de dosage acceptable qui permet d'établir un profil de dissolution (plusieurs niveaux de concentration en fonction du temps) et cela avec une possibilité d'effectuer un dosage direct, sans dilution, à partir du milieu de dissolution.

Pour atteindre cet objectif, cette méthode doit être validée selon le protocole élaboré par la commission de la société française des sciences techniques et pharmaceutiques (SFSTP) décrivant une approche de validation harmonisée, publié dans la revue STP Pharma pratique en janvier 2006.

PARTIE THEORIQUE

CHAPITRE I
DICLOFENAC SODIQUE

Le premier médicament anti-inflammatoire mis sur le marché après l'acide acétyle salicylique est la phénylbutazone, parue en 1952. Ce n'est qu'après une décennie qu'on a eu la venue de l'acide méfénamique, ibuprofène et l'indométacine dans cette classe médicamenteuse[1]. A ce stade, les industriels pharmaceutiques se sont décidé de se lancer dans un projet de développement de nouveaux médicaments anti inflammatoires qui ont une activité supérieure et une tolérance bien meilleure. C'est en 1973 que le laboratoire CIBA-GEIGY innove en commercialisant le Diclofénac sous le nom de Voltarène [2].

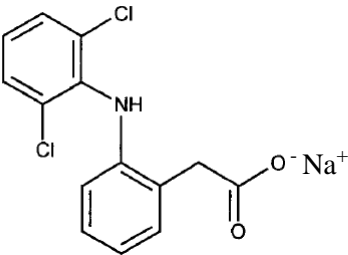
1. Définition

Le Diclofénac est un anti-inflammatoire non stéroïdien (AINS), dérivé de l'acide phénylacétique du groupe des acides arylcarboxyliques. Il possède les propriétés suivantes : activité antalgique, antipyrétique, anti-inflammatoire et inhibition de courte durée de la fonction plaquettaire. On compte 57 médicaments contenant la substance active seule et deux médicaments contenant la substance active en association (Misoprostol) [3]. Disponible sous plusieurs formes : orale, injectable, rectale, cutanée, collyre et à différentes doses 25 mg, 50 mg, 75 mg, 100 mg [4].

2. Caractéristiques physicochimiques

Les propriétés physicochimiques sont résumées dans le tableau I suivant :

Tableau I : Propriétés physicochimiques du diclofénac sodique[5]

DCI	Diclofénac de sodium
IUPAC	[2-[(2,6-dichlorophényl)amino]phényl] acétate de sodium.
Formule chimique brute	C ₁₄ H ₁₁ Cl ₂ NO ₂
Pka	4,0 ± 0,2 à 25°C dans l'eau
Formule chimique développée	
Masse molaire :	318,1 g /mole
Point de fusion	280°C, avec décomposition
Solubilité pour une température de 15°C à 25°C	<ul style="list-style-type: none"> • Facilement soluble dans le méthanol (1 à 10 ml / 1g du Diclofénac) • Soluble dans l'éthanol à 96% (10 à 30 ml / 1g du Diclofénac) • Assez soluble dans l'eau (30 à 100 ml / 1g du Diclofénac) • Peu soluble dans l'acétone (100 à 1000 ml / 1g du Diclofénac)
Aspect	Poudre cristalline, blanche ou faiblement jaunâtre, faiblement hygroscopique.

Le Diclofénac selon le système de classification des produits biopharmaceutiques (BCS) telle que défini par la FDA appartient à la CLASSE II, caractérisé par une haute perméabilité et une faible solubilité[6].

3. Propriétés pharmacologiques

3.1. Propriétés pharmacocinétiques

3.1.1. Absorption

Le Diclofénac est absorbé à 100% après une administration orale. Toutefois, en raison du premier passage hépatique, seulement 50% de la dose absorbée est systémiquement disponible. Les aliments n'ont pas d'effet significatif sur l'ampleur de l'absorption du Diclofénac [7].

3.1.2. Distribution

Le volume de distribution du Diclofénac est de 1,4 l/kg. Il se lie à plus de 99% aux protéines plasmatiques (albumine). Le Diclofénac diffuse dans et en dehors du liquide synovial selon le gradient de concentration, mais on ne sait pas si cette diffusion joue un rôle dans l'efficacité du Diclofénac [7].

3.1.3. Métabolisme

Cinq métabolites ont été identifiés dans le plasma et les urines. Le Diclofénac est hydroxylé au niveau hépatique avant qu'il subisse une glucuroconjugaison et une sulfonoconjugaison suivi d'une excrétion biliaire. Il n'y a qu'un seul métabolite qui est le 4'hydroxy-diclofénac dont persiste l'activité pharmacologique, mais elle reste très faible [7].

3.1.4. Excrétion

L'infime quantité de la forme inchangée est éliminée dans les urines ainsi que 65% des métabolites, le reste est éliminé dans les fécès. La demi-vie du Diclofénac inchangé dans le plasma est entre 1,2 et 2 heures, sachant que 35% de la dose rentre dans le cycle entéro-hépatique [7].

3.2. Propriétés pharmacodynamiques et mécanisme d'action

L'action d'une dose unique est beaucoup plus longue que sa demi-vie, cela s'explique en partie par les concentrations élevées présentes dans le liquide synovial. Le mécanisme d'action exact n'est pas connu mais il est assimilé aux autres AINS, en bloquant la synthèse des prostaglandines par inhibition de la cyclo-oxygénase (COX).

L'inhibition de la COX engendre la diminution de la prostaglandine au niveau de l'épithélium de l'estomac la rendant très sensible à la corrosion par l'acidité gastrique, sachant que le Diclofénac a une petite préférence à bloquer les COX2 ce qui le rend moins agressif par rapport à l'Aspirine et l'Indométacine. Le Diclofénac est le seul AINS qui apparemment inhibe aussi la lipo-oxygénase (LOX) diminuant ainsi la synthèse des leucotriènes (médiateurs pro-inflammatoires).

Il est aussi soupçonné qu'une action sur la phospholipase A2 est ajoutée à l'ensemble des mécanismes provoquant ainsi des actions antipyrétique, antalgique et anti-inflammatoire [7].

4. Indications thérapeutiques

Ce médicament est un anti-inflammatoire non stéroïdien (AINS). Il lutte contre l'inflammation et la douleur, fait baisser la fièvre et fluidifie le sang.

Il est utilisé chez l'adulte dans :

- Le traitement symptomatique des rhumatismes inflammatoires chroniques (notamment de la polyarthrite et de la spondylarthrite ankylosante) et de certaines arthroses invalidantes ;
- Le traitement de courte durée des douleurs aiguës d'arthrose, des arthrites (dont la goutte), des tendinites, des bursites, des lombalgies, des sciatiques et des cruralgies ;
- Les règles douloureuses (comprimés à 25 et à 50 mg).

- Il est utilisé chez l'enfant de plus de 6 ans dans le traitement des rhumatismes inflammatoires (dosages à 25 et 50 mg)[8].

5. Effets indésirables

- Les effets indésirables les plus fréquents sont digestifs : nausées, vomissements, diarrhée, ballonnements, constipation, douleurs abdominales, gastrite, aggravation d'une maladie inflammatoire chronique des intestins (maladie de Crohn, rectocolite hémorragique). Ulcère de l'estomac ou du duodénum, notamment en cas de traitement à dose élevée, de prise prolongée et chez la personne âgée. Exceptionnellement : hémorragie du tube digestif (vomissements sanglants, selles noires ou plus souvent pertes de sang imperceptibles, responsables de l'apparition d'une anémie).
- Réaction allergique : crise d'asthme, choc anaphylactique.
- Eruption cutanée, urticaire, démangeaisons. Exceptionnellement : photosensibilisation, allergie cutanée gravissime (éruptions bulleuses), complication infectieuse en cas de varicelle.
- Hypertension artérielle, œdèmes.
- Rétention d'eau pouvant aggraver une insuffisance cardiaque.
- Insuffisance rénale, en particulier en cas d'insuffisance cardiaque, de déshydratation ou de traitement par diurétique.
- Maux de tête, étourdissements. Plus rarement : somnolence ou au contraire insomnie, irritabilité, tremblements. Exceptionnellement : troubles de la vue, bourdonnements d'oreille.
- Augmentation des transaminases, hépatite (rare)
- Très rares anomalies de la numération formule sanguine.
- Les AINS en général sont susceptibles de diminuer la fertilité chez les femmes, notamment en cas de traitement chronique [8].

6. Contre-indications

Ce médicament ne doit pas être utilisé dans les cas suivants :

- Antécédent d'allergie ou d'asthme provoqué par la prise d'AINS, y compris l'aspirine ;
- Antécédent d'hémorragie digestive au cours d'un précédent traitement par AINS ;
- Ulcère de l'estomac ou du duodénum en cours, antécédent d'ulcère ou d'hémorragie digestive répétée ;
- Antécédent d'infarctus du myocarde ou d'accident vasculaire cérébral, insuffisance coronarienne, artérite ;
- Insuffisance cardiaque grave ;

- Insuffisance hépatique grave ;
- Insuffisance rénale grave ;
- Inflammation ou saignement récent du rectum (suppositoire adulte) ;
- Enfant de moins de 6 ans (comprimé à 25 mg) ;
- Enfant de moins de 35 kg (comprimé à 50 mg) ;
- Enfant de moins de 15 ans (comprimés LP à 75 et 100 mg, suppositoire adulte) ;
- Grossesse (à partir du 6^e mois)[8].

7. Interactions médicamenteuses

Les principales interactions médicamenteuses du Diclofénac sont résumées dans le tableau II suivant :

Tableau II: Interactions du Diclofénac sodique avec d'autres médicaments [7]

Médicaments	Effets engendrés
Aspirine et autres AINS	Majoration des effets indésirables
Méthotrexate	Toxicité du méthotrexate (hémato-toxicité)
Cyclosporine	Majoration de la toxicité hépatique
Inhibiteurs d'enzyme de conversion	Diminution de l'effet antihypertenseur
Les diurétiques	Hyperkaliémie
Lithium	Hyperlithémie
Warfarine	Saignement gastro-intestinal

CHAPITRE II
COMPRIMES ET CINETIQUE
DE DISSOLUTION

A. Comprimés

Aujourd'hui la forme solide des médicaments représentant les trois tiers de toutes les formes pharmaceutiques reste le système de délivrance du médicament de choix. La moitié de ses formes galéniques sèches est de type comprimé. Cet aspect du médicament inventé par un britannique, William Brockedon qui dépose le 8 décembre 1843 le brevet n° 9977 relatif à la fabrication des comprimés par le compactage de poudre entre deux poinçons, a souffert d'une concurrence avec les cachets cette forme posologique obsolète de nos jours, sachant qu'historiquement ces deux formes ont le même ancêtre qui est la pilule[9].

1. Définition du comprimé

Les comprimés sont des préparations solides contenant une unité de prise d'une ou plusieurs substances actives. Ils sont obtenus en agglomérant par compression un volume constant de particules ou par un autre procédé de fabrication approprié tel que l'extrusion, le moulage ou la cryodessiccation (lyophilisation). Les comprimés sont destinés à la voie orale. Certains sont avalés ou croqués, d'autres sont dissous ou désagrégés dans de l'eau avant administration, certains, enfin, doivent séjourner dans la bouche pour y libérer la substance active.

Les particules sont constituées d'une ou plusieurs substances actives, additionnées ou non d'excipients tels que : diluants, liants, désagrégant, agents d'écoulement, lubrifiants, composés pouvant modifier le comportement de la préparation dans le tube digestif, colorants autorisés par l'autorité compétente, aromatisants[10].

2. Classification des comprimés

On retrouve trois types de classifications des comprimés :

2.1. Classification selon l'enrobage

2.1.1. Comprimés non enrobés

Les comprimés non enrobés comprennent des comprimés à couche unique et des comprimés à couches multiples disposées parallèlement ou concentriquement. Les comprimés non enrobés répondent à la définition générale des comprimés. Examinée à la loupe, leur section présente suivant les cas une texture relativement homogène (comprimés à couche unique) ou stratifiée[10,11].

2.1.2. Comprimés enrobés

Les comprimés enrobés sont des comprimés recouverts d'une ou plusieurs couches de mélanges de substances diverses telles que : résines naturelles ou synthétiques, gommes, gélatine, charges insolubles inactives, sucres, substances plastifiantes, polyols, cires, colorants autorisés par l'autorité compétente et, parfois, aromatisants et substances actives. Les substances employées pour l'enrobage sont généralement appliquées sous forme de solution ou de suspension dans des conditions qui favorisent l'évaporation du solvant. Quand l'enrobage est constitué d'un film polymère très mince, le comprimé est dit pelliculé.

Le revêtement des comprimés enrobés est lisse, souvent coloré et il peut être poli ; examinée à la loupe, leur section présente un noyau entouré d'une ou de plusieurs couches continues de texture différente[10,11].

2.2. Comprimés spéciaux

On retrouve les comprimés effervescents, solubles, dispersibles, orodispersibles, les lyophilisats oraux et les comprimés gastro-résistants[10,11].

2.3. Comprimés à libération modifiée

Les comprimés à libération modifiée sont des comprimés enrobés ou non, qui sont préparés avec des excipients spéciaux, ou par des procédés particuliers, ou les deux, visant à modifier la vitesse, le lieu où le moment de la libération de la ou des substances actives.

Les comprimés à libération modifiée comprennent :

- Les comprimés à libération immédiate
- Les comprimés à libération prolongée
- Les comprimés à libération contrôlée
- Les comprimés à libération séquentielle [10,11].

3. Les comprimés gastro résistants

Ils sont des comprimés à libération modifiée destinés à résister au suc gastrique et à libérer la ou les substances actives dans le suc intestinal. Ils sont généralement préparés à partir de granulés ou de particules déjà recouverts d'un enrobage gastro-résistant, ou dans certains cas en recouvrant les comprimés d'une enveloppe gastro-résistante (comprimés entériques)[11].

4. Fabrication des comprimés

Le principe de la fabrication est très simple mais la réalisation est en fait assez complexe : il ne suffit pas de placer la dose de poudre destinée à faire un comprimé dans la matrice d'une

machine et de la comprimer entre deux poinçons. Pour avoir un comprimé, il faut tout d'abord que la poudre à comprimer ou « grain » ait des propriétés physiques et mécaniques très particulières. Le grain doit d'une part avoir une granulométrie et une fluidité qui assure un remplissage précis et rapide de la chambre de compression et d'autre part être constitué de particules capables de s'agglutiner pour rester liées les unes aux autres après la compression et donner ainsi un comprimé solide non friable. Toutefois, cette propriété d'agglutination ne doit pas être telle que le grain adhère aux poinçons et à la matrice ou que le comprimé se délite mal dans un peu d'eau ou dans le tube digestif. En fait, peu de principes actifs peuvent être comprimés directement.[11].

Les étapes de fabrication sont élucidées dans le schéma de la figure 01 suivante :

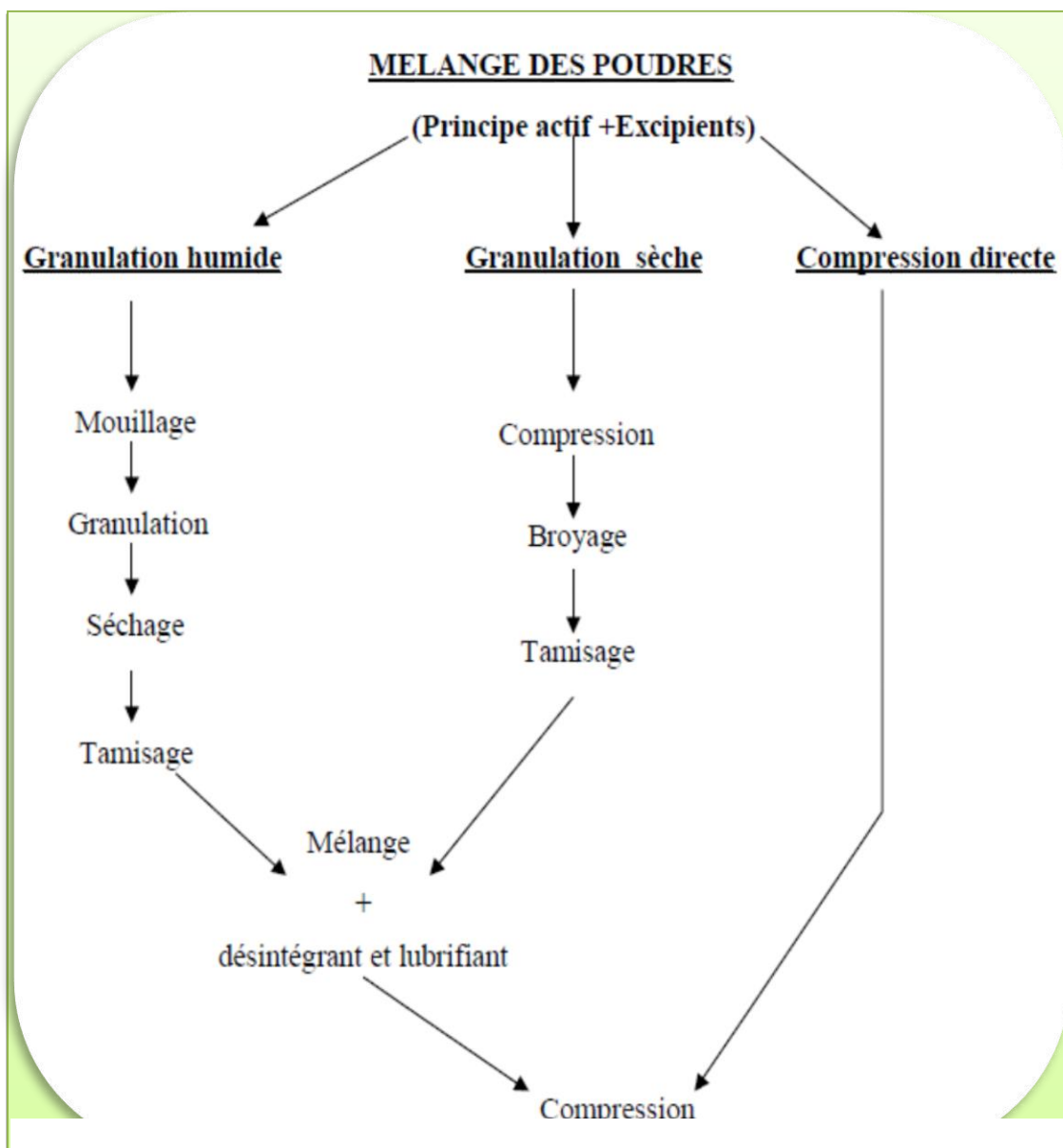


Figure 01 : Diagramme illustrant des étapes de la fabrication de comprimés

5. Contrôle qualité des comprimés

Selon la norme ISO 9001, le mot « qualité » peut être définie comme : « l'ensemble des propriétés et caractéristiques d'un produit ou service qui lui confèrent l'aptitude à satisfaire des besoins exprimés ou implicites ». D'après les BPF européennes, lorsqu'on parle de la « qualité du médicament », il s'agit de la qualité à réaliser pour répondre aux besoins des malades, c'est-à-dire la qualité décrite dans le dossier de demande d'AMM. « le contrôle consiste à mesurer une ou plusieurs caractéristiques d'une entité et à comparer les résultats obtenus à des spécifications préétablies » [11].

Pour cela, il est exigé pour les comprimés les essais suivants regroupés en 4 catégories [10–16], selon le tableau III suivant :

Tableau III : Essais de contrôle qualité des comprimés [10–16].

Essais pharmaceutiques	Essais liés à la nature du PA
<ul style="list-style-type: none"> - Test de sécabilité - Test de dureté ou de résistance à la rupture - Test de friabilité - Essai d'uniformité de masse - Essai d'uniformité de teneur - Test de désagrégation - Test de dissolution in vitro 	<ul style="list-style-type: none"> - Test d'identification du PA - Dosage du PA - Identification et dosage des substances apparentées et des produits de dégradation du PA
Essais d'identification et de dosage de diverses impuretés	Essais microbiologiques
<ul style="list-style-type: none"> - Solvants résiduels (éthanol par exemple) - Eau - D'autres impuretés suspectées (métaux lourds dans le PA, impuretés provenant des excipients, etc.) 	<ul style="list-style-type: none"> - Le dénombrement des germes aérobies viables totaux (bactéries, moisissures et levures) - La recherche d'Escherichia coli

B. Cinétique de dissolution

La détermination de la solubilité du médicament et les moyens de la modifier, si nécessaire, sont des composantes essentielles des programmes de développement pharmaceutique [17]. La biodisponibilité d'un médicament administré par voie orale dépend principalement de sa solubilité dans le tractus gastro-intestinal et de sa perméabilité à travers les membranes cellulaires. Cela n'est en effet confirmé qu'avec les travaux de Wagner qui a écrit: "quand le processus de dissolution est beaucoup plus lent que celui de la désagrégation et de l'absorption, c'est la dissolution qui contrôle la vitesse d'absorption" [18].

Ainsi, la détermination de la cinétique de dissolution est devenue un des plus importants tests d'évaluation des formes galéniques solides, quelles que soient leur nature et leur voie

d'administration, même si les formes per-os comme les comprimés ou les capsules constituent l'essentiel de ces essais.

1. Définitions

La dissolution et la désintégration sont des paramètres de première importance dans la stratégie de développement de produit pharmaceutique, la désintégration étant souvent considérée comme un processus du premier ordre et la dissolution des particules de médicament comme proportionnelle à la différence de concentration du médicament entre la surface des particules et le milieu de dissolution. La désintégration reflète généralement l'effet de la formulation et des différents procédés de fabrication, alors que la dissolution à partir des particules de médicament reflète principalement l'effet de la solubilité et de la granulométrie, qui sont en grande partie des propriétés de la matière première de médicament[19].

2. Mécanisme de la dissolution

Le test de dissolution détermine la quantité cumulée du principe actif dissout en fonction du temps. La dissolution d'une forme pharmaceutique implique au moins deux étapes consécutives. Premièrement la libération du principe actif de la forme galénique (désintégration), suivie par la dissolution (solubilisation des particules libérées dans le milieu de dissolution) comme il est montré dans la figure 02 :

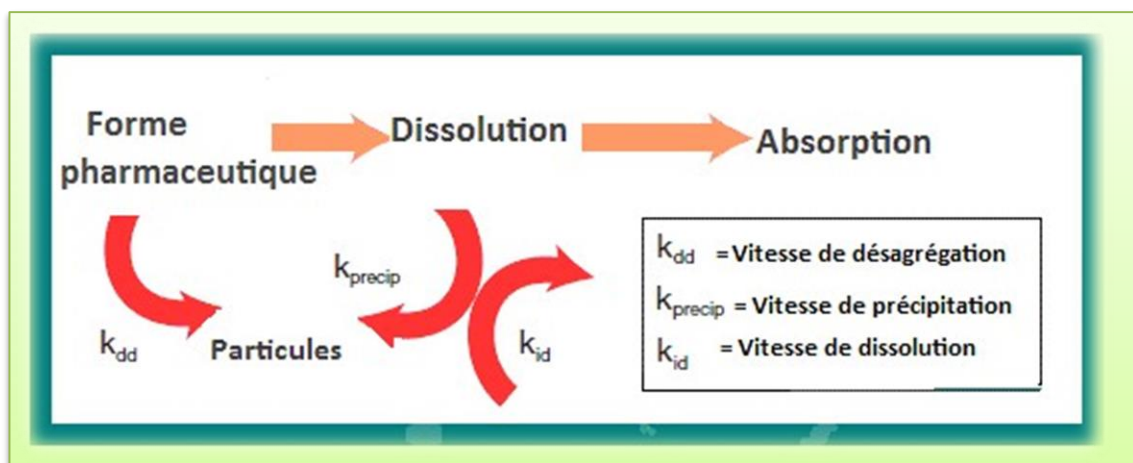


Figure 02 :Phase biopharmaceutique du devenir d'un PA à partir d'une forme sèche (comprimés)

La vitesse globale de dissolution dépend de la plus lente de ces deux étapes. Les propriétés de cohésion des particules d'une forme pharmaceutique solide évaluées lors de la formulation (par exemple : les profils de libération des granulés pré-comprimés, l'impact de la force de compression, la porosité et la lubrification) jouent un rôle clé dans la première étape de dissolution[20].

3. Facteurs intervenant dans la dissolution

3.1. Facteurs liés aux propriétés physicochimiques de la molécule

Il faut distinguer les facteurs qui interviennent sur la solubilité et ceux qui modifient la vitesse de dissolution.[11,21–23] selon le tableau IV ci-dessous :

Tableau IV : Facteurs liés aux propriétés physicochimiques de la molécule [11,21–23]

Facteurs qui influencent la solubilité	Facteurs qui influencent la vitesse de dissolution
<ul style="list-style-type: none"> - Nature chimique de la molécule : solubilité par ionisation et solubilité par polarité. - Le ph du milieu de dissolution : Dans un milieu aqueux la solubilité d'un composé est en fonction de sa capacité à former des liaisons hydrogènes avec les molécules d'eau. - Température : la solubilité d'une molécule augmente avec la température. En général, une température de $37 \pm 0,5^\circ\text{C}$ est toujours maintenue au cours de la dissolution des médicaments. - Polymorphisme : la forme amorphe d'un principe actif présente une plus grande solubilité et une vitesse de dissolution plus élevée par rapport à celui présenté par la forme cristalline. - Substances additives : favorisent la dissolution ou conduisant au relargage (diminution de la solubilité). 	<p>La vitesse de dissolution peut être donnée par la formule⁽¹⁾ de Noyes et Whitney (1897) :</p> $\frac{dC}{dT} = KS (C_s - C_t)$ <ul style="list-style-type: none"> - La surface de contact solide-liquide : La vitesse de dissolution croît avec le degré de division. - La viscosité : La viscosité diminue la vitesse de dissolution en réduisant la diffusion. - Tension superficielle : Les surfactants abaissent l'angle de contact entre la forme solide et le milieu de dissolution, et par conséquent ils améliorent la pénétration du solvant. - L'agitation : L'agitation accélère la dissolution en renouvelant le liquide à l'interface - Condition Sink : vitesse de dissolution est directement proportionnelle au gradient de concentration.

3.2. Facteurs liés à la formulation

Les excipients ont un rôle galénique car ils facilitent la fabrication des comprimés. De plus ils doivent garantir la libération du principe actif[24].

¹ S : surface de contact solide liquide.

C_S : Concentration à saturation du produit à dissoudre ;

C_T : Concentration de la solution à l'instant t.

K : $K = D / h V = k T / 6 \eta \pi r h V$ (D : coefficient de diffusion, h : épaisseur de la couche de diffusion, V : volume du milieu de dissolution. Avec k est la constante de Boltzmann ($k = 1,38 \cdot 10^{-23} \text{ J.K}^{-1}$), η en (Pas) est la viscosité du milieu de dissolution, r est le rayon de la molécule, et $(6\eta\pi r)$ est la force de Stokes d'une molécule sphérique).

Leur influence sur la cinétique de dissolution est décrite dans le tableau V ci-dessous :

Tableau V : Facteurs liés à la formulation intervenant dans la dissolution [24].

Excipients	Influence sur la dissolution
Diluants	La vitesse de dissolution augmente avec les diluants hydrophiles, le changement de la concentration du diluant ou le changement du diluant lui-même peut changer la vitesse de dissolution des comprimés.
Délitants ou désintégrants	Leur but est le délitement du comprimé et la libération du principe actif (désintégration), augmentant ainsi la surface de contact entre le milieu de dissolution et le comprimé et par conséquent elle augmente la vitesse de dissolution.
Liants ou agglutinants	Le liant fournit la cohésion aux particules lors de la compression, une quantité excessive de celui-ci augmente la dureté et le temps de désintégration et par conséquent elle ralentie la vitesse de dissolution.
Lubrifiants	Les lubrifiants peuvent augmenter ou diminuer la vitesse de dissolution. La plupart des lubrifiants sont hydrophobes ; ils ralentissent la vitesse de dissolution.

3.3. Facteurs liés aux processus de fabrication

Deux étapes principales du processus de fabrication, influencent la cinétique de dissolution sont décrites dans le tableau VI suivant :

Tableau VI : Facteurs liés au processus de fabrication influençant la dissolution [21].

Etape de fabrication	Influence sur la dissolution
La méthode de granulation	La vitesse de dissolution des substances peu solubles augmente avec la performance du procédé de granulation (Avec la disponibilité du matériel de pointe)
La compression	La compression joue un double rôle, elle augmente la vitesse de dissolution en augmentant la surface de contact grâce à l'effet d'écrasement, et diminue à la fois la vitesse de dissolution par l'augmentation de la force de cohésion des particules ce qui provoque une augmentation de la densité et de la dureté.

4. Le système de classification biopharmaceutique (BCS)

Le système de classification biopharmaceutique (BCS) est un cadre scientifique pour classer les substances médicamenteuses en fonction de leur solubilité aqueuse et de leur perméabilité intestinale. Lorsqu'elle est combinée à la dissolution du produit médicamenteux, la BCS prend en compte trois facteurs principaux qui régissent la vitesse et l'étendue de l'absorption du médicament à partir de formes posologiques orales solides : dissolution, solubilité et perméabilité intestinale. Selon la BCS, les substances médicamenteuses sont classées comme suit :

- Classe 1 : haute solubilité - perméabilité élevée
- Classe 2 : faible solubilité - perméabilité élevée
- Classe 3 : solubilité élevée - faible perméabilité
- Classe 4 : faible solubilité - faible perméabilité[6].

On entend par la solubilité d'une substance (soluté) par la somme de molécules qui sont passées dans la solution lorsque l'équilibre est atteint.

La perméabilité intestinale ou l'absorption est le processus par lequel le médicament inchangé passe de son site d'administration à la circulation générale.

Une substance active est considérée comme ayant une haute solubilité lorsque la dose administrable maximale par libération immédiate est soluble dans 250ml d'un milieu aqueux avec un pH allant de 1 à 6,8 à $37\pm 1^{\circ}\text{C}$. Quand plus de 85% de la dose de substance active initialement administrée est absorbée à travers la barrière intestinale, elle présente une haute perméabilité[25].

5. Essai de dissolution des formes solides :

L'essai de dissolution trouve son importance dans le contrôle d'une formulation mais aussi pour expliquer son comportement. Il est destiné à déterminer la plus ou moins grande aptitude d'une forme galénique à laisser passer en solution, dans un milieu déterminé, le ou les principes actifs qu'elle contient. Il permet ainsi la validation des choix à faire à différents stades de développement de la forme médicamenteuse.

En pré-formulation, il sera question d'étudier les différents paramètres pour préparer la formulation. En formulation, ce sont les études comparatives des résultats de dissolution qui permettent de faire les différents choix, d'abord par l'étude du screening dont l'objectif est d'étudier les différents facteurs ayant un impact sur la formulation et puis ensuite par l'étude

d'optimisation de la formulation dont l'objectif est de déterminer la surface de réponse optimale[10,13,26].

5.1. Intérêt de l'essai de dissolution

L'essai de dissolution est un outil essentiel :

- Dans la pré-formulation : connaître la solubilité du principe actif dans l'analyse de la recherche dans le processus de découverte de médicaments qui consiste à mesurer la stabilité du produit soumis à l'étude,
- Dans le développement : aide à l'optimisation de la formule et du processus de fabrication.
- Dans le contrôle de routine : il assure la qualité et les performances des produits pharmaceutiques (reproductibilité inter lot)
- Dans la détermination de la conformité des formes pharmaceutiques solides orales
- Dans l'étude d'équivalence in vitro : comparaison des profils de dissolution entre princeps et générique[27].

5.2. Appareillage :

Compte tenu de la diversité des formes pharmaceutiques orales solide et des propriétés physico-chimiques des principes actifs, il n'est pas possible de concevoir un appareil unique utilisable pour toutes les formes. Il existe un grand nombre d'appareils décrits dans la littérature dont certains sont dédiés à une seule et unique forme pharmaceutique.

Du fait de la nécessité de disposer d'un contrôle qualité fiable et reproductible, les autorités d'enregistrement ont standardisé 4 d'appareils pour les pharmacopées (européenne, américaine et japonaise) pour les essais de dissolution des formes solides décrits dans la figure 03 suivante[28].

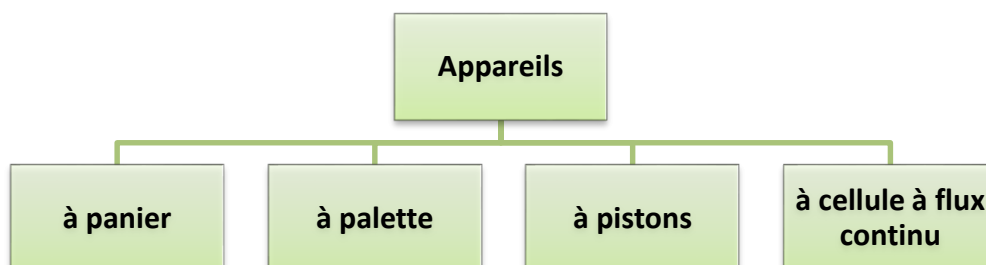


Figure 03 : schéma des quatre types d'appareils de dissolution

6. Comparaison des profils de dissolution in vitro

Les études de bioéquivalence in vivo sont des essais qui évaluent l'équivalence entre une formulation d'essai et une formulation de référence, basés sur le taux et l'étendue de l'absorption du médicament chez l'homme sans réellement effectuer des essais cliniques pour garantir l'efficacité similaire et la sécurité. L'hypothèse fondamentale de la bioéquivalence implique que les formulations soient thérapeutiquement équivalentes. Après que le médicament a été approuvé pour la commercialisation, il peut y avoir des changements dans la fabrication et dans les contrôles qualité de la production. Par conséquent la formulation d'essai fabriquée après les changements doit montrer une qualité et un rendement similaire à la formulation de référence. L'absorption du médicament dépend de son état de dissolution, et les essais de dissolution permettent l'évaluation in vitro de la vitesse et l'étendue de la libération du principe actif. Par conséquent, il est suggéré que, les essais de dissolution in vitro soient utilisés comme des substituts pour les études de bioéquivalence in vivo pour évaluer l'équivalence entre le générique et son princeps [24].

6.1. Méthodes de comparaison

Quelques méthodes pour la comparaison des profils de dissolution sont utilisées en industrie pharmaceutique :

6.1.1. Les approches statistiques

Basées sur l'analyse de la variance, qui évalue l'hypothèse que les deux profils sont statistiquement semblables [24].

6.1.2. La méthode modèle dépendant

Utilisée principalement pour la clarification des mécanismes de dissolution ou de la libération dans différentes conditions expérimentales. La méthode modèle dépendant peut-être appliquée aux profils de dissolution obtenus avec des programmes de dissolution à échantillonnage non identique [24].

6.1.3. La méthode modèle indépendant

La méthode dite de « fit factor » qui nécessite des points de prélèvement identiques pour le calcul de deux facteurs à partir des données brutes individuelles de deux profils. Ces deux facteurs (facteur de différence f_1 et le facteur de similarité f_2), ont été adoptées par les organismes de réglementation, et ont été inclus dans les lignes directrices pour le contrôle qualité des essais de dissolution [24].

Le graphe suivant représente un exemple du profil de dissolution d'un principe actif formulé sous forme de comprimé.

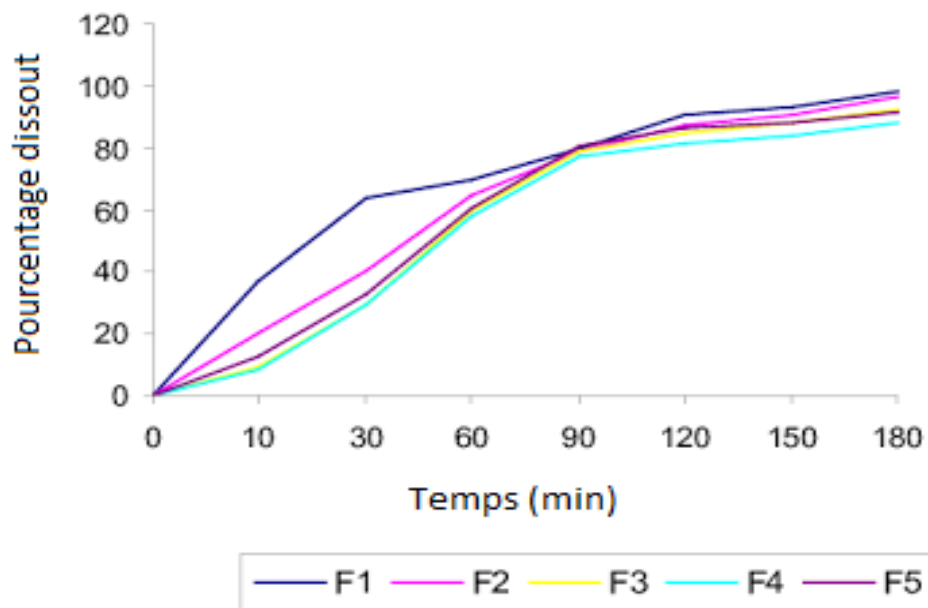


Figure 04 : Exemple d'un graphe représentant le profil de dissolution du Diclofénac

CHAPITRE III
VALIDATION ANALYTIQUE

Les systèmes d'assurance qualité en industrie pharmaceutique ont connu une évolution d'une approche qu'on peut qualifier de « documentaire », dans la mesure où il fallait surtout référencer les méthodes et assurer la traçabilité des résultats, à une approche complémentaire qui se base sur la qualité métrologique des mesures ce qui se traduit par des exigences de validation des méthodes et d'estimation de l'incertitude accrues. De nombreux documents ont été publiés sous la forme de normes, de guides, de guidances ou même de textes réglementaires pour essayer de définir des procédures de validation avec ses différentes approches développées dans le temps, de l'approche classique qui se base sur les critères de performance aux méthodes alternatives : quantification d'incertitudes, profil d'exactitude...

Il existe en effet de nombreux documents officiels décrivant les critères de validation à tester, mais ils ne proposent pas de protocole expérimental et se limitent le plus souvent aux concepts généraux. Pour cela les commissions de la SFSTP ont élaboré successivement des guides de validation dans le but d'aider concrètement les industriels du médicament à appliquer les recommandations réglementaires. Suivant le protocole décrit dans les guides publiés dans la revue STP Pharm en 2003 et 2006.

1. Contexte réglementaire

Des directives sur la validation des méthodes analytiques sont fournies dans des publications comme les guidelines ICH, notamment la guideline ICH Q2 (R1) parue en 2005 : « Validation of Analytical Procedures: Text and Methodology ». Son but est de fournir des recommandations sur la manière d'appréhender les différentes caractéristiques de la validation pour chaque méthode analytique. En outre, le document fournit une indication sur les données qui devraient être présentées dans un dossier d'enregistrement.

Cette guideline ICH est une exigence réglementaire, toute validation de méthode analytique présentée dans un dossier d'AMM (Autorisation de Mise sur le Marché) doit répondre à ses exigences. Il existe également des publications ne constituant pas des exigences réglementaires, comme les guides de validation analytique de la SFSTP :

- SFSTP « Guide de validation analytique – Rapport d'une commission SFSTP »
 - o I. Méthodologie, paru dans STP Pharma Pratique en 1992 ;
 - o II. Exemples d'application, paru dans STP Pharma Pratique en 1992 ;
- SFSTP « Méthodes chromatographiques de dosage dans les milieux biologiques : stratégie de validation. Rapport d'une commission SFSTP » paru dans STP Pharma Pratique en 1997 ;

- SFSTP « Validation des procédures analytiques quantitatives : Harmonisation des démarches »
 - I. Généralités, paru dans STP Pharma Pratique en 2003;
 - II. Statistiques, paru dans STP Pharma Pratique en 2006;
 - III. Exemples d'application, paru dans STP Pharma Pratique en 2006;
 - IV. Exemples d'application, paru dans Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis en 2008.[29]

2. Cycle de vie d'une méthode analytique

Le cycle de vie d'une méthode est un concept souligné dans la norme ISO 17025. L'idée de base est qu'une méthode d'analyse n'est pas statique, mais une entité vivante qui passe par plusieurs étapes interdépendantes. Ainsi, pour bien comprendre le rôle et la place de la validation, il convient de décrire les différentes étapes de ce cycle, depuis la création de la méthode analytique jusqu'à son remplacement par une autre.

La vie d'une méthode d'analyse est un processus évolutif qui suit différentes étapes pouvant être représentées par un cycle :

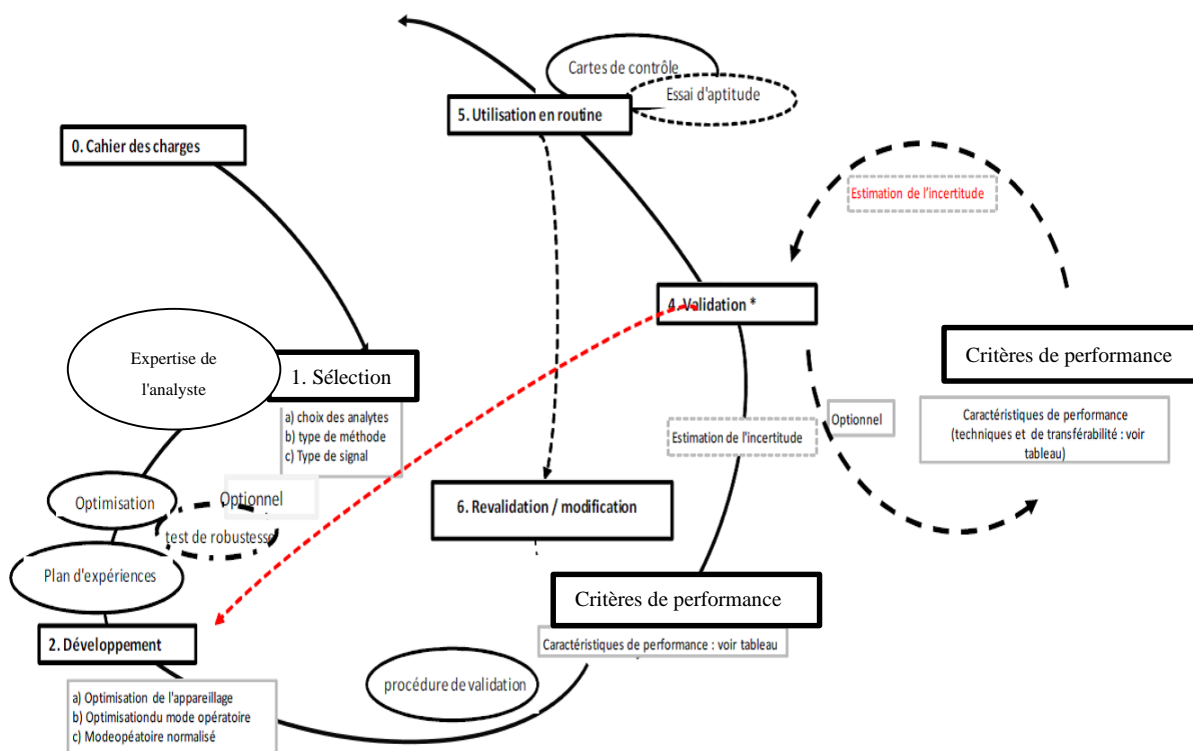


Figure 05: Cycle de vie d'une méthode d'analyse.
(D'après Max Feinberg, 2009, modifié)

Les principales étapes de ce cycle sont les suivantes :

- Etape préliminaire (étape « 0 ») : expression du déploiement et de la mise en œuvre d'une méthode pour un client/prescripteur et/ou pour un usage spécifié sous la forme d'un cahier des charges ;
- Etape 1 : phase de sélection des outils, des analytes, ... ;
- Etape 2 : phase de développement / optimisation de la méthode (en l'absence de méthode préexistante pour le domaine d'application considéré) ;
- Etape 3 : caractérisation intra laboratoire et, au besoin, inter-laboratoires, de la méthode ;
- Etape 4 : validation de la méthode développée au regard de l'usage attendu (voir étape 0)⁽¹⁾

A l'issue de ces étapes, l'utilisation en routine de la méthode peut être envisagée (étape 5). La revue périodique de la méthode peut donner lieu à un besoin de revalidation ou d'un nouveau développement (étape 6)[30,31].

3. Définition et objectifs de la validation

3.1. Définition

Selon la norme NF en ISO / CEI 17025, il s'agit de la « confirmation par examen et l'apport de preuves objectives du fait que les exigences particulières en vue d'une utilisation prévue déterminée sont remplies »[30,32].

Le laboratoire doit valider :

- Les méthodes non normalisées,
- Les méthodes conçues/développées par le laboratoire,
- Les méthodes normalisées employées en dehors de leur domaine d'application prévu,
- Les amplifications ou modifications de méthodes normalisées [32].

3.2. Objectifs de la validation

La validation des méthodes analytiques a pour principal objectif de s'assurer qu'une méthode analytique donnée donnera des résultats suffisamment fiables et reproductibles, compte tenu du but de l'analyse. Il faut donc définir correctement à la fois les conditions dans lesquelles la méthode sera utilisée et le but dans lequel elle sera employée. Ces principes s'appliquent à toutes les méthodes utilisées par un fabricant de produits pharmaceutiques, qu'elles soient ou non

¹L'astérisque en étape 4 matérialise le fait qu'une première validation doit être entreprise à l'issue de la caractérisation intra laboratoire avant d'engager la phase de caractérisation inter laboratoires par un Essai Inter-Laboratoire de Validation (EILV).

décrites dans une pharmacopée. Autrement dit : « le but de la validation d'une procédure analytique est de démontrer qu'elle correspond à l'usage pour lequel elle est prévue ».

L'objectif d'une méthode d'analyse est de pouvoir quantifier le plus exactement possible chacune des quantités inconnues que le laboratoire aura à déterminer. C'est-à-dire que l'écart du résultat d'analyse et de la valeur vraie inconnue soit inférieur à une limite d'acceptation (λ) qui peut être variable selon les exigences de l'analyste (et/ou du client) et de la finalité de la méthode d'analyse. Il apparaît ainsi deux principes fondamentaux : la notion de limite d'acceptation des performances d'une procédure analytique et celle de la responsabilité de l'analyste dans la décision d'accepter ou non une procédure en fonction de ses performances et de l'usage pour lequel elle est destinée[33].

4. Critères de validation

Les principaux critères de validation couramment utilisés dans les laboratoires sont résumés dans le tableau VII suivant :

Tableau VII : Les principaux critères de validation

Critères	Définitions	
La spécificité ou sélectivité	La propriété qui fait qu'une méthode d'analyse rend compte sans ambiguïté de la substance analysée en présence d'autres composantes normalement présentes. Ces dernières peuvent inclure des impuretés, des produits de dégradation, la matrice, etc[35].	
La linéarité	La capacité d'une procédure d'analyse de donner des résultats qui sont directement (à l'intérieur de certaines limites) proportionnels à la concentration (quantité) de la substance analysée dans un échantillon[34].	
La justesse d'une méthode	La justesse exprime l'étroitesse de l'accord entre la valeur moyenne obtenue à partir d'une série de résultats d'essais et une valeur qui est acceptée soit comme une valeur conventionnellement vraie, soit comme une valeur de référence acceptée[36].	
La fidélité	La fidélité exprime l'étroitesse de l'accord (degré de dispersion, coefficient de variation) entre une série de mesures provenant de multiples prises d'un même échantillon homogène (résultats d'essais indépendants) dans des conditions prescrites. La fidélité fournit une indication sur les erreurs liées au hasard. La fidélité peut être évaluée à trois niveaux [36]:	
	La répétabilité	Exprime la fidélité sous des conditions opératoires identiques et sur un court intervalle de temps ; la répétabilité est aussi désignée par : précision intra-analyse[35].
	La fidélité intermédiaire	Exprime les variations intra-laboratoires : jours différents, analystes différents, équipements différents...[35].
	La reproductibilité	Exprime la fidélité inter-laboratoire[34].
Exactitude	Exprime l'étroitesse de l'accord entre le résultat d'essai et la valeur de référence acceptée, aussi appelée « valeur conventionnellement vraie ». L'étroitesse de l'accord ainsi observée est la résultante de la somme des erreurs systématique et aléatoire, en d'autres termes l'erreur totale liée au résultat. Par conséquent, l'exactitude est l'expression de la somme de la justesse et de la fidélité[36].	
Limite de détection	La plus faible quantité de la substance analysée que la méthode permet de détecter, sans nécessairement fournir la valeur exacte[35].	
Limite de quantification	La plus petite quantité de l'analyte dans un échantillon pouvant être dosée dans les conditions expérimentales décrites avec une exactitude définie[36].	
Robustesse	La robustesse d'une méthode d'analyse est une mesure de sa capacité à supporter sans conséquences de petites variations apportées délibérément aux paramètres de la méthode; elle donne une idée de la fiabilité de la méthode aux conditions normales d'utilisation[34].	

5. Le choix des critères de validation

Les critères de validation des méthodes qualitatives et quantitatives sont résumés dans le tableau VIII. Ces caractéristiques ne doivent pas être systématiquement étudiées et documentées mais l'absence d'une ou plusieurs caractéristiques doit être justifiée dans le rapport de caractérisation et de validation de méthode d'analyse[30].

Tableau VIII : Critères de performance à déterminer pour les méthodes qualitatives et les méthodes quantitatives.

Étape du processus de validation	Critères	Critères de performance		
		Qualitative	Quantitative	
Caractérisation Intra labo	Spécificité	X	X	
	Sensibilité	X	(X) ¹	
	Fonction d'étalonnage		X	
	Fidélité	Répétabilité	(X)	X
		Fidélité intermédiaire	X	X
	Justesse	sans objet ²	X	
	Exactitude (justesse + fidélité) ³	sans objet	X	
	Linéarité	sans objet	X	
	Limite de	quantification	sans objet	X
		détection	X	(X)
Domaine de validité	X	X		
Caractérisation interlaboratoires	Reproductibilité	X	X	
	Répétabilité	(X)	X	
	LD	(X)	sans objet	
	LQ	sans objet	(X)	
	Spécificité ⁴	X	sans objet	
	Sensibilité ⁵	X	sans objet	
	Autres caractéristiques non techniques à définir selon les points critiques et le cahier des charges (délai, rapidité, efficacité, coût...)	X	X	

¹ Les caractéristiques inscrites entre parenthèses sont recommandées

² Sans objet : caractéristique non pertinente

³ Pour les méthodes analytiques quantitatives, l'exactitude représente toujours la combinaison de la justesse et de la fidélité

⁴ ou taux de faux positifs dans certains référentiels

⁵ ou taux de faux négatifs dans certains référentiels

Les caractéristiques listées dans le tableau VIII en amont sont au minimum requises pour une caractérisation complète de la méthode. Toutefois, selon les référentiels applicables au domaine concerné, d'autres caractéristiques pourront être exigées (ex : robustesse, exactitude relative...)[30].

6. Protocoles en phase de validation

Le profil d'exactitude ne s'applique qu'aux méthodes complètement développées et mises au point. En particulier, la sélectivité / spécificité doit avoir été étudiée ainsi que le domaine d'application de la méthode à valider, en termes de types de matrice et de niveaux de concentrations. L'ensemble des données de la phase de validation doit faire l'objet d'un rapport détaillé dans lequel tous les résultats obtenus doivent être documentés. Au terme de la phase de validation et avant son exploitation en routine, la procédure d'analyse doit être complètement décrite sous forme d'un mode opératoire standardisé. Selon les référentiels, les principaux objectifs de la phase de validation sont de :

- Démontrer la spécificité (sélectivité),
- Valider la fonction de réponse (ou modèle d'étalonnage utilisé en routine),
- Estimer la fidélité (répétabilité et fidélité intermédiaire),
- Estimer la justesse,
- Estimer l'exactitude,
- Valider les seuils de quantification,
- Valider l'intervalle de dosage,
- Vérifier la linéarité de la procédure analytique[35].

Après avoir vérifié la spécificité de la méthode d'analyse on opère sur deux ensembles d'échantillons :

- Standards d'étalonnage (SE) : peuvent être réalisés sans la matrice (si on a démontré l'absence d'effet matrice) ou avec la matrice, utilisé pour évaluer les différentes fonctions de réponse $y = f(x)$ afin d'effectuer les prédictions inverses.
- Standards de validation (SV) : doivent toujours être réalisés avec la matrice, utilisé dans le but de déterminer l'erreur totale à chaque niveau de concentration, calculer l'intervalle de tolérance et tracer le profil d'exactitude et déterminer les limites inférieures et supérieures de quantification (intervalle de dosage).

En ce qui concerne la préparation des SE et SV, celle-ci dépend du protocole de validation choisi. Le logigramme de la figure (06) suivante, présente la démarche proposée dans le guide

SFSTP 2003 pour sélectionner un protocole expérimental de la validation en fonction des contraintes ou des spécificités liées à la procédure de dosage sous épreuve[35].

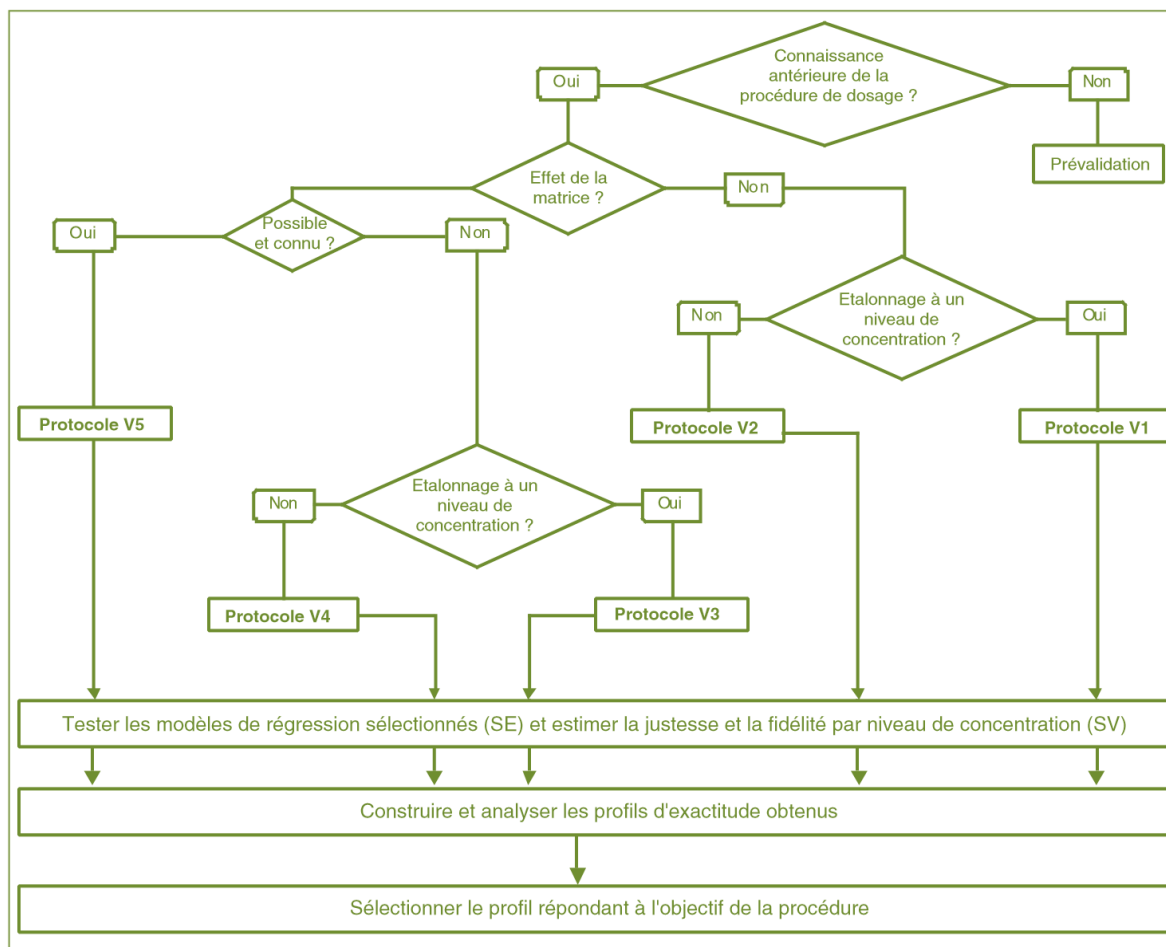


Figure 06: Logigramme permettant de sélectionner un protocole de validation.

SE : standard d'étalonnage. SV : standard de validation

Le tableau IX suivant présente selon le protocole choisi, le nombre total minimal d'essai à réaliser pour valider la procédure analytique concernée :

Tableau IX : Choix du nombre de standards d'étalonnage et de validation en fonction du protocole choisi.

Standards	Niveau de concentration	Protocole				
		V1	V2	V3	V4	V5
SE. Etalonnage Sans la matrice	Bas		2		2	
	Médian	2	2 ⁽¹⁾	2	2 ⁽¹⁾	
	Haut	2 ⁽²⁾	2	2 ⁽²⁾	2	
SE. Etalonnage Avec la matrice	Bas				2	2
	Médian			2	2 ⁽²⁾	2 ⁽²⁾
	Haut			2 ⁽¹⁾	2	2
	Additif					2 ⁽³⁾
SV. Validation Avec la matrice	Bas	3	3	3	3	3
	Médian	3	3	3	3	3
	Haut	3	3	3	3	3
Nbre minimum séries		3	3	3	3	3
Nbre total essais (min.)		33	45	39	63	45

7. Démarches statistiques de la validation

7.1. Spécificité

La spécificité peut être démontrée de deux façons :

- Soit en comparant les chromatogrammes obtenus à partir des quatre solutions précédemment préparées : les chromatogrammes obtenus à partir de la solution standard 100% et l'échantillon 100% doivent renfermer des pics au même temps de rétention et avec des surfaces comparables et les chromatogrammes obtenus à partir du diluant et de la solution placebo ne doivent pas présenter un pic au même temps de rétention que l'analyte.
- Soit par la comparaison de la droite obtenue avec les standards de validation (avec matrice) avec celle obtenue à partir des standards d'étalonnage.

¹Suppression possible du niveau de concentration médian pour l'étalonnage sur la base du modèle de régression retenu pour exprimer la fonction de réponse (exemple : modèle plus simple comme le modèle mathématique des moindres carrés). Dans ce cas, le nombre total est de 39 essais pour les protocoles V2 (sans matrice) et V5 (avec la matrice). Le nombre d'essais est de 51 pour le protocole V4.

²Sélection d'un niveau de concentration supérieure à la concentration cible pour l'étalonnage (exemple : 120% de la concentration cible).

³Addition d'un niveau de concentration supplémentaire pour une fonction de réponse nécessitant un modèle plus complexe (exemple : fonction logistique à quatre paramètres).

La comparaison des droites est basée sur le test t de Student selon une stratégie statistique qui permet la recherche d'effet matrice et/ou de l'erreur systématique en vérifiant la spécificité de la méthode pour le dosage du principe actif seul et aussi pour la forme reconstituée[35,36].

7.2. Fonction de réponse

Les mesures effectuées sur les SE permettent de déterminer la relation entre la réponse Y donnée par l'instrument et la concentration X des solutions. Cette relation est une fonction de type :

$$Y = f(X) + \varepsilon$$

Avec ε , l'erreur résiduelle associée à la fonction de réponse. Cette fonction n'est pas nécessairement linéaire mais elle doit être strictement monotone sur l'intervalle de dosage envisagé.

La fonction de réponse doit être ajustée, c'est-à-dire que ses paramètres doivent être évalués de telle sorte que l'erreur résiduelle ε soit minimisée.

La procédure SFSTP 2003-2006 propose d'appliquer le concept de « fitness-for-purpose »¹ pour choisir la fonction de réponse la mieux adaptée pour la courbe d'étalonnage, et ainsi avoir un modèle d'étalonnage permettant de minimiser ε et donc de calculer les concentrations prédites les plus correctes possibles. Le Tableau XI illustre quelques exemples des différentes fonctions de réponse pouvant être envisagées lors d'une validation des méthodes analytiques.

¹l'IUPAC donne la définition suivante : « degré auquel les données produites par un processus de mesure permettent à l'utilisateur de prendre des décisions techniques et administratives correctes dans un but spécifié » [37]

Tableau X : Exemple de fonctions de réponse

Type	Equation	Paramètres	Linéaire
Fonction affine passant par l'origine	$Y = \beta X$	Pente β	Oui
Fonction affine	$Y = \alpha + \beta X$	Ordonnée à l'origine α Pente β	Oui
Fonction quadratique	$Y = \alpha + \beta X + \gamma X^2$	α, β, γ	Oui
Fonction logistique à 4 paramètres	$Y = \alpha + \frac{\delta - \alpha}{1 + \left(\frac{X}{\gamma}\right)^\beta}$	$\alpha, \beta, \gamma, \delta$	Non
Fonction logistique à 5 paramètres	$Y = \alpha + \frac{\delta - \alpha}{1 + \left[\left(\frac{X}{\gamma}\right)^{\beta\Psi}\right]}$	$\alpha, \beta, \gamma, \delta, \Psi$	Non

Très vraisemblablement, la plupart des méthodes physicochimiques auront recours à la droite (passant par 0 ou non). Pour les méthodes bio-analytiques, la fonction quadratique pourra être envisagée dans certains cas. Dans le cas d'un immuno-dosage, le choix se portera sur les fonctions logistiques à 4 ou 5 paramètres.

Les paramètres des fonctions de réponse vont être estimés soit par la méthode des moindres carrés classique, soit par la méthode du maximum de vraisemblance, comme recommandé dans la procédure SFSTP 2003-2006. Pour l'ajustement de modèles non linéaires il est recommandé de recourir à des ouvrages de référence et d'utiliser des logiciels spécialisés.

Après le calcul des erreurs résiduelles ; Les variances résiduelles aux différents niveaux de concentrations, le test Cochran est appliqué pour vérifier l'homogénéité des variances. En comparant la variation résiduelle maximale à la somme des erreurs résiduelles. Si une hétérogénéité des variances est observée, une stabilisation de la variance est envisageable pour corriger le manque de proportionnalité entre la variance et la concentration :

- Soit avec une transformation mathématique : par exemple, le logarithme népérien ou la racine carrée pourrait être appliqué à la concentration X ainsi qu'à la réponse Y. Il est cependant recommandé de n'appliquer ce type de transformation qu'avec les modèles linéaires du tableau ;

- Soit en appliquant une pondération, Ceci implique de donner un poids à chaque niveau de concentration. Quatre cas sont généralement observés :
 - Il n'y a pas de relation entre la concentration et la variance (le cas idéal) : le poids $w_i = 1$. En d'autre terme, il n'y a pas de nécessité de pondérer.
 - La variance varie avec une relation de type $1/X$ i.e. inversement proportionnelle à la concentration, le poids qui doit être pris en compte est de la forme $w_i = 1/C$.
 - La variance varie selon une relation de type $1/X^2$ i.e. inversement proportionnelle au carré de la concentration, le poids à utiliser est de la forme $w_i = 1/C^2$
 - La relation n'est pas une relation simple entre la concentration et la variance, chaque variance variant indépendamment du niveau de concentration, le poids $w_i = 1/S^2$ avec S^2 la variance observée à chaque niveau de concentration.[36,38–40]

7.3. Alignement des observations

Si, pour un niveau de concentration, les quantités introduites ne sont pas identiques pour toutes les séries (souvent pour des raisons de pesées qui doivent être indépendantes), il est indispensable de procéder à un alignement sur la concentration moyenne dès lors qu'un calcul de variance doit être effectué (estimation de la répétabilité et de la fidélité intermédiaire).

Cela consiste à transformer les réponses observées ($Y_{ijk} \rightarrow Y_{ijk,c}$) afin de les aligner sur cette concentration moyenne. Cet alignement s'effectue par interpolation en ajoutant à la réponse observée la différence entre la valeur de la fonction de réponse considérée à la concentration moyenne et la valeur de cette fonction à la concentration introduite.

En validation, l'alignement s'applique aux réponses obtenues avec les échantillons de validation en utilisant les équations ou les fonctions de réponse obtenues avec les standards d'étalonnage. Ainsi l'alignement des répétitions du niveau de concentration j de la série i s'effectue comme suit :

$$y_{ijk,c} = y_{ijk} + f(\bar{x}_{ij}) - f(x_{ijk})$$

En résumé, pour les différentes fonctions de réponse[38] :

Tableau XI : Règles d'alignement pour différentes fonctions de réponses

Fonction de réponse	Règle d'alignement
Fonction affine	$y_{ijk,c} = y_{ijk} + \hat{\beta}_i [\bar{x}_{ij} - x_{ijk}]$
Fonction quadratique	$y_{ijk,c} = y_{ijk} + \hat{\beta}_i [\bar{x}_{ij} - x_{ijk}] + \hat{\gamma}_i [\bar{x}_{ij} - x_{ijk}]^2$
Fonction logistique	$y_{ijk,c} = y_{ijk} + (\hat{\delta}_i - \hat{\alpha}_i) \left[\frac{1}{1 + \left(\frac{\hat{\gamma}_i}{\bar{x}_{ij}}\right)^{\hat{\beta}_i}} - \frac{1}{1 + \left(\frac{\hat{\gamma}_i}{x_{ijk}}\right)^{\hat{\beta}_i}} \right]$

7.4. Prédiction inverses

Pour les méthodes indirectes, les modèles d'étalonnage servent à déduire les concentrations calculées, à partir des données du plan de validation, en utilisant la fonction inverse du modèle d'étalonnage, selon le modèle mathématique suivant :

$$x_{calc} = f^{-1}(y)$$

Si les observations ont été alignées, il faut remplacer les y par les y_{calc} (la valeur de y alignée sur la moyenne des x).

La fonction inverse est appelée équation de prédiction inverse. Le tableau XII fournit ces équations selon la fonction de réponse choisie au tableau XI.

Tableau XII : Calcul des prédictions inverses pour différentes fonctions de réponse

Type	Equation
Fonction affine passant par l'origine	$x_{ijk,calc} = \frac{y_{ijk}}{\hat{\beta}_i}$
Fonction affine	$x_{ijk,calc} = \frac{y_{ijk} - \hat{\alpha}_i}{\hat{\beta}_i}$
Fonction quadratique	$x_{ijk,calc} = \frac{-\hat{\beta}_i + \sqrt{\hat{\beta}_i^2 - 4\hat{\gamma}_i(\hat{\alpha}_i - y_{ijk})}}{2\hat{\beta}_i}$
Fonction logistique à 4 paramètres	$x_{ijk,calc} = \hat{\gamma}_i \left(\frac{\hat{\delta}_i - \hat{\alpha}_i}{y_{ijk} - \hat{\alpha}_i} - 1 \right)^{\frac{1}{\hat{\beta}_i}}$
Fonction logistique à 5 paramètres	$x_{ijk,calc} = \hat{\gamma}_i \left(\left(\frac{\hat{\delta}_i - \hat{\alpha}_i}{y_{ijk} - \hat{\alpha}_i} - 1 \right)^{\frac{1}{\hat{\beta}_i}} \right)^{\frac{1}{\hat{\beta}_i}}$

Si une transformation ou une pondération ont été utilisées, il ne faut pas oublier d'effectuer la transformation inverse ou une multiplication fois l'inverse de la pondération après ce calcul en retour[38,41].

7.5. Calcul de la justesse et de la fidélité

7.5.1. Modèle

L'estimation de la justesse et de la fidélité de la méthode s'effectue avec les concentrations calculées provenant des standards de validation en phase de validation (ou des standards d'étalonnage eux-mêmes en phase de pré-validation). Cette estimation est réalisée à chacun des j niveaux de concentration considérés à l'aide du modèle statistique suivant :

$$x_{ijk} = \mu_j + \alpha_{ij} + \varepsilon_{ijk}$$

Où

- x_{ijk} est la $k^{\text{ème}}$ concentration calculée du niveau j de la $i^{\text{ème}}$ série,
- μ_j est la moyenne des concentrations calculées du niveau de concentration j ,
- α_{ij} est au niveau j l'écart entre la moyenne de la $i^{\text{ème}}$ série et la moyenne μ_j ; α_{ij} est considéré comme une variable aléatoire ayant une distribution normale de moyenne 0 et de variance $\sigma^2_{B,j}$.
- ε_{ijk} est l'erreur expérimentale, considérée comme une variable aléatoire ayant une distribution normale de moyenne 0 et de variance $\sigma^2_{r,j}$

L'erreur expérimentale est supposée indépendante de la série.

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

La méthode du maximum de vraisemblance restreint est utilisée pour estimer à chaque niveau de concentration j les paramètres μ_j , $\sigma^2_{B,j}$ et $\sigma^2_{r,j}$ du modèle.

La norme ISO 5725 ne prend en compte que les plans d'expérience où le nombre de répétitions K par série est le même pour toutes les séries (plan équilibré). Le nombre total de répétitions doit être égal à $I \times K$ (I est le nombre de séries). Par contre, ce total peut être différent pour chaque niveau.

Calculer la moyenne générale d'un niveau :

$$\hat{\mu}_j = \bar{x}_{j,calc} = \frac{1}{I \times K} \sum_{i=1}^I \sum_{K=1}^K x_{ik,calc}$$

Calculer les écarts-types de répétabilité, inter-séries et de fidélité intermédiaire en effectuant l'analyse de la variance (ANOVA) d'un modèle à effet aléatoire, selon les principes décrits de la norme ISO 5725, à savoir une décomposition de la somme des carrés des écarts totaux en

deux sommes des carrés d'écarts (l'indice j de niveau n est pas noté pour cause de simplification) :

$$\underbrace{\sum_{k=1}^K \sum_{i=1}^I (x_{ik,calc} - \bar{x}_{i,calc})^2}_{SCE_t} = \underbrace{\sum_{k=1}^K \sum_{i=1}^I (x_{ik,calc} - \bar{x}_{k,calc})^2}_{SCE_r} + \underbrace{\sum_{k=1}^K I \times (\bar{x}_{ik,calc} - \bar{x}_{i,calc})^2}_{SCE_B}$$

Cette équation est traditionnellement écrite sous une forme abrégée, faisant appel à trois sommes de carrés d'écarts (SCE).

$$SCE_t = SCE_B + SCE_r$$

Où chacune des sommes est définie comme suit pour faciliter l'interprétation :

- SCE_t : Somme totale des écarts à la moyenne générale du niveau
- SCE_B : Somme des écarts inter-séries (due à la variance du biais)
- SCE_r : Somme des écarts intra-série (due à la variance résiduelle)

Comme le propose la norme ISO 5725, il n'est pas nécessaire de développer les trois sommes de carrés pour effectuer les calculs ; le calcul de SCE_B se fait par différence. Cette méthode peut poser des problèmes si le résultat est négatif : forcer alors la valeur de SCE_B à 0 [38,42].

$$SCE_B = SCE_t - SCE_r \text{ si } SCE_B > 0$$

$$SCE_B = 0 \text{ si } SCE_B \leq 0$$

Calculer la variance de répétabilité du niveau, Variance intra-série notée $\hat{\sigma}_r^2$ à partir des répétitions $x_{ijk,calc}$:

$$\hat{\sigma}_r^2 = \frac{SCE_r}{I(K-1)}$$

Calculer la variance inter-séries notée $\hat{\sigma}_B^2$, comme suit :

$$\hat{\sigma}_B^2 = \frac{\frac{SCE_B}{I-1} - \hat{\sigma}_r^2}{K}$$

7.5.2. Justesse

La justesse (ou le biais) de la méthode au niveau de concentration est obtenue en calculant la différence entre la moyenne arithmétique des concentrations introduites et la moyenne des concentrations calculées. Le biais peut s'exprimer en termes absolu, relatif ou de recouvrement par rapport aux quantités introduites [38,42], comme suit :

$$Biais_j = \hat{\mu}_j - \bar{x}_j$$

$$Biais (\%)_j = \frac{\hat{\mu}_j - \bar{x}_j}{\bar{x}_j} \times 100$$

$$recouvrement(\%)_j = \frac{\hat{\mu}_j}{\bar{x}_j} \times 100$$

\bar{x}_j : Moyenne des concentrations introduites

$\hat{\mu}_j$: Moyenne des concentrations prédites

7.5.3. Fidélité

L'estimation de la variance intra-série donne une estimation de la variance de répétabilité tandis que la somme des estimations des variances intra et inter-série donne une estimation de la variance de fidélité intermédiaire.

L'écart-type de répétabilité : $\hat{\sigma}_r$

L'écart-type de fidélité intermédiaire du niveau : $\hat{\sigma}_{FI} = \sqrt{\hat{\sigma}_r^2 + \hat{\sigma}_B^2}$ [38,42]

7.6. Calcul de l'exactitude

L'exactitude d'un résultat (par opposition à celui de la méthode analytique) exprime l'étroitesse de l'accord entre le résultat d'essai et la valeur de référence acceptée, aussi appelée valeur conventionnellement vraie, à savoir pour chaque mesure :

$$\text{Exactitude} = X - \mu$$

Pour chaque modèle et chaque observation l'exactitude de la mesure en valeur relative est donnée comme suit :

$$\text{Exactitude (\%)} = \frac{X - \mu}{\mu} \times 100$$

L'erreur maximale relative observée pour chaque modèle sur l'ensemble des séries montre déjà l'impact du choix de la fonction de réponse sur l'exactitude des résultats [38,42].

7.6.1. Erreur totale et profil d'erreur totale

Chaque mesure obtenue est le reflet de la vraie valeur, du biais de la méthode et de sa fidélité, ce qui s'exprime comme suit :

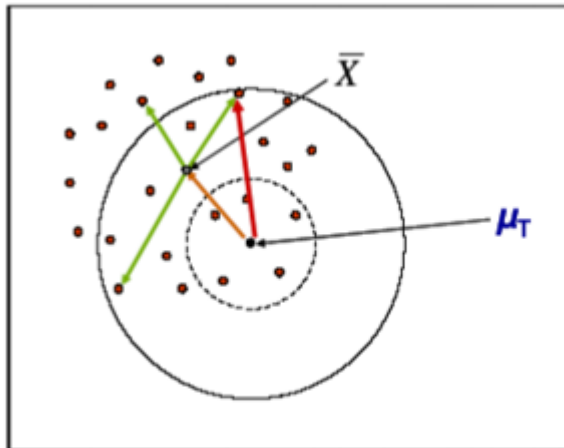
$$X = \mu + |Biais|_{procédure} + \text{Fidélité intermédiaire}_{procédure}$$

$$X - \mu = |Biais|_{procédure} + \text{Fidélité intermédiaire}_{procédure}$$

$$X - \mu = \text{Erreur Totale}_{procédure}$$

L'Erreur Totale d'une procédure analytique évalue son aptitude à produire des résultats exacts. Donc l'estimation de l'erreur totale d'une procédure est fondamentale pour juger de la validité d'une méthode.

Pour mieux comprendre et différencier entre la justesse (biais), la fidélité et l'exactitude ; il faut bien différencier les erreurs ; l'erreur systématique qui représente la justesse et l'erreur aléatoire qui représente la fidélité. La somme de ces deux critères de performance d'une méthode d'analyse nous renseigne sur la qualité d'un résultat de mesure à travers cette erreur totale ou dite globale qui représente l'exactitude de mesure[43].



- Flèche orange : Erreur systématique ou biais,
- Flèche verte : erreur aléatoire ou écart type
- Flèche rouge : erreur totale.
- \bar{X} Est la moyenne des résultats (points rouges)
- μ_T est la vraie valeur.

Figure 07 : Représentation schématique des composantes de l'erreur

Cette erreur totale, comme indiqué ci-dessus, est la somme de la justesse (biais) et de la fidélité. Il est normal que l'erreur maximale observée sur un grand nombre d'observations soit sensiblement plus grande que l'erreur totale vu que ces erreurs maximales représentent des événements rares tandis que l'erreur totale reflète plutôt les plus grandes erreurs auxquelles on peut s'attendre dans la plupart des cas. L'erreur totale d'une procédure analytique est donc bien un bon indicateur de l'exactitude des résultats qu'elle produit[35].

7.6.2. Calcul de l'intervalle de tolérance

Ce qui nous importe cependant en validation, ce n'est pas la validité des résultats calculés que nous obtenions avec l'erreur totale, mais plutôt une garantie ou une représentation de ce que la même procédure analytique pourra donner comme résultats dans le futur, C'est le rôle de l'intervalle de Tolérance. L'estimation des paramètres μ_j , $\hat{\sigma}_{B,j}$ et $\hat{\sigma}_{r,j}$ à chaque niveau de concentration j a pour but de permettre d'estimer la proportion attendue d'observations dans les limites d'acceptation prédéfinies $[-\lambda, \lambda]$, c'est-à-dire :

$$E_{\hat{\mu}_M, \hat{\sigma}_M} \{ P_x[|X - \mu_T| < \lambda] | \hat{\mu}_M, \hat{\sigma}_M \} \geq \beta$$

L'intervalle de tolérance sera calculé pour chaque niveau de concentration envisagé avec les standards de validation et pour chaque modèle mathématique.

Pratiquement, l'intervalle de tolérance se calcule comme suit en valeur absolue :

$$E_{\hat{\mu}_M, \hat{\sigma}_M} \{P_x[\hat{\mu}_M - Q_t \hat{\sigma}_M < X < \hat{\mu}_M + Q_t \hat{\sigma}_M | \hat{\mu}_M, \hat{\sigma}_M]\} = \beta$$

Où :

$$\hat{\sigma}_{FI,j}^2 = \hat{\sigma}_{r,j}^2 + \hat{\sigma}_{B,j}^2$$

$$R_j = \frac{\hat{\sigma}_{B,j}^2}{\hat{\sigma}_{r,j}^2}$$

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

$$v = \frac{(R+1)^2}{\frac{(R+1/K)^2}{I-1} + \frac{1-1/K}{I \times K}}$$

$Q_t\left(v; \frac{1+\beta}{2}\right)$ le quantile de la distribution t de Student pour v degrés de liberté et β la probabilité.

Le même intervalle en échelle relative devient :

$$\left[\text{biais}(\%)_j - Q_t\left(v; \frac{1+\beta}{2}\right) \sqrt{1 + \frac{1}{pnB_j^2} CV_{FI,j}}; \text{biais}(\%)_j + Q_t\left(v; \frac{1+\beta}{2}\right) \sqrt{1 + \frac{1}{pnB_j^2} CV_{FI,j}} \right]$$

Deux termes sont contenus dans l'intervalle de tolérance : l'un étant la justesse et l'autre étant, à un facteur près, le coefficient de variation de fidélité intermédiaire. C'est la raison pour laquelle cet intervalle peut ainsi être considéré comme une expression de l'exactitude des résultats. Mais l'intervalle de tolérance intègre une dimension supplémentaire, celle de chance (ou risque) pour des résultats futurs, conditionnellement à des résultats passés. La méthode peut dès lors être considérée comme exacte au niveau de chance β pour le niveau de concentration en question, si l'intervalle de tolérance est inclus dans les limites $[-\gamma, \gamma]$ définies a priori en fonction des objectifs de la méthode[38].

7.6.3. Le profil d'exactitude

Selon l'équation ci-dessous, les bornes de ces intervalles sont :

$$L_j(\text{borne supérieure}) = \text{biais}(\%)_j - Q_t\left(v; \frac{1+\beta}{2}\right) \sqrt{1 + \frac{1}{pnB_j^2} CV_{FI,j}}$$

$$U_j(\text{borne inférieure}) = \text{biais}(\%)_j + Q_t\left(v; \frac{1+\beta}{2}\right) \sqrt{1 + \frac{1}{pnB_j^2} CV_{FI,j}}$$

Le profil d'exactitude de la méthode s'obtient en reliant d'une part les bornes L_j entre elles ($L_1 \rightarrow L_2 \rightarrow \dots \rightarrow L_m$) et d'autre part les bornes U_j entre elles ($U_1 \rightarrow U_2 \rightarrow \dots \rightarrow U_m$)[38].

7.7. Le choix de la fonction de réponse

L'utilisation de certaines fonctions ne permet pas à la procédure analytique d'atteindre ses objectifs vus que pour certaines concentrations, les limites de tolérances sortent des limites d'acceptation. Par ailleurs, parmi les fonctions de réponses acceptables, on pourra remarquer que certaines fournissent des résultats meilleurs que d'autres. Ce seront ces dernières qui devront être retenues, sachant que le coefficient de détermination R^2 ne renseigne pas sur la qualité des résultats.

Le profil d'exactitude, qui est le reflet direct de ce que la procédure analytique est capable, permet de juger l'adéquation de différentes pratiques et permet de prendre des décisions sur le choix de la fonction de réponse adéquate[38].

7.8. Linéarité

La linéarité de la méthode de dosage est vérifiée sur l'intervalle de validation, en utilisant les données des premières répétitions de chaque niveau de concentration, pour les trois séries de validation. La linéarité est, dans un premier temps, évaluée par comparaison visuelle des représentations graphiques des réponses instrumentales y en fonction des concentrations introduites (x) selon la fonction $[y = f(x)]$, pour la forme pharmaceutique reconstituée et pour les standards d'étalonnage. Dans un deuxième temps, la linéarité de la relation entre les concentrations retrouvées (x_{calc}) et les concentrations introduites (x) est évaluée en représentant graphiquement la fonction $[x_{calc} = f(x)]$ pour les trois séries de validation conjointement. Une analyse statistique de la droite obtenue est effectuée, la pente est comparée à la valeur de référence 1, l'ordonnée à l'origine est comparée à la valeur de référence 0, et une vérification de l'ajustement est effectuée[29].

7.9. Limites de quantification

Le profil d'exactitude, construit à partir des intervalles de mesures attendues, permet donc de décider des niveaux de concentration pour lesquels une procédure est apte à fournir des résultats dans les limites d'acceptation. Ainsi, par définition, quand elle se produit, l'intersection entre le profil d'exactitude et les limites d'acceptation définissent les limites de quantification basse (LQ_{inf}) et haute (LQ_{sup}) de la procédure. Entre ces deux limites, il y a bien sûr l'intervalle de dosage. De la sorte, les limites de quantification sont bien les valeurs extrêmes qui peuvent être quantifiées avec une exactitude définie[38].

8. Outils de calculs pour la validation

De nombreux outils sont disponibles pour effectuer les calculs statistiques. L'utilisation de logiciels statistiques commerciaux (SAS, Statgraphics, Systat...) ou en accès libre (ex : R) est possible pour faire les analyses et les graphiques basiques (comparaison de moyenne (test de Student, ANOVA...), comparaison de variances (test de Fisher, Cochran ...), les calculs d'intervalle de confiance... Il existe également des logiciels intégrés dédiés à la validation. Il est également possible d'utiliser des feuilles de calcul du logiciel Microsoft Excel [30].

PARTIE PRATIQUE

Le Diclofénac sodique est un anti-inflammatoire non stéroïdien (AINS), possédant des propriétés analgésiques et antipyrétiques, très prescrit dans les maladies rhumatologiques.

La solubilité du Diclofénac sodique dépend du pH du milieu. Il est très peu soluble en milieu aqueux, peu soluble dans un tampon phosphate à pH 6,8 et pratiquement insoluble dans l'acide chlorhydrique à pH 1,2. Selon le Système de la Classification Biopharmaceutique (BCS), le Diclofénac sodique appartient à la classe II, c'est-à-dire, il possède une faible solubilité et une perméabilité élevée.

Le présent travail consiste à mettre au point et à valider une nouvelle méthode de dosage du Diclofénac sodique, formulé en comprimés gastro-résistants de 50 mg, par Chromatographie Liquide Haute Performance (HPLC), en vue de l'étude de son profil de dissolution.

Cette étude a été réalisée au sein du laboratoire de Chimie Analytique du Département de Pharmacie de Tizi-Ouzou, selon les directives de la commission de la société française des sciences techniques et pharmaceutiques (SFSTP) décrivant un protocole de validation harmonisé, publié dans la revue STP Pharma pratique en janvier 2006.

1. Matériels

1.1. Appareillage

Tableau XIII : Appareillages utilisés dans ce présent travail

Désignation		Spécification	Usage
HPLC (SHIMADZU LC20)	Pompe	Lc20 at	Dosage (obtention des chromatogrammes)
	Injecteur automatique	SIL 20 A	
	Contrôleur	CBM-20	
	Compartiment de la colonne	CTO-20 A	
	Colonne	C18 (25 cm)	
	Détecteur	Spectrophotomètre UV visible	
	Logiciel d'exploitation	LC-solution	
Distillateur	Lab-Tech	Eau distillée	
Pompe à vide	Fisher Bioblock Scientific $P_{\max} = 4$ bar	Filtration de la phase mobile	
Sonicateur	Advantage-LAB	Solubilisation	
Agitateurs magnétique	NAHITA Model690-1	Homogénéisation des solutions	
Balances analytiques	KERN	Pesé	
	METLER TOLEDO		
pH-mètre	METLER TOLEDO	Préparation du tampon	
Etuve	MEMMERT	Séchage	

1.2. Verreries et autres

Tableau XIV : Verreries et autres matériels utilisés dans ce présent travail

Verreries	Autres
<ul style="list-style-type: none"> - Fioles jaugées : 50 ml, 100 ml, 250 ml, 1000 ml, 2000 ml ; - Béchers ; - Eprouvette : 1000 ml ; - Pipettes graduées : 20 ml ; - Pipettes jaugées : 5 ml ; - Entonnoirs ; - Vials ; 	<ul style="list-style-type: none"> - Micropipette : 1 ml ; - Poires ; - Pissettes ; - Spatules ; - Papier aluminium ; - Des flacons pour phase mobile ; - Bavettes ; - Les filtres millipores ; - Barreau magnétique ; - Mortier ; - Tamis ; - Pulvérisateur.






1.3. Matières premières

Tableau XV : Matières premières utilisées dans le présent travail

Matières premières		provenance
Principe actif	Diclofénac de sodium	BIOPHARM
Excipients	Lactose monohydraté	SAIDAL
	Amidon de maïs	
	Povidone (k29-k32)	
	Alcool isoropyl	Sigma-Aldrich
	Stéarate de magnésium	Sigma-Aldrich
	Opadry rose	BIOPHARM

1.4. Réactifs

Tableau XVI : Réactifs utilisés dans le présent travail

Réactifs	Provenance	Données physicochimique	Précaution
Phosphate tri-sodique	ALDRICH Chemistry	Formule brute : Na_3PO_4 N° CAS : 7601-54-9 Mr : 163,94 g/mol	
Acide chlorhydrique	SIGMA ALDRICH	Formule brute : HCl N° CAS : 7647-01-0 M ^r : 36,46 g/mol ρ : 1,19 g / cm ⁻³	
Acide phosphorique	SIGMA ALDRICH	Formule brute : H_3PO_4 N° CAS : 7664-38-2 M ^r : 98,00 g/mol ρ : 1,83 g / cm ⁻³	
Méthanol grade HPLC	BIOCHEM Chemopharma	Formule brute : CH_4O N° CAS : 67-56-1 M ^r : 32,04 g/mol ρ : 0,79 g / cm ⁻³	
Acétonitrile grade HPLC	BIOCHEM Chemopharma	Formule brute : $\text{C}_2\text{H}_3\text{N}$ N° CAS : 75-05-8 M ^r : 41,05 g/mol ρ : 0,8g / cm ⁻³	
Eau distillée	Préparée avec le distillateur LAB-TECH	Formule brute : H_2O N° CAS : 7732-18-5 Mr: 18 g/mol ρ : 1 g / cm ⁻³	

2. Méthode

2.1. Méthodologie de la validation analytique

Il existe de nombreux documents officiels décrivant les critères de validation à tester, mais ils ne proposent pas de protocole expérimental et se limitent le plus souvent aux concepts généraux. C'est pourquoi deux commissions SFSTP ont élaboré successivement des guides de validation (en 1992 pour les analyses des spécialités pharmaceutiques et en 1997 pour les analyses en milieu biologique) dans le but d'aider concrètement les industriels du médicament à appliquer les recommandations réglementaires. Si ces premiers guides ont largement contribué à faire appliquer et progresser les validations analytiques, ils présentent toutefois des

faiblesses quant aux conclusions des tests réalisés et quant à l'aide à la prise de décision au regard de limites d'acceptation définies pour l'usage d'une procédure analytique. Sur ce, le présent travail est basé sur les recommandations de la commission SFSTP publiées en 2003 complétées en 2006 qui propose de revoir les bases mêmes de la validation analytique pour une démarche harmonisée, en distinguant notamment les règles de diagnostic et les règles de décision. Ces dernières reposent sur l'utilisation du profil d'exactitude, basé sur la notion d'erreur totale (biais + écart type), permettant de simplifier l'approche de la validation d'une procédure analytique tout en contrôlant le risque associé à son utilisation.

2.2. Choix du protocole de validation

Selon le logigramme de la figure 06 qui permet de sélectionner un protocole de validation et le tableau X et sachant que : la procédure de dosage est connue ultérieurement, il n'y a pas d'effet matrice et l'étalonnage ne se fait pas à un niveau de concentration, le protocole adopté dans notre étude est le V2 modifié ; en utilisant 5 niveaux de concentration au lieu de trois pour les SE et les SV.

2.3. Le choix des paramètres de la validation

2.3.1. Domaine d'application et les niveaux de concentration

le choix des niveaux de concentration pour le dosage d'une substance chimique (principe actif) dans le cadre d'une cinétique de dissolution d'une forme pharmaceutique sèche, se fait de façon à couvrir une gamme de concentrations correspondant aux concentrations dissoutes du comprimé lors du test de dissolution à travers le temps, de la limite de quantification jusqu'à la concentration maximale [35].

Dans le présent travail, on a opté pour des niveaux de concentration qui englobent la plage des concentrations dissoutes d'un comprimé de 50 mg lors d'une étude du profil de dissolution ; de 5% jusqu'à 105% (C_{max}) en passant par trois niveaux intermédiaires.

2.3.2. Limites d'acceptabilité (λ)

$\lambda = \pm 5\%$, signifie que pour une concentration de 50 mg/L le résultat sera compris au maximum entre 47,5 et 52,5 mg/L et pour une concentration de 5 mg/L, il sera compris au maximum entre 4,75 et 5,25 mg/L.

2.3.3. Probabilité de confiance (β)

$\beta = 95\%$ (pas de réglementation pour cette application à part la directive 75/318/CEE amendée de l'union européenne qui stipule pour les médicaments que : « Sauf justification appropriée,

les écarts maximaux tolérables de la teneur en substance active ne peuvent dépasser $\pm 5\%$ dans les produits finis au moment de la fabrication. [...] Les limites excédant $\pm 5\%$ au moment de la libération doivent être justifiées dans la partie « Développement du procédé de fabrication » par des résultats expérimentaux habituellement basés sur un intervalle de confiance de 95%. Les limites élargies incluent également les variations liées à la production et à la procédure analytique. »[29]), en général, on choisit $\beta \geq 95\%$ dans le domaine pharmaceutique.

2.4. Conditions expérimentales

2.4.1. Le choix de la dilution

Pour réaliser un dosage direct, sans dilution, à partir des prélèvements des bacs de dissolution qui renferment 1000 ml pour un comprimé de 50 mg, un niveau théorique de 100% doit avoir une concentration de 50 mg/L.

2.4.2. Le choix du diluant

L'étude du profil de dissolution pour les comprimés gastro-résistants du Diclofénac se fait dans un milieu de dissolution tamponné à pH 6,8. Pour pratiquer un dosage direct sans faire de dilution et pour des raisons pratiques, le diluant est considéré comme étant ce même milieu de dissolution qui est le tampon phosphate à pH 6,8.

2.4.3. Préparation des solutions

2.4.3.1. Préparation du diluant (tampon à pH 6,8)

Le diluant (tampon pH 6.8) a été obtenu comme suit :

- Dissoudre 76 g de phosphate tri-sodique dans un litre de l'eau distillée ;
- Mélanger 250 ml de cette solution avec 750ml de HCL 0.1N ;
- Ajuster le pH jusqu'au 6.8 ± 0.05 par HCl 2N (pour une QSP 1L).

2.4.3.2. Préparation des standards d'étalonnage

Chaque jour, pendant 03 jours, 05 niveaux de concentration sont préparés à raison de 02 répétitions par niveau selon le tableau suivant :

Tableau XVII : Montage expérimental des SE

Niveaux	5%		30%		55%		80%		105%	
Répétition	1	2	1	2	1	2	1	2	1	2
Prise d'essai théorique	2,5 mg		15 mg		27,5 mg		40 mg		52,5 mg	
Protocole	<ul style="list-style-type: none"> - Peser chaque PE théorique du Diclofénac de sodium pour chaque répétition dans une fiole de 100 ml (solution mère); - Ajouter 90 ml du diluant et mettre dans le sonicateur pour une dissolution complète ; - Compléter au trait de jauge avec le diluant pour ainsi obtenir des solutions mères ; - Mettre 5 ml de la solution mère dans une fiole de 50 ml ; - Compléter au trait de jauge avec le diluant (une dilution 1/10) ; - Agiter par retournement à chaque fois et remplir les vials. 									
Solutions à préparer	SE = 5x3x2 = 30 solutions (5 niveaux, 3 séries, 2 répétitions)									

2.4.3.3. Préparation du placebo

a. Préparation des granulés du placebo de Diclofénac de sodium

Le poids théorique de 10 comprimés est de 1.68 g (1.64-1.72), avec une épaisseur de 4.60 à 5.0 mm. La formulation des excipients est selon le tableau suivant :

Tableau XVIII : Formulation du placebo des comprimés 50 mg gastro-résistants du Diclofenac sodique

Excipients	Teneurs	Qsp 50 cp
Lactose monohydraté	85 mg/cp	4250 mg
Amidon de maïs	26 mg/cp	1300 mg
Povidone (k29-k32)	5 mg/cp	250 mg
Alcool isopropyl	0,073 ml/cp	3,65 ml
Stéarate de magnésium	2 mg/cp	100 mg
Opadry rose	5% (masse moyenne = 168 mg)	420 mg

Etapas de la granulation :

- Mélanger ensemble le lactose et l'amidon de maïs pendant 10 à 15 minutes ;
- Préparer la solution liante : dissoudre le Povidone dans l'alcool isopropylique jusqu'à dissolution complète ;

- Ajouter la solution liante au mélange 1 et compléter avec l'alcool, ajouter encore de l'alcool si nécessaire ;
- Faire passer la masse humide à travers un tamis d'ouverture de maille de 4,8 mm et récupérer les grains humides directement sur du papier aluminium à mettre sur les plateaux de l'étuve ;
- Faire sécher les grains à 40°C.

La granulation humide doit se faire dans des conditions d'humidité ne dépassant pas les 45% et de T° ne dépassant pas 26,5 °C.

- Exercer un léger broyage des grains obtenus après séchage en les faisant passer à travers un tamis de 1-1,19 mm à l'aide de spatule en exerçant un geste lent et délicat vers l'avant
- Conserver les grains obtenus dans un contenant en verre sec et propre.

Lubrification du mélange de grains :

- Charger le mortier avec la moitié du mélange obtenu et rajouter le reste d'amidon de maïs et le stéarate de magnésium puis rajouter le reste du mélange de grains et mélanger le tout pendant 15 à 20 minutes.
- Conserver le mélange final obtenu dans un contenant en verre sec et propre.

b. Préparation de la solution placebo

Chaque jour, dans une fiole de 1000 ml, peser 1180 mg de granulés (QSP 10 cp) du placebo, rajouter 105 mg de l'Opadry rose (QSP 10 cp), compléter au trait de jauge avec le diluant après l'avoir mis dans l'ultrason pendant 15 mn avec une proportion du diluant qui permet une solubilisation. Filtrer cette solution, pour avoir la solution mère du placebo (10 fois plus concentrée que la QSP d'un Cp dans 1000 ml du milieu de dissolution).

2.4.3.4. Préparation des standards de validation

Chaque jour, pendant les 03 jours, 05 niveaux de concentration sont préparés à raison de 03 répétitions par niveau selon le tableau suivant :

Tableau XIX : Montage expérimental des SV

Niveaux	5%			30%			55%			80%			105%		
Répétition	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3
Prises d'essai théoriques	2,5 mg			15 mg			27,5 mg			40 mg			52,5 mg		
Protocole	<ul style="list-style-type: none"> - Peser chaque PE théorique du Diclofénac de sodium pour chaque répétition dans une fiole de 100 ml ; - Ajouter 90 ml du diluant et mettre dans le sonicateur pour une dissolution complète ; - Compléter au trait de jauge avec le diluant pour ainsi obtenir des solutions mères ; - Mettre 5 ml de la solution mère dans une fiole de 50 ml ; - Ajouter 5 ml de la solution placebo ; - Compléter au trait de jauge avec le diluant (une dilution 1/10) ; - Agiter par retournement à chaque fois et remplir les vials. 														
Solutions à préparer	SV = 5x3x3 = 45 solutions (5 niveaux, 3 séries, 3 répétitions)														

2.4.3.5. Préparation de la phase mobile

Mélanger 219 ml d'eau distillée, 1 ml d'acide phosphorique, 280 ml d'Acétonitrile grade HPLC et 500 ml de méthanol grade HPLC dans une éprouvette graduée de 1000 ml. Filtrer à l'aide du dispositif de filtration sous-vide en utilisant des filtres SUPELCO, puis verser dans le réservoir de la phase mobile.

2.4.4. Conditions chromatographiques

Tableau XX : Conditions chromatographiques de la méthode de dosage

Colonne	Longueur	25 cm
	Diamètre	4,6 mm
	Taille des particules	5 μm
	Phase stationnaire	Gel de silice octadecylesilyle (C18)
Détection	Spectrophotomètre UV-Visible : longueur d'onde $\lambda=273$ nm	
Volume d'injection	20 μl	
Temps d'analyse	8 mn	
Débit	1.2 ml/min	
Température	Ambiante	
Phase mobile	MeOH/ACN/Eau/ H_3PO_4 : 500/280/219/1 (V/V/V/V)	

2.5. Préparation de la feuille de calcul

En utilisant le logiciel Excel de Microsoft office 2016 enregistré, installé sur le système d'exploitation Windows 10 authentique.

L'ensemble des équations rentrant dans l'étude statistique de la validation et la construction du profil d'exactitude sont introduites dans un tableur, pour avoir les résultats complets en tableaux et en graphes si nécessaire juste en introduisant les données brutes en termes de prises d'essais et de leurs réponses instrumentales.

1. Spécificité et effet matrice

1.1. Comparaison des chromatogrammes

Comparaison du chromatogramme du principe actif seul et celui du placebo chargé d'un même niveau de concentration (niveau 5 : 105%) ainsi qu'avec ceux de leur blancs (diluant seul et diluant avec placebo) est illustrée dans les figures suivantes :

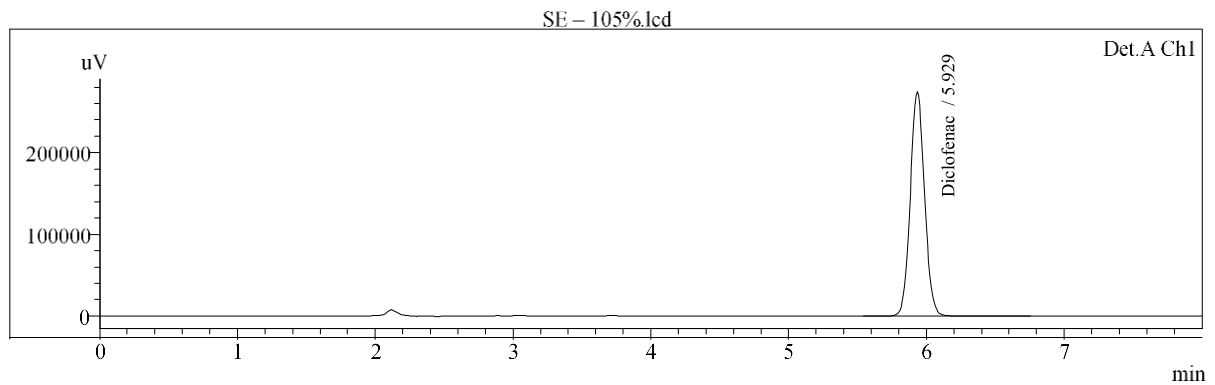


Figure 08 : Chromatogramme du standard d'étalonnage, niveau 105%

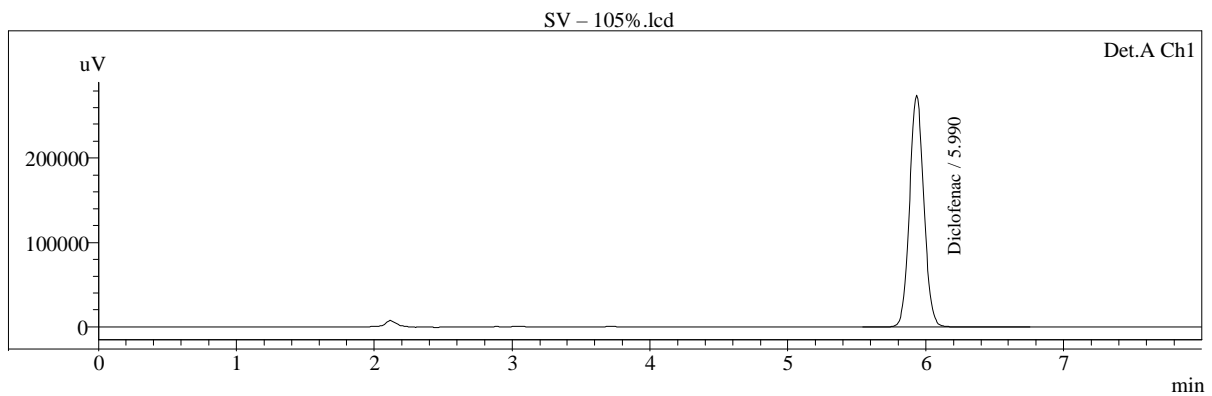


Figure 09 : Chromatogramme du standard de validation, niveau 105%

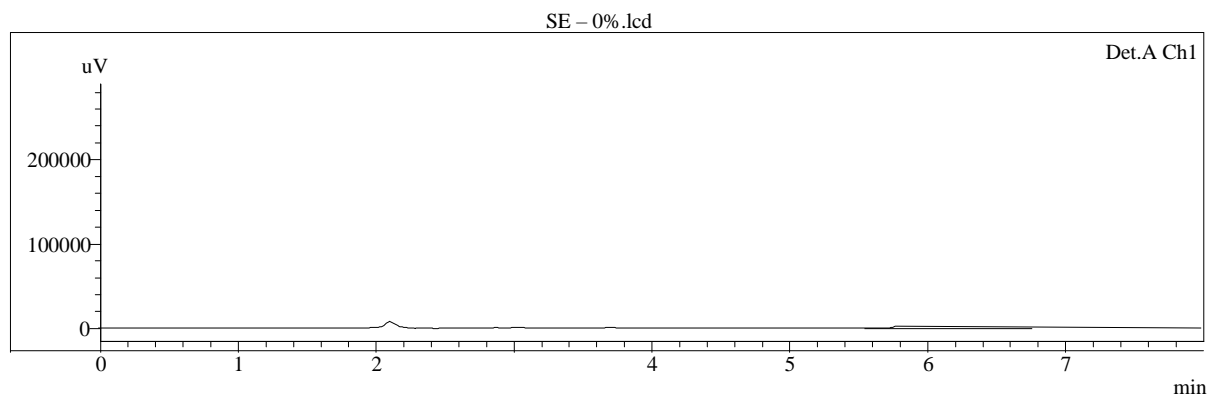


Figure 10 : Chromatogramme du diluant non chargé de PA

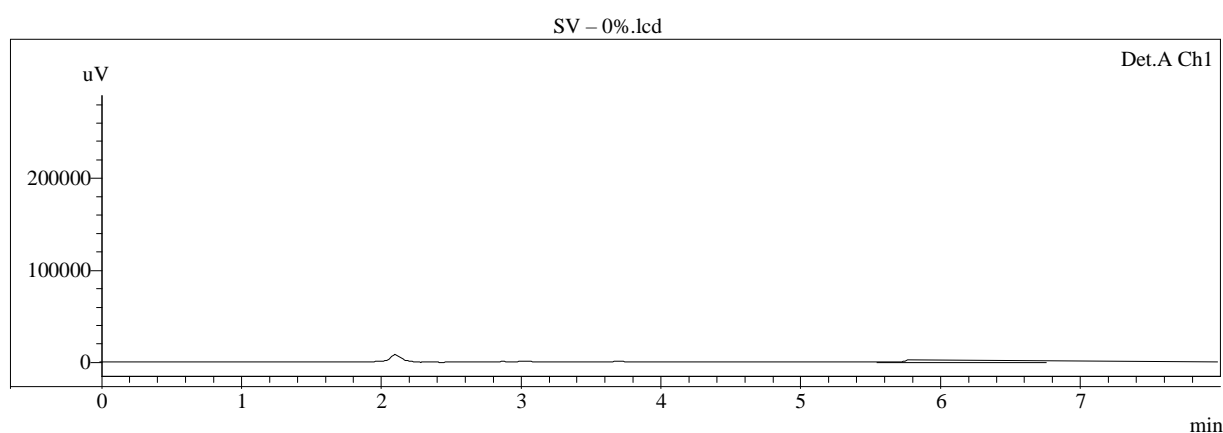


Figure 11 : Chromatogramme du diluant avec placebo non chargé de PA

Le tableau suivant représente les résultats de la superposition des quatre chromatogrammes :

Tableau XXI : Résultats de la comparaison des chromatogrammes

solutions	Temps de rétention (min)	Superposition
diluant non chargée de PA	Absence	
du diluant avec placebo non chargée de PA		
standard de validation	5,990	Concluante
standard d'étalonnage	5,929	

1.2. Confirmation de la spécificité sur les deux gammes d'étalonnage et de validation

Les résultats de la comparaison des deux pentes de la droite de régression obtenue sur la gamme sans matrice et la droite obtenue sur la gamme avec matrice sont évalués dans les tableaux suivants :

Tableau XXII : Résultats obtenus sur la gamme sans matrice

Gamme sans matrice						
Niveaux	1 ^{ère} répétitions de chaque série	Masses introduites en mg (Xi)	Réponses instrumentales : aire des pics (Yi)	Réponses calculées (Y*i)	$(Y_i - Y^*_i)^2$	$(X_i - X')^2$
5%	1	2,46	96249	86531,43	94431260,74	627,07
	2	2,59	102868	91466,32	129998303,68	620,57
	3	2,59	103786	91466,32	151774511,91	620,57
30%	1	15,08	549957	565595,85	244573477,70	154,29
	2	15,06	551416	564836,63	180113324,11	154,79
	3	15,00	536653	562558,99	671120147,18	156,28
55%	1	27,51	1049496	1037447,73	145160898,39	0,00
	2	27,54	1042182	1038586,55	12927273,29	0,00
	3	27,58	1050222	1040104,98	102354144,82	0,01
80%	1	40,12	1499572	1516132,54	274251452,52	159,23
	2	40,07	1516830	1514234,50	6736607,34	157,97
	3	40,08	1508981	1514614,11	31731925,94	158,22
105%	1	51,57	1941571	1950782,90	84859179,40	579,30
	2	52,68	1998447	1992919,32	30555299,56	633,97
	3	52,59	2008551	1989502,85	362832040,54	629,44
Pente		37960,73059				
ordonnée à l'origine		-6851,972079				
SCE/(n-2)		194109219				
Erreur pente		204,2755741				
Erreur ordonnée à l'origine		6670,896535				

Tableau XXIII : Comparaison de la pente et l'ordonnée à l'origine avec 0 sur la gamme sans matrice

Comparaison de la pente avec 0	t calculé	185,831	différence significative
	$t^\circ(\alpha ; 13)$	2,160	
	Condition	$t \text{ calculé} > t^\circ(\alpha ; 13)$	
Comparaison de l'ordonnée à l'origine avec 0	t calculé	1,027	différence non significative
	$t^\circ(\alpha ; 13)$	2,160	
	Condition	$t \text{ calculé} < t^\circ(\alpha ; 13)$	

Tableau XXIV : Résultats obtenus sur la gamme avec matrice

Gamme avec matrice						
Niveaux	1 ^{ère} répétitions de chaque série	Masses introduites en mg (Xi)	Réponses instrumentales : aire des pics (Yi)	Réponses calculées (Y*i)	$(Y_i - Y^*_i)^2$	$(X_i - X')^2$
5%	1	2,46	94785	93209,09	2483492,86	627,07
	2	2,59	97389	98099,22	504415,78	620,57
	3	2,59	102395	98099,22	18453705,65	620,57
30%	1	15,08	553084	567928,11	220347533,68	154,29
	2	15,06	559177	567175,78	63980475,57	154,79
	3	15,00	537415	564918,80	756458761,01	156,28
55%	1	27,51	1051625	1035500,01	260015340,10	0,00
	2	27,54	1046010	1036628,50	88012524,37	0,00
	3	27,58	1062271	1038133,16	582635459,34	0,01
80%	1	40,12	1543031	1509842,86	1101452459,37	159,23
	2	40,07	1509087	1507962,04	1265529,44	157,97
	3	40,08	1507519	1508338,21	671099,31	158,22
105%	1	51,57	1910687	1940550,69	891839856,37	579,30
	2	52,68	1957348	1982304,90	622846673,43	633,97
	3	52,59	1995787	1978919,42	284515256,60	629,44
Pente		37616,40395				
ordonnée à l'origine		672,7361105				
SCE/(n-2)		376575583,3				
Erreur pente		284,5243483				
Erreur ordonnée à l'origine		9291,529336				

Tableau XXV : Comparaison de la pente et l'ordonnée à l'origine avec 0 sur la gamme sans matrice

Comparaison de la pente avec 0	t calculé	132,208	différence significative
	$t^\circ(\alpha ; 13)$	2,160	
	Condition	t calculé > $t^\circ(\alpha ; 13)$	
Comparaison de l'ordonnée à l'origine avec 0	t calculé	0,072	différence non significative
	$t^\circ(\alpha ; 13)$	2,160	
	Condition	t calculé < $t^\circ(\alpha ; 13)$	

1.3. Vérification de l'absence d'effet matrice et d'erreur systématique

Tableau XXVI : Comparaison des deux pentes

Comparaison des deux pentes des deux droites de régression	t calculé	0,983	différence non significative
	$t^\circ(\alpha ; 26)$	2,056	
	Condition	$t \text{ calculé} < t^\circ(\alpha ; 26)$	
Comparaison des ordonnées à l'origine des deux droites de régression	t calculé	0,658	différence non significative
	$t^\circ(\alpha ; 26)$	2,056	
	Condition	$t \text{ calculé} < t^\circ(\alpha ; 26)$	

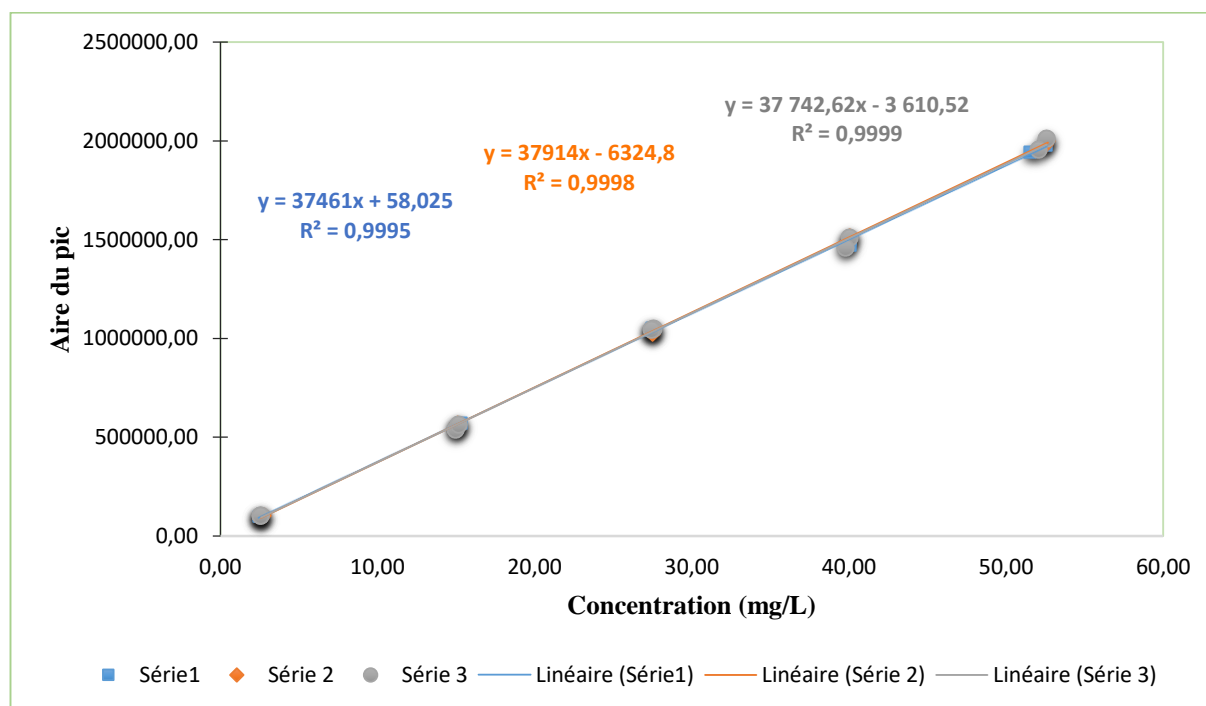
2. Fonctions de réponse

La relation existante entre l'aire du pic (réponse instrumentale) et la masse introduite dans les standards d'étalonnage (concentration), obtenue sur chacune des trois séries, est représentée pour cinq modèles mathématiques comme suit :

- **Modèle : $y = ax + b$**

Tableau XXVII : Résultats obtenus pour la fonction $y = ax + b$

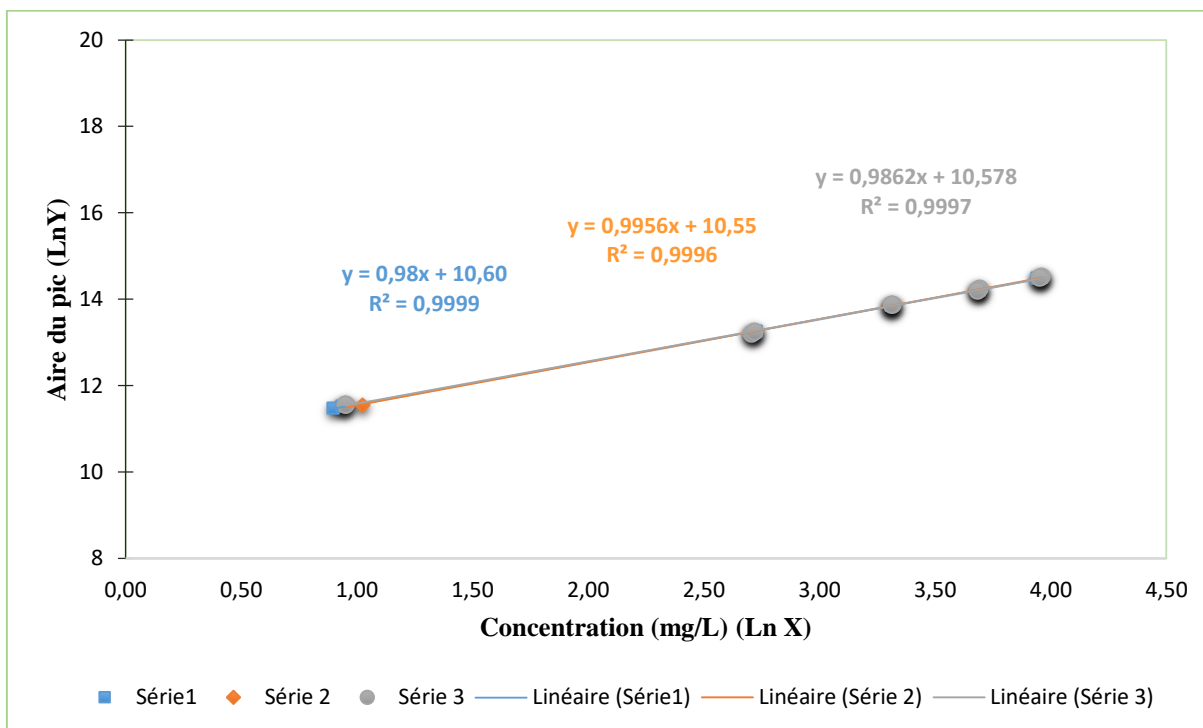
Niveaux %	répétitions	Séries (Jours)					
		1		2		3	
		Masse introduite (mg)	Aire du pic	Masse introduite (mg)	Aire du pic	Masse introduite (mg)	Aire du pic
5%	1	2,46	96249	2,59	102868	2,59	103843
	2	2,55	99640	2,79	103120	2,59	103786
30%	1	15,08	549957	15,06	551416	15,00	536653
	2	15,33	568060	15,13	566814	15,16	564664
55%	1	27,51	1049496	27,54	1042182	27,58	1050222
	2	27,40	1041406	27,53	1020866	27,44	1043843
80%	1	40,12	1499572	40,07	1516830	40,08	1508981
	2	40,09	1468001	40,09	1517070	39,78	1461637
105%	1	51,57	1941571	52,68	1998447	52,59	2008551
	2	52,58	1976913	52,54	1982259	52,08	1956783
Pente		37461,447		37914,353		37742,618	
Ord. L'origine		58,025		-6324,759		-3610,518	

Figure 12 : Courbes d'étalonnage obtenues avec la fonction $y = ax + b$

- Modèle $\ln y = f(\ln x)$

Tableau XXVIII : Résultats obtenus avec la fonction $\ln y = f(\ln x)$

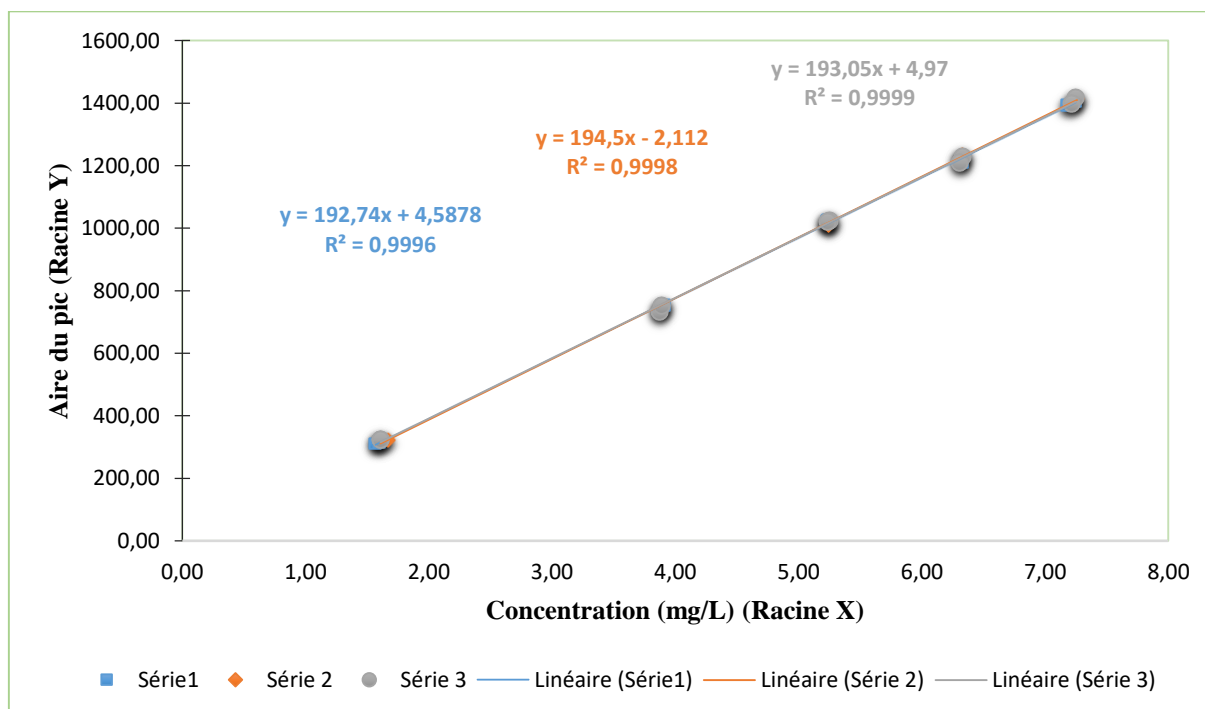
Niveaux %	répétitions	Séries (Jours)					
		1		2		3	
		Masse introduite (Ln x)	Aire du pic (Ln y)	Masse introduite (Ln x)	Aire du pic (Ln y)	Masse introduite (Ln x)	Aire du pic (Ln y)
5%	1	0,90	11	0,95	12	0,95	12
	2	0,94	12	1,03	12	0,95	12
30%	1	2,71	13	2,71	13	2,71	13
	2	2,73	13	2,72	13	2,72	13
55%	1	3,31	14	3,32	14	3,32	14
	2	3,31	14	3,32	14	3,31	14
80%	1	3,69	14	3,69	14	3,69	14
	2	3,69	14	3,69	14	3,68	14
105%	1	3,94	14	3,96	15	3,96	15
	2	3,96	14	3,96	14	3,95	14
Pente		0,986		0,996		0,980	
Ord. L'origine		10,578		10,550		10,602	

Figure 13 : courbes d'étalonnage obtenues avec la fonction $\ln y = f(\ln x)$

- **Modèle :** $\sqrt{y} = f(\sqrt{x})$

Tableau XXIX : Résultats obtenus pour la fonction $\sqrt{y} = f(\sqrt{x})$

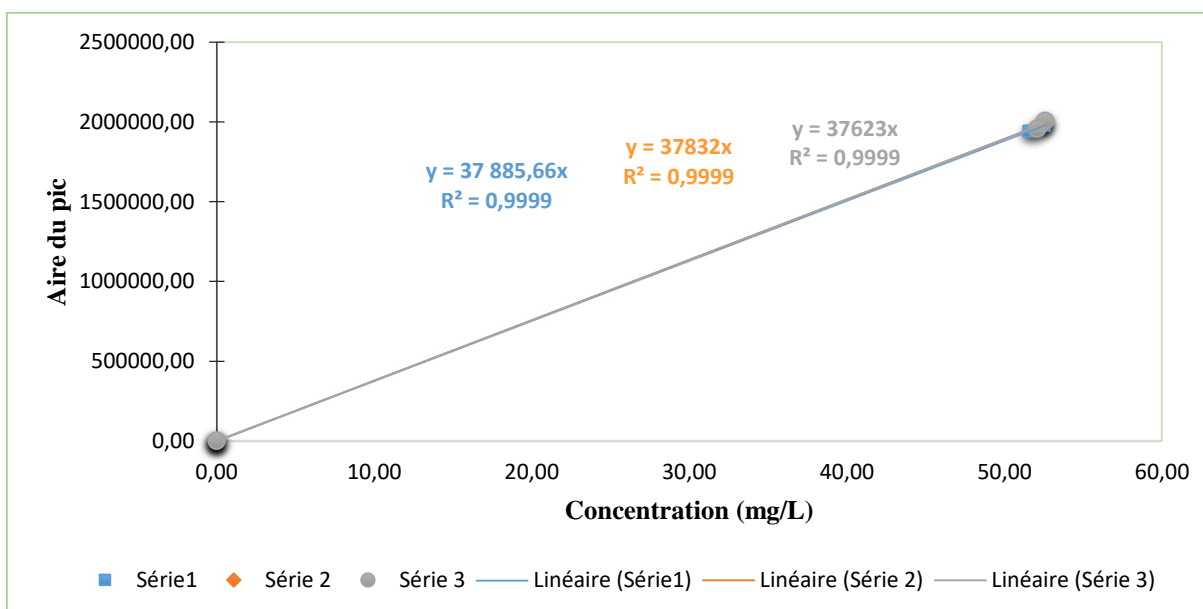
Niveaux %	répétitions	Séries (Jours)					
		1		2		3	
		Masse introduit e (\sqrt{x})	Aire du pic(\sqrt{y})	Masse introduite (\sqrt{x})	Aire du pic(\sqrt{y})	Masse introduite (\sqrt{x})	Aire du pic(\sqrt{y})
5%	1	1,57	310,24	1,61	320,73	1,61	322,25
	2	1,60	315,66	1,67	321,12	1,61	322,16
30%	1	3,88	741,59	3,88	742,57	3,87	732,57
	2	3,92	753,70	3,89	752,87	3,89	751,44
55%	1	5,24	1024,45	5,25	1020,87	5,25	1024,80
	2	5,23	1020,49	5,25	1010,38	5,24	1021,69
80%	1	6,33	1224,57	6,33	1231,60	6,33	1228,41
	2	6,33	1211,61	6,33	1231,69	6,31	1208,98
105%	1	7,18	1393,40	7,26	1413,66	7,25	1417,23
	2	7,25	1406,03	7,25	1407,93	7,22	1398,85
Pente		192,739		194,497		193,048	
Ord. L'origine		4,588		-2,112		4,975	

Figure 14 : Courbes d'étalonnage obtenues avec la fonction $\sqrt{y} = f(\sqrt{x})$

- Modèle $y = ax$ ajusté en utilisant uniquement le niveau 5

Tableau XXX : Résultats obtenus pour la fonction $y = ax$

Niveaux %	répétitions	Séries (Jours)					
		1		2		3	
		Masse introduite (mg)	Aire du pic	Masse introduite (mg)	Aire du pic	Masse introduite (mg)	Aire du pic
105%	1	51,57	1941571	52,68	1998447	52,59	2008551
	2	52,58	1976913	52,54	1982259	52,08	1956783
Pente		37 885,66		37832,22		37623,15	
Ord. L'origine		0		0		0	

Figure 15 : courbes d'étalonnage obtenues avec la fonction $y = ax$

2.1. Critères de choix de la fonction de réponse

Les différents modèles de régression testés dans notre travail aboutissent aux profils d'exactitudes élucidés dans le tableau suivant :

Tableau XXXI : Critères de choix de la fonction de réponse

Modèle de fonction de réponse	Profil d'exactitude	Intervalle de dosage (mg/L)
$y = ax + b$	<p>Legend:</p> <ul style="list-style-type: none"> Biais (%) Limite intervalle tolérance basse Limite intervalle tolérance haute Limite d'acceptation basse Limite d'acceptation haute 	[15,30 ; 52,5]
$\ln y = f(\ln x)$		[17,10 ; 52,5]
$\sqrt{y} = f(\sqrt{x})$		[16,19 ; 52,5]
$y = ax$ ajusté en utilisant uniquement le niveau 5		[16,68 ; 52,5]

Les résultats qui seront désormais élucidés sont basés sur le modèle mathématique choisi, en l'occurrence la fonction de réponse : $y = ax + b$, sachant que ce sont les mêmes étapes aussi suivies avec les autres modèles.

3. Alignement des observations

L'alignement appliqué aux réponses obtenues avec les trois séries des standards de validation, sur la moyenne des masses introduites pour chaque niveau de concentration théorique est résumé dans le tableau suivant :

Tableau XXXII : Tableau d'alignement des réponses observées avec les trois séries de validation

niveaux	Répétitions	Séries (Jours)									moyenne des PE(mg)
		1			2			3			
		Masse introduite (mg)	Réponses instrumentales	Réponses alignées	Masse introduite (mg)	Réponses instrumentales	Réponses alignées	Masse introduite (mg)	Réponses instrumentales	Réponses alignées	
5%	1	2,46	94785	99280,374	2,59	97389	97009,856	2,59	102395	102017,574	2,58
	2	2,55	97389	98512,843	2,79	103675	95712,986	2,59	102455	102077,574	
	3	2,70	100524	96028,626	2,39	95962	103165,727	2,56	91862	92616,852	
30%	1	15,08	553084	553999,724	15,06	559177	560862,082	15,00	537415	541357,007	15,10
	2	15,33	578923	570473,363	15,13	560574	559605,078	15,16	560758	558661,188	
	3	15,08	557271	558186,724	15,00	547701	551660,943	15,10	547824	547991,745	
55%	1	27,51	1051625	1052582,348	27,54	1046010	1045841,492	27,58	1062271	1060593,550	27,54
	2	27,40	1043441	1048519,107	27,53	1025065	1025275,635	27,44	1042385	1045991,517	
	3	27,72	1051743	1044833,444	27,52	1016221	1016810,779	27,58	1060873	1059195,550	
80%	1	40,12	1543031	1547567,997	40,07	1509087	1515574,567	40,08	1507519	1513599,755	40,24
	2	40,09	1492328	1497988,841	40,09	1505626	1511355,280	39,78	1467985	1485388,540	
	3	40,78	1534378	1514190,443	41,09	1521550	1489364,927	40,07	1519216	1525674,181	
105%	1	51,57	1910687	1942404,358	52,68	1957348	1947363,887	52,59	1995787	1989244,946	52,42
	2	52,58	1997604	1991485,297	52,54	1966535	1961858,897	52,08	1973674	1986380,681	
	3	52,56	1981480	1976110,526	52,56	1948729	1943294,609	52,59	1956916	1950373,946	
Pente		37461,44655			37914,35255			37742,61772			
Ord. l'origine		58,02483499			-6324,759114			-3610,518463			

4. Prédiction inverses

Le calcul des concentrations prédites dites en retour est présenté dans le tableau ci-dessous :

Tableau XXXIII : Prédiction inverses obtenus avec les SV

Niveaux	Répétitions	Séries (Jours)					
		1		2		3	
		Réponses alignées	prédiction inverses (mg)	Réponses alignées	prédiction inverses (mg)	Réponses alignées	prédiction inverses (mg)
5 %	1	99280,37	2,649	97009,86	2,725	102017,57	2,799
	2	98512,84	2,628	95712,99	2,691	102077,57	2,800
	3	96028,63	2,562	103165,73	2,888	92616,85	2,550
30 %	1	553999,72	14,787	560862,08	14,960	541357,01	14,439
	2	570473,36	15,227	559605,08	14,927	558661,19	14,898
	3	558186,72	14,899	551660,94	14,717	547991,74	14,615
55 %	1	1052582,35	28,096	1045841,49	27,751	1060593,55	28,196
	2	1048519,11	27,988	1025275,64	27,209	1045991,52	27,809
	3	1044833,44	27,889	1016810,78	26,985	1059195,55	28,159
80 %	1	1547568,00	41,309	1515574,57	40,140	1513599,76	40,199
	2	1497988,84	39,986	1511355,28	40,029	1485388,54	39,451
	3	1514190,44	40,418	1489364,93	39,449	1525674,18	40,519
105 %	1	1942404,36	51,849	1947363,89	51,529	1989244,95	52,801
	2	1991485,30	53,159	1961858,90	51,911	1986380,68	52,725
	3	1976110,53	52,749	1943294,61	51,422	1950373,95	51,771

5. Justesse

La justesse est exprimée en biais absolu, biais relatif en sus du taux de recouvrement pour chaque niveau de concentration théorique des standards de validation comme indiqué dans le tableau suivant :

Tableau XXXIV : Calcul de la justesse pour chaque niveau des SV

Niveaux %	5 %	30 %	55 %	80 %	105 %
Concentration moyenne théorique (mg/L)	2,58	15,10	27,54	40,24	52,42
Concentration moyenne retrouvé (mg/L)	2,70	14,83	27,79	40,17	52,21
Biais absolu	0,12	-0,27	0,25	-0,07	-0,20
Biais relatif (%)	4,62	-1,82	0,91	-0,18	-0,39
Taux de recouvrement (%)	104,62	98,18	100,91	99,82	99,61

6. Fidélité

La fidélité en ses deux conditions de répétabilité et de fidélité intermédiaire est exprimée en écarts types relativisés en coefficients de variation suite à l'étude de la variance du modèle choisi qui a donné les résultats suivants dans le tableau ci-dessous :

Tableau XXXV : Calcul de fidélité pour chaque niveau des SV

Niveaux %	5 %	30 %	55 %	80 %	105 %
Concentration moyenne retrouvé (mg/L)	2,699	14,830	27,787	40,167	52,213
SCE résiduelle	0,068	0,246	0,423	1,786	1,690
SCE totale	0,105	0,407	1,431	2,573	3,304
SCE inter séries	0,037	0,160	1,009	0,786	1,614
Ecart type de répétabilité	0,106	0,203	0,265	0,546	0,531
Ecart type inter séries	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
Ecart type de fidélité intermédiaire	0,106	0,203	0,265	0,546	0,531
CV de répétabilité	3,938	1,366	0,955	1,358	1,016
CV de fidélité intermédiaire	3,938	1,366	0,955	1,358	1,016

7. Exactitude

Le tableau suivant élucide pour chaque concentration des standards de validation son exactitude relative, et met en avant l'erreur relative maximale observée (en rouge) pour chaque niveau de concentration théorique :

Tableau XXXVI : Résultats du calcul de l'exactitude relative

Niveaux %	répétitions	Séries (Jour)								
		1			2			3		
		Concentration introduite (mg/L)	Concentration prédite (mg/L)	Exactitude relative (%)	Concentration introduite (mg/L)	Concentration prédite (mg/L)	Exactitude relative (%)	Concentration introduite (mg/L)	Concentration prédite (mg/L)	Exactitude relative (%)
5 %	1	2,46	2,649	-7,669	2,59	2,725	-5,231	2,59	2,799	-8,056
	2	2,55	2,628	-3,065	2,79	2,691	3,539	2,59	2,800	-8,117
	3	2,70	2,562	5,117	2,39	2,888	-20,830	2,56	2,550	0,407
30 %	1	15,08	14,787	1,943	15,06	14,960	0,666	15,00	14,439	3,740
	2	15,33	15,227	0,674	15,13	14,927	1,345	15,16	14,898	1,731
	3	15,08	14,899	1,202	15,00	14,717	1,887	15,10	14,615	3,213
55 %	1	27,51	28,096	-2,131	27,54	27,751	-0,767	27,58	28,196	-2,235
	2	27,40	27,988	-2,145	27,53	27,209	1,167	27,44	27,809	-1,346
	3	27,72	27,889	-0,611	27,52	26,985	1,942	27,58	28,159	-2,100
80 %	1	40,12	41,309	-2,965	40,07	40,140	-0,176	40,08	40,199	-0,297
	2	40,09	39,986	0,260	40,09	40,029	0,152	39,78	39,451	0,826
	3	40,78	40,418	0,887	41,09	39,449	3,993	40,07	40,519	-1,120
105 %	1	51,57	51,849	-0,541	52,68	51,529	2,185	52,59	52,801	-0,402
	2	52,58	53,159	-1,102	52,54	51,911	1,197	52,08	52,725	-1,239
	3	52,56	52,749	-0,360	52,56	51,422	2,166	52,59	51,771	1,557

8. Erreur totale

Le tableau ci-dessous représente le calcul de l'erreur totale relative pour chaque niveau de concentration théorique :

Tableau XXXVII : Calcul de l'erreur totale pour chaque niveau de concentration des SV

Niveaux %	5 %	30 %	55 %	80 %	105 %
Biais relatif (%)	4,62	-1,82	0,91	-0,18	-0,39
 Biais relatif 	4,62	1,82	0,91	0,18	0,39
CV de fidélité intermédiaire	3,93	1,37	0,96	1,36	1,02
Erreur totale (%)	8,55	3,19	1,87	1,54	1,41

La figure suivante illustre la distribution de l'erreur totale relative sur les cinq niveaux de concentrations théoriques :

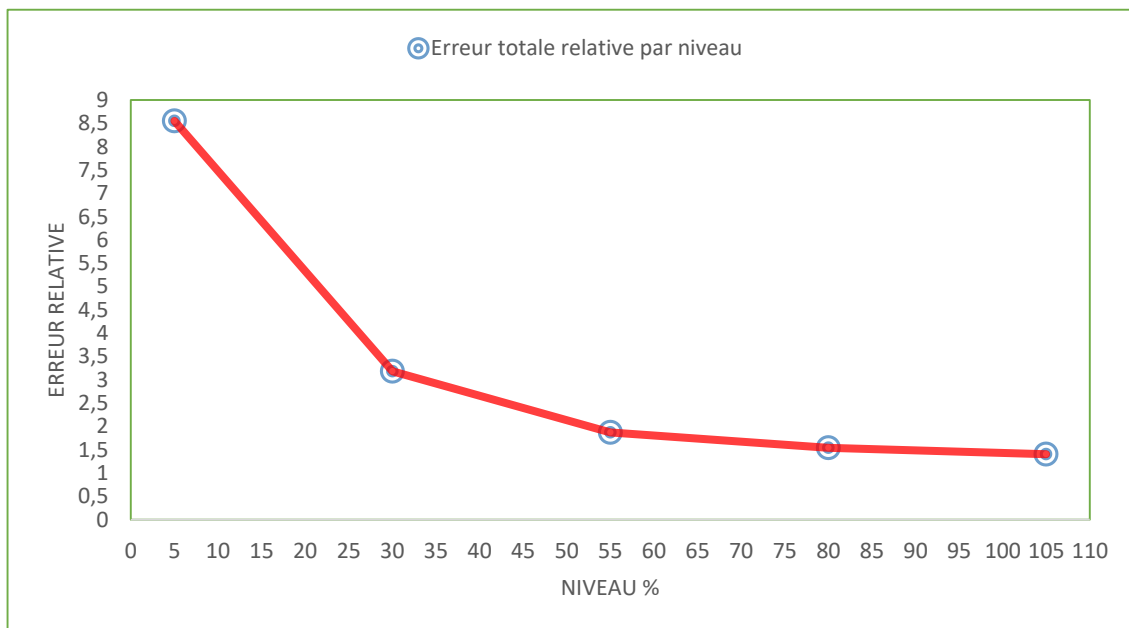


Figure 16 : Profil d'erreur relative totale

9. Intervalle de tolérance

Le calcul des limites de l'intervalle de tolérance pour chaque niveau de concentration théorique est résumé dans le tableau suivant :

Tableau XXXVIII : Calcul des limites de tolérance pour chaque niveau de concentration

Niveaux	1(5%)	2(30%)	3(55%)	4(80%)	5(105%)
Concentration moyenne théorique (mg/L)	2,58	15,10	27,54	40,24	52,42
Nombre de séries (I)	3				
Nombre de mesures par niveau (IK)	9				
Nombre de répétitions (K)	3				
Facteur de couverture de l'intervalle de tolérance					
Rapport des variances (R)	0	0	0	0	0
Coefficient B²	1	1	1	1	1
Nombre de degrés liberté	7,714285714	7,714285714	7,714285714	7,714285714	7,714285714
Probabilité tolérance (bêta)	95%				
t Student bas	2,364624252	2,364624252	2,364624252	2,364624252	2,364624252
t Student haut	2,306004135	2,306004135	2,306004135	2,306004135	2,306004135
Facteur de couverture	2,32275274	2,32275274	2,32275274	2,32275274	2,32275274
Ecart-type de tolérance	0,112050368	0,213489039	0,279774336	0,575179953	0,559351157
Intervalle de tolérance					
Limite de tolérance basse	2,484790273	14,42139892	27,25203313	39,06686133	51,14332814
Limite de tolérance haute	2,913363193	15,23795688	28,32212068	41,26682333	53,28274779
Limite de tolérance relative basse	-3,69	-4,52	-1,03	-2,92	-2,43
Limite de tolérance relative haute	12,92	0,88	2,86	2,55	1,65

10. Profil d'exactitude

La figure ci-dessous dans laquelle l'axe horizontal représente les concentrations théoriques allant de 2.5 à 52.5 mg/L et l'axe vertical le biais relatif, représente le profil d'exactitude :

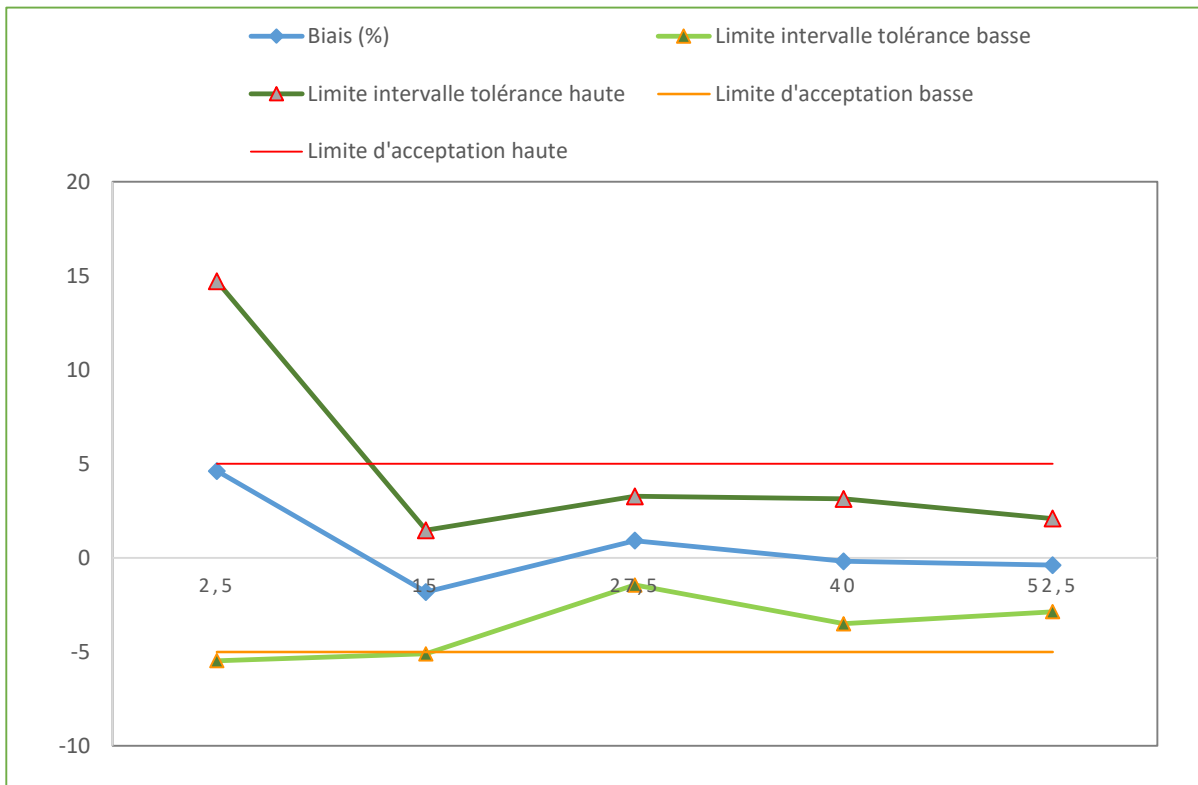


Figure 17 : Profil d'exactitude

11. Linéarité

Le calcul des différents paramètres de la linéarité, nécessaires pour sa vérification est élucidé dans le tableau suivant :

Tableau XXXIX : Calcul des différents paramètres de la linéarité

Gamme avec matrice						
Niveaux	1 ^{ère} répétitions de chaque série	Masse introduite en mg (X_i)	Prédiction inverse (X_i^*)	concentration calculé ($X_{i,calc}$)	$(X_i^* - X_{i,calc})^2$	$(X_i - X')^2$
5%	1	2,46	2,65	2,58	0,00487	627,06838
	2	2,59	2,73	2,71	0,00028	620,57453
	3	2,59	2,80	2,71	0,00806	620,57453
30%	1	15,08	14,79	15,20	0,16766	154,28952
	2	15,06	14,96	15,18	0,04698	154,78678
	3	15,00	14,44	15,12	0,45888	156,28334
55%	1	27,51	28,10	27,62	0,22296	0,00008
	2	27,54	27,75	27,65	0,00943	0,00150
	3	27,58	28,20	27,69	0,25235	0,00619
80%	1	40,12	41,31	40,23	1,16175	159,23075
	2	40,07	40,14	40,18	0,00169	157,97138
	3	40,08	40,20	40,19	0,00005	158,22286
105%	1	51,57	51,85	51,68	0,02886	579,30072
	2	52,68	51,53	52,79	1,58788	633,96526
	3	52,59	52,80	52,70	0,01042	629,44120
Pente		0,99980503				
ordonnée à l'origine		0,119381651				
SCE/(n-2)		0,304777685				
Erreur pente		0,008094405				
Erreur ordonnée à l'origine		0,264333805				
Coefficient de détermination R^2		0,9991				
Comparaison de la pente avec 1		t calculé	0,024			différence non significative
		$t^\circ(\alpha ; 13)$	2,160			
		Condition	t calculé < $t^\circ(\alpha ; 13)$			
Comparaison de l'ordonnée à l'origine avec 0		t calculé	0,452			différence non significative
		$t^\circ(\alpha ; 13)$	2,160			
		Condition	t calculé < $t^\circ(\alpha ; 13)$			

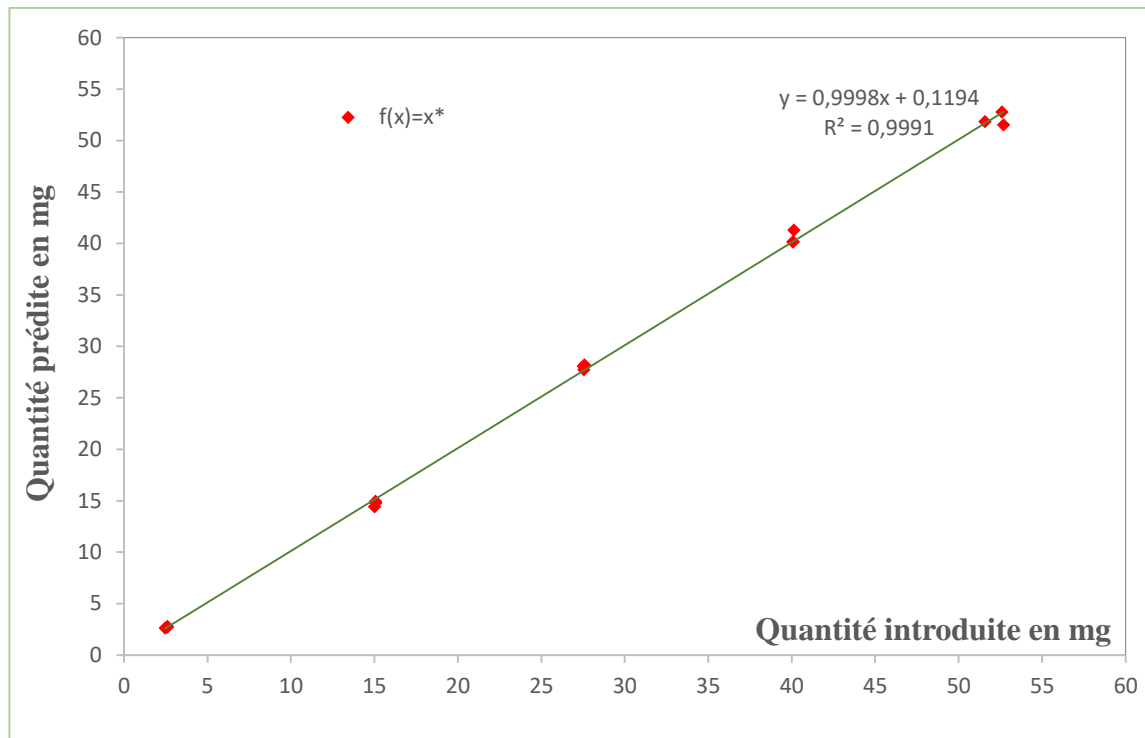


Figure 18 : Droite de régression linéaire entre les quantités prédites et les quantités introduites.

12. Limites de quantification

Les limites de quantification sont tirées du profil d'exactitude, elles représentent les points d'intersection (premier point pour la limite basse et le dernier point pour la limite haute) du tracé des limites de tolérance avec les limites d'acceptabilité.

- Le calcul du premier point d'intersection (qui se situe entre le deuxième et le troisième niveau de concentration) étant la limite de quantification basse est élucidé dans le tableau suivant :

Tableau XL : calcul de la limite de quantification

Niveaux critiques	Niveau A	Niveau B
Concentration moyenne introduite (mg/L)	15,10	27,54
Limite d'intervalle de tolérance critique	14,33	27,14
Limite d'acceptabilité critique	14,35	26,16
Droite	Pente	Origine
Intervalle tolérance	1,030	-1,223
Limite d'acceptabilité critique	0,95	0
LQ _{inf}	15,30	

- Selon le profil d'exactitude, il n'y a pas de plus grande concentration pour laquelle les limites de tolérance sortent des limites d'acceptabilité (pas d'intersection) le résultat de la limite de quantification haute est donné comme étant la limite supérieure de l'intervalle de validation (LQ_{sup} = 52,5 mg).

1. Spécificité

1.1. Comparaison des chromatogrammes

Selon les résultats obtenus, la spécificité de la méthode est confirmée par :

- L'absence de pic au temps de rétention théorique dans le chromatogramme obtenu avec le diluant seul et le diluant avec placebo ;
- Les temps de rétention du pic du Diclofénac dans le standard d'étalonnage et le standard de validation sont comparables à dire similaire.

1.2. Confirmation de la spécificité sur les deux gammes d'étalonnage et de validation

La discussion des résultats obtenus est résumée dans le tableau ci-dessous :

Tableau XLI : Signification des résultats de la comparaison des pentes et des ordonnées à l'origine avec 0

Test	Gamme	Résultat	Signification
Les pentes sont-elles comparables avec 0 ?	Sans matrice	NON	Pentes significatives
	Avec matrice	NON	
Les ordonnées à l'origine sont-elles comparables avec 0 ?	Sans matrice	OUI	La méthode est spécifique
	Avec matrice	OUI	

1.3. Comparaison des deux pentes des deux droites de régression

La discussion des résultats obtenus est résumée dans le tableau suivant :

Tableau XLII : signification des résultats de la comparaison des deux pentes et des deux ordonnées à l'origine entre elles.

Test	Résultat	Signification
Les pentes sont-elles comparables ?	OUI	Pas d'effet matrice
Les ordonnées à l'origine sont-elles comparables ?	OUI	Pas d'erreur systématique

On peut dire qu'avec un risque de 5%, statistiquement la méthode est spécifique ainsi qu'une absence d'effet matrice et d'erreur systématique est confirmée.

2. Le choix de la fonction de réponse

2.1. Homogénéités des variances

D'après le test d'homogénéité des variances effectué sur l'ensemble des modèles mathématiques simulés, on constate que la répartition des résidus est homogène dans l'intervalle de validation sauf pour le modèle quadratique, ce qui signifie que la variance est homogène pour les autres modèles linéaires simples et transformés alors qu'elle est hétérogène pour le modèle de la fonction quadratique testé.

On conclut que le modèle quadratique n'est pas adapté à la réponse, contrairement aux autres modèles, puisque la troisième hypothèse (homocédasticité des résultats) qui est une propriété fondamentale du modèle de régression linéaire est réfutée.

3.2. Fonction de réponse

D'après les profils d'exactitude élucidés dans le tableau XXXI est les intervalles de validité (intervalle de dosage) de la méthode qui en découlent pour chaque modèle simulé et validé, on constate que le modèle de régression linéaire avec l'équation $y = ax + b$ a donné l'intervalle de validité le plus large de 15,30 à 52,5 mg/l, ce qui nous a permis de le sélectionner comme étant le modèle qui convient le plus à notre méthode de dosage.

3. Critères de performance de la fonction de réponse choisie

3.1. Justesse

L'accord entre la valeur de la concentration moyenne prédite obtenue à partir des trois séries de validation et la valeur de la moyenne des concentrations théoriques considérées comme étant la valeur de référence est assez étroit pour les niveaux 2, 3,4 et 5, mais on remarque que pour le premier niveau, la concentration moyenne prédite s'éloigne de la valeur de référence, compte tenu du fait que les biais relatifs sont inférieurs à 1,9 % pour les quatre niveaux supérieurs alors que pour le premier niveau, le biais relatif est supérieur à 4,6 %.

3.2. Fidélité

Le degré de dispersion des concentrations prédites obtenues à partir des trois séries de validation est assez étroit pour les niveaux 2, 3,4 et 5, alors qu'il augmente pour le premier niveau, compte tenu du fait que le coefficient de variation est inférieur à 1,4 % pour les quatre niveaux supérieurs tant dit qu'il se rapproche de 4% pour le premier niveau.

Cependant ces estimations de la fidélité et de la justesse ne sont pas une fin en soi, ils sont une étape intermédiaire obligatoire pour pouvoir évaluer si la procédure analytique va vraisemblablement pouvoir ou non quantifier avec une exactitude suffisante chacune des quantités inconnues, en d'autres termes elles ne renseignent pas sur la qualité des résultats et ne permettent pas de prendre une décision sur la validité de la méthode.

4. Critère de décision sur la validité de la méthode

4.1. Erreur totale

Selon le profil d'erreur totale élucidé dans la figure 16 on juge que le premier niveau de concentration (2,5 mg/l) sort de l'intervalle de validité puisqu'il présente une erreur totale relative qui dépasse les 5% fixés comme limite d'acceptabilité, cependant les autres niveaux seront inclus dans l'intervalle de validité. Et ceci est confirmé par l'erreur maximale observée pour le premier niveau lors du calcul d'exactitude relative qui est de l'ordre de -20.83% par rapport aux autres niveaux qui présentent des erreurs maximales < 4%.

Les résultats obtenus en termes de justesse, de fidélité et d'erreur totale pour le premier niveau de concentration peuvent être expliqués par le fait que l'erreur sur les prises d'essai et les dilutions est d'autant plus grande lorsque la concentration du niveau est faible.

4.2. Profil d'exactitude

En se référant au profil d'exactitude élucidé dans la figure 17, on considère que la méthode mise aux points dans ce présent travail est valide pour l'intervalle de dosage où le profil d'exactitude est compris dans les limites d'acceptation de $\pm 5\%$, autrement dit du point d'intersection de la limite supérieure de l'intervalle de tolérance avec la limite d'acceptabilité jusqu'au niveau de concentration 52.5 mg/l, et cela en garantissant que seule 5 % des futures mesures d'échantillons inconnus peuvent avoir des résultats non fiables.

4.3. Limites de quantification et intervalle de validité

La limite de quantification inférieure selon le tableau XL est de 15,30mg/l.

L'intervalle de validité est $[LQ_{inf} ; LQ_{sup}]$; selon les résultats, la méthode est tenue pour valide dans l'intervalle $[15,30 \text{ mg/l} ; 52,50 \text{ mg/l}]$

4.4. Linéarité

- Le coefficient de détermination linéaire de la relation existante entre la concentration introduite et la concentration prédite est acceptable ($R^2 = 0,9991$), étant donné que les deux

variables ne sont pas toutes les deux indépendantes, il ne peut confirmer à lui seul la validité de la linéarité.

- La pente est statistiquement comparable à 1 au risque de 5 %, en l'occurrence la pente est significativement différente de 0, cela veut dire que la régression est significative entre la variable expliquée (concentration prédite) et la variable explicative (concentration introduite).
- L'ordonnée à l'origine est statistiquement comparable avec 0 au risque de 5 %, Ce qui nous amène à conclure que la linéarité de la méthode de dosage est validée.

1. Synthèse des résultats

La spécificité, la linéarité et l'exactitude de la méthode de dosage du Diclofénac de sodium dans les comprimés gastro-résistants à 50 mg par HPLC mise au point dans le présent travail en vue d'une étude de son profil de dissolution sont démontrés dans l'intervalle de dosage [15,30 mg/l ; 52.50 mg/l] avec une probabilité de confiance de 95 % dans les limites d'acceptation définies ± 5 %. Autrement dit, 95% des futurs résultats fournis par la méthode analytique développée se situeront dans les limites d'acceptabilité et les limites de dosage.

La méthode s'est révélée concluante est valide avec les critères d'acceptation prédéfinis sur l'intervalle décrit.

L'utilisation de l'HPLC avec une détection dans le domaine de l'Ultraviolet comme méthode de dosage a permis d'obtenir des résultats plus exacts, plus précis et plus spécifiques (méthode séparative) dans un intervalle de dosage plus étendu par rapport aux méthodes spectrophotométriques simples.

Cet étendu de l'intervalle de dosage est suffisant pour effectuer des dosages multiples à différents temps durant l'étude de la dissolution du comprimé de Diclofénac, ce qui permet d'obtenir un profil de dissolution avec plusieurs points améliorant ainsi la qualité de ce dernier.

2. Commentaire sur le protocole de validation choisi

Le protocole de validation développé à partir des guides de validation analytique SFSTP 2003-2006 est bien applicable aux validations analytiques des méthodes de dosage des médicaments en vue d'une étude de la cinétique de dissolution qui comprend un intervalle de dosage élargi pas seulement pour des dosages sur un seul point.

L'étude de la cinétique de dissolution est devenue un des plus importants tests d'évaluation des formes galéniques solides. Les laboratoires pharmaceutiques sont tenus de confirmer par examen et apporter des preuves objectives du fait que les exigences particulières que la méthode de dosage utilisée pour étudier le profil de dissolution sont remplies. Ces données doivent être présentées dans le dossier d'enregistrement du médicament.

Cependant, bien que ce principe soit reconnu comme indispensable à la gestion de la Qualité dans l'industrie pharmaceutique, son application pratique n'est pas toujours aisée suite à la rareté des sources proposant des solutions pratiques en terme de protocoles expérimentaux de validation.

Les quelques guides et les documents officiels qui proposent des protocoles expérimentaux, ne peuvent offrir une solution globale applicable sans adaptation à tous les produits possibles et à n'importe quel intervalle de dosage.

Le présent travail propose une méthode de dosage du Diclofénac de sodium dans les comprimés gastro-résistants à 50 mg par chromatographie liquide à haute performance examinée selon le protocole développé et proposé par les guides de validation SFSTP 2003-2006, qui repose sur le profil d'exactitude comme outil de décision.

Les résultats obtenus prouvent que toutes les exigences spécifiques élaborées dans cette approche harmonisée sont remplies, ce qui atteste la validité de la méthode mise au point dans le présent travail, et ce qui signifie que l'analyste peut garantir la fiabilité des résultats de cette méthode de dosage et qu'elle est apte à être utilisée et appliquée en routine pour le dosage du Diclofénac sodique pour une éventuelle étude du profil de dissolution des comprimés gastro-résistants à 50 mg dans un intervalle en permettant d'effectuer plusieurs dosages en fonction de temps de dissolution.

REFERENCES
BIBLIOGRAPHIQUES

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

1. Sallmann AR. The history of diclofenac. Am J Med. 28 avr 1986;80(4):29-33.
2. Historique du diclofénac [Internet]. [cité 9 janv 2017]. Disponible sur: <http://www.xn--diclofnac-g4a.fr/historique.html>
3. VIDAL - Diclofénac [Internet]. [cité 10 janv 2017]. Disponible sur: <https://www.vidal.fr/substances/6757/diclofenac/>
4. Dictionnaire Vidal. 84ème édition. France. 2008. Voltarène ; p.2518-20.
5. Direction de la qualité du médicament. Pharmacopée européenne publiée selon la Convention relative à l'élaboration d'une pharmacopée européenne (Série des traités européens, n° 50). Strasbourg: Conseil de l'Europe; 2007.
6. Niazi S. Handbook of bioequivalence testing. New York: Informa Healthcare USA; 2007. 569 p. (Drugs and the pharmaceutical sciences).
7. S. Swarnalata, « NSAIDs Non-Steroidal Anti-Inflammatory Drugs; An Overview ». PharmaMed Press, 2008; P.63-64.
8. VOLTARÈNE comprimé et suppositoire - EurekaSanté par VIDAL [Internet]. EurekaSanté. [cité 4 févr 2017]. Disponible sur: <http://eukasante.vidal.fr/medicaments/vidal-famille/medicament-jvolor01VOLTARENE-comprime-et-suppositoire.html>
9. A. Frogerais, « Histoire des comprimés pharmaceutiques en France, des origines au début du XXème siècle. », 2013.
10. Council of Europe, European Directorate for the Quality of Medicines & HealthCare (EDQM). Pharmacopée européenne. Strasbourg: Conseil de l'Europe; 2010.
11. Le Hir A, Chaumeil J-C, Brossard D. Pharmacie galénique: bonnes pratiques de fabrication des médicaments. Paris: Elsevier Masson; 2009.
12. E. Levacher et collaborateurs. Méthodes générales d'analyse des formes solides. In : Phamacotechnie industrielle, 2ème édition. IMT Editions, 2006.
13. Pharmacopée américaine 2007 (USP30-NF25)-Version électronique (CD-ROM).
14. Organisation mondiale de la santé (OMS). Guide pour l'élaboration de mesures visant à éliminer les médicaments contrefaits. Genève; 2000 (Document non publié WHO/EDM/QSM/99.1).
15. Pharmacopée britannique 2007 – Version électronique (CD-ROM).
16. P.Wehrlé. Contrôle biopharmaceutique des formes orales solides. In: Pharmacie galénique, formulation et technologie pharmaceutique. Maloine, 2007.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

17. Mark R. Berry, Michael D. Likar Pfizer. Statistical assessment of dissolution and drug release profile similarity using a model-dependent approach Global. Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis 2007.
18. BURI P. Mesure de la vitesse de dissolution pour l'amélioration et le contrôle de la qualité des médicaments. Laboratoire de Pharmacie Galénique, Université de Genève, Sciences II, 30, Quai Ernest-Ansemet, CH-1211 Genève 4, Suisse;
19. FDA Guidance. Dissolution Testing of IR Solid Oral Dosage Forms (Appendix A), Apparatus August 1997.
20. Cynthia K. Brown, Hitesh P. Chokshi, Beverly Nickerson, Robert A. Reed, Brian R. Rohrs, and Pankaj A. Shah. Acceptable Analytical Practices for Dissolution Testing of Poorly Soluble Compound; Pharmaceutical Technology 2004.
21. A. R. Paradkar. Biopharmaceutics & Pharmacokinetics 3^{ème} édition 2008.
22. David B. Troy. Remington The science and practice of pharmacy 21^{ème} édition 2005.
23. Han van de Waterbeemd, Hans Lennernas, Per Artursson. Drug bioavailability Estimation of solubility, permeability, absorption and bioavailability 1^{ière} édition 200.
24. RIDOUAN Khadija, thèse de doctorat de la Université Mohammed v Faculté de Médecine et de Pharmacie rabat application de certaines approches statistiques au transfert de la cinétique de dissolution cas du diclofénac sodique.
25. MICHENAUD Matthieu Formulation et évaluation des systèmes lipidiques de type III et IV avec un nouveau tensioactif de la famille des Gélucire®. In.
26. Pharmacopée britannique 2007 – Version électronique (CD-ROM).
27. <http://www.sante.dz/Incpp/Incpp-formation/pharmacotechnie.pdf>.
28. AMOR HB. VALIDATION ANALYTIQUE: VALIDATION DU DOSAGE PAR HPLC DES PRINCIPES ACTIFS D'UN NOUVEAU MÉDICAMENT GÉNÉRIQUE DE L'EXFORGE.
29. Isabelle Pinguet. Validation analytique : application de la procédure SFSTP 2003-2006 au domaine de la phytothérapie. Sciences pharmaceutiques. 2015. <dumas-01188779>.
30. Groupe de travail « GT Val 2 » coordonné par Michel Laurentie. Guide de validation des méthodes d'analyses. ANSES. Agence nationale de sécurité sanitaire; 2015.
31. Validation de Méthodes | CQS Experts [Internet]. [cité 29 mars 2017]. Disponible sur: <https://www.cqs-experts.fr/laboratoire-validation-de-methodes/>
32. ISO/CEI 17025:2005(fr), Exigences générales concernant la compétence des laboratoires d'étalonnages et d'essais [Internet]. [cité 29 mars 2017]. Disponible sur: <https://www.iso.org/obp/ui/fr/#iso:std:iso-iec:17025:ed-2:v2:fr>

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

33. J-C BOUVIER et Laboratoire du SGVC. VALIDATION GLOBALE D'UNE METHODE D'ANALYSE QUANTITATIVE A PARTIR DE SON PROFIL D'EXACTITUDE.
34. Note for guidance on validation of analytical procedures: Text and methodology. ICH Q2 (R1) Validation of Analytical Procedures: Text and Methodology. CPMP/ICH/381/95.
35. Hubert P., Nguyen-Huu J.J., Boulanger B. et al., 2003. Validation of quantitative analytical procedures: harmonization of approaches. STP Pharma Pratiques. 2003, 13, 3, 101-138.
36. SFSTP. Validation des procédures analytiques quantitatives. Juin 1992.
37. Inczedy J., Lengyel T., Ure A.M., IUPAC, Compendium of Analytical Nomenclature – 3rd edition. s.l. : Blackwell Science, 1998, 264 pages.
38. Hubert P., Nguyen-Huu J.J., Boulanger B. et al., 2006. Validation des procédures analytiques quantitatives : Harmonisation des démarches Partie II. Statistiques. STP Pharma Pratiques. 2006, 16, 1, 30-60.
39. Rozet E., Hubert C., Ceccato A., et al., Using tolerance intervals in prestudy validation of analytical methods to predict in-study results. The fit-for-futurepurpose concept. Journal of Chromatography A. 2007, 1158, 126-137.
40. Laurentie M. Compléments sur la quantification des résultats, pondération et transformation. In: Validation des méthodes d'analyse quantitative par le profil d'exactitude [Internet]. 2010 [cité 6 mars 2017]. p. 61–69. Disponible sur: https://www6.inra.fr/cahier_des_techniques/content/download/3290/31795/version/1/file/45_Feinberg_valid.pdf
41. Feinberg M. Mise en œuvre du profil d'exactitude. In: Validation des méthodes d'analyse quantitative par le profil d'exactitude [Internet]. 2010 [cité 6 mars 2017]. p. 27–44.
42. Feinberg M. Interprétation du profil d'exactitude. In: Validation des méthodes d'analyse quantitative par le profil d'exactitude [Internet]. 2010 [cité 6 mars 2017]. p. 45–60.
43. Bouabidi A. Etude Critique des Différentes Approches de Validation des Méthodes Analytiques. Faculté des Sciences Ben M'Sik Casablanca; 2013.
44. Georges Mahuzier; et al. Abrégé de chimie analytique. Tome II, Méthodes de séparation. 2e éd. rev. et augm. 1999.
45. Biotechnologie & Biologie et Physiopathologie humaine - Académie de Rouen - HPLC Principe et appareillage [Internet]. [cité 7 juill 2017]. Disponible sur: <http://biotech.spip.ac-rouen.fr/spip.php?article9>

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

46. Georges Mahuzier; et al. Abrégé de chimie analytique. Tome II, Méthodes de séparation. 2e éd. rev. et augm. 1999.
47. Dr MAMOU DM. cours de chromatographie Liquide Haute Performance HPLC. 2014.
48. MANDHAM M, DENNEY D, BARNES THOMAS T. ANALYSE CHIMIQUE QUANTITATIVE DE VOGEL. 6ème Ed. de boeck;
49. Rouessac F, Rouessac A. Analyse chimique méthodes et techniques instrumentales modernes. Paris: Dunod; 2004.
50. file://C:\html\physique\CHIM\Jumber\HPLC\Chromatographie_en_pha - HPLC.pdf [Internet]. [cité 7 juill 2017]. Disponible sur:
http://www4.ac-nancy-metz.fr/physique/liens/Jumber/pdf_chimie/HPLC.pdf
51. Dr. MAMOU. cours d' analyse quantitative et qualitative en chromatographie. 2014.
52. SCOOG S, WEST W, HOLLER H. CHIMIE ANALYTIQUE. 7ème Ed. de boeck;

ANNEXES

ANNEXE I
CHROMATOGRAPHIE LIQUIDE A
HAUTE PERFORMANCE
HPLC

La chromatographie permet la séparation ou la purification d'un ou de plusieurs composés d'un mélange en vue de leur identification et de leur quantification.

La chromatographie en phase liquide a permis de réaliser des analyses qui n'étaient auparavant pas possible avec les techniques sur couche mince ou en phase gazeuse.

A l'origine la chromatographie en phase liquide se faisait sur des colonnes en verre. Le liquide traversait la phase stationnaire par gravité ou sous faible pression. Actuellement grâce aux procédés de fabrication, il est possible d'obtenir des phases stationnaires de granulométrie fine et régulière. Ceci présente l'avantage d'accroître la surface d'échange. Parallèlement à la présence de pompe, capables de distribuer la phase mobile sous pression élevée[44]. C'est ce que l'on a appelé la chromatographie liquide sous haute pression (HPLC). Très rapidement le « P » de pression est devenu le « P » de performance lorsque l'on a optimisé la technique (diminution de la taille de particules de la phase stationnaire, régularité de cette phase...) [45].

1. Principe

Les composés à analyser (solutés) sont mis en solution et entraînés par une phase mobile liquide (éluant) tout au long d'une phase stationnaire pour être séparés grâce à une répartition sélective des solutés entre la phase mobile et la phase stationnaire.

Chaque soluté est donc soumis à une force de rétention (partage, adsorption...) exercée par la phase stationnaire, et une force de mobilité due à la phase mobile. Suivant la nature des molécules.

La phase mobile, poussée par une pompe sous forte pression, parcourt le système chromatographique. Le mélange à analyser est injecté puis transporté à travers le système chromatographique. Les composés en solution se répartissent alors suivant leur affinité entre la phase mobile et la phase stationnaire. En sortie de colonne, grâce à un détecteur approprié, les différents solutés sont représentés par des pics. L'ensemble des pics enregistrés est appelé chromatogramme[45].

2. Appareillage

L'appareillage utilisé doit être capable de supporter les pressions élevées imposées par la très fine granulométrie des phases stationnaires. Il est pour cela en acier inoxydable résistant à la corrosion chimique des phases mobiles liquides[46].

Représenté schématiquement dans la figure 20 ; il comprend essentiellement :

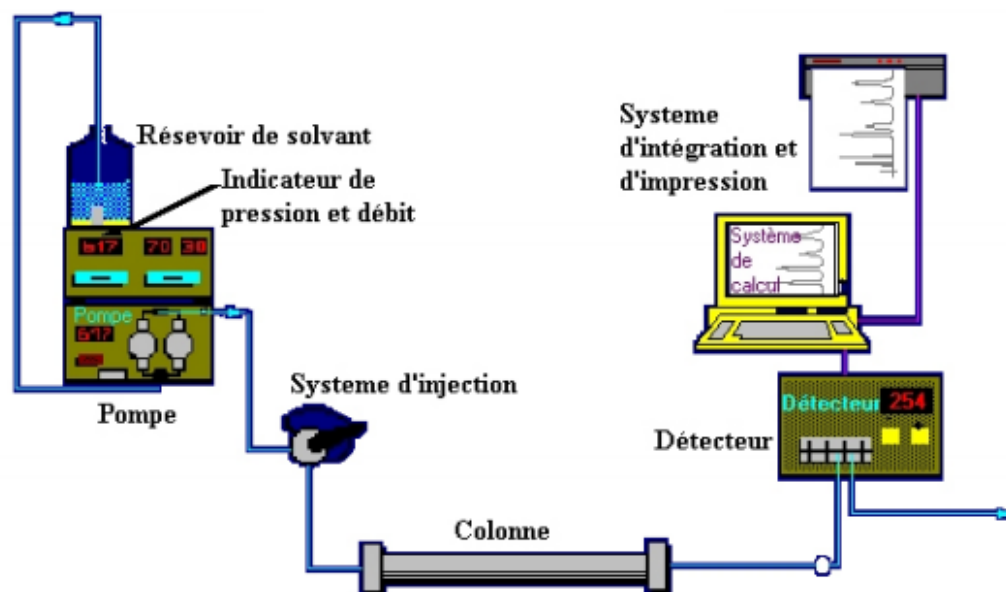


Figure 19: schéma d'une chaîne d'HPLC

2.1. Réservoir

Ces réservoirs contiennent la phase mobile en quantité suffisante. Ils sont étanches afin d'éviter l'évaporation ou contamination des solvants, équipés également de dispositifs (barbotage d'azote ou agitateurs magnétiques) qui ont pour but de chasser les gaz dissous [46].

Le nombre de solvants utilisés dans la phase mobile est limité à 4 solvants : méthanol, tétrahydrofurane, eau, acétonitrile ; tous ces solvants sont caractérisés par :

- Une faible viscosité ;
- Une disponibilité avec une pureté élevée ;
- Une bonne miscibilité les uns avec les autres ;
- Une bonne transparence en UV [47].

Ces solvants doivent être de « qualité HPLC », ce qui permet de garantir leurs degrés de pureté [47].

2.1.1. Régime isocratique

la phase mobile conserve pendant toute la chromatographie la même composition (figure21), elle est donc préalablement préparée et disposée dans un seul réservoir [46]

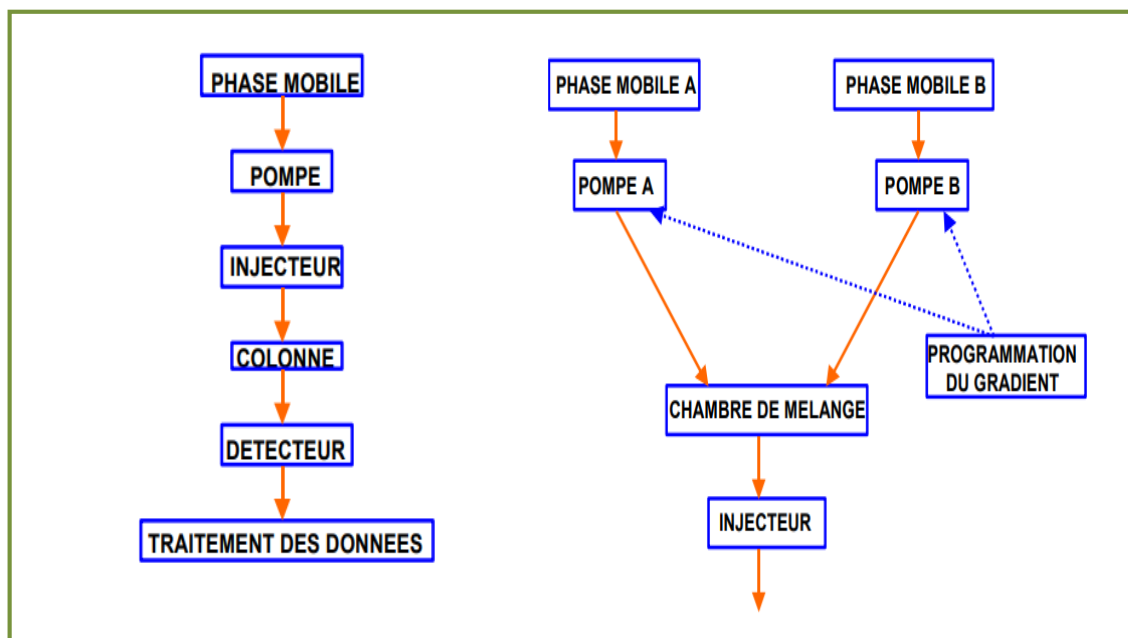


Figure 20: Schéma des différents régimes d'introduction de la phase mobile

2.1.2. Régime en gradient d'élution

La phase mobile est obtenue en mélangeant instantanément plusieurs solvants provenant de différents réservoirs [46]. Cette technique du gradient d'élution permet souvent de séparer des solutés qui ne pourraient pas l'être par élution isocratique même avec un mélange de solvant (figure2); elle est particulièrement efficace quand les constituants de l'échantillon présentent des polarités très différentes [48].

2.2. Système de pompage

Toute installation de HPLC comporte au moins une pompe pour forcer le passage de la phase mobile à travers la colonne dont le remplissage est très compact. Il en résulte une pression importante au niveau de l'injecteur. Celle-ci peut atteindre 20 000 kPa (200 bars) selon le débit imposé à la phase mobile ou sa viscosité ainsi que selon la nature de la phase stationnaire. On utilise des pompes conçues pour maintenir un débit non pulsé et stable, même si la composition de la phase mobile varie. Ces pompes débitométriques comportent généralement deux pistons en série fonctionnant en opposition pour éviter les interruptions de débit dues au remplissage du

cylindre. Le déplacement des pistons est contrôlé par un moteur pas à pas associé à une came de forme particulière[49].

On distingue deux sortes de pompes : les pompes à pression constante et les pompe à débit constant[46].

2.3. Injecteurs

L'injection d'un volume précis de l'échantillon en tête de colonne doit se faire en un temps bref afin de perturber le moins possible le régime de circulation de la phase mobile qui doit être stable de la colonne au détecteur. On utilise pour ce faire, une vanne haute pression à plusieurs voies, manuelle ou motorisée dans le cas des injecteurs automatiques, placée juste avant la colonne. Il s'agit d'une pièce de précision qui doit résister à des pressions pouvant dépasser 30 000 kPa. Elle fonctionne en deux temps :

- Dans la position *chargement*, où seule la communication entre pompe et colonne est assurée, l'échantillon est introduit à pression atmosphérique à l'aide d'une seringue dans un petit volume tubulaire appelé boucle. Celle-ci, dont il existe tout un choix de volumes, est soit extérieure, soit intégrée dans le corps de la vanne.
- Dans la position *injection*, l'échantillon est inséré dans le flux de phase mobile par rotation de 60 ° d'un levier qui permet d'inverser le sens de circulation dans la boucle. Une bonne reproductibilité des volumes n'est atteinte que si la boucle a été totalement remplie par l'échantillon. Le volume prélevé avec la seringue est donc toujours largement supérieur à celui de la boucle[49].

2.4. Colonnes

Les colonnes utilisées en HPLC se caractérisent par leur géométrie et par la nature des phases stationnaires qu'ils contiennent.

Les colonnes analytiques ont des longueurs moyennes de 10 à 25cm, et les diamètres sont de 1 ; 4 ; 6 et 8 mm[46]

Les appareils actuels permettent de thermostatier la colonne et l'éluant, à la fois pour assurer la répétitivité des analyses et pour faire intervenir éventuellement la température comme paramètre de séparation[49].

2.4.1. Phases stationnaires

Ces phases sont essentiellement constituées par des fines particules poreuses (silice ou alumine). Elles peuvent également être recouvertes par des imprégnations ou greffages :

2.4.1.1. La phase normale

La phase normale est constituée de gel de silice. Ce matériau est très polaire. Il faut donc utiliser un éluant apolaire. Ainsi lors de l'injection d'une solution, les produits polaires sont retenus dans la colonne, contrairement aux produits apolaire qui sortent en tête.

L'inconvénient d'une telle phase, c'est une détérioration rapide au cours du temps du gel de silice, ce qui entraîne un manque de reproductibilité des séparations [50].

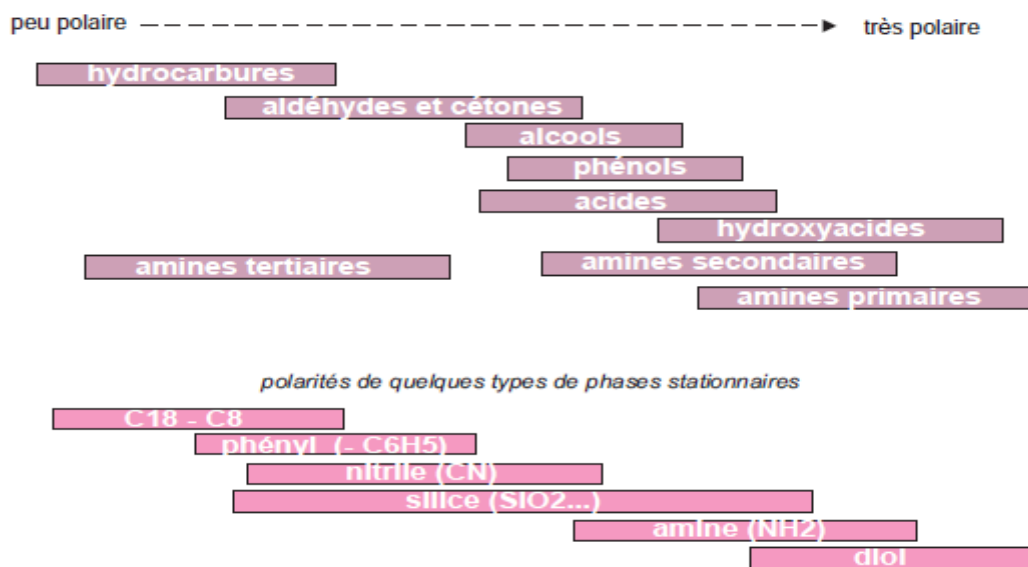


Figure 21: polarités de quelques phases stationnaires

2.4.1.2. La phase inverse

La phase inverse est majoritairement composée de silice greffée par des chaînes linéaires de 8 ou 18 atomes de carbones (C8 et C18). Cette phase est apolaire (figure3) et nécessite donc un éluant polaire (Acétonitrile, Méthanol, eau). Dans ce cas, ce sont les composés polaires qui seront élués en premier. Contrairement à une phase normale, il n'y a pas d'évolution de la phase stationnaire au cours du temps, et la qualité de la séparation est donc maintenue constante [50].

2.5. Détecteurs

Le détecteur suit en continu l'apparition des solutés. Pour détecter, on utilise différents phénomènes physico-chimiques. Le signal obtenu est enregistré en fonction du temps.

- **UV-Visible**

Le détecteur le plus utilisé en CLHP est un spectrophotomètre d'absorption UV-visible (190-600 nm) relié à la sortie de colonne. La détection est basée sur la loi de Lambert-Beer :

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

L'absorbance A de la Phase mobile est mesurée en sortie de colonne, à la longueur d'onde λ ou plusieurs longueurs. D'onde dans l'UV ou le visible. La phase mobile ne doit pas, ou très peu, absorber par elle-même[49].

Il existe plusieurs autres détecteurs :

- Réfractomètre différentiel ;
- UV à barrette de diodes ;
- Electrochimique ;
- Fluorimétrie...

Ainsi que différents types de couplage :

- Spectrométrie infrarouge
- Spectrométrie de masse
- Résonance Magnétique Nucléaire...

2.6. Intégrateur

La chromatographie est une méthode de séparation utilisée en vue d'un dosage. Il faut donc avant tout chercher à séparer correctement les pics avant de les intégrer. Une intégration consiste à mesurer la surface sous un pic.

La détection d'un pic chromatographique par l'intégrateur, dépend de 2 paramètres : La largeur attendue des pics et le seuil d'intégration (sensibilité)[49].

3. Analyse du chromatogramme

Une bonne séparation se traduit par une séparation distincte des pics correspondant à chacun des produits[48]

3.1. Analyse qualitative

3.1.1. Information apportée par le tracé chromatographique

3.1.1.1. Grandeurs fondamentales

- « ω » : Largeur du pic à la base (à 13.5% de la hauteur du pic);
- « δ » : Largeur à mi-hauteur ;
- « h » : hauteur du pic chromatographique ;
- « A » : Surface de la courbe [51]

3.1.1.2. Grandeurs de rétention

- Temps de rétention t_R : le temps écoulé entre l'instant de l'injection du soluté et celui correspondant sur le chromatogramme au maximum du pic ;
- Temps mort t_0 ou t_M : le temps nécessaire à l'éluant non retenu pour qu'il arrive au détecteur ;
- Temps réduit : est défini par la différence entre les deux temps précédents ;

$$t'_R = t_R - t_0$$

- Volume de rétention : volume de la phase mobile nécessaire à entraîner la substance jusqu'au détecteur ;

Une correction tenant compte du volume mort de la colonne V_M est généralement appliquée ; définissant le volume de rétention corrigé V_R' ;

$$V_R' = V_R - V_M$$

- Facteurs de rétention k' :

C'est le rapport entre la quantité de soluté se trouvant dans la phase stationnaire et celle se trouvant dans la phase mobile [46].

$$k' = \frac{K D V_S}{V_M} = \frac{t'_R}{t_M}$$

Plus le k' est grand, plus le composé est retenu longtemps dans la colonne et le pic est élargi [51].

3.1.1.3. Efficacité de la colonne

Elle se traduit par la finesse des pics obtenus pour les composés, plus le pic est fin plus la colonne est efficace, elle est exprimée par deux grandeurs [51].

- Nombre de plateaux théoriques N :

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

- La hauteur équivalente d'un plateau théorique :

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

(Avec L : longueur de la colonne)

L'efficacité de la colonne augmente lorsque le nombre de plateau théoriques augmentent ou si H diminue à longueur L constante [52].

3.1.1.4. Sélectivité

C'est une mesure de l'efficacité du processus de séparation intervenant à l'interface entre les phases, dans le cas de deux solutés ; pour qu'il y ait une séparation il faut que la valeur de k' de chaque soluté soit différente, on peut donc définir un facteur de séparation (sélectivité) α par l'équation :

$$\alpha = \frac{k'1}{k'2} = \frac{t'_{R1}}{t'_{R2}}$$

Par convention, on choisit toujours les pics pour que l'on ait un α supérieur à 1 [48].

3.1.1.5. Facteurs de résolution

En plus des interactions entre les solutés et chaque une des deux phases, d'autres mécanismes conduisent toujours à l'élargissement des pics. L'importance de cet élargissement est exprimée par la résolution R_s , de deux pics adjacents, défini en chromatographie par :

$$R = \frac{t_{R2} - t_{R1}}{0.5(\omega_1 + \omega_2)}$$

Une bonne séparation des pics à la base correspond à $R_s > 1.5$ [48].

3.2. Analyse quantitative

La chromatographie quantitative se base sur la comparaison de l'aire ou de la hauteur du pic de l'analyse avec celle d'un ou de plusieurs étalons. Si les conditions sont soigneusement contrôlées, ces deux paramètres varient linéairement avec la concentration [52], qui peut être déterminée par plusieurs méthodes principalement :

3.2.1. Etalonnage externe

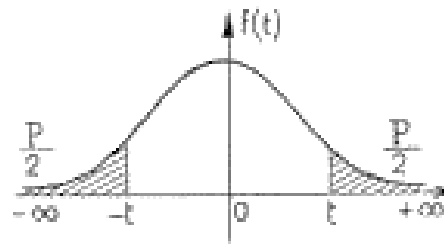
Elle est basée sur la comparaison entre deux chromatogrammes (étalonnage et analyse) effectuées successivement dans des conditions chromatographiques identiques [51].

La source d'erreur la plus importante propre à cette méthode d'étalonnage est généralement liée à l'incertitude sur le volume d'échantillon (cette erreur est réduite par le système 'injection en boucle) [52].

3.2.2. Etalonnage interne

Dans cette méthode une quantité soigneusement mesurée d'un étalon interne est introduite dans chaque étalon et dans chaque échantillon. Le rapport de l'aire de l'analyte à l'aire de l'étalon interne constitue le paramètre analytique [52].

ANNEXE II
TABLES DES TESTS STATISTIQUES
DE LA VALIDATION



$\frac{P}{2}$	0,90	0,80	0,70	0,60	0,50	0,40	0,30	0,20	0,10	0,05	0,02	0,01	0,001
1	0,189	0,334	0,519	0,727	1,000	1,378	1,965	2,878	4,314	12,706	31,821	63,657	638,810
2	0,142	0,289	0,445	0,617	0,878	1,061	1,388	1,983	2,878	4,301	6,965	9,925	31,526
3	0,137	0,277	0,438	0,604	0,789	0,978	1,320	1,838	2,733	3,182	4,541	5,984	12,929
4	0,134	0,271	0,414	0,589	0,741	0,941	1,199	1,673	2,373	2,776	3,747	4,604	8,611
5	0,132	0,267	0,408	0,580	0,727	0,920	1,168	1,478	2,015	2,571	3,365	4,032	6,869
6	0,131	0,265	0,404	0,573	0,718	0,906	1,134	1,440	1,943	2,447	3,141	3,701	5,959
7	0,130	0,263	0,401	0,569	0,711	0,896	1,119	1,419	1,885	2,365	2,998	3,499	5,408
8	0,130	0,262	0,399	0,566	0,706	0,888	1,108	1,397	1,860	2,308	2,896	3,353	5,041
9	0,129	0,261	0,398	0,563	0,703	0,883	1,100	1,387	1,839	2,282	2,821	3,250	4,761
10	0,129	0,260	0,397	0,562	0,700	0,878	1,092	1,378	1,819	2,228	2,764	3,182	4,587
11	0,129	0,259	0,396	0,560	0,697	0,874	1,086	1,369	1,798	2,201	2,718	3,108	4,437
12	0,129	0,259	0,395	0,559	0,695	0,871	1,082	1,364	1,782	2,179	2,681	3,069	4,318
13	0,128	0,259	0,394	0,558	0,694	0,870	1,078	1,360	1,771	2,160	2,659	3,032	4,221
14	0,128	0,258	0,393	0,557	0,692	0,868	1,074	1,355	1,761	2,143	2,628	2,977	4,146
15	0,128	0,258	0,393	0,556	0,691	0,866	1,071	1,351	1,753	2,131	2,602	2,947	4,071
16	0,128	0,258	0,392	0,555	0,690	0,865	1,071	1,347	1,746	2,120	2,581	2,921	4,015
17	0,128	0,257	0,392	0,554	0,689	0,863	1,069	1,343	1,740	2,110	2,567	2,898	3,965
18	0,127	0,257	0,392	0,554	0,688	0,862	1,067	1,339	1,734	2,101	2,552	2,878	3,922
19	0,127	0,257	0,391	0,553	0,688	0,861	1,066	1,338	1,730	2,091	2,539	2,861	3,883
20	0,127	0,257	0,391	0,553	0,687	0,860	1,064	1,335	1,726	2,086	2,528	2,845	3,850
21	0,127	0,257	0,391	0,552	0,686	0,859	1,063	1,333	1,721	2,080	2,518	2,831	3,818
22	0,127	0,256	0,390	0,552	0,686	0,858	1,061	1,331	1,717	2,074	2,508	2,819	3,792
23	0,127	0,256	0,390	0,552	0,685	0,858	1,060	1,329	1,714	2,069	2,500	2,807	3,767
24	0,127	0,256	0,390	0,551	0,685	0,857	1,059	1,328	1,711	2,064	2,492	2,797	3,745
25	0,127	0,256	0,390	0,551	0,684	0,856	1,058	1,326	1,708	2,060	2,485	2,787	3,726
26	0,127	0,256	0,390	0,551	0,684	0,856	1,058	1,325	1,706	2,058	2,479	2,779	3,707
27	0,127	0,256	0,389	0,551	0,684	0,855	1,057	1,324	1,703	2,052	2,473	2,771	3,689
28	0,127	0,256	0,389	0,550	0,683	0,855	1,056	1,323	1,701	2,048	2,467	2,763	3,674
29	0,127	0,256	0,389	0,550	0,683	0,854	1,055	1,321	1,699	2,045	2,462	2,756	3,658
30	0,127	0,256	0,389	0,550	0,683	0,854	1,055	1,320	1,697	2,042	2,457	2,750	3,646
40	0,126	0,255	0,388	0,549	0,681	0,851	1,050	1,313	1,684	2,021	2,423	2,726	3,521
60	0,126	0,254	0,387	0,547	0,679	0,848	1,046	1,306	1,671	2,000	2,390	2,690	3,480
100	0,126	0,254	0,386	0,546	0,677	0,845	1,041	1,299	1,658	1,980	2,358	2,657	3,371
*	0,126	0,253	0,385	0,524	0,674	0,842	1,038	1,292	1,645	1,960	2,326	2,625	3,261

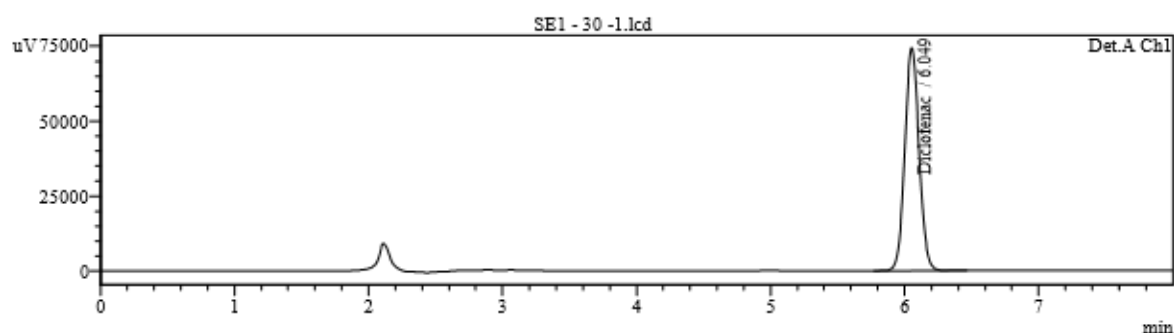
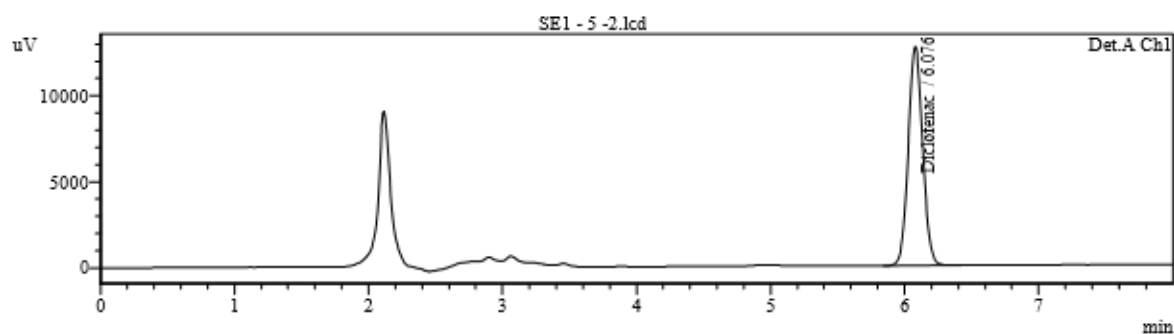
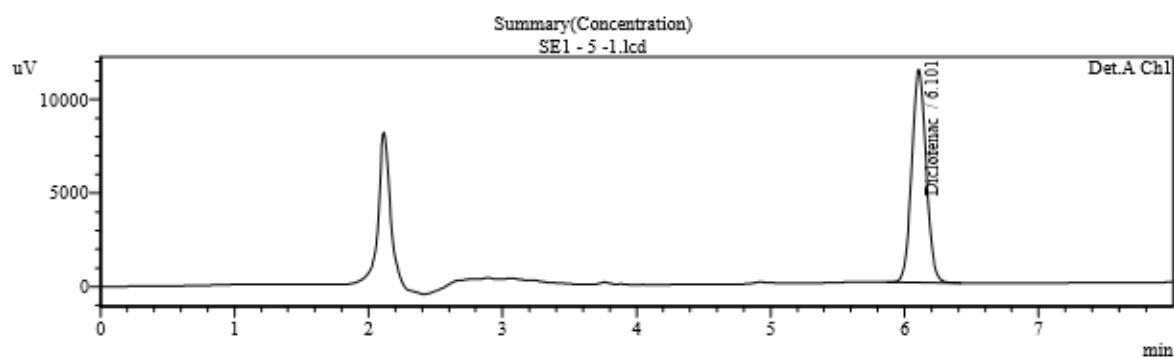
Figure 22 : Table de Student

ANNEXE III
DONNEES BRUTES DE LA
VALIDATION ANALYTIQUE

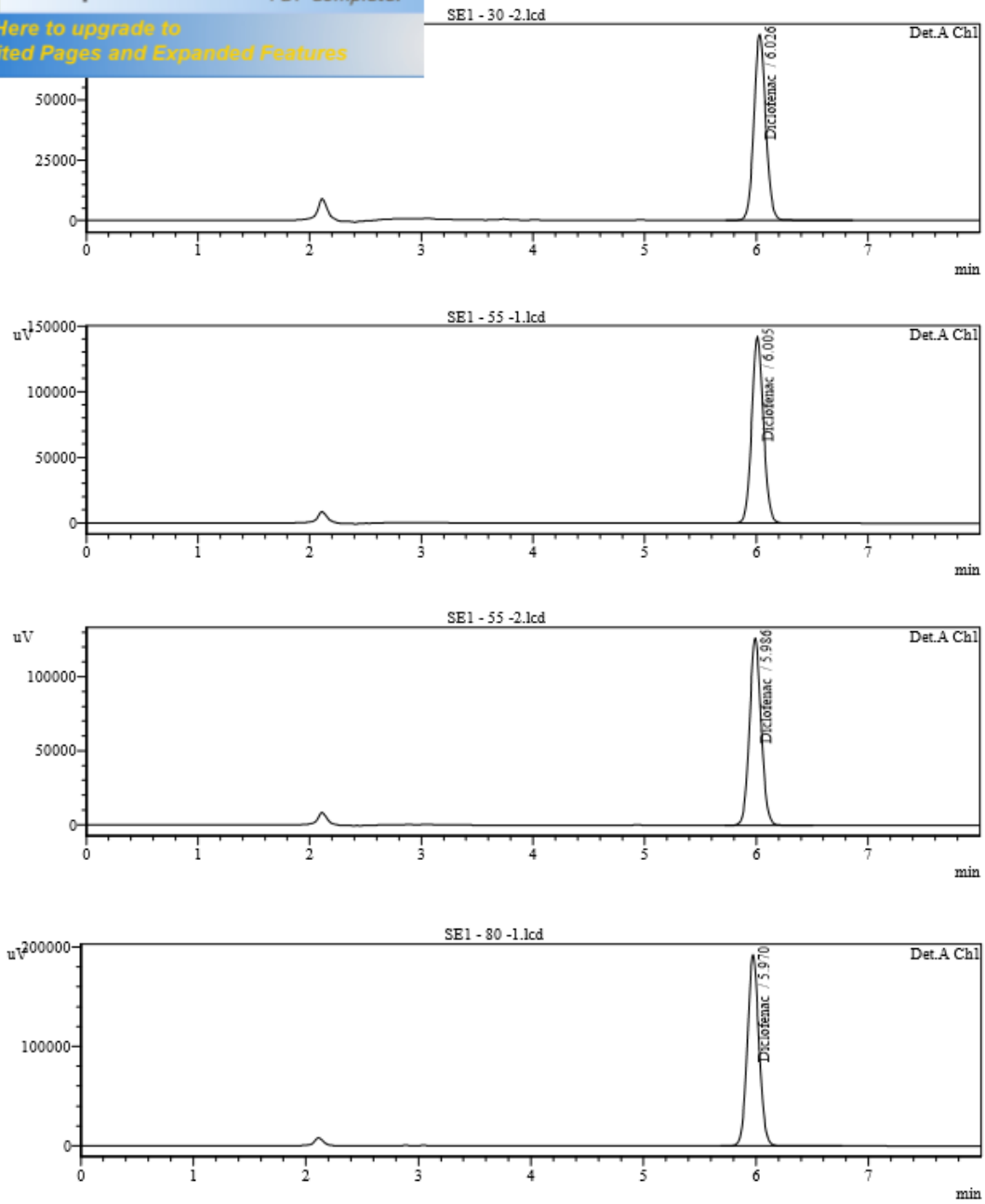
JOUR 1 (serie 1)

Acquired by : TAMAZIRT Boussad
Sample Name : Diclofénac
Sample ID : SERIE 1
Injection Volume: 20 uL
Method Filename: diclofenac.lcm
Batch Filename :Diclofénac série1.lcb
Report Filename : Default.lcr
Date Acquired :16/05/2017 23:47:48
Data Processed :17/05/2017 10:23:49

<< Detector A >>

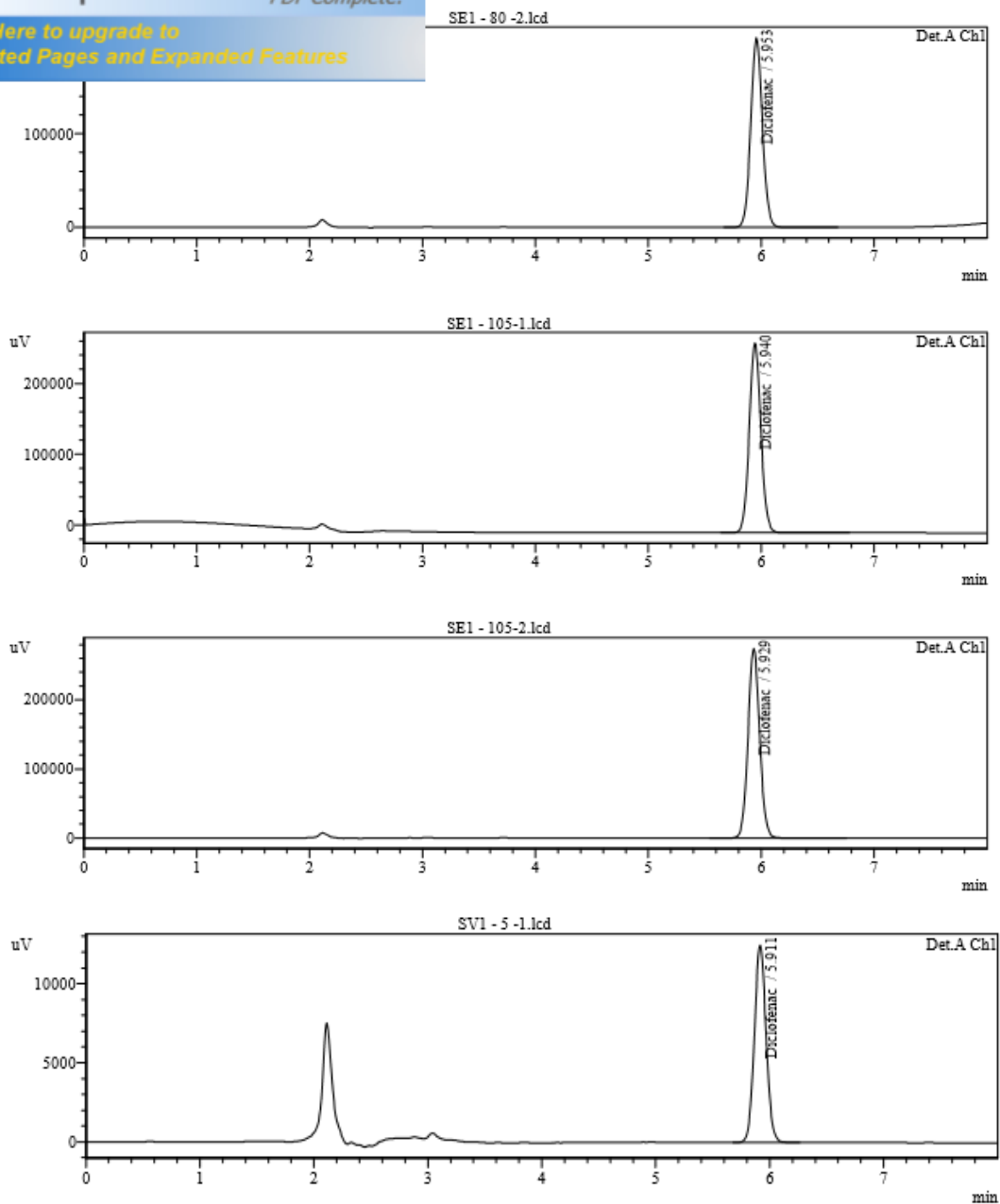


 **PDF Complete**
Your complimentary use period has ended.
Thank you for using PDF Complete.
[Click Here to upgrade to Unlimited Pages and Expanded Features](#)

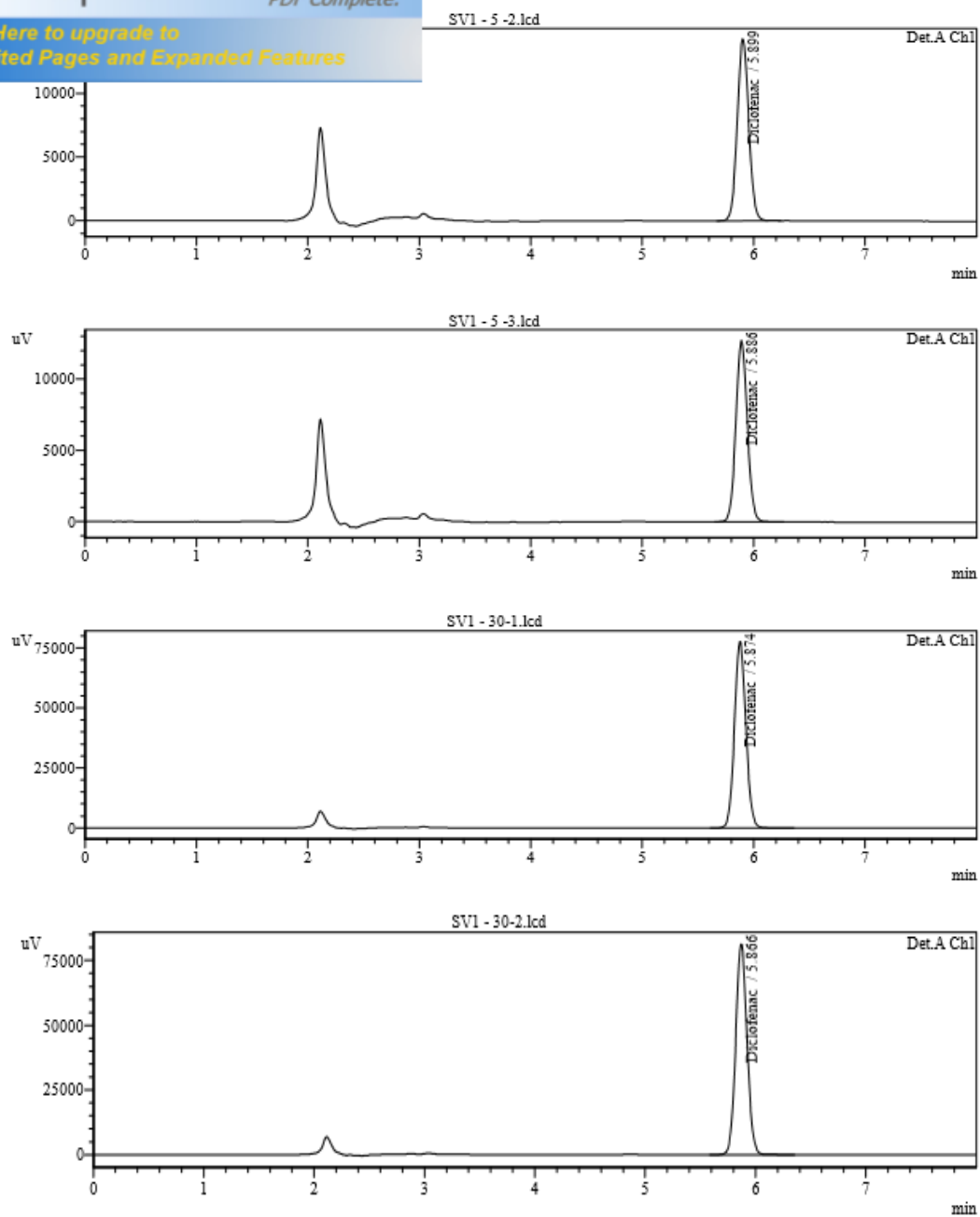




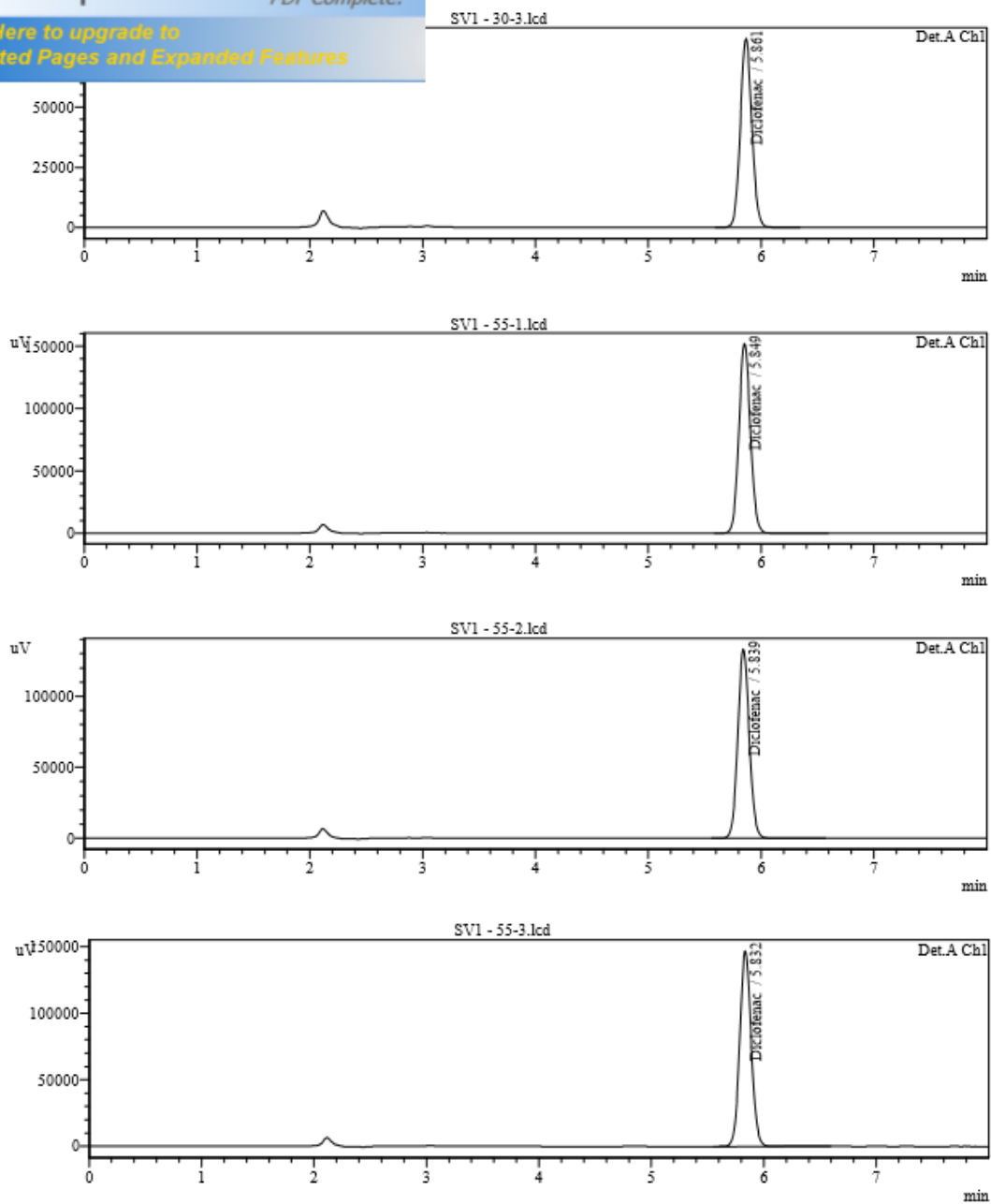
[Click Here to upgrade to Unlimited Pages and Expanded Features](#)



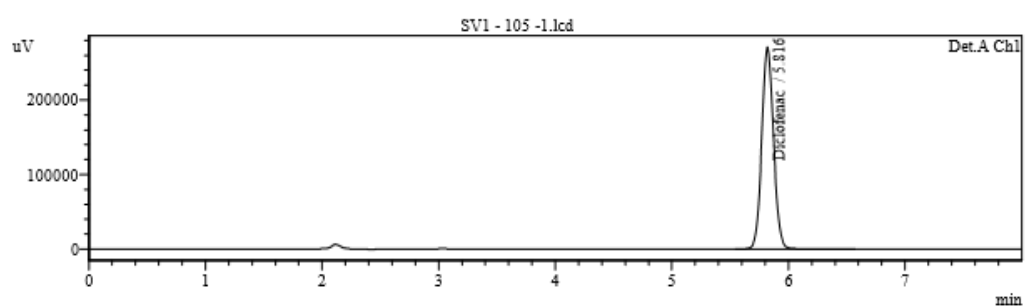
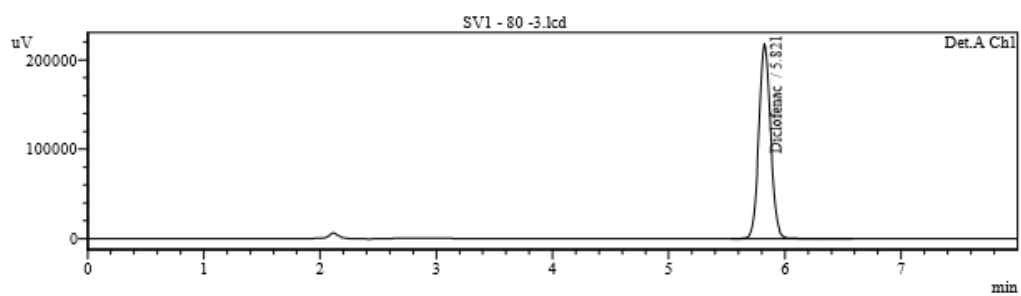
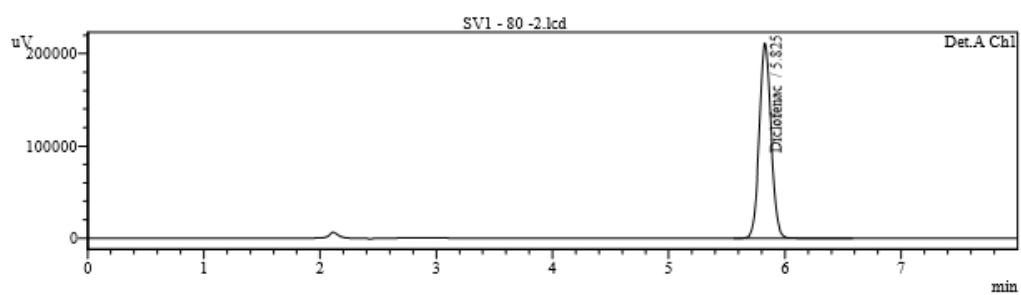
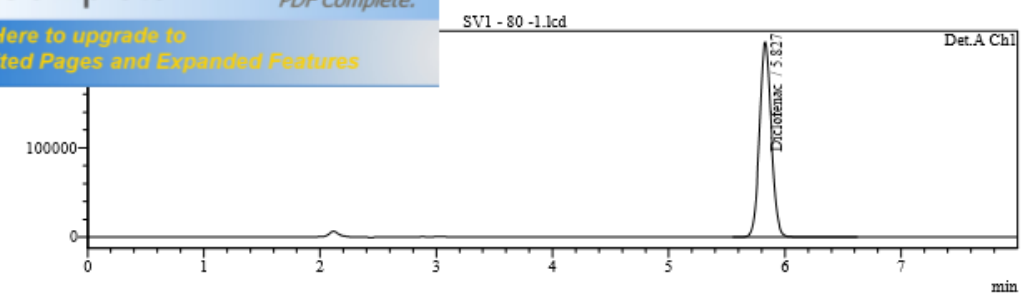
 **PDF Complete**
Your complimentary use period has ended.
Thank you for using PDF Complete.
[Click Here to upgrade to Unlimited Pages and Expanded Features](#)

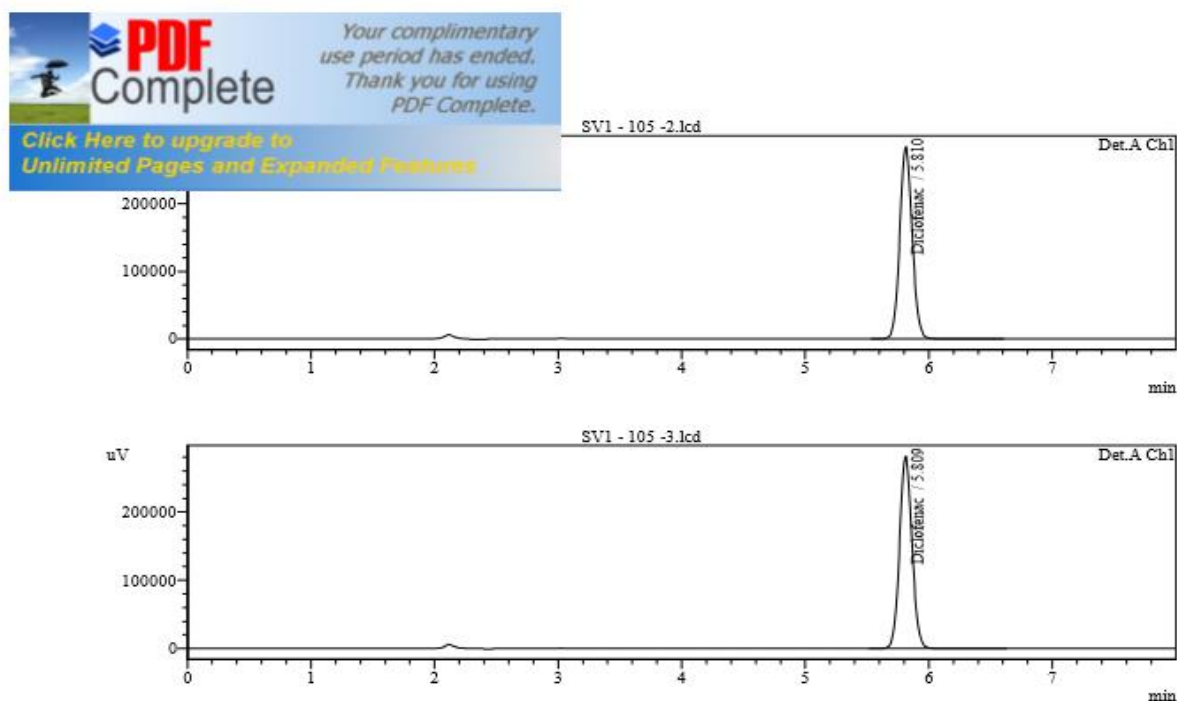


 **PDF Complete**
Your complimentary use period has ended.
Thank you for using PDF Complete.
[Click Here to upgrade to Unlimited Pages and Expanded Features](#)



 **PDF Complete**
Your complimentary use period has ended.
Thank you for using PDF Complete.
[Click Here to upgrade to Unlimited Pages and Expanded Features](#)



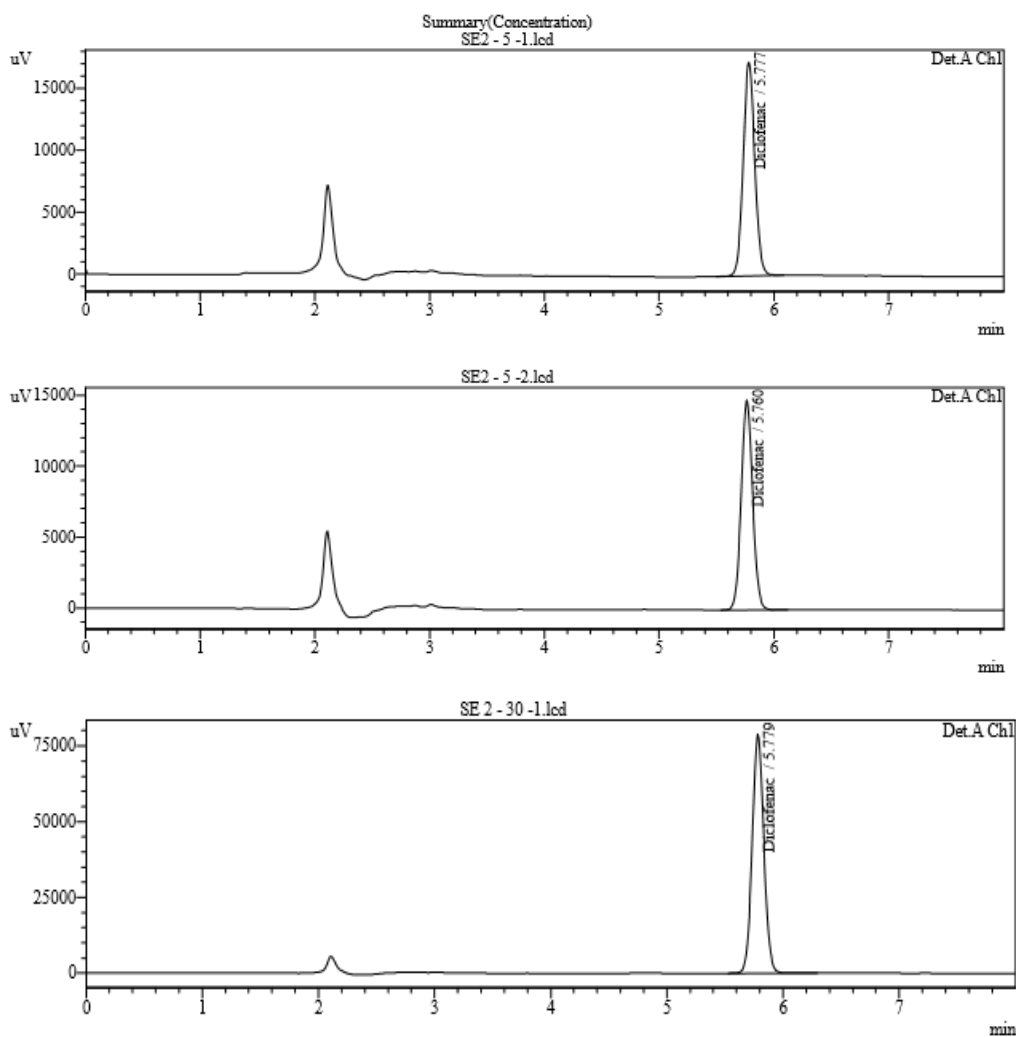


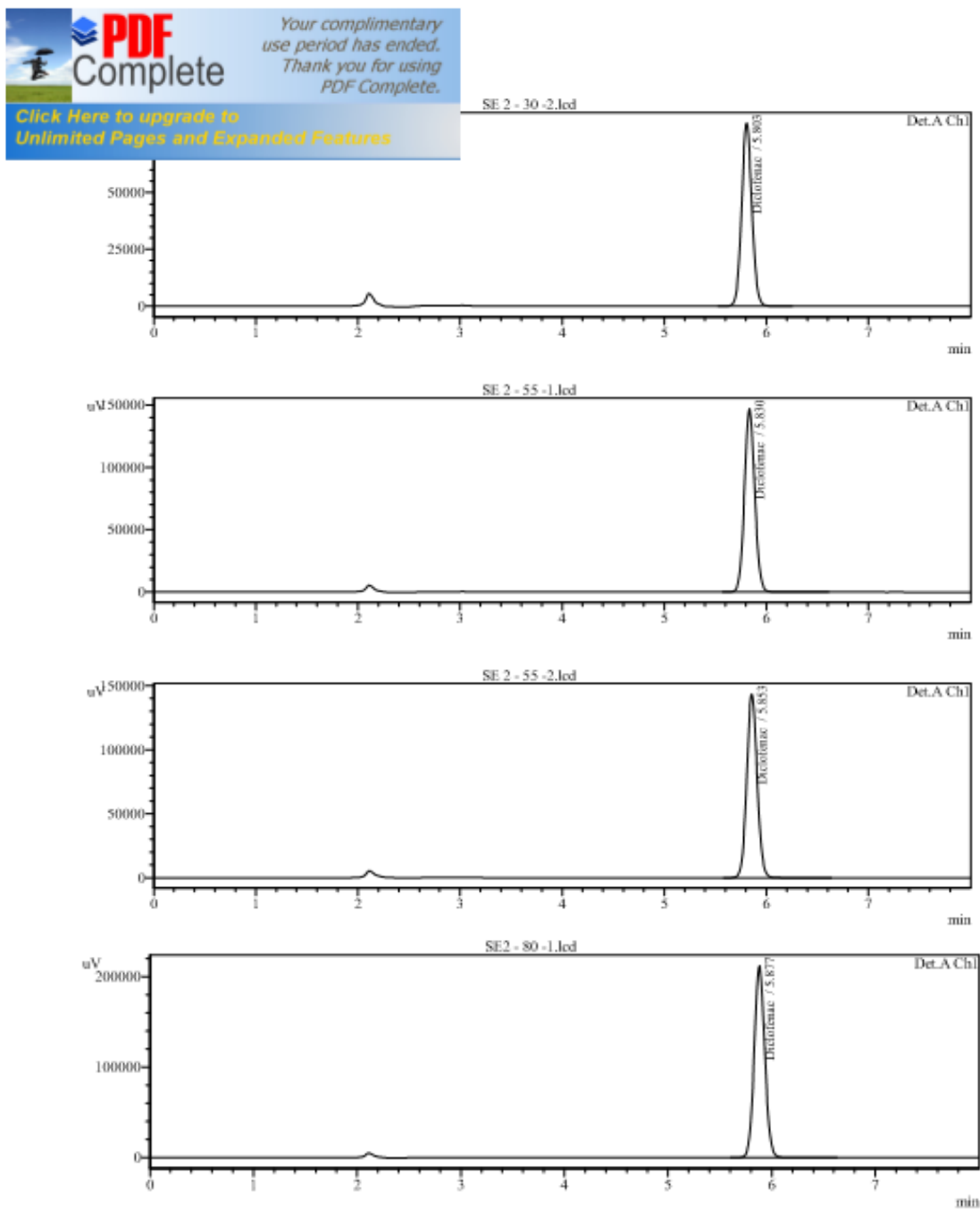
Title	Sample Name	Sample ID	Diclofenac
SE1 - 5 -1.lcd	Diclofénaç	SERIE 1	96249
SE1 - 5 -2.lcd	Diclofénaç	SERIE 1	99640
SE1 - 30 -1.lcd	Diclofénaç	SERIE 1	549957
SE1 - 30 -2.lcd	Diclofénaç	SERIE 1	568060
SE1 - 55 -1.lcd	Diclofénaç	SERIE 1	1049496
SE1 - 55 -2.lcd	Diclofénaç	SERIE 1	1041406
SE1 - 80 -1.lcd	Diclofénaç	SERIE 1	1499572
SE1 - 80 -2.lcd	Diclofénaç	SERIE 1	1468001
SE1 - 105-1.lcd	Diclofénaç	SERIE 1	1941571
SE1 - 105-2.lcd	Diclofénaç	SERIE 1	1976913
SV1 - 5 -1.lcd	Diclofénaç	SERIE 1	94785
SV1 - 5 -2.lcd	Diclofénaç	SERIE 1	97389
SV1 - 5 -3.lcd	Diclofénaç	SERIE 1	100524
SV1 - 30-1.lcd	Diclofénaç	SERIE 1	553084
SV1 - 30-2.lcd	Diclofénaç	SERIE 1	578923
SV1 - 30-3.lcd	Diclofénaç	SERIE 1	557271
SV1 - 55-1.lcd	Diclofénaç	SERIE 1	1051625
SV1 - 55-2.lcd	Diclofénaç	SERIE 1	1043441
SV1 - 55-3.lcd	Diclofénaç	SERIE 1	1051743
SV1 - 80 -1.lcd	Diclofénaç	SERIE 1	1543031
SV1 - 80 -2.lcd	Diclofénaç	SERIE 1	1492328
SV1 - 80 -3.lcd	Diclofénaç	SERIE 1	1534378
SV1 - 105 -1.lcd	Diclofenac	SERIE 1	1910687
SV1 - 105 -2.lcd	Diclofénaç	SERIE 1	1997604
SV1 - 105 -3.lcd	Diclofénaç	SERIE 1	1981480
Average		1035166	
%RSD		65,20	
Maximum		1997604	
Minimum		94785	
Standard Deviation		674952	

JOUR 2 (série 2)

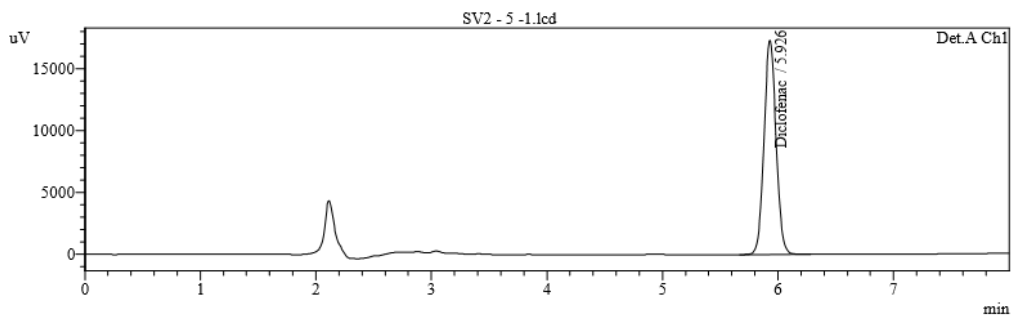
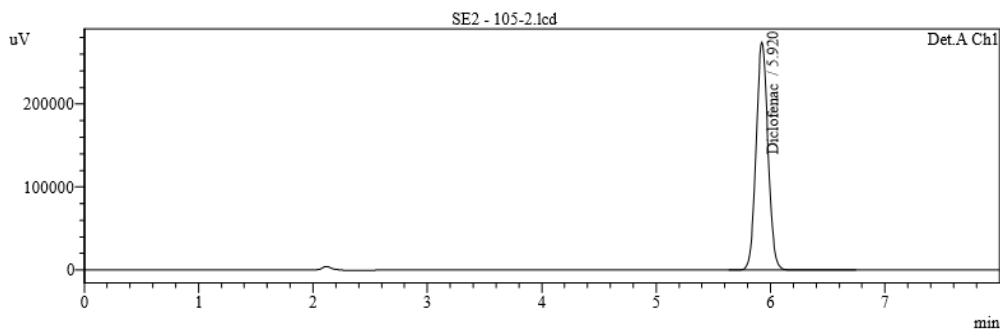
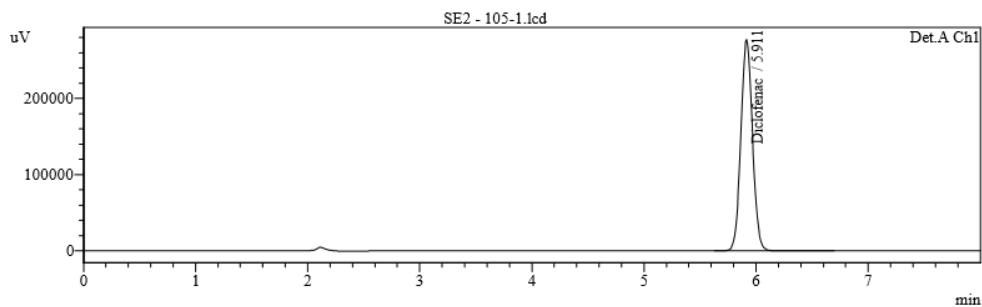
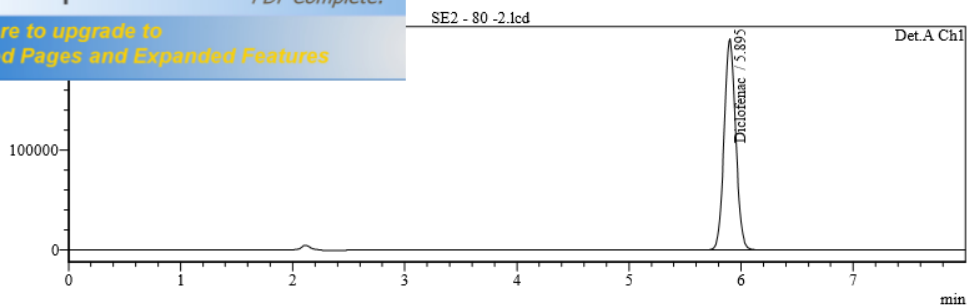
Acquired by : TAMAZIRT Boussad
Sample Name : Diclofénac
Sample ID : SERIE 2
Injection Volume: 20 uL
Method Filename: diclofenac.lcm
Batch Filename :Diclofénac série1.lcb
Report Filename : Default.lcr
Date Acquired :18/05/2017 11:54:29
Data Processed :19/05/2017 12:02:31

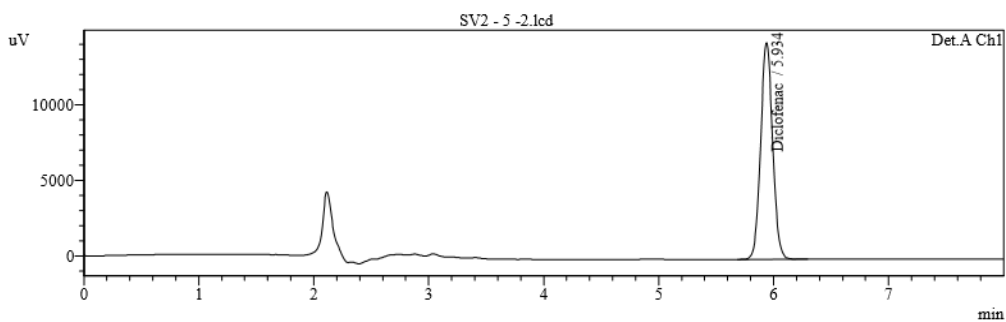
<< Detector A >>



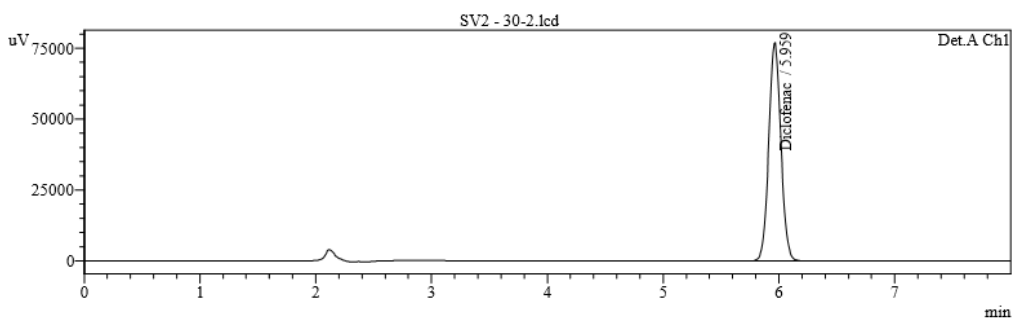
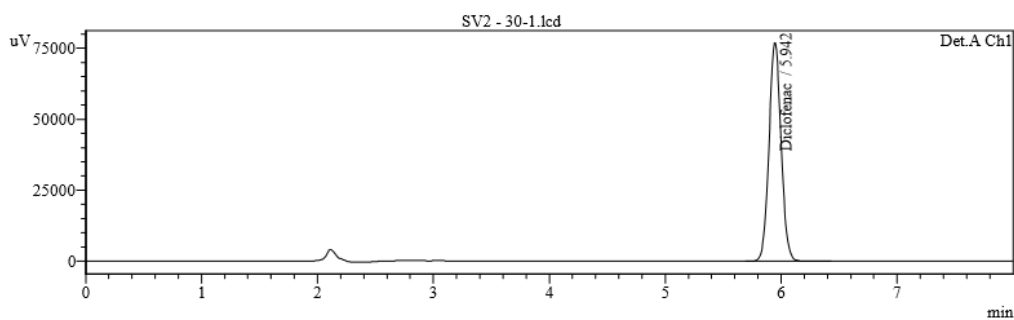
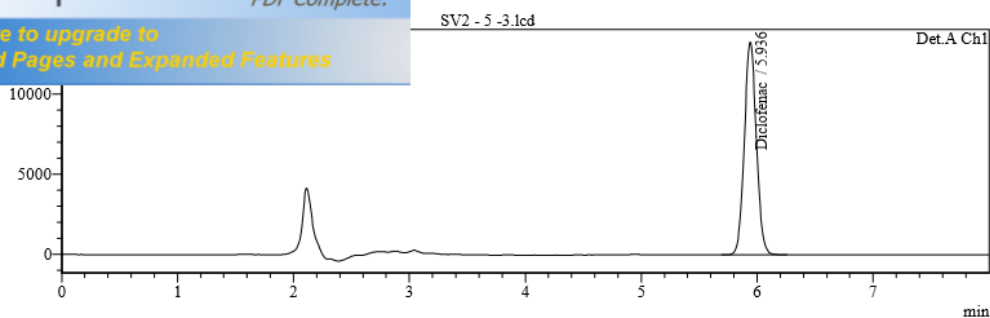


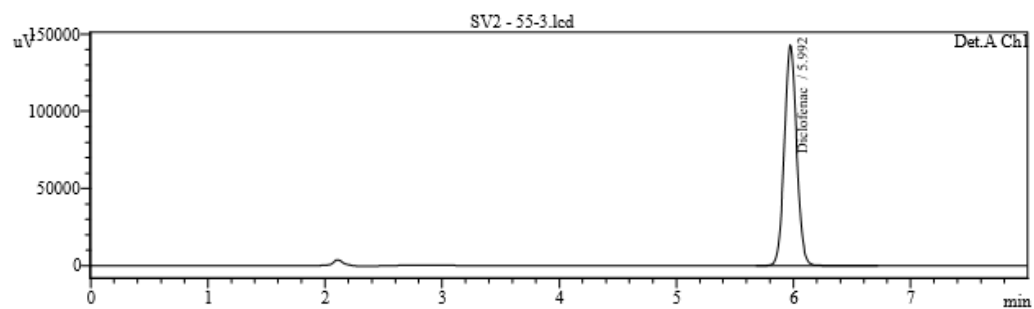
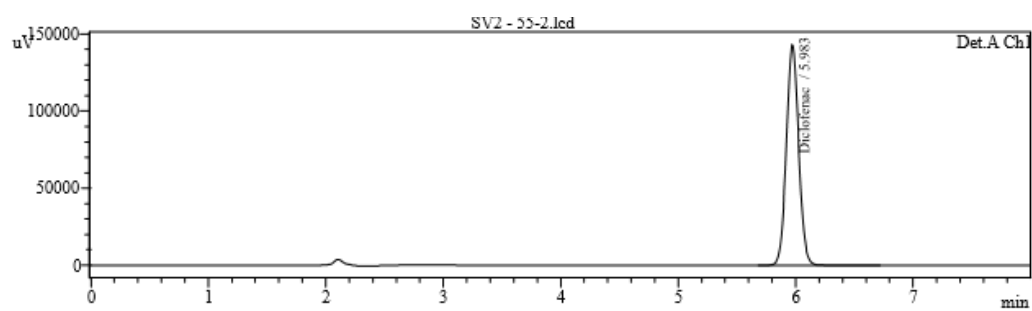
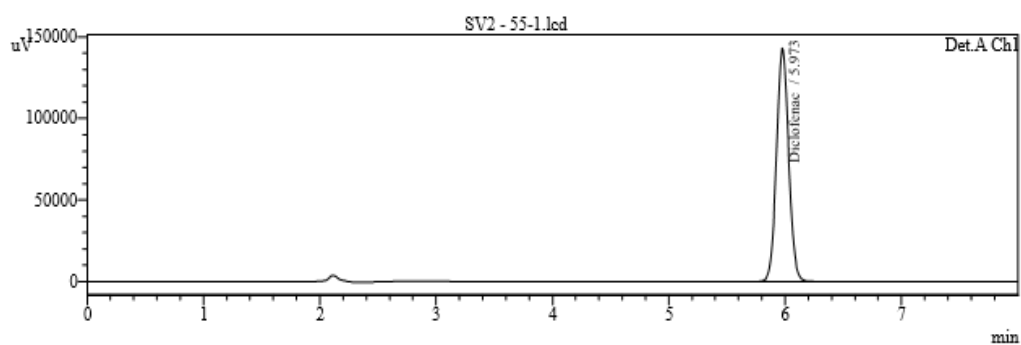
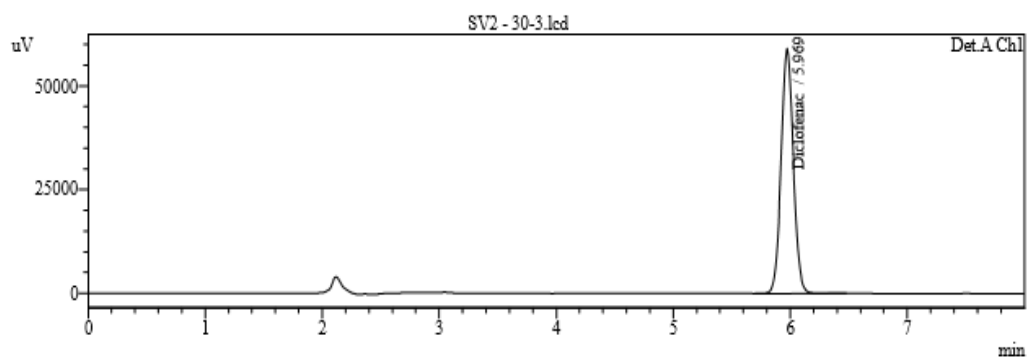
 **PDF Complete**
Your complimentary use period has ended.
Thank you for using PDF Complete.
[Click Here to upgrade to Unlimited Pages and Expanded Features](#)



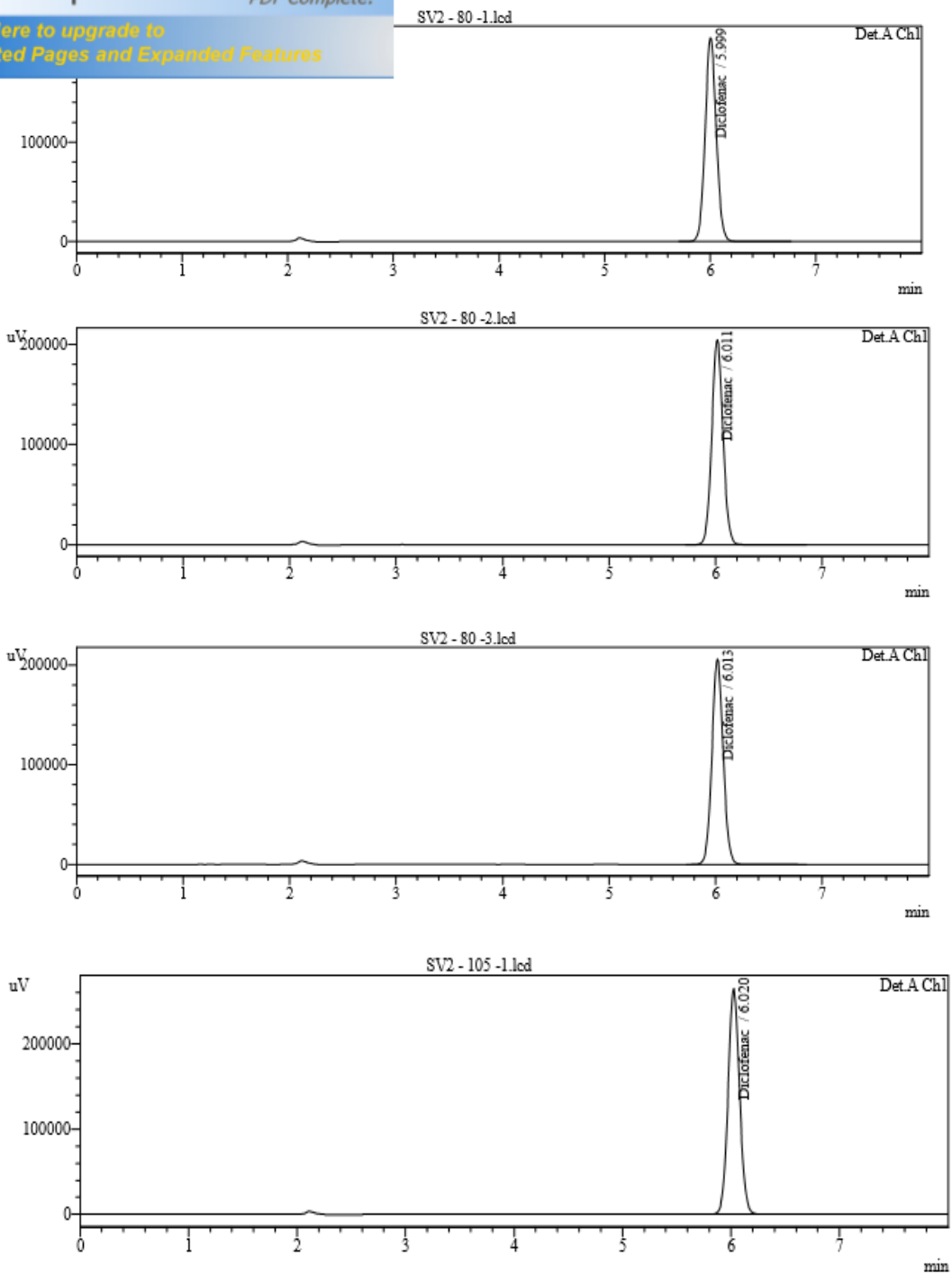


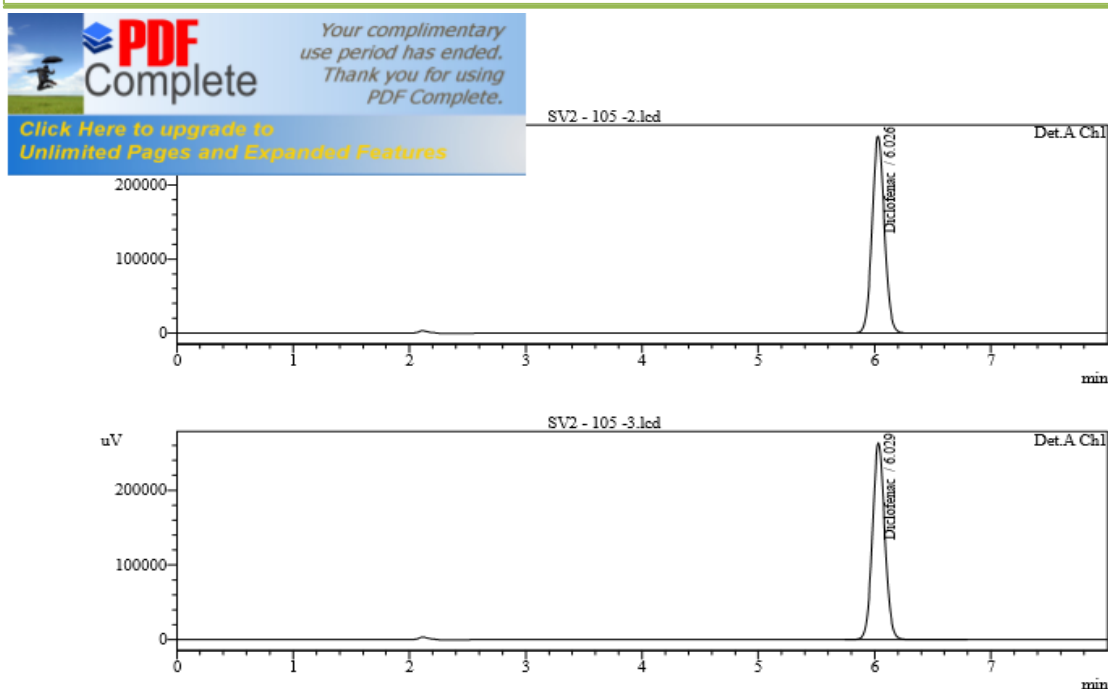
 **PDF Complete**
Your complimentary use period has ended.
Thank you for using PDF Complete.
[Click Here to upgrade to Unlimited Pages and Expanded Features](#)





 **PDF Complete**
Your complimentary use period has ended.
Thank you for using PDF Complete.
[Click Here to upgrade to Unlimited Pages and Expanded Features](#)



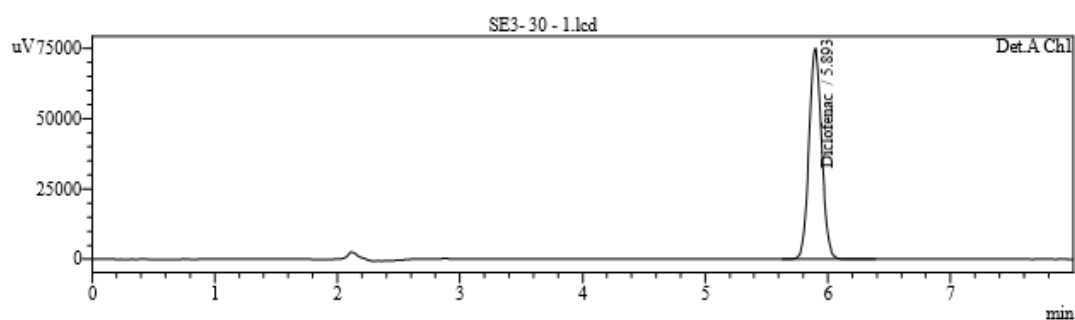
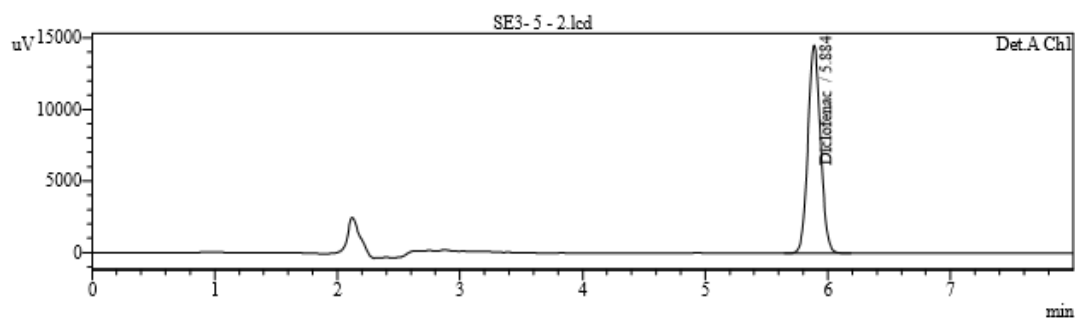
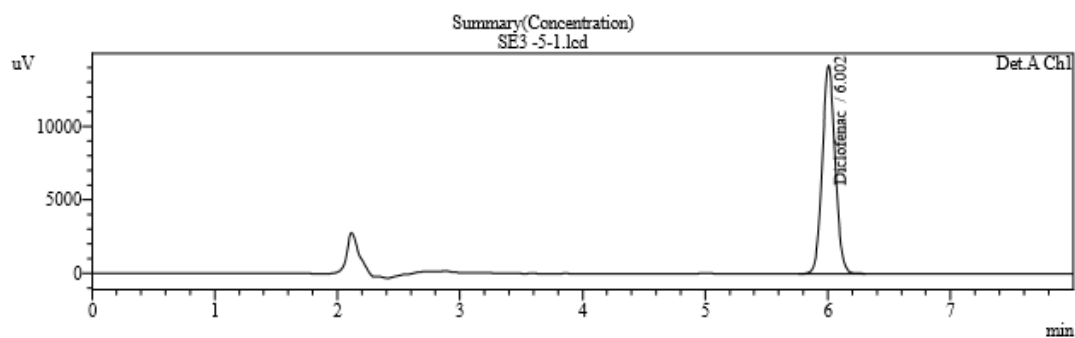


Title	Sample Name	Sample ID	Diclofenac
SE2 - 5 -1.lcd	Diclofénac	SERIE 2	102868
SE2 - 5 -2.lcd	Diclofénac	SERIE 2	103120
SE2 - 30 -1.lcd	Diclofénac	SERIE 2	551416
SE2 - 30 -2.lcd	Diclofénac	SERIE 2	566814
SE2 - 55 -1.lcd	Diclofénac	SERIE 2	1042182
SE2 - 55 -2.lcd	Diclofénac	SERIE 2	1020866
SE2 - 80 -1.lcd	Diclofénac	SERIE 2	1516830
SE2 - 80 -2.lcd	Diclofénac	SERIE 2	1517070
SE2 - 105-1.lcd	Diclofénac	SERIE 2	1998447
SE2 - 105-2.lcd	Diclofénac	SERIE 2	1982259
SV2 - 5 -1.lcd	Diclofénac	SERIE 2	97389
SV2 - 5 -2.lcd	Diclofénac	SERIE 2	103675
SV2 - 5 -3.lcd	Diclofénac	SERIE 2	95962
SV2 - 30-1.lcd	Diclofénac	SERIE 2	559177
SV2 - 30-2.lcd	Diclofénac	SERIE 2	560574
SV2 - 30-3.lcd	Diclofénac	SERIE 2	547701
SV2 - 55-1.lcd	Diclofénac	SERIE 2	1046010
SV2 - 55-2.lcd	Diclofénac	SERIE 2	1025065
SV2 - 55-3.lcd	Diclofénac	SERIE 2	1016221
SV2 - 80 -1.lcd	Diclofénac	SERIE 2	1509087
SV2 - 80 -2.lcd	Diclofénac	SERIE 2	1505626
SV2 - 80 -3.lcd	Diclofenac	SERIE 2	1521550
SV2 - 105 -1.lcd	Diclofenac	SERIE 2	1957348
SV2 - 105 -2.lcd	Diclofénac	SERIE 2	1966535
SV2 - 105 -3.lcd	Diclofénac	SERIE 2	1948729
Average		1034501	
%RSD		65,55	
Maximum		1998447	
Minimum		97389	
Standard Deviation		678073	

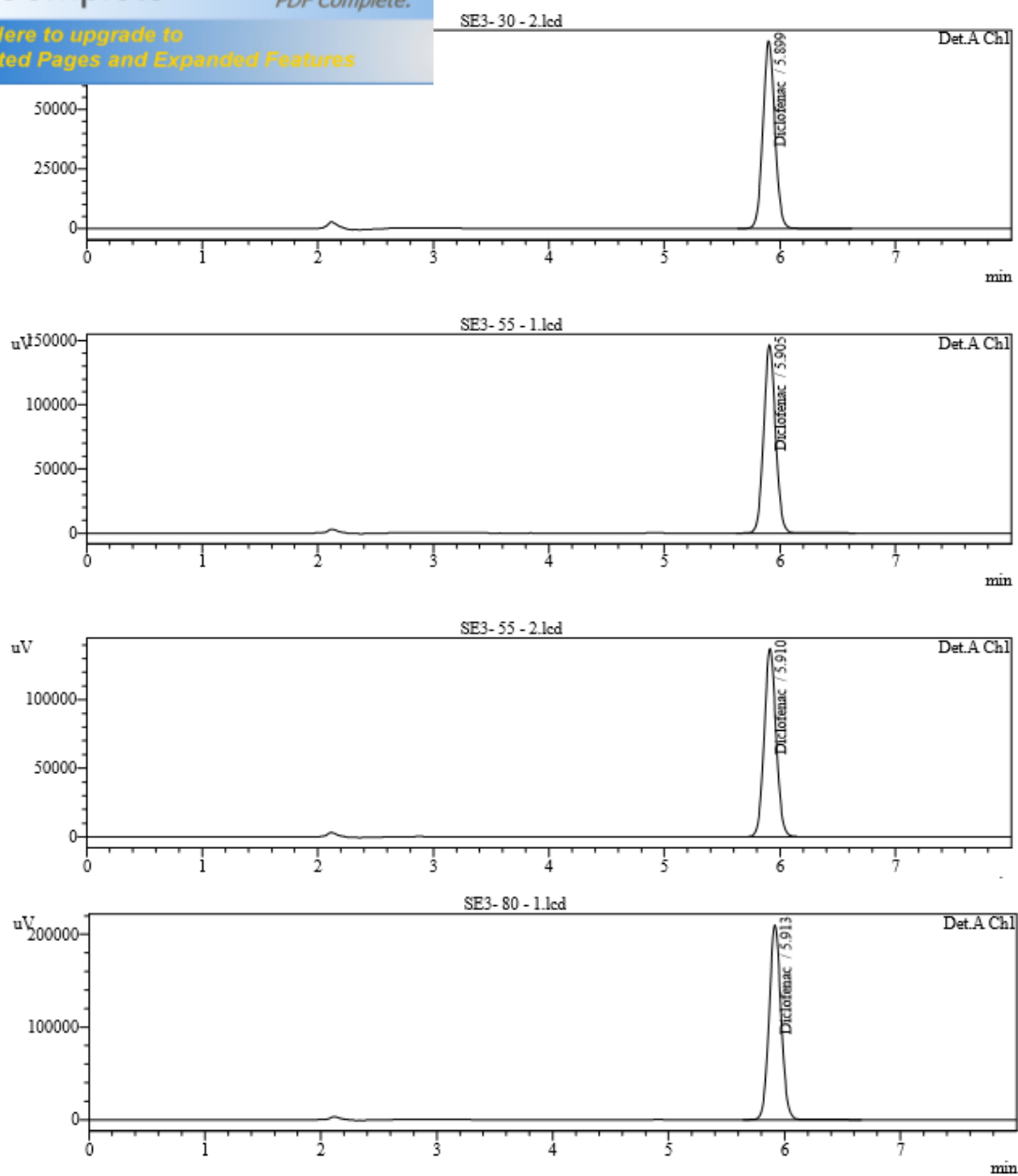
JOUR 3 (série 3)

Acquired by : TAMAZIRT Boussad
Sample Name : Diclofénac
Sample ID : SERIE 3
Injection Volume: 20 Ul
Method Filename: diclofenac.lcm
Batch Filename :Diclofénac série1.lcb
Report Filename : Default.lcr
Date Acquired : 20/05/2017 11:58:21
Data Processed : 21/05/2017 13:04:03

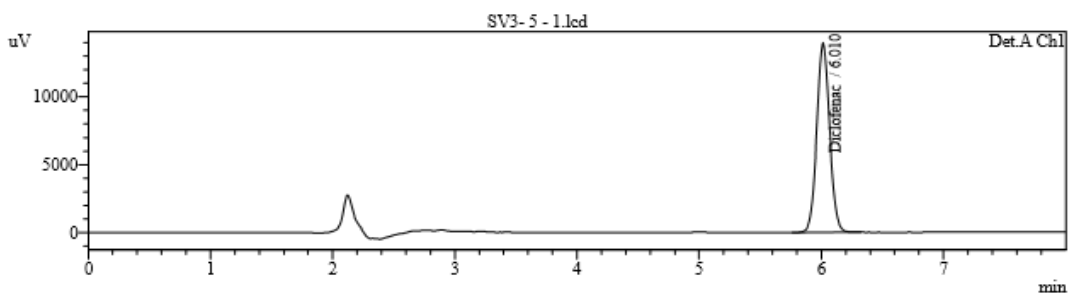
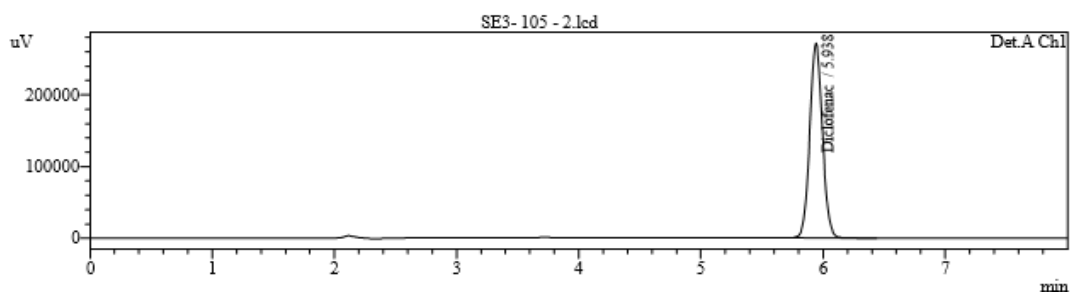
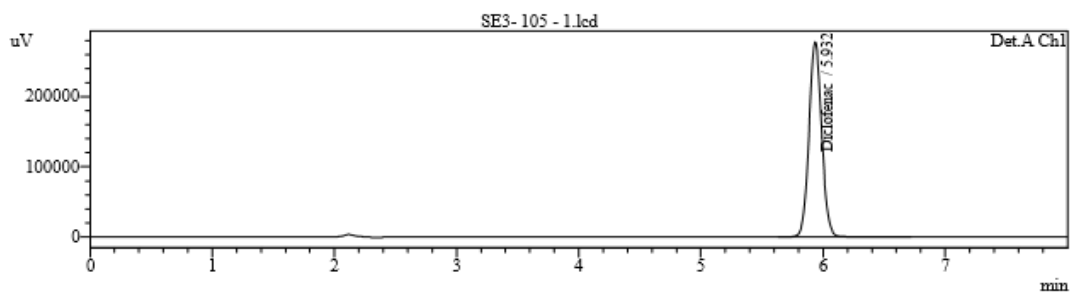
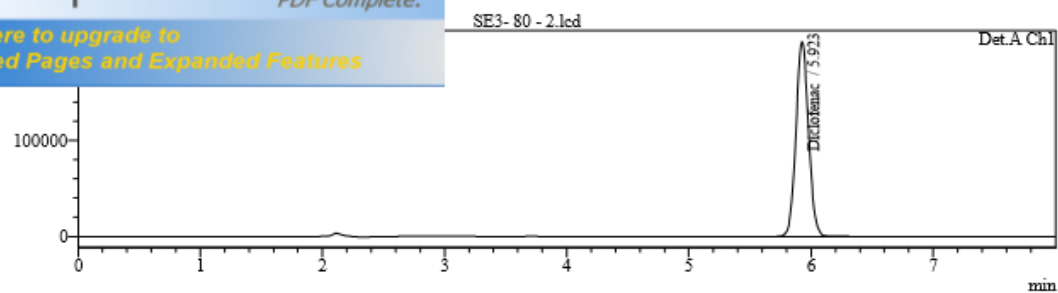
<< Detector A >>



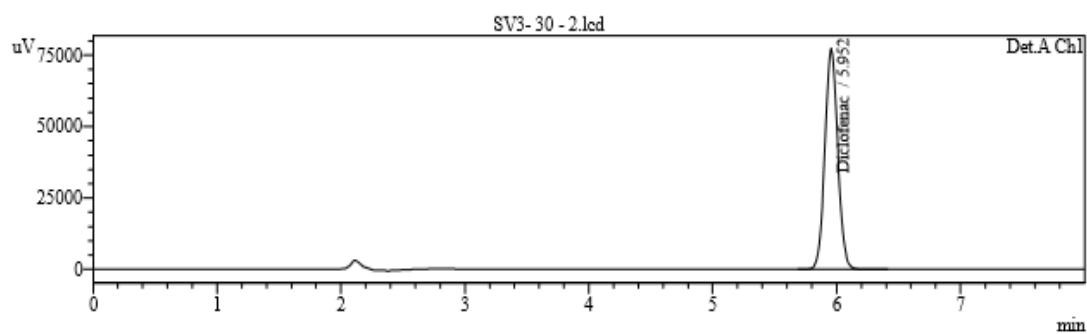
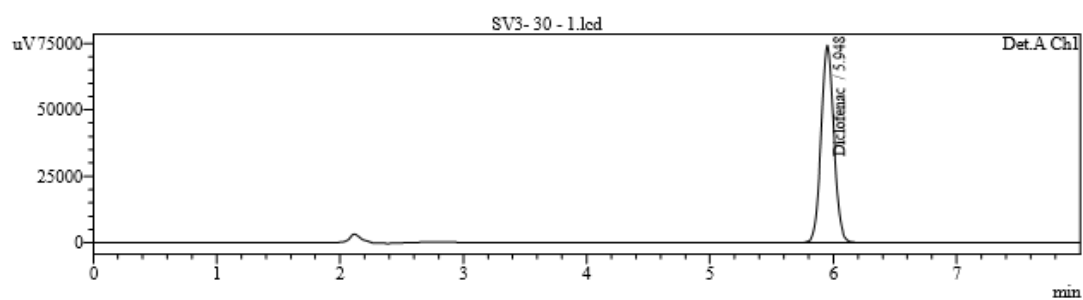
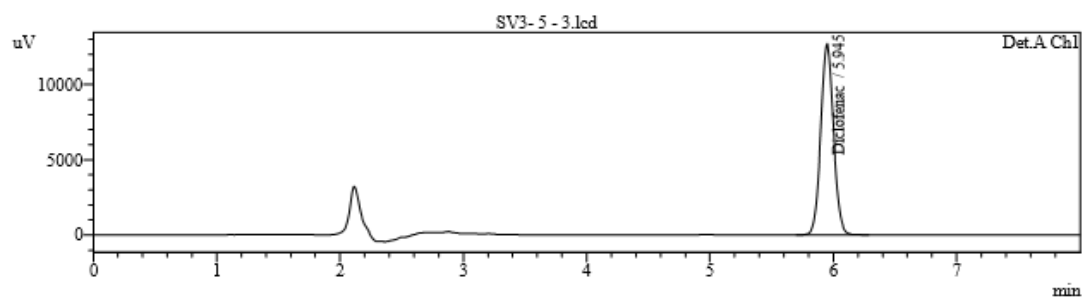
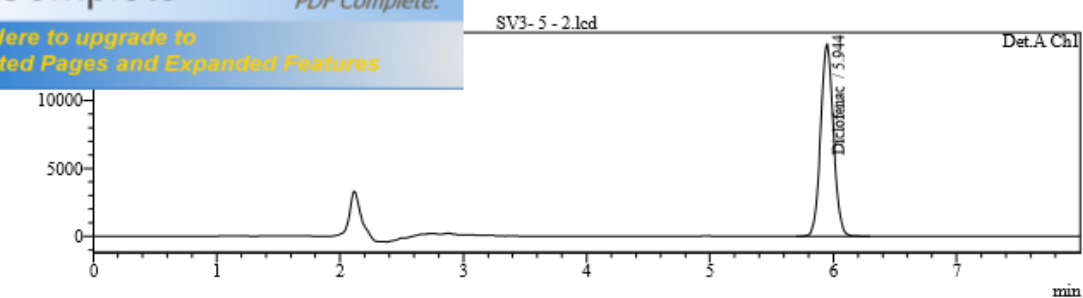
 **PDF Complete**
Your complimentary use period has ended.
Thank you for using PDF Complete.
[Click Here to upgrade to Unlimited Pages and Expanded Features](#)



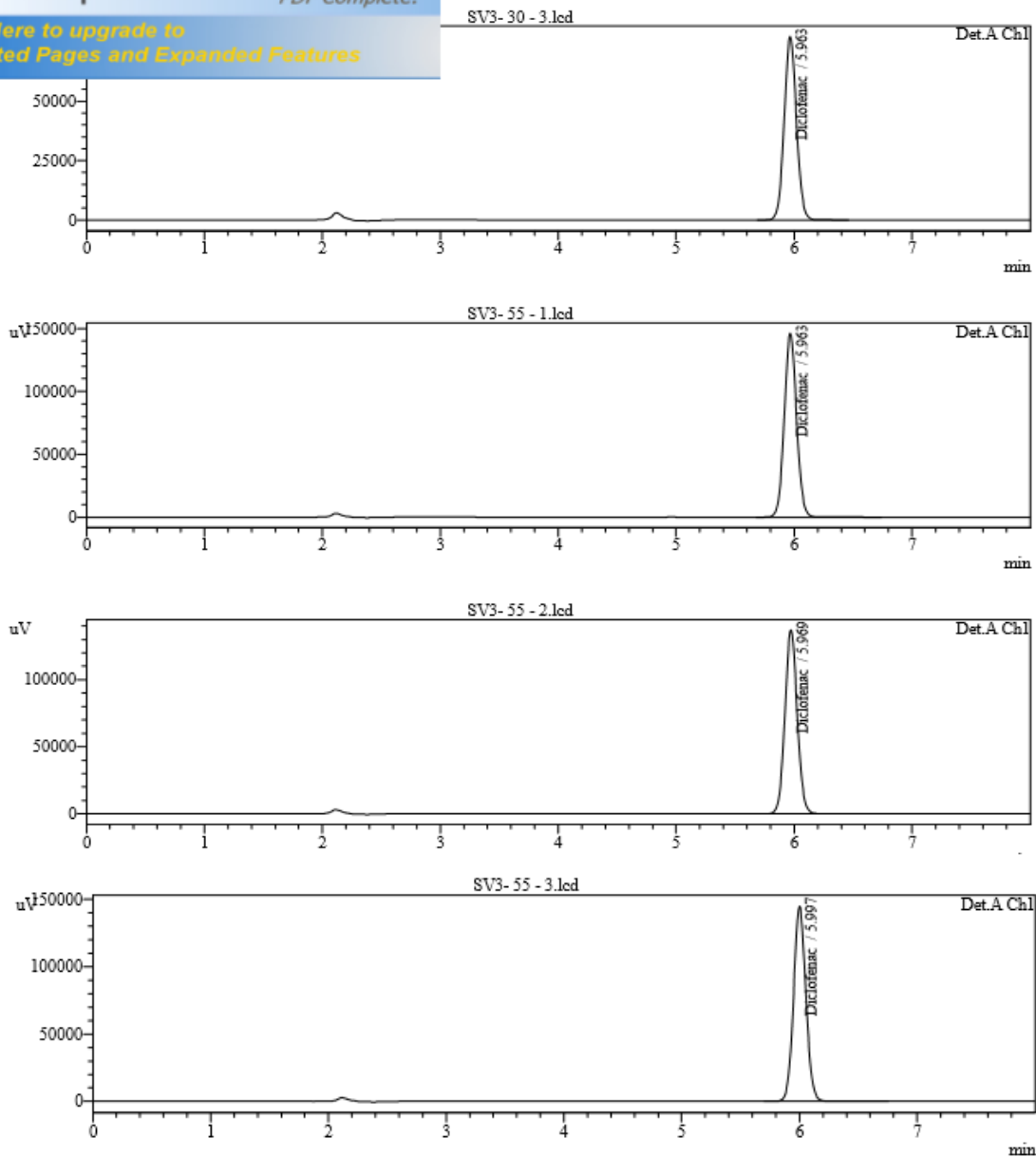
 **PDF Complete**
Your complimentary use period has ended.
Thank you for using PDF Complete.
[Click Here to upgrade to Unlimited Pages and Expanded Features](#)



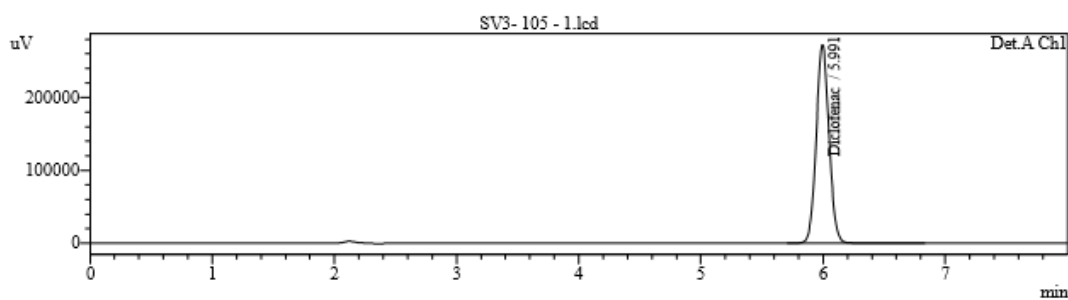
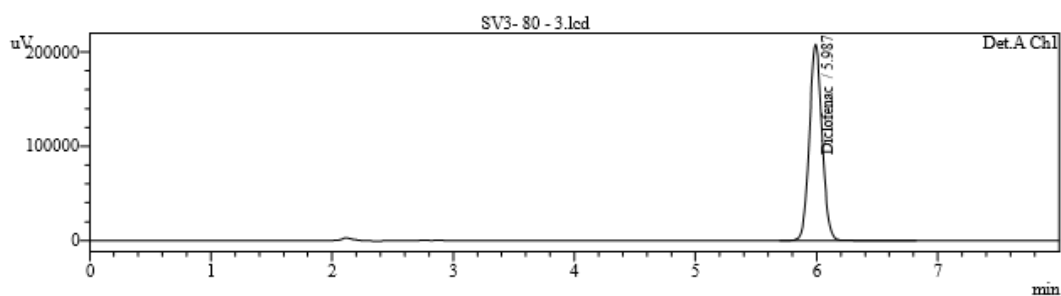
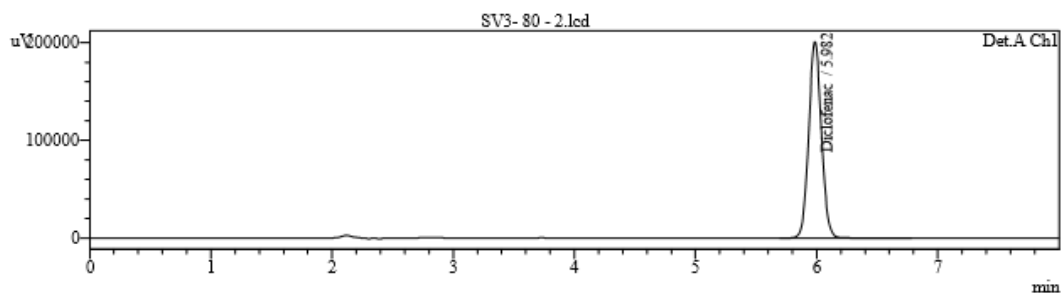
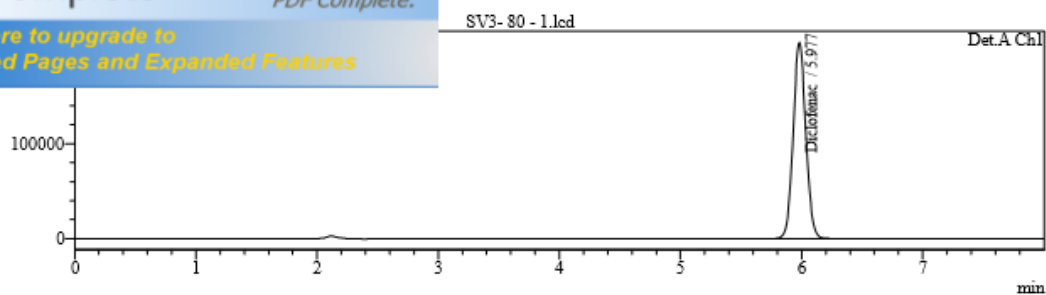
 **PDF Complete**
Your complimentary use period has ended.
Thank you for using PDF Complete.
[Click Here to upgrade to Unlimited Pages and Expanded Features](#)

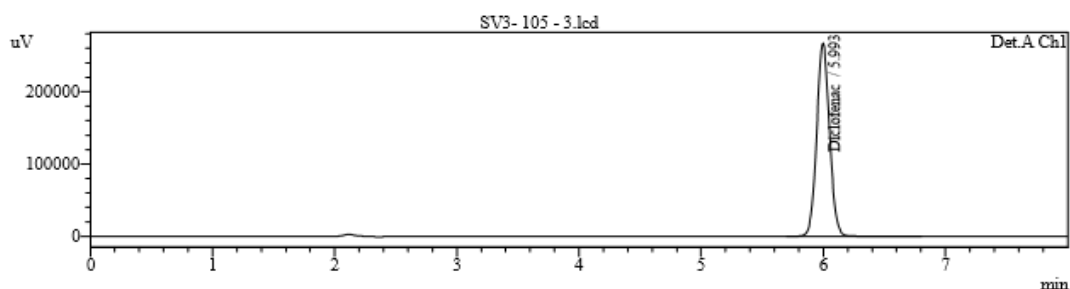
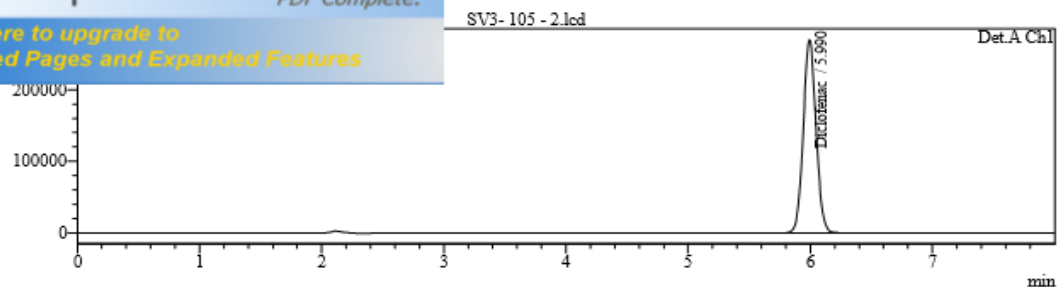


 **PDF Complete**
Your complimentary use period has ended.
Thank you for using PDF Complete.
[Click Here to upgrade to Unlimited Pages and Expanded Features](#)



 **PDF Complete**
Your complimentary use period has ended.
Thank you for using PDF Complete.
[Click Here to upgrade to Unlimited Pages and Expanded Features](#)





Title	Sample Name	Sample ID	Diclofenac
SE3 - 5 -1.lcd	Diclofénac	SERIE 3	103843
SE3 - 5 -2.lcd	Diclofénac	SERIE 3	103786
SE3 - 30 -1.lcd	Diclofénac	SERIE 3	536653
SE3 - 30 -2.lcd	Diclofénac	SERIE 3	564664
SE3 - 55 -1.lcd	Diclofénac	SERIE 3	1050222
SE3 - 55 -2.lcd	Diclofénac	SERIE 3	1043843
SE3 - 80 -1.lcd	Diclofénac	SERIE 3	1508981
SE3 - 80 -2.lcd	Diclofénac	SERIE 3	1461637
SE3 - 105-1.lcd	Diclofénac	SERIE 3	2008551
SE 3- 105-2.lcd	Diclofénac	SERIE 3	1956783
SV3 - 5 -1.lcd	Diclofénac	SERIE 3	102395
SV3 - 5 -2.lcd	Diclofénac	SERIE 3	102455
SV3 - 5 -3.lcd	Diclofénac	SERIE 3	91862
SV3 - 30-1.lcd	Diclofénac	SERIE 3	537415
SV3 - 30-2.lcd	Diclofénac	SERIE 3	560758
SV3 - 30-3.lcd	Diclofénac	SERIE 3	547824
SV3 - 55-1.lcd	Diclofénac	SERIE 3	1062271
SV3 - 55-2.lcd	Diclofénac	SERIE 3	1042385
SV3 - 55-3.lcd	Diclofénac	SERIE 3	1060873
SV3 - 80 -1.lcd	Diclofénac	SERIE 3	1507519
SV3 - 80 -2.lcd	Diclofénac	SERIE 3	1467985
SV3 - 80 -3.lcd	Diclofénac	SERIE 3	1519216
SV3 - 105 -1.lcd	Diclofénac	SERIE 3	1995787
SV3 - 105 -2.lcd	Diclofénac	SERIE 3	1973674
SV3 - 105 -3.lcd	Diclofénac	SERIE 3	1956916
Average		1034732	
%RSD		65,57	
Maximum		2008551	
Minimum		91862	
Standard Deviation		678473	

RESUME

Le concept de l'assurance qualité est une nécessité inexorable dans le domaine de l'industrie pharmaceutique, sur ce toute méthode analytique utilisée dans le parcours de la conception du médicament doit être validée selon un protocole bien défini.

En vue d'une étude du profil de dissolution du Diclofénac sodique dans des comprimés gastro-résistants de 50 mg, une méthode de dosage par chromatographie liquide de haute performance (HPLC) est mise au point et validée selon les directives de la commission de la société française des sciences et techniques pharmaceutiques (SFSTP) suivant un protocole de validation harmonisé, publié dans la revue STP Pharma pratique en janvier 2006 qui repose sur le profil d'exactitude comme outil de décision.

Les résultats obtenus prouvent que toutes les exigences spécifiques élaborées dans cette approche harmonisée sont remplies, ce qui atteste la validité de la méthode proposée dans le présent travail, prouvant ainsi mathématiquement la fiabilité et l'exactitude des résultats d'une éventuelle étude du profil de dissolution du Diclofenac sodique, comprimés gastro-résistants de 50 mg, avec un dosage par HPLC.

Mots clés : Diclofenac sodique, comprimés gastro-résistants, profil de dissolution, HPLC, validation analytique, profil d'exactitude.

ABSTRACT

The concept of insuring quality is an undeniable requirement in the field of pharmaceutical industry. Thus, every analytical method used along the path underlying the conception of a medicine must be validated according to a well defined protocol.

For the aim of a study of the dissolution profile of Sodium Diclofénac in gastro-resistant tablets of 50 mg, a method of dosage by means of high performance liquid chromatography (HPLC) has been set up and validated according to the instructions of the panel of the French Society of Sciences and Pharmaceutical Technics (SFSTP) following an harmonized protocol of a validation, published in the magazine STP Pharma Pratique in January 2006 relying on the accuracy profile as a means to reach a decision.

The results attained show that all the specific requirements elaborated within this balanced approach have been met, and this confirms the validity of the method suggested in the current work, proving therefore mathematically the reliability and accuracy of the results of a dissolution profile of Sodium Diclofénac, gastro resistant tablets of 50 mg, probable study with a dosage by means of HPLC.

Key words: Sodium Diclofénac, Gastro-resistant tablets, dissolution feature, HPLC, Validation.