

الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية

REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE

Ministère de l'enseignement supérieur
et de la recherche scientifique

Université Mouloud MAMMERRI
Faculté de médecine
Tizi-Ouzou



وزارة التعليم العالي و البحث العلمي

جامعة مولود معمري
كلية الطب
تيزي وزو

ⵍⵔⵉⵎⵉⵏⵉⵔ ⵏ ⵉⵎⵓⵏⵉⵏ ⵏ ⵉⵎⵓⵏⵉⵏ ⵏ ⵉⵎⵓⵏⵉⵏ

Département de pharmacie

Mémoire de fin d'études

Numéro d'ordre : 02/DP/FM/2016

Présenté et soutenu publiquement

Le 23 juin 2016

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

Thème :

Validation analytique d'une méthode de dosage du diclofénac de sodium dans les suppositoires à 100 mg par HPLC. Application de la démarche harmonisée.

Réalisé par :

MIMOUN Nacéra
SARAOUI Nawel

Encadrées par :

Dr M.MAMOU

Composition du jury :

- Dr KESSAL Fetta	MAHU	UMMTO	Président du jury
- Dr MAMOU Marzouk	MAHU	UMMTO	Encadreur
- Dr BOURKAIB Amina	MAHU	UMMTO	Examinatrice

PROMOTION 2015-2016

DEDICACES

Dédicaces

C'est à cœur ouvert, avec un énorme plaisir, une immense joie que je dédie ce mémoire de fin d'études à tous ceux qui me sont chers

Tout les mots ne sauraient exprimer la gratitude, l'amour, le respect, la reconnaissance que j'ai pour vous mes très chers parents.

Ma tendre maman HAMTOUCHE BAHDJIA ; je te remercie pour ton amour inconditionnel, mon cher papa BELKACEM ; je te remercie pour tes précieux conseils.

Je vous remercie pour tout les sacrifices que vous avez consenti pour mon instruction, ma réussite et mon bien-être.

Que ce modeste travail soit l'exaucement de vos vœux tant formulés, le fruit de vos innombrables sacrifices.

Puisse DIEU, le très haut, vous accorder santé, bonheur et longue vie .

Mon adorable mari GADA Lyes : tes sacrifices, ton soutien moral, ta gentillesse sans égal, ton profond attachement m'ont permis de réussir mes études.

Que dieu réunisse nos chemins pour un long commun serein et que ce travail soit témoignage de ma reconnaissance et de mon amour sincère et fidèle.

A mes sœurs ZAZIE et SAMIA, à mes frères YANIS et AGHILES : je vous dédie ce travail avec tout mes vœux de bonheur, de santé et de réussite en témoignage de l'affection, de l'attachement et de l'amour que je porte pour vous.

A ma très chère binome NAWEL , tu es pour moi plus qu'une amie ; une confidente , une sœur... je te souhaite tout le bonheur du monde et Merci de toujours être là pour moi.

A la mémoire de mes grands parents, puisse DIEU vous accueillir dans son vaste paradis

A ma belle famille, à ma très chère amie Sabrina AMZIANE, trouvez ici l'expression de mon profond attachement.

MIMOUN Nacéra

Dédicaces

C'est avec grand amour et profonde gratitude que je dédie ce mémoire de fin d'études à mes chers parents, si je suis cette personne aujourd'hui, je sais que c'est à vous que je le dois. Ce travail est le fruit de vos sacrifices, votre soutien inconditionnel et vos précieux conseils. Merci maman merci papa je prie le bon DIEU de veiller sur vous en espérant que vous serez toujours fiers de moi.

A mes beaux parents, Vous m'avez accueilli à bras ouverts dans votre famille. En témoignage de l'attachement et de l'affection que je porte pour vous, je vous dédie ce travail avec tous mes vœux de bonheur et santé.

A mon cher mari, mon âme sœur KAMEL, sans ton aide, tes conseils et tes encouragements ce travail n'aurait vu le jour. Merci d'exister et merci d'exister pour moi. Tu es la lumière de mon chemin.

A la mémoire de mes grands parents que j'aurais tant aimé qu'ils soient là et me féliciter. Puisse DIEU les accueillir dans son infinie miséricorde.

A mon adorable sœur NASSIMA et son mari AHMED, à mes frères NABIL RAMDANE NASSIM et sa femme LYNDIA, TAHAR et sa femme HAKIMA.

A ma belle sœur LILA et à mon beau frère YANIS qu'ils trouvent ici l'expression de mes sentiments de respect et de reconnaissance.

A ma chère binôme NACERA une deuxième sœur pour moi, merci pour tout ce que t'as fait pour moi à titre personnel et à titre professionnel. Que DIEU te préserve bonne santé et longue vie.

Je dédie particulièrement ce modeste travail à Mme LAMROUS je vous remercie pour tout le temps que vous m'avez consacré, vos directives précieuses et pour la qualité de votre suivi durant toute la période de mon stage. Merci à toute l'équipe.

A ma douce DEHBIA et ma chère SABRINA, merci pour tout.

SARAOUI Nawel

REMERCIEMENTS



REMERCIEMENTS

*Nous remercions DIEU le tout puissant de nous avoir procuré courage
santé et volonté d'avancer dans la vie et briller dans les études.*

*Nous tenons à exprimer nos remerciements les plus vifs à notre
encadreur Dr M.MAMOU*

*Nous avons eu le privilège de travailler parmi votre
équipe et d'apprécier vos qualités et vos valeurs.*

*Votre sérieux, votre compétence et votre sens du devoir
nous ont énormément marqués.*

*Veillez trouver ici l'expression de notre respectueuse
considération et notre profonde admiration pour toutes vos
qualités scientifiques et humaines.*

*Ce travail est pour nous l'occasion de vous témoigner
notre profonde gratitude.*

*Nous tenons également à remercier Dr F. KESSAL et Dr
A.BOURKAIB pour nous avoir fait l'honneur d'accepter de faire
partie de notre jury.*



TABLE DES MATIERES

Introduction générale.....	01	
Objectifs.....	02	
Partie théorique		
Chapitre I : Diclofénac de sodium		
Introduction		
1. Définition	03	
2. Propriétés	03	
2.1. Physicochimiques.....	03	
2.2. Pharmacologiques.....	04	
2.2.1. Pharmacocinétiques.....	04	
2.2.1.1. Absorption.....	04	
2.2.1.2. Distribution.....	04	
2.2.1.3. Métabolisme.....	04	
2.2.1.4. Excrétion.....	05	
2.2.2. Pharmacodynamiques.....	05	
3. Mécanisme d'action.....	05	
4. Posologie et indications thérapeutiques.....	06	
4.1. Posologie.....	06	
4.2. Indications.....	06	
5. Effets indésirables.....	07	
6. Contre indications.....	07	
7. Interactions médicamenteuses.....	07	
8. Toxicité.....	08	
8.1. Surdosage.....	08	
8.1.1. Symptômes.....	08	
8.1.2. Conduite à tenir.....	08	
Chapitre II : Les suppositoires		
Introduction.....		09
1. Historique.....	09	
2. Définition.....	09	
3. Excipients utilisés pour la fabrication des suppositoires.....	10	
3.1. Propriétés.....	10	
3.2. Classification.....	10	
3.2.1. Excipients lipophiles.....	10	
3.2.1.1. Beurre de cacao.....	10	
3.2.1.2. Huiles hydrogénées	11	
3.2.1.3. Glycérides hémi synthétiques solides.....	11	
3.2.1.4. Macrogols glycérides saturés.....	11	
3.2.2. Excipients hydrosolubles	11	

TABLE DES MATIERES

4. Production des suppositoires.....	11
4.1. Traitement des principes actifs	12
4.2. Traitement de l'excipient	12
4.3. Préparation de la masse.....	12
4.4. Moulage des suppositoires.....	13
4.4.1. Moules emballages	13
5. Avantages et inconvénients des suppositoires.....	13
6. Mode d'action des suppositoires.....	14
Chapitre III : Validation analytique	
1. Définition.....	15
2. But de la validation analytique.....	15
3. Aspect réglementaire et normatif.....	15
4. Critères de validation.....	16
4.1. Spécificité-sélectivité.....	17
4.2. Exactitude.....	17
4.3. Linéarité.....	17
4.4. Fidélité.....	17
4.5. Sensibilité.....	18
4.6. Limite de détection.....	18
4.7. Limite de quantification.....	18
4.8. Robustesse.....	18
5. Etude statistique de la validation analytique.....	18
5.1. Spécificité.....	19
5.1.1. Protocole.....	19
5.1.2. Etude statistique.....	19
5.2. Fonction de réponse.....	22
5.3. Alignement des observations.....	23
5.4. Prédiction inverses.....	24
5.5. Calcul de la justesse et de la fidélité.....	25
5.5.1. Modèle.....	25
5.5.2. Justesse.....	26
5.5.3. Fidélité.....	27
5.6. Calcul de l'exactitude.....	27
5.6.1. Erreur totale et profil de l'erreur totale.....	27
5.7. Calcul de l'intervalle de tolérance.....	28
5.8. Profil d'exactitude.....	30
5.8.1. Calcul.....	30
5.8.2. Choix de la fonction de réponse.....	30
6. Linéarité.....	31
7. Limites de quantification.....	31
8. Robustesse.....	32
8.1. Protocole	32
8.2. Etude statistique.....	32

TABLE DES MATIERES

8.2.1. Méthode des plans factoriels.....	32
Partie pratique	
Introduction.....	34
1. Matériels et méthodes.....	34
1.1. Matériels.....	34
1.1.1. Matières premières et réactifs.....	34
1.1.2. Appareillage et équipement.....	34
1.1.3. Verrerie.....	35
1.1.4. Autres.....	35
1.2. Méthodes.....	35
1.2.1. Préparation des solutions.....	35
1.2.2. Conditions chromatographiques.....	36
2. Résultats.....	36
2.1. Spécificité.....	37
2.2. Fonction de réponse.....	39
2.3. Critères de choix de la fonction de réponse.....	42
2.4. Alignement des observations.....	44
2.5. Prédications inverses.....	46
2.6. Justesse.....	46
2.7. Fidélité.....	47
2.8. Exactitude.....	47
2.9. Erreur totale et profil d'erreur totale.....	48
2.10. Intervalle de tolérance.....	48
2.11. Profil d'exactitude.....	49
2.12. Linéarité.....	49
2.13. Limites de quantification et intervalle de dosage.....	50
2.14. Robustesse.....	50
3. Discussions.....	53
3.1. Spécificité.....	53
3.2. Choix de la fonction de réponse.....	53
3.3. Profil d'exactitude.....	53
3.4. Limites de quantification et intervalle de dosage.....	54
3.5. Linéarité.....	54
3.6. Robustesse.....	54
Conclusion.....	55
Conclusion générale.....	56
Références bibliographiques	
Annexes	
Résumé	

LISTE DES ABREVIATIONS

AINS : Anti Inflammatoire Non Stéroïdien

ARA II : Antagoniste des Récepteurs de l'Angiotensine II

COX : Cyclo oxygénase

CV : Coefficient de Variation

DCI : Dénomination Commune Internationale

DDL : Degré De Liberté

FDA : Food and Drug Administration

FI : Fidélité Intermédiaire

FR : Forme Reconstituée

HPLC : High Performance Liquid Chromatography

ICH : International Conference on Harmonization

IEC : Inhibiteurs de l'Enzyme de Conversion

IM : Intra Musculaire

ISO : International Standard Organization

IT: Intervalle de Tolérance

IV : Intra Veineuse

ND : Non Déterminé

NS : Non Significatif

Ord : Ordonnée

PA : Principe Actif

PE : Pharmacopée Européenne

PEG : Poly Ethylène Glycol

S : Significatif

SE: Standard d'Etalonnage

SV: Standard de Validation

SFSTP : Société Française des Sciences Techniques et Pharmaceutiques

UV : Ultra-Violet

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 01 : Propriétés physicochimiques du diclofénac de sodium.....	03
Tableau 02 : Interactions médicamenteuses.....	08
Tableau 03 : Avantages et inconvénients des suppositoires.....	13
Tableau 04 : Résumé des critères de validation en fonction du type d'analyse.....	16
Tableau 05 : Choix du nombre de standards d'étalonnage et de standards de validation en fonction du protocole choisi.....	21
Tableau 06 : Exemples de fonctions de réponse.....	22
Tableau 07 : Règles d'alignement pour différentes fonctions de réponse.....	23
Tableau 08 : Calcul des prédictions inverses pour différentes fonctions de réponse.....	24
Tableau 09 : Calcul des prédictions inverses pour la droite ayant subi une transformation logarithmique ou racine carrée.....	25
Tableau 10 : Critères de choix de la fonction de réponse.....	30
Tableau 11 : Ensemble d'étapes combinatoires permettant l'étude de la robustesse.....	33
Tableau 12 : Matériels du laboratoire de chimie analytique utilisés dans le présent travail.....	35
Tableau 13 : Résultats des tests de comparaison des deux pentes de régression (gamme standard et gamme matrice)	
Tableau 13.1 : Résultats obtenus sur la gamme standard.....	38
Tableau 13.2 : Résultats obtenus sur la gamme placebo chargé.....	38
Tableau 13.3 : Comparaison des pentes.....	39
Tableau 14 : Résultats obtenus pour la fonction $y = ax + b$	39
Tableau 15 : Résultats obtenus pour la fonction $\ln Y = f(\ln X)$	40
Tableau 16 : Résultats obtenus pour la fonction $\sqrt{Y} = f(\sqrt{X})$	41
Tableau 17 : Modèles d'étalonnage triés par indices d'exactitude.....	43
Tableau 18 : Alignement des réponses observées avec les trois séries des standards de validation	
Tableau 18.1 : Alignement des réponses observées avec la série 1.....	44
Tableau 18.2 : Alignement des réponses observées avec la série 2.....	45
Tableau 18.3 : Alignement des réponses observées avec la série 3.....	45
Tableau 19 : Prédictions inverses obtenues pour les standards de validation.....	46
Tableau 20 : Justesse calculée pour chaque niveau de concentration des standards de validation.....	46
Tableau 21 : Fidélité calculée pour chaque niveau de concentration des standards de validation.....	47

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 22 : Résultats de calcul de l'exactitude.....	47
Tableau 23 : Calcul de l'erreur totale pour chaque niveau de concentration des standards de validation	48
Tableau 24 : Calcul des limites de tolérance pour chaque niveau de concentration j.....	49
Tableau 25 : Matrice des effets d'un plan factoriel 2^3	51
Tableau 26 : Plan d'expérience à trois facteurs et calcul de l'écart type	52
Tableau 27 : Calcul des limites de confiance pour les effets des paramètres.....	53

LISTE DES FIGURES

Figure 01 : Mécanismes d'action du diclofénac de sodium.....	06
Figure 02 : Conception générale d'un fondoir.....	12
Figure 03 : Logigramme permettant de sélectionner un protocole de validation.....	21
Figure 04 : Chromatogramme d'un standard d'étalonnage niveau 100%.....	37
Figure 05 : Chromatogramme d'un standard de validation niveau 100%.....	37
Figure 06 : Courbes d'étalonnage obtenues avec les trois séries des standards d'étalonnage.....	40
Figure 07 : Courbes d'étalonnages $\text{Ln}Y=f(\text{Ln}X)$ obtenues sur les trois séries des SE.....	41
Figure 08 : Courbes d'étalonnages $\sqrt{Y} = f(\sqrt{X})$ obtenues avec les trois séries des SE.....	42
Figure 09 : Profil de l'erreur relative totale.....	48
Figure 10 : Tracé du profil d'exactitude.....	49
Figure 11 : Profil de linéarité entre les concentrations trouvées et les concentrations introduites.....	50

INTRODUCTION GENERALE

Le diclofénac de sodium est un anti-inflammatoire non stéroïdien appartenant à la famille chimique des arylcarboxyliques. Il est utilisé pour ses propriétés antalgiques et anti-inflammatoires.

Vu son importante utilisation, plusieurs techniques analytiques comme la spectrophotométrie, la chromatographie sur couche mince, la chromatographie liquide de haute performance et la potentiométrie directe par des électrodes sélectives ont été utilisées pour son dosage dans les formulations pharmaceutiques.

Toute nouvelle méthode mise au point doit faire l'objet d'une validation, exigence réglementaire, avant sa mise en routine, cette dernière est basée sur un ensemble de mesures expérimentales et des tests statistiques qui permettent de prouver qu'une procédure est suffisamment exacte et fiable et de garantir aux laboratoires et aux autorités compétentes les résultats fournis. Actuellement, de nouvelles tendances et de nouveaux concepts scientifiques apparaissent afin de faire évoluer la validation des méthodes analytiques, avec notamment l'apparition de l'utilisation du profil d'exactitude comme outil de décision.

Le contenu de notre mémoire élaboré est réparti en deux grandes parties, lesquelles sont scindées en chapitres :

La première partie comprend une synthèse bibliographique composée de trois chapitres :

Chapitre I : diclofénac de sodium

Chapitre II : suppositoires

Chapitre III : validation analytique

La deuxième partie est consacrée à la pratique qui comprend la mise au point et la validation d'une méthode de dosage du diclofénac de sodium dans les suppositoires à 100 mg par HPLC.

OBJECTIFS

L'objectif de notre étude est de mettre au point et de valider une technique analytique de dosage du diclofénac de sodium dans les suppositoires à 100 mg par Chromatographie Liquide Haute Performance (HPLC) en vue d'être appliquée en routine, en utilisant le profil d'exactitude comme outil de décision. Approche harmonisée décrite dans le guide de validation élaboré par une commission de la Société Française des Sciences Techniques et Pharmaceutiques (SFSTP) publié dans la revue STP Pharma Pratique en janvier 2006.

La partie pratique de ce travail s'étale sur une période de deux mois.

PARTIE THEORIQUE

CHAPITRE I

DICLOFENAC DE SODIUM

Introduction

Le diclofénac de sodium appartient à la famille des AINS (Anti Inflammatoires Non Stéroïdiens) : ce sont des médicaments symptomatiques s'opposant au processus inflammatoire quelle qu'en soit la cause (mécanique, chimique, infectieuse, immunologique). Ils possèdent des propriétés anti-inflammatoires, antalgiques et antipyrétiques [1].

1. Définition

Les AINS sont regroupés en plusieurs familles chimiques qui possèdent certaines particularités. On distingue ainsi :

- Les salicylés ;
- Les indoliques ;
- Les oxicams ;
- Les fénamates ;
- Les coxibs (inhibiteurs sélectifs de la cyclo-oxygénase2) ;
- Les pyrazolés ;
- les arylcarboxyliques [1].

Le diclofénac est un arylcarboxylique de formule brute $C_{14}H_{11}Cl_2NO_2$, médicament inscrit dans les pharmacopées mondiales sous diverses appellations [2]. Il est disponible sous plusieurs formes : orale, injectable (IM, IV), rectale, cutanée, collyre et à différentes doses : 25 mg, 50 mg, 75 mg et 100 mg [3].

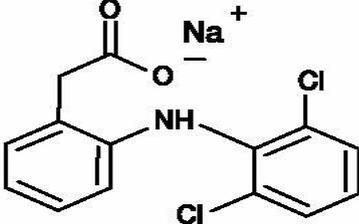
Les AINS agissent sur les signes locaux de l'inflammation : rougeur, chaleur, douleur et œdème. En outre, tous les AINS possèdent, à côté de leur action anti-inflammatoire, une action antalgique et antipyrétique [1].

2. Propriétés

2.1. Physicochimiques

Les propriétés physicochimiques du diclofénac de sodium sont résumées dans le tableau 01 suivant :

Tableau 01: Propriétés physicochimiques du diclofénac de sodium [4].

DCI	diclofénac de sodium
Nom chimique	[2-[2,6-dichlophényl) 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	environ 280°C, avec décomposition
Solubilité	assez soluble dans l'eau, faiblement soluble dans le méthanol, soluble dans l'éthanol à 96%, peu soluble dans l'acétone.
Aspect	poudre cristalline blanche, ou faiblement jaunâtre, faiblement hygroscopique.

2.2. Pharmacologiques

2.2.1. Pharmacocinétique

2.2.1.1. Absorption

Sous forme de suppositoire, le diclofénac de sodium est rapidement absorbé. Sa biodisponibilité est de l'ordre de 50%. Après administration d'un suppositoire à 100 mg, le pic de concentration plasmatique est atteint en 1 heure et se situe vers 2 mg/l.

2.2.1.2. Distribution

Le diclofénac de sodium est fortement lié aux protéines plasmatiques (taux de liaison > 99 %).

Dans le plasma, la décroissance des concentrations du diclofénac est bi-phasique. Elle correspond à une phase rapide de distribution tissulaire et une phase plus lente d'élimination.

Le diclofénac diffuse dans le liquide synovial où les concentrations maximales sont mesurées 2 à 4 heures après le pic plasmatique. Sa demi-vie apparente d'élimination du liquide synovial est de 3 à 6 heures. Le diclofénac passe en faible quantité dans le lait maternel.

2.2.1.3. Métabolisme

Le diclofénac de sodium est métabolisé rapidement. Ce métabolisme est pratiquement total. Il est essentiellement hépatique.

Les principales voies de métabolisation sont l'hydroxylation et la glucuroconjugaison. Les métabolites obtenus sont dénués d'activité pharmacologique.

2.2.1.4. Excrétion

L'excrétion est à la fois urinaire et fécale. Moins de 1% du principe actif est éliminé inchangé dans les urines. Environ 60% de la quantité administrée est éliminée sous forme de métabolites dans les urines, le reste est éliminé dans les fécès.

La demi-vie d'élimination plasmatique du diclofénac inchangé se situe autour de 1 à 2 heures. La clairance plasmatique totale est d'environ 263 ml/minute [5].

2.2.2. Pharmacodynamiques

- Action antipyrétique : les AINS diminuent la fièvre d'origine infectieuse, inflammatoire ou néoplasique, en s'opposant à la synthèse des prostaglandines PGE2 induites par les cytokines dans le centre de la thermorégulation qui est l'hypothalamus.

- Action antalgique : cette action est surtout marquée pour les douleurs de l'appareil locomoteur : (ostéoarticulaires, musculaires, tendino-ligamentaires), les douleurs postopératoires, dentaires, les céphalées, les dysménorrhées, les coliques hépatiques ou néphrétiques.

- Action anti- inflammatoire : cette action, très intriquée avec les deux précédentes, requiert des posologies plus élevées notamment avec l'aspirine et les dérivés propioniques [1].

3. Mécanisme d'action

Le mécanisme d'action commun de tous les AINS est la diminution de la production des prostaglandines, directement impliquées dans l'inflammation, la douleur et l'hyperthermie, du fait de l'inhibition de la cyclo-oxygénase (COX) [1]. La plupart des AINS sont des acides organiques qui agissent comme des inhibiteurs réversibles de la COX. Il y aura compétition entre le substrat naturel (acide arachidonique) et l'AINS sur le site actif de l'enzyme. Les AINS se fixent sur le même site hydrophobe que l'acide arachidonique sur l'enzyme [6,7].

La figure 01 ci-dessous illustre le mécanisme d'action du diclofénac de sodium :

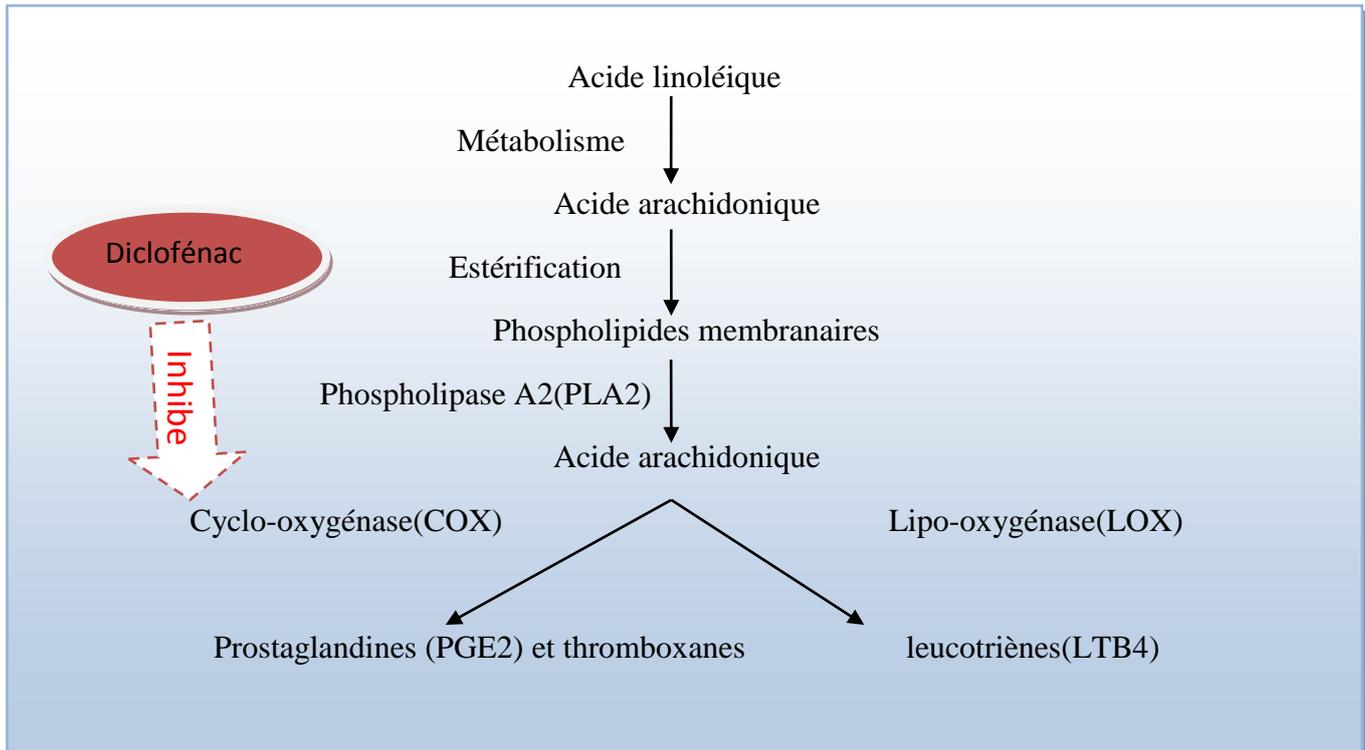


Figure 01 : Mécanisme d'action du diclofénac de sodium.

4. Posologies et indications thérapeutiques

4.1. Posologie

Diclofénac sodique 100 mg, suppositoire :

- Traitement d'attaque : 150 mg en 2 prises, soit 1 suppositoire à 100 mg, à compléter avec une forme orale à 50 mg.
- Traitement d'entretien (ou d'emblée chez certains malades) : 1 suppositoire à 100 mg par jour, le soir au coucher.

Durée d'administration : L'utilisation de la voie rectale doit être la plus courte possible en raison du risque de toxicité locale surajoutée aux risques par voie orale [8].

4.2. Indications

Elles découlent de l'activité anti-inflammatoire du diclofénac, de l'importance des manifestations d'intolérance auxquelles le médicament donne lieu et de sa place dans l'éventail des produits anti-inflammatoires actuellement disponibles.

Chez l'adulte et à partir de 15 ans, elles sont limitées au :

- Traitement symptomatique au long terme de :

-Rhumatismes inflammatoires chroniques, notamment polyarthrite rhumatoïde, spondylarthrite ankylosante ou syndromes apparentés tels que le syndrome de Fiessinger - Leroy-Reiter et rhumatisme psoriasique ;
- Certaines arthroses douloureuses et invalidantes.

- Traitement symptomatique de courte durée des poussées aiguës de:

- Rhumatismes abarticulaires (épaules douloureuses aiguës, tendinites, bursites) ;
- Arthrites microcristallines ;
- Arthroses ;
- Lombalgies, radiculalgies sévères [5].

5. Effets indésirables

Des études cliniques et des données épidémiologiques suggèrent que l'utilisation du diclofénac de sodium, surtout lorsqu'il est utilisé à dose élevée (150 mg par jour) et sur une longue durée de traitement, peut être associée à une légère augmentation du risque d'évènement thrombotique artériel (par exemple, infarctus du myocarde ou accident vasculaire cérébral). Les effets indésirables les plus fréquemment observés sont de nature gastro-intestinale. Des ulcères peptiques, perforations ou hémorragies gastro-intestinales, parfois fatales, peuvent survenir, en particulier chez le sujet âgé.

Des nausées, vomissements, diarrhées, flatulences, constipation, dyspepsie, stomatite ulcéreuse, douleur abdominale, melæna, hématurie, exacerbation d'une recto-colite ou d'une maladie de Crohn ont été rapportées à la suite de l'administration d'AINS. Moins fréquemment, des gastrites ont été observées [5].

6. Contre-indications

- Au-delà de 24 semaines d'aménorrhée (5 mois de grossesse) toute prise ponctuelle du diclofénac est contre indiquée ;
- Les AINS passent dans le lait maternel par mesure de précaution il convient d'éviter de les administrer chez la femme qui allaite ;
- Antécédents d'allergie ou d'asthme déclenché par la prise du diclofénac ou de substance d'activité proche, tel qu'autres AINS, aspirine ;
- Hypersensibilité à l'un des excipients ;
- Ulcère gastroduodénal en évolution ;
- Insuffisance hépatocellulaire sévère ;
- Insuffisance rénale sévère ;
- Insuffisance cardiaque sévère non contrôlée ;
- Enfants de moins de 15 ans ;
- Antécédents récents de rectites ou de rectorragies [2].

7. Interactions médicamenteuses

Les principales interactions médicamenteuses du diclofénac sont résumées dans le tableau 02 suivant :

Tableau 02 : Interactions médicamenteuses [9].

Médicaments	Effets
Sels de potassium, diurétiques hyperkaliémiants, IEC, ARA II.	Risque d'hyperkaliémie
Autres AINS	Majoration du risque ulcérogène et hémorragique digestif
Anticoagulants oraux et héparines non fractionnées	Augmentation du risque hémorragique de l'anticoagulant
Lithium	Hyperlithémie par diminution de l'excrétion rénale du lithium
Méthotrexate	Toxicité hématologique majorée

8. Toxicité

Les études de toxicité aiguë, de toxicité en administration répétée, de génotoxicité et de carcinogénèse n'ont pas révélé de risque lié à l'utilisation du diclofénac aux doses thérapeutiques chez l'Homme. Il n'a pas été décelé de potentiel tératogène au diclofénac chez la souris, le rat ou le lapin. Le diclofénac n'a pas eu d'effet sur la fertilité chez le rat; le développement prénatal, périnatal et postnatal de la descendance n'a pas été affecté.

8.1. Surdosage

8.1.1. Symptômes

- Céphalées, agitation motrice, secousses musculaires, irritabilité accrue, ataxie, vertiges;
- Convulsions surtout chez l'enfant en bas âge;
- Douleurs épigastriques, nausées, vomissements, hématomèse, diarrhée, ulcère gastroduodéal;
- Troubles de la fonction hépatique;
- Oligurie.

8.1.2. Conduite à tenir

- Transfert immédiat en milieu hospitalier spécialisé;
- Traitement symptomatique: accélération d'élimination, dialyse en cas d'intoxication grave s'accompagnant d'insuffisance rénale, diazépam ou phénobarbital en cas de convulsions [5].

CHAPITRE II

SUPPOSITOIRES

Introduction

L'industrie pharmaceutique moderne dispose de différentes voies d'administration et formes pharmaceutiques dans le but de délivrer les principes actifs au site d'action. Parmi ces voies, la voie orale est la plus employée avec en particulier l'usage des formes comprimé et gélule. À ses côtés, on trouve les voies topique, parentérale, et rectale. Cette dernière est l'une des plus anciennes voies d'administration avec comme principales formes pharmaceutiques, les lavements et les suppositoires [10].

1. Historique

Les formes rectales sont parmi les plus anciennes formes pharmaceutiques puisque leur usage remonte à l'Antiquité avec des mentions dans l'Ancien Testament ou les textes d'Hippocrate. La première forme rectale fut le lavement puis le suppositoire dont le nom vient du latin *supponere* qui veut dire « à la place du » lavement. Les premiers suppositoires étaient constitués de formes solides (corne, miel cuit, gland, etc.) imprégnés dans des préparations médicamenteuses. Cependant, il faut attendre le 19^{ième} siècle pour que la forme suppositoire devienne une véritable forme pharmaceutique moderne par l'utilisation du beurre de cacao comme vecteur puis par l'introduction de la substance active dans la préparation fondue avant moulage [10].

2. Définition

La Pharmacopée Européenne (PE) définit le suppositoire comme étant « une préparation unitaire solide dont la forme, le volume et la consistance sont adaptés à l'administration rectale. Les suppositoires peuvent contenir une ou plusieurs substances actives dispersées ou dissoutes dans la masse suppositoire. Ces masses sont soit hydrophiles et se dissolvent ou se dispersent au contact de l'eau de l'ampoule rectale, soit lipophiles et fondent à la température rectale ». Les masses pour suppositoire référencées dans la PE sont les macrogols et les mélanges gélatineux, pour les masses hydrophiles, et les glycérides hémi synthétiques et le beurre de cacao, pour les masses lipophiles [10].

3. Excipients utilisés pour la fabrication des suppositoires

Les suppositoires peuvent contenir un ou plusieurs principes actifs dispersés ou dissous dans un excipient simple ou composé qui est, suivant le cas, soluble ou dispersible dans l'eau ou qui fond à la température du corps. D'autres excipients tels que des agents diluants, absorbants, tensioactifs, lubrifiants, des conservateurs antimicrobiens et des matières colorantes autorisées peuvent éventuellement être utilisés [11].

3.1. Propriétés

Les caractéristiques requises d'un excipient pour la fabrication des suppositoires doivent être adaptées aux caractéristiques de l'ampoule rectale :

- Température de fusion proche de 37 °C et la capacité de se dissoudre ou se disperser dans les fluides de l'ampoule rectale pour une libération rapide et totale du principe actif dans le rectum.
- Innocuité et bonne tolérance vis-à-vis de la muqueuse rectale ;
- Inertie vis-à-vis des médicaments incorporés. Certaines incompatibilités avec les principes actifs peuvent être dues aux impuretés des excipients ;
- Consistance convenable : il ne doit être ni trop mou, ni trop cassant. Pour la fabrication, la zone de solidification doit être aussi réduite que possible pour assurer une prise en masse rapide et il doit se rétracter au refroidissement pour faciliter le démoulage ;
- Capacité d'étalement sur la muqueuse pour favoriser l'absorption du principe actif ;
- Bonne conservation [10,11].

Les excipients correspondants à ces caractéristiques techniques sont limités en nature et en nombre et doivent également répondre à des critères économiques, industriels et réglementaires. Ainsi, ils doivent être facilement disponibles et avoir un prix raisonnable [10].

3.2. Classification des excipients

Les excipients utilisés pour la fabrication des suppositoires peuvent être classés en deux catégories principales :

3.2.1 Excipients lipophiles

Ce sont les excipients les plus utilisés, ils fondent dans le rectum à une température qui avoisine 37°C.

3.2.1.1. Beurre de cacao

De moins en moins utilisé, le beurre de cacao est solide et suffisamment dur à température ordinaire pour permettre une manipulation facile. La zone de ramollissement est assez courte puisqu'elle est d'environ 3°C. La présence d'une proportion importante d'acide oléique dans sa composition explique que sa conservation ne soit pas parfaite.

Il ne permet pas l'incorporation de solutions aqueuses sans recours à des adjuvants et présente de façon marquée la possibilité de transformation en plusieurs variétés allotropiques à propriétés physiques différentes, d'où la nécessité de précautions particulières dans la préparation par fusion des suppositoires. Des trois formes α , β et β II, seule la forme β est stable et fond à 32-35°C ; les autres fondent à des températures plus basses ce qui les rend inutilisables [11].

3.2.1.2. Huiles hydrogénées

En mélangeant des huiles naturelles et en réglant le degré d'hydrogénation, on obtient des produits cireux ressemblant au beurre de cacao et fondant aux environs de 33 à 37°C. Convenablement choisis, ils possèdent les avantages cités pour le beurre de cacao.

Ils présentent de plus l'avantage de s'oxyder moins facilement. Comme dans le cas du beurre de cacao, on ne peut y incorporer directement des solutions aqueuses [11].

3.2.1.3. Glycérides hémi-synthétiques solides

Ces excipients sont aussi des huiles hydrogénées mais contiennent une certaine quantité de mono et de di-glycérides qui permettent l'incorporation de petites quantités de solutions aqueuses de médicaments. Ils sont très employés en milieu industriel, sur le marché on trouve les marques suivantes : witepsol[®], suplocire[®], estarinum[®] [11].

3.2.1.4. Macrogols glycérides saturés

Ces excipients encore plus hydrophiles facilitent dans certains cas le passage des principes actifs à travers la muqueuse rectale [11].

3.2.2. Excipients hydrosolubles

Le mélange gélatine-glycérine est bien hydrosoluble mais ne peut être considéré comme un excipient du fait de l'action laxative de la glycérine.

Dans cette catégorie d'excipients, on y retrouve les macrogols ou les polyoxyéthylène-glycols (PEG) qui ont une consistance suffisante pour être mis sous forme de suppositoires. La dispersion des principes actifs est due à la dissolution et non à la fusion de l'excipient qui fond au-dessus de 40°C.

Ils ont l'avantage d'avoir une bonne stabilité thermique comme les glycérides mais ils présentent deux inconvénients : d'une part celui d'être incompatibles avec un certain nombre de principes actifs (barbituriques, pénicilline...) et d'autre part celui d'avoir une action irritante sur la muqueuse rectale. Ils sont peu utilisés [11].

4. Production des suppositoires

La fabrication des suppositoires fait appel au procédé par fusion et coulée. Il existe un autre procédé par compression qui n'est plus utilisé [11].

Le principe consiste à rendre le mélange principe actif et excipient suffisamment fluide par action de la chaleur et coulée dans les alvéoles appropriés, ensuite la solidification du suppositoire par refroidissement [11].

4.1. Traitement des principes actifs

- Si le PA est soluble dans l'excipient, il n'y a pas de traitements particuliers à lui faire subir.
- Si le PA est insoluble, il faut l'amener à un degré de ténuité convenable, d'une part pour qu'il ne se produise pas de sédimentation pendant la coulée dans les moules et, d'autre part, pour que la dissolution se fasse facilement dans le liquide aqueux du rectum.
- Si le PA est insoluble dans l'excipient mais très soluble dans l'eau, il peut être mis en solution aqueuse. Celle-ci sera ensuite émulsionnée dans l'excipient fondu [11].

4.2. Traitement de l'excipient

La méthode courante consiste à faire fondre l'excipient à la température la plus basse possible et à incorporer ensuite les principes actifs.

Industriellement on a recours à des fondoirs. Le fondoir, comme illustré dans la figure 02, est une cuve en acier inoxydable à doubles parois entre lesquelles circule un fluide à température parfaitement réglée. La masse liquéfiée traverse une grille ou tamis, qui retient les morceaux d'excipients non fondus, avant d'être dirigée vers le mélangeur [11].

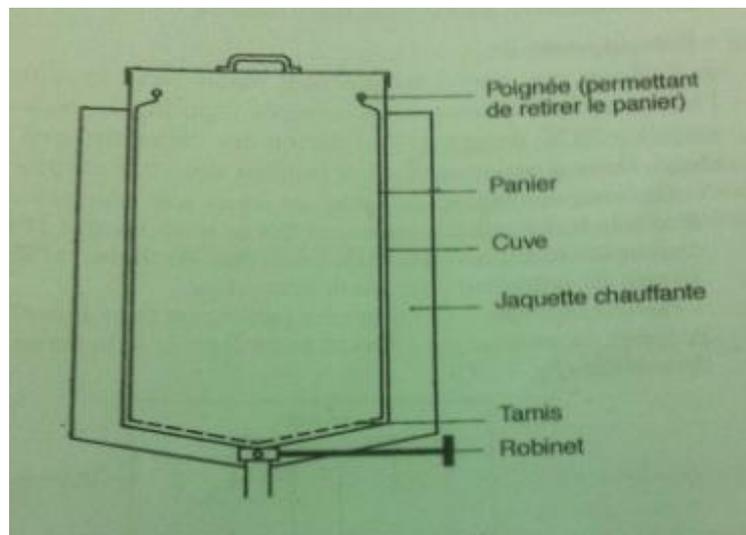


Figure 02 : Conception générale d'un fondoir.

4.3. Préparation de la masse

Excipient fondu et principe actif sont introduits dans un mélangeur en acier inoxydable dont la température est parfaitement réglée à 1°C près. Le mélange est assuré par un appareil mélangeur adapté aux constituants de la masse (agitateur rapide à hélice ou à turbine). La

dispersion faite, une agitation lente de toute la masse doit être assurée pendant toute la durée de la répartition dans les moules pour éviter toute sédimentation. Lorsque les principes actifs sont très volatils, il faut envisager l'emploi de cuves hermétiques [11].

4.4. Moulage des suppositoires

Deux procédés sont utilisés :

- Le moulage dans des moules métalliques (procédé officinal).
- Le moulage dans des moules-emballages en matière plastique à l'aide d'une pompe doseuse (procédé industriel) [11].

4.4.1. Moules – emballages :

Les suppositoires sont coulés à l'aide de pompes doseuses dans les moules qui leur serviront ensuite d'emballage. On évite ainsi l'opération délicate du démoulage. Les moules peuvent alors être en acétate de cellulose, en chlorure de polyvinyle non plastifié, en polyéthylène ou toute autre matière plastique thermoformable.

Les alvéoles, formés par soudure ou collage de deux feuilles de matière plastique convenablement moulées, sont remplis par injection. Après refroidissement, l'orifice supérieur est obturé à l'aide d'une bande adhésive.

Les formes les plus courantes de suppositoires sont la forme conique et la forme torpille. Il existe pour les enfants des suppositoires sécables et, pour éviter les incompatibilités, des suppositoires multicouches [11].

5. Avantages et inconvénients des suppositoires

Les avantages et les inconvénients des suppositoires sont cités dans le tableau 03 suivant :

Tableau 03 : Avantages et inconvénients des suppositoires [12].

Avantages	Inconvénients
<ul style="list-style-type: none"> - Permet l'administration de médicaments irritants pour le tube digestif ou altérés par les sucs digestifs ; - Facilité d'utilisation par les nourrissons ; - Résorption rapide du principe actif car le rectum est très vascularisé ; - Libération lente du principe actif et action durable. 	<ul style="list-style-type: none"> - De très nombreux principes actifs sont peu résorbés au niveau du rectum car la muqueuse est épaisse, la surface de contact est faible et contient peu de liquides ; - C'est une forme qui plait peu ; - Conservation au frais ; - Transport et prise difficiles dans la journée.

6. Mode d'action des suppositoires

Un suppositoire peut avoir une action mécanique, locale ou systémique.

L'action mécanique : est due à l'éveil d'un réflexe de défécation provoqué par la présence d'un corps étranger dans le rectum. Dans le cas des suppositoires à la glycérine, celle-ci par son hydrophilie attire de l'eau dans l'ampoule rectale et déclenche les mouvements péristaltiques et, ainsi, l'effet laxatif recherché.

L'action locale : peut être une action antihémorroïdale ou encore une action antiparasitaire, contre les oxyures par exemple.

L'action systémique : est la plus recherchée, le principe actif doit alors passer dans la circulation générale.

La muqueuse rectale a un pouvoir d'absorption semblable à celui de la muqueuse de l'intestin grêle mais la surface absorbante est limitée. Les principes actifs administrés par cette voie passent très rapidement dans la circulation sanguine par les veines hémorroïdales et aussi, mais en plus faible proportion dans la circulation lymphatique [11].

CHAPITRE III

VALIDATION ANALYTIQUE

Introduction

La validation analytique des méthodes employées en industrie pharmaceutique constitue une exigence réglementaire. Son champ d'application s'étend à toute procédure d'analyse utilisée dans le contrôle de la matière première, le développement galénique, le contrôle en cours de fabrication, le contrôle des produits intermédiaires et finis et les essais de stabilité de tous les produits pharmaceutiques.

1. Définition

La validation analytique est la procédure par laquelle on démontre, preuve expérimentale à l'appui, que les performances de la méthode permettent de répondre aux exigences de l'usage auquel elle est destinée. Elle est fondée sur une analyse statistique basée sur un certain nombre de critères [13].

2. But de la validation analytique

La validation analytique a pour principal objectif de fournir, aux laboratoires ainsi qu'aux autorités compétentes, les garanties qu'une méthode analytique donnée fournit 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 en industrie pharmaceutiques, qu'elles soient ou non décrites dans une pharmacopée, afin de minimiser le risque tant au niveau du producteur que du futur consommateur [14].

3. Aspect réglementaire et normatif

Les principaux référentiels qui décrivent les procédures de validation analytique sont les suivants :

- Les documents : ISO 17025 « Exigences générales concernant la compétence des laboratoires d'étalonnages et d'essais ». Et ISO 5725 « Exactitude (justesse et fidélité) des résultats et méthodes de mesures.

- Les documents ICH:

- ICH Q2A : Text on validation of analytical procedures “definitions and terminology” (1995);

- ICH Q2B : Text on validation of analytical procedures “methodology” (1997);

- ICH Q2 (R1) : Validation of analytical procedures: text and methodology (2005).

- Les documents FDA (Guidance for industry): validation of bioanalytical method (2001).
- Le guide de validation analytique-rapport d'une commission SFSTP :
 - Méthodologie 1992
 - Exemples d'application 1992
- la validation des procédures analytiques quantitatives : Harmonisation des démarches-Guide SFSTP :
 - Partie I : Généralités (2003)
 - Partie II : Statistiques (2006)
 - Partie III: Exemples d'application (2006)

4. Critères de validation

Les principaux critères de validation sont ceux couramment utilisés dans les laboratoires d'analyse et dont la nécessité de l'étude a fait l'objet d'un large consensus. Ces critères sont les suivants :

- Spécificité-sélectivité ;
- Exactitude ;
- Linéarité ;
- Fidélité ;
- Sensibilité ;
- Limite de détection ;
- Limite de quantification ;
- Robustesse.

Tous ces critères ne sont pas applicables à toutes les méthodes d'analyse (tableau 04). Cela dépend en grande partie du but de l'analyse [14].

Tableau 04 : Résumé des critères de validation en fonction du type d'analyse [13].

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

4.1. Spécificité-sélectivité

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

Une procédure d'analyse est dite spécifique lorsqu'elle permet de garantir que le signal mesuré provient seulement de la substance à analyser ou qu'elle permet de mesurer quantitativement un paramètre physicochimique ou un groupement fonctionnel d'une ou de plusieurs substance(s) dans l'échantillon.

En pratique, une procédure d'analyse doit convenir exclusivement à la caractéristique ou l'analyte, avec la garantie que le résultat de l'analyse ne provient que de l'analyte [14].

4.2. Exactitude

L'exactitude exprime l'étroitesse de l'accord entre le résultat d'essai et la valeur de référence acceptée, aussi appelée « valeur conventionnellement vraie ». L'étroitesse de l'accord ainsi observée est la résultante de la somme des erreurs systématique et aléatoire, en d'autres termes l'erreur totale liée au résultat. Par conséquent, l'exactitude est l'expression de la somme de la justesse et de la fidélité [14].

4.3. Linéarité

La linéarité d'une procédure d'analyse est sa capacité à l'intérieur d'un certain intervalle de dosage d'obtenir des résultats directement proportionnels à la quantité (exemple : concentration) en analyte dans l'échantillon [14].

4.4. 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 : la répétabilité, la fidélité intermédiaire (intra laboratoire) et la reproductibilité (inter laboratoire).

Les mesures quantitatives de la fidélité dépendent de façon critique des conditions stipulées. Peuvent ainsi être distinguées les conditions de :

- Répétabilité : conditions où les résultats d'essais indépendants sont obtenus par la même méthode sur des échantillons d'essais identiques dans le même laboratoire, par le même opérateur, utilisant le même équipement et pendant un court intervalle de temps ;
- Fidélité intermédiaire : conditions où les résultats d'essais indépendants sont obtenus par la même méthode sur des échantillons d'essais identiques dans le même laboratoire, avec différents opérateurs et utilisant des équipements différents et pendant un intervalle de temps donné ;
- Reproductibilité : conditions où les résultats d'essais sont obtenus par la même méthode sur des échantillons d'essais identiques dans différents laboratoires, avec différents opérateurs et utilisant des équipements différents [14].

4.5. Sensibilité

La sensibilité d'une procédure d'analyse peut être définie comme étant le rapport de la variation de la réponse de la méthode d'analyse à la variation de la quantité d'analyte.

Une procédure est dite sensible si une faible variation de la concentration ou de la quantité d'analyte entraîne une variation significative de la réponse [14].

4.6. Limite de détection

La limite de détection d'une procédure d'analyse est la plus petite quantité de l'analyte dans un échantillon pouvant être détectée, mais non quantifiée comme une valeur exacte dans les conditions expérimentales décrites de la procédure [14].

4.7. Limite de quantification

La limite de quantification est la plus petite quantité de l'analyte dans un échantillon pouvant être dosée dans les conditions expérimentales décrites avec une exactitude définie [14].

4.8. Robustesse

La robustesse d'une méthode est sa capacité à maintenir ses performances lorsqu'elle est soumise à de petites variations fortuites des conditions expérimentales, telles celles susceptibles de se produire lors de sa mise en œuvre par un autre opérateur, sur un autre matériel ou dans un autre laboratoire [13].

5. Etude statistique de la validation analytique

La validation de techniques d'analyses en chimie analytique passe par l'étude et la validation de plusieurs critères qui sont : spécificité, linéarité, exactitude, fidélité, limite de

quantification et de détection. Cette méthodologie est basée à la fois sur les critères décrits dans le guide élaboré par la SFSTP et ICH Q2(R1).

Le protocole SFSTP 2006 repose sur l'utilisation du profil d'exactitude, basé sur la notion d'erreur totale (erreur systématique + erreur aléatoire), permettant de simplifier l'approche de la validation d'une procédure analytique tout en contrôlant le risque associé à son utilisation [15].

5.1. Spécificité

5.1.1. Protocole

L'étude de la spécificité nécessite la préparation et l'analyse des solutions suivantes :

- Le diluant ;
- Une solution placebo ;
- Une solution standard à 100% (par rapport à la concentration théorique) ;
- Une solution échantillon (ou forme reconstituée ou placebo chargé) à 100% (par rapport à la concentration théorique) [16].

5.1.2. Etude statistique

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 le diclofénac de sodium.
- Soit par la comparaison de la droite obtenue avec la matrice (forme reconstituée) avec celle obtenue à partir de la gamme standard. Ceci tend à démontrer l'absence d'effet matrice (absence d'interactions entre le milieu et la substance à quantifier) [16].

Test t de Student

Si les pentes sur standard et sur la forme reconstituée sont comparables, leur différence ne doit pas être différente de zéro.

Ceci revient donc à comparer une valeur observée ($a_1 - a_2$) à une valeur théorique (zéro) connaissant l'erreur totale (l'écart type) faite sur a_1 et a_2 .

$$t_{\text{calculé}} = \frac{|a_1 - a_2|}{\sqrt{\sigma_{a1}^2 + \sigma_{a2}^2}}$$

Le $t_{\text{calculé}}$ est comparé à la valeur $t^\circ(\alpha ; n_1+n_2-4)$ lue sur la table de Student.

Si $t_{\text{calculé}} < t^\circ$, les pentes sont comparables donc absence d'effet matrice : la méthode est spécifique [16].

Avec :

- a_1 et a_2 : pentes respectives des droites de régression D1 (obtenue à partir de la gamme standard) et D2 (obtenue à partir de la gamme placebo chargé).
- σ_{a1}^2 et σ_{a2}^2 : variances respectives des pentes a_1 et a_2 .
- α : risque d'erreur accepté (5%).
- n_1 et n_2 : nombre d'échantillon réalisé pour la forme standard et la forme placebo chargé.
- n_1+n_2-4 : degré de liberté (ddl).

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, utilisés 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, utilisés 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 inférieure et supérieure 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 03 suivante, présente la démarche proposée dans le guide SFSTP 2003 pour sélectionner un protocole expérimental de validation en fonction des contraintes ou des spécificités liées à la procédure de dosage sous épreuve.

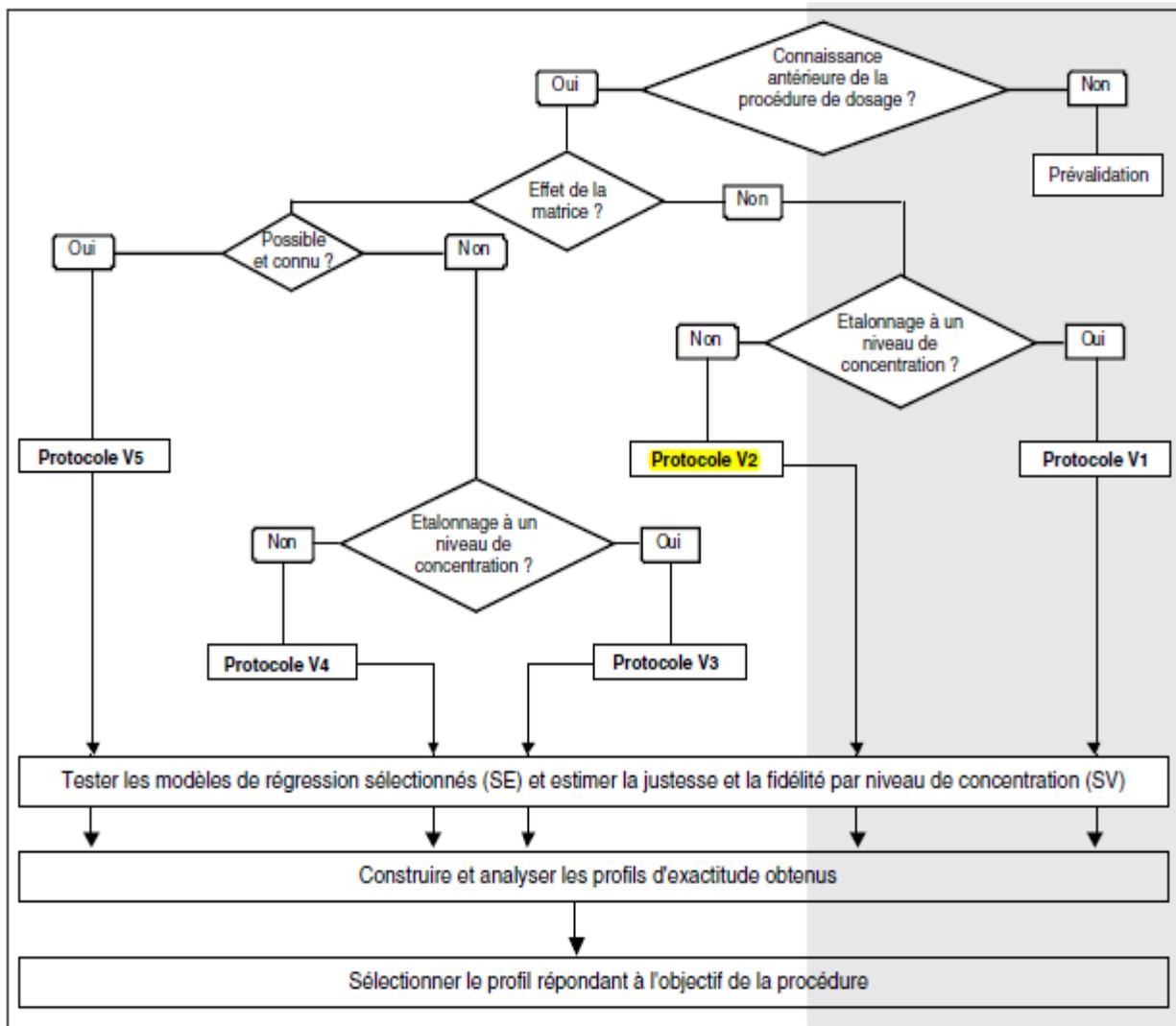


Figure 03 : Logigramme permettant de sélectionner un protocole de validation [14].

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

Le tableau 05 suivant présente selon le protocole choisi, le nombre total d'essai à réaliser pour valider la procédure analytique concernée :

Tableau 05 : Choix du nombre de standards d'étalonnage et de validation en fonction du protocole choisi [14].

Standards	Niv. de conc.	Protocole				
		V1	V2	V3	V4	V5
SE. Etalonnage sans la matrice	Bas	2	2	2	2	2
	Médian	2	2 ⁽²⁾	2	2 ⁽²⁾	2
SE. Etalonnage avec la matrice	Bas				2	2
	Médian			2	2 ⁽²⁾	2 ⁽²⁾
SV. Validation avec la matrice	Haut			2 ⁽³⁾	2	2
	Addit.					2 ⁽³⁾
Nbre minimum séries Nbre total essais (min.)	Bas	3	3	3	3	3
	Médian	3	3	3	3	3
	Haut	3	3	3	3	3
Nbre minimum séries Nbre total essais (min.)		33	45	39	63	45

Le protocole adopté dans notre étude est le V2 modifié : en utilisant cinq niveaux de concentrations au lieu de trois pour les SE et les SV.

5.2. Fonction de réponse

Une fois les expériences réalisées et les données collectées, il convient tout d'abord de déterminer, sur la base des standards d'étalonnage (SE), la relation entre la réponse (signal ou réponse de l'instrument) Y et la quantité (concentration) X . Cette relation se caractérise à l'aide d'une fonction f qui doit être strictement monotone (strictement croissante ou décroissante) sur l'intervalle de dosage envisagé:

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

Où ε est l'erreur associée à la fonction de réponse f appelée communément erreur résiduelle. Il faut donc ajuster la fonction de réponse, c'est-à-dire évaluer les paramètres du modèle, de manière à ce que l'erreur résiduelle soit minimisée.

Différentes fonctions de réponse peuvent être envisagées lors de la validation de la méthode, comme illustré au tableau 06. Le choix dépend du type de méthode (méthode physicochimique, bioanalytique, immunodosage) [15].

Tableau 06 : Exemples de fonctions de réponses [15].

Type	Equation	Paramètres/Parameters	Linéaire/Linear
Droite passant par l'origine/ Straight line through	$Y = \beta X$	β	oui/yes
Droite/Straight line	$Y = \alpha + \beta X$	α, β	oui/yes
Fonction quadratique/ Quadratic function	$Y = \alpha + \beta X + \gamma X^2$	α, β, γ	oui/yes
Fonction logistique à 4 paramètres/4-parameter logistic function	$Y = \alpha + \frac{\delta - \alpha}{1 + \left(\frac{X}{\gamma}\right)^\beta}$	$\alpha, \beta, \gamma, \delta$	non/no
Fonction logistique à 5 paramètres/5-parameter logistic function	$Y = \alpha + \frac{\delta - \alpha}{\left[1 + \left(\frac{X}{\gamma}\right)^\beta\right]^\psi}$	$\alpha, \beta, \gamma, \delta, \psi$	non/no

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

Des transformations mathématiques sont également envisageables. 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 06 [15].

5.3. Alignement des observations

Si, pour un niveau de concentration, les quantités introduites ne sont pas identiques pour toutes les séries (souvent pour de 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 fonction de réponses obtenues avec les standards d'étalonnage. Ainsi l'alignement des n_{ij} répétitions du niveau de concentration j de la série i s'effectue comme suit :

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

Où : \bar{x}_{ij} : Moyenne des concentrations introduites du niveau j de la série i.

x_{ijk} : Concentration introduite du niveau j de la série i répétition k.

En résumé, pour les différentes fonctions de réponse (tableau 07) :

Tableau 07 : Règles d'alignement pour différentes fonctions de réponses [15].

Fonction de réponse/Response function	Règle d'alignement/alignment rule
Droite passant par l'origine/Straight line through the origin	$y_{ijk,c} = y_{ijk} + \hat{\beta}_i [\bar{x}_{ij} - x_{ijk}]$
Droite/Straight line	$y_{ijk,c} = y_{ijk} + \hat{\beta}_i [\bar{x}_{ij} - x_{ijk}]$
Fonction quadratique/Quadratic function	$y_{ijk,c} = y_{ijk} + \hat{\beta}_i [\bar{x}_{ij} - x_{ijk}] + \hat{\gamma}_i [\bar{x}_{ij}^2 - x_{ijk}^2]$
Logistique à 4 paramètres/4-parameter logistic	$y_{ijk,c} = y_{ijk} + (\hat{\delta}_i - \hat{\alpha}_i) \left(\frac{1}{1 + \left(\frac{\hat{\gamma}_i}{\bar{x}_{ij}}\right)^{\hat{\beta}_i}} - \frac{1}{1 + \left(\frac{\hat{\gamma}_i}{x_{ijk}}\right)^{\hat{\beta}_i}} \right)$

5.4. Prédiction inverses

Après avoir choisi le modèle mathématique adéquat des concentrations en retour avec la fonction de réponse sont calculées.

Les prédictions inverses pour les différents modèles de régression s'obtiennent comme suit (tableau 08).

Tableau 08 : Calcul des prédictions inverses pour différentes fonctions de réponses [15].

Fonction de réponse/ Response function	Concentration calculée/ concentration calculated
Droite passant par l'origine/ Straight line through the origin	$x_{ijk,calc} = \frac{y_{ijk}}{\hat{\beta}_i}$
Droite/Straight line	$x_{ijk,calc} = \frac{y_{ijk} - \hat{\alpha}_i}{\hat{\beta}_i}$
Fonction quadratique/ Quadratic function	$x_{ijk,calc} = \frac{-\hat{\beta}_i + \sqrt{\hat{\beta}_i^2 - 4\hat{\gamma}_i(\hat{\alpha}_i - y_{ijk})}}{2\hat{\gamma}_i}$
Logistique à 4 paramètres/ 4-parameter logistic	$x_{ijk,calc} = \hat{\gamma}_i \left(\frac{\hat{\delta}_i - \hat{\alpha}_i}{y_{ijk} - \hat{\alpha}_i} - 1 \right)^{\frac{1}{\hat{\beta}_i}}$
Logistique à 5 paramètres/ 5-parameter logistic	$x_{ijk,calc} = \hat{\gamma}_i \left(\left(\frac{\hat{\delta}_i - \hat{\alpha}_i}{y_{ijk} - \hat{\alpha}_i} \right)^{\frac{1}{\hat{\psi}_i}} - 1 \right)^{\frac{1}{\hat{\beta}_i}}$

Si les observations ont été alignées, il faut remplacer les y_{ijk} par $y_{ijk,c}$ dans le tableau précédent.

Si une transformation a été utilisée il ne faut pas oublier d'effectuer la transformation inverse après ce calcul en retour (tableau 09). Par exemple, après une transformation logarithmique ou racine carrée de la droite les concentrations calculées se font de la manière suivante :

Tableau 09 : Calcul des prédictions inverses pour la droite ayant subi une transformation logarithmique ou racine carrée [15].

Fonction de réponse/ Response function	Concentration calculée (logarithme)/ calculated concentration (logarithm)	Concentration calculée (racine carrée)/ calculated concentration (square root)
Droite/Straight line	$x_{ijk,calc} = e^{\frac{\ln(y_{ijk}) - \hat{a}_i}{\hat{b}_i}}$	$x_{ijk,calc} = \left(\frac{\sqrt{y_{ijk}} - \hat{a}_i}{\hat{b}_i} \right)^2$

5.5. Calcul de la justesse et de la fidélité

5.5.1. Modèle

La justesse d'une méthode analytique exprime l'étroitesse de l'accord entre la moyenne des résultats d'essai avec la méthode et la valeur de référence acceptée, aussi appelée valeur conventionnellement vraie.

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. 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 -ième concentration calculée du niveau j de la i -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 -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 $\sigma_{B,j}^2$.
- ε_{ijk} est l'erreur expérimentale, considérée comme une variable aléatoire ayant une distribution normale de moyenne 0 et de variance $\sigma_{W,j}^2$.

L'erreur expérimentale est supposée indépendante de la série.

Les variances $\sigma_{B,j}^2$ et $\sigma_{W,j}^2$ 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 $\sigma^2_{W,j}$ du modèle.

$$\hat{\mu}_j = \frac{1}{\sum_{i=1}^p n_{ij}} \sum_{i=1}^p \sum_{k=1}^{n_{ij}} x_{ijk,calc}$$

$$MSM_j = \frac{1}{p_1 - 1} \sum_{i=1}^p n_{ij} (\bar{x}_{ij,calc} - \bar{x}_{j,calc})^2$$

$$MSE_j = \frac{1}{\sum_{i=1}^p n_{ij} - p} \sum_{i=1}^p \sum_{k=1}^{n_{ij}} (x_{ijk,calc} - \bar{x}_{ij,calc})^2$$

Où : MSM_j et MSE_j : maximum des vraisemblances pour chaque niveau de concentration j .

$\bar{x}_{ij,calc}$: moyenne des concentrations calculées du niveau j de la série i .

$\bar{x}_{j,calc}$: moyenne des concentrations calculées du niveau j .

$\bar{x}_{ijk,calc}$: concentration calculée du niveau j de la série i répétition k .

n : nombre de répétitions.

p : nombre de série.

Dans le cas d'un schéma équilibré (le nombre de répétitions est identique pour tout niveau de concentration dans chaque série), les composantes de la variance du niveau sont estimées comme suit (n étant le nombre de répétition dans chaque série) [15].

Si $MSE_j < MSM_j$ alors :

$$\hat{\sigma}_{W,j}^2 = MSE_j$$

$$\hat{\sigma}_{B,j}^2 = \frac{MSM_j - MSE_j}{n}$$

Sinon :

$$\hat{\sigma}_{W,j}^2 = \frac{1}{pn - 1} \sum_{i=1}^p \sum_{j=1}^k (x_{ijk,calc} - \bar{x}_{j,calc})^2$$

$$\hat{\sigma}_{B,j}^2 = 0$$

5.5.2. 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, comme suit:

$$\begin{aligned} \text{biais}_j &= \bar{\mu}_j - \bar{x}_j \\ \text{biais } (\%)_j &= \frac{\bar{\mu}_j - \bar{x}_j}{\bar{x}_j} \times 100 \\ \text{recouvrement } (\%)_j &= \frac{\bar{\mu}_j}{\bar{x}_j} \times 100 \end{aligned}$$

Où : $\bar{\mu}_j$: moyenne des concentrations calculées du niveau j.

\bar{x}_j : moyenne des concentrations introduites du niveau j.

5.5.3. 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 :

Répétabilité : $\hat{\sigma}_{\text{Re},j}^2 = \hat{\sigma}_{\text{w},j}^2$

Fidélité intermédiaire : $\hat{\sigma}_{\text{IP},j}^2 = \hat{\sigma}_{\text{w},j}^2 + \hat{\sigma}_{\text{B},j}^2$ [15].

5.6. Calcul de l'exactitude

L'exactitude d'un résultat 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:

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

Avec => x : concentration prédite

μ : concentration introduite

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 [15].

5.6.1. 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 :

$$\begin{array}{c}
 x = \mu + |\text{biais}|_{\text{procédure}} + \text{fidélité intermédiaire}_{\text{procédure}} \\
 \updownarrow \\
 x - \mu = |\text{biais}|_{\text{procédure}} + \text{fidélité intermédiaire}_{\text{procédure}} \\
 \updownarrow \\
 x - \mu = \text{erreur totale}_{\text{procédure}}
 \end{array}$$

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.

Cette erreur totale, comme indiqué ci-dessus, est la somme de la justesse (biais) et de la fidélité. L'erreur totale observée avec chaque modèle et pour chaque niveau de concentration est étroitement liée avec les erreurs maximales observées correspondantes. 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.

Si l'on considère la seconde erreur la plus grande, on voit alors que les points se répartissent bien autour de la bissectrice $y=x$, ce qui démontre bien que l'estimation de l'erreur totale rend compte des erreurs les plus grandes que la méthode produit. L'erreur totale d'une procédure analytique est donc bien un bon indicateur de l'exactitude des résultats qu'elle produit.

C'est la raison pour laquelle nous proposons ce critère pour une première évaluation simple de la procédure analytique [15].

5.7. Calcul de l'intervalle de tolérance

L'important dans une validation analytique ce n'est pas la validité des résultats obtenus avec l'erreur totale, mais plutôt la 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 et du profil d'exactitude.

L'estimation des paramètres de justesse et fidélité μ_j , $\sigma_{B,j}^2$ et $\sigma_{W,j}^2$, et à chaque niveau de concentration j , n'est pas une fin en soi, mais une étape indispensable pour calculer la proportion attendue de résultats qui se situent dans les limites d'acceptation.

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:

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

Où :

$$\begin{aligned} \hat{\sigma}_{FI,j}^2 &= \hat{\sigma}_{W,j}^2 + \hat{\sigma}_{B,j}^2 \\ Rj &= \frac{\hat{\sigma}_{B,j}^2}{\hat{\sigma}_{W,j}^2} \\ Bj &= \sqrt{\frac{Rj + 1}{nRj + 1}} \\ v &= \frac{(R + 1)^2}{\frac{(R + 1/n)^2}{p - 1} + \frac{1 - 1/n}{pn}} \\ &Q_t \left(v; \frac{1 + \beta}{2} \right) \end{aligned}$$

n : nombre de répétitions

p : nombre de séries

Le même intervalle en échelle relative devient :

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

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 $[-\lambda, +\lambda]$ définies à priori en fonction des objectifs de la méthode [15].

5.8. Profil d'exactitude

5.8.1. Calcul

Le profil d'exactitude s'obtient en reliant entre elles les bornes supérieures puis les bornes inférieures de l'intervalle de tolérance :

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

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

Si le profil d'exactitude est entièrement inclus dans les limites d'acceptations $[-\lambda, +\lambda]$ alors on peut affirmer que, en routine, le pourcentage de résultats dont la différence entre la valeur déterminée X et la valeur vraie V est inférieure, en valeur absolue à λ sera au moins égale à β [15].

$$\text{Prob} (|X - V| < \lambda) \geq \beta$$

5.8.2. Choix de la fonction de réponse

L'utilisation de certaines fonctions ne permet pas à la procédure analytique d'atteindre ses objectifs vu que pour certaines concentrations, les limites de tolérances sortent des limites d'acceptation retenues. Par ailleurs, parmi les fonctions de réponses acceptables, on pourra remarquer que certaines fournissent des résultats meilleurs que d'autres (exemple tableau 10). Ce seront ces dernières qui devront être retenues.

Nous attirons également l'attention sur le fait, que pour l'ensemble de ces modèles, le coefficient de détermination R^2 est toujours supérieur à 0.99 et pas en rapport ici avec la qualité des résultats. Une fois de plus nous tenons à souligner ici que ce coefficient n'est pas une indication fiable de la qualité des résultats que la procédure rendra [15].

Tableau 10 : Critères de choix de la fonction de réponse.

Modèle	Indice d'exactitude	Limite inférieure et supérieure de quantification (unit)	Indice d'intervalle de dosage	Indice de fidélité	Indice de justesse
Régression linéaire	0.9329	[80.39, 120.2]	1.0000	0.8281	0.9805
Régression linéaire après transformation racine carrée	0.9326	[80.39, 120.2]	1.0000	0.8274	0.9805
Régression linéaire pondérée (1/X)	0.9323	[80.39, 120.2]	1.0000	0.8267	0.9803
Régression linéaire après transformation logarithmique	0.9322	[80.39, 120.2]	1.0000	0.8263	0.9805
Régression linéaire pondérée (1/X ²)	0.9317	[80.39, 120.2]	1.0000	0.8251	0.9802
Régression quadratique pondérée (1/X)	0.9248	[80.39, 120.2]	1.0000	0.8080	0.9787
Régression quadratique pondérée (1/X ²)	0.9250	[80.39, 120.2]	1.0000	0.8082	0.9791
Régression quadratique	0.9242	[80.39, 120.2]	1.0000	0.8069	0.9781

6. Linéarité

La linéarité d'une procédure d'analyse est sa capacité à l'intérieur d'un certain intervalle de dosage d'obtenir des résultats directement proportionnels à la quantité (ex : concentration) en analyte dans l'échantillon. Rappelons que l'exigence de linéarité s'applique aux résultats (concentrations calculées = f (concentrations introduites)), pas aux réponses (signal = f (concentrations introduites)). C'est un pré-requis à l'estimation de la justesse. A l'inverse, l'existence d'une relation linéaire entre la concentration estimée et la concentration introduite n'implique pas que la méthode soit juste [15].

7. Limites de quantification

Le profil d'exactitude, construit à partir des intervalles des 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 (L_{LOQ}) et haute (U_{LOQ}) 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 [15].

8. Robustesse

8.1. Protocole

L'étude de robustesse est réalisée en préparant et en analysant deux solutions échantillons (forme reconstituée) à 95% et à 105% et une solution standard de quantification à 100% par rapport à la concentration théorique.

Chacune des deux solutions est analysée à deux débits différents et la détection sera faite à deux longueurs d'onde différentes [16].

8.2. Etude statistique

L'étude statistique consiste en premier lieu au calcul des effets et interactions à partir des réponses mesurées et de la matrice d'expérience, qui sera suivi de la recherche de la significativité des effets.

Pour étudier l'influence de chaque paramètre et leurs interactions on utilise la méthode de plan factoriel qui permet de faire varier plusieurs facteurs en même temps et de minimiser le nombre d'essais à effectuer [16].

8.2.1. Méthode des plans factoriels

Pour chaque facteur on aura deux valeurs ou deux niveaux (un niveau bas 95% représenté par un - et un niveau haut 105% représenté par un +).

Pour l'HPLC les paramètres à faire varier sont : la teneur en substance à analyser (A), le débit (B) et la longueur d'onde (C).

Le premier paramètre étudié est la teneur en substance à analyser, noté A (PA), en faisant des variations autour de deux niveaux de concentrations (niveau - = 95%, niveau + = 105%).

Et c'est pareil pour les deux autres paramètres.

Les combinaisons réalisées sont représentées dans le tableau 11 suivant :

Tableau 11 : Ensemble d'étapes combinatoires permettant l'étude de la robustesse [16].

N° essai		A (Teneur en PA)	B (Débit)	C (Longueur d'onde)
1	Echantillon	-	-	-
	Standard	/	-	-
2	Echantillon	+	-	-
	Standard	/	-	-
3	Echantillon	-	+	-
	Standard	/	+	-
4	Echantillon	+	+	-
	Standard	/	+	-
5	Echantillon	-	-	+
	Standard	/	-	+
6	Echantillon	+	-	+
	Standard	/	-	+
7	Echantillon	-	+	+
	Standard	/	+	+
8	Echantillon	+	+	+
	Standard	/	+	+

Donc : le nombre d'essais à effectuer est de 2^n , n : représente le nombre de facteurs.

L'usage du plan factoriel 2^3 a permis l'étude des trois paramètres A, B et C au même temps ainsi que leurs interactions de 2^{ème} ordre (AB, AC, BC) et l'unique interaction de 3^{ème} ordre (ABC).

Par exemple, le calcul de l'effet B sera :

$$B = 1/8 (-y_1 - y_2 + y_3 + y_4 - y_5 - y_6 + y_7 + y_8)$$

Puis sa limite de confiance est ensuite établie :

$$B \pm t \left(\frac{\sigma_{exp}}{\sqrt{8}} \right)$$

σ_{exp} est l'écart type expérimental des mesures, t est le coefficient de Student.

Si l'intervalle de confiance de l'effet d'un paramètre d'une interaction contient le zéro, l'effet de ce paramètre ou de cette interaction est considéré comme nul, si zéro est à l'extérieur de l'intervalle de mesure, le résultat de mesure est influencé par la variation des paramètres en cause [16].

PARTIE PRATIQUE

PARTIE PRATIQUE

Introduction

Le dosage du diclofénac de sodium dans les suppositoires peut s'effectuer selon plusieurs méthodes analytiques.

L'objectif du présent travail est de mettre au point et de valider une nouvelle méthode de dosage du diclofénac sodique dans les suppositoires par Chromatographie Liquide Haute Performance (HPLC).

Cette étude a été réalisée au sein du laboratoire de Chimie Analytique du Département de Pharmacie de Tizi-Ouzou, et cela conformément au protocole de validation analytique décrit dans le guide de validation élaboré par une commission de la Société Française des Sciences et Techniques Pharmaceutiques (SFSTP) publié dans la revue STP Pharma Pratique en janvier 2006.

1. Matériels et méthodes

1.1. Matériels

1.1.1. Matières premières et réactifs

- Diclofénac de sodium : principe actif fourni gracieusement par le laboratoire pharmaceutique BIOPHARM ;
- Glycéride hémi synthétique solide : suppocire, excipient fourni gracieusement par le laboratoire pharmaceutique BIOPHARM ;
- Hydroxyde de sodium ;
- n- hexane ;
- Acide phosphorique ;
- Acétonitrile grade HPLC ;
- Méthanol grade HPLC ;
- Eau purifiée.

1.1.2. Appareillage et équipement

PARTIE PRATIQUE

Tableau 12 : Matériels du laboratoire de chimie analytique utilisés dans le présent travail.

Désignation		Spécifications	Usage
Appareil HPLC (SHIMADZU LC20)	Pompe	LC 20 AT	Analyse des solutions et obtention des chromatogrammes
	Injecteur automatique	SIL 20 A	
	Contrôleur	CBM- 20	
	Compartiment de la colonne	CTO-20 A	
	Colonne	C 18	
	Détecteur	Détecteur spectrophotométrique UV visible	
	Logiciel d'exploitation	LC-solution	
Purificateur de l'eau		Human power I	Purification de l'eau
Pompe à vide		Fisher bioblok scientific Pmax = 4 bar	Filtration de la phase mobile
Bain ultrasons : sonicateur		Advantage-LAB	Dissolution
Agitateur magnétique		STUART	Homogénéisation des solutions
Balance de précision		KERN	Pesée
Etuve		MEMMERT	Séchage

1.1.3. Verrerie

- Bêchers ;
- Fioles jaugées de 50 ml, 100 ml, 1000 ml et 2000 ml ;
- Pipette jaugée de 5 ml ;
- Eprouvettes graduées ;
- Erlenmeyer ;
- Ampoules à décanter.

1.1.4. Autres

- Spatule ;
- Pissettes à eau.

1.2. Méthodes

1.2.1. Préparation des solutions

1.2.1.1. Préparation du diluant (NaOH 0,1 N)

Dans une fiole jaugée de 1 L, peser 40g de NaOH, dissoudre dans un volume suffisant d'eau purifiée. Agiter et mettre dans l'ultrason pour une dissolution complète puis compléter au trait de jauge. Effectuer une dilution au 1/10 dans l'eau purifiée (100 ml de NaOH 1N dans 1 L d'eau purifiée).

1.2.1.2. Préparation du standard 100%

PARTIE PRATIQUE

Dans une fiole de 100 ml, peser 100 mg de diclofénac de sodium, ajouter 50 ml du diluant et mettre dans l'ultrason pour une dissolution complète. Compléter au trait de jauge avec le même diluant. Effectuer une dilution au 1/10 avec le même diluant (5 ml de la préparation dans 50 ml de NaOH 0,1N).

1.2.1.3. Préparation du placebo

Solution A : dans un Erlenmeyer, peser 28,53 g (poids moyen de cinq suppositoires – masse de principe actif 100 mg) de suppicore puis ajouter 150 ml de n-hexane, agiter jusqu'à dissolution complète.

Solution placebo : dans une fiole jaugée de 100 ml, verser 10 ml de la solution A et compléter jusqu'au trait de jauge avec le diluant (NaOH 0,1N), laisser reposer dans une ampoule à décanter et soutirer la phase aqueuse, puis effectuer une dilution au 1/10 (5 ml de la préparation dans 50 ml de NaOH 0,1N).

1.2.1.4. Préparation du placebo chargé à 100%

Dans une fiole jaugée de 100 ml, peser 100 mg de diclofénac de sodium, ajouter 50 ml du diluant et mettre dans l'ultrason jusqu'à dissolution complète. Compléter au trait de jauge avec le même diluant. Dans une ampoule à décanter, verser cette solution, ajouter 10 ml de la solution A, agiter puis laisser le mélange reposer et soutirer la phase aqueuse. Effectuer une dilution au 1/10 (5 ml de la préparation dans 50 ml de NaOH 0,1N).

1.2.1.5. Préparation de la phase mobile

Dans une éprouvette graduée de 1000 ml, mélangez 500 ml de méthanol grade HPLC, 280 ml d'acétonitrile grade HPLC, 219 ml d'eau purifiée et 1 ml d'acide phosphorique. Filtrer puis verser dans le réservoir de la phase mobile.

1.2.2. Conditions chromatographies

- Colonne : longueur 15 cm, diamètre 4.6 mm, taille des particules 5 μ m, phase stationnaire : gel de silice octadecylsilyle pour chromatographie (C18) ;
- Détection : longueur d'onde $\lambda=263$ nm ;
- Volume injecté : 20 μ l ;
- Débit : 1.2 ml/min ;
- Température : ambiante.

2. Résultats

La technique de dosage utilisée dans notre méthode est l'HPLC (annexe I).

2.1. Spécificité

PARTIE PRATIQUE

- Comparaison des chromatogrammes : illustrée dans les figures 04 et 05 ci-dessous :

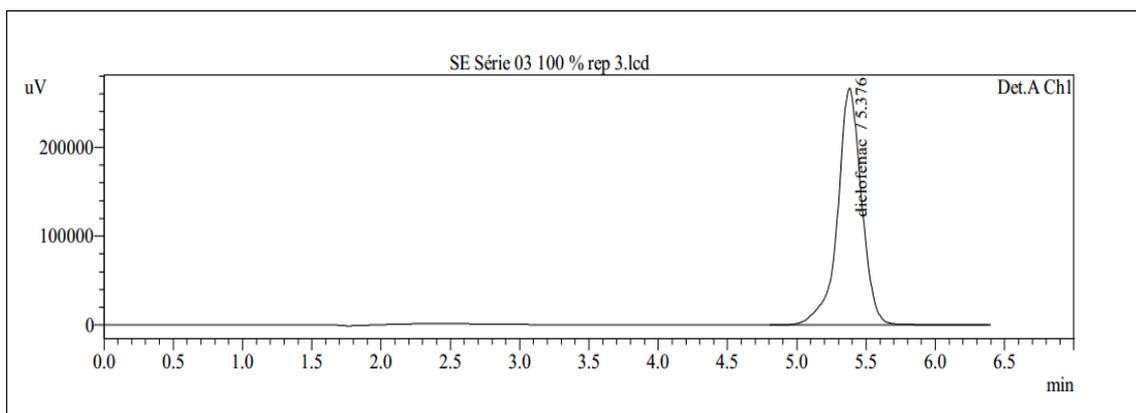


Figure 04 : Chromatogramme du standard d'étalonnage niveau 100%.

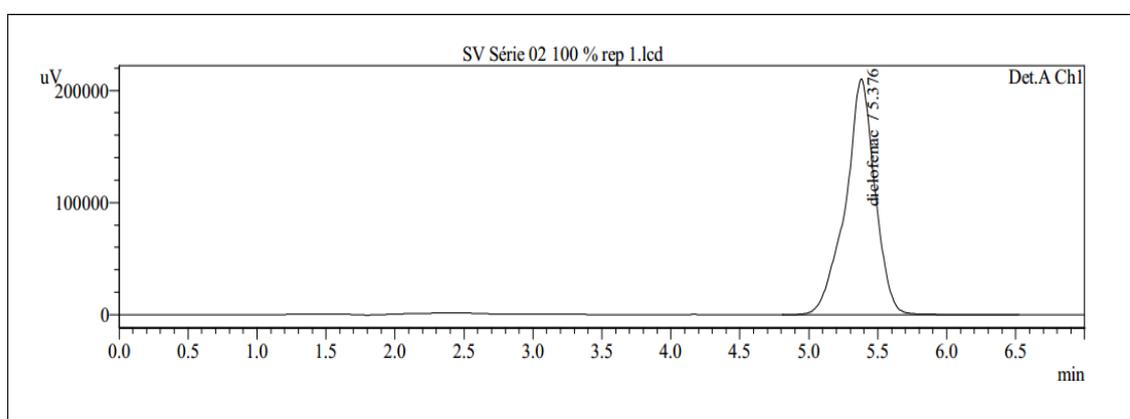


Figure 05 : Chromatogramme du standard de validation niveau 100%.

- Comparaison des deux pentes des deux droites de régression : les résultats de test de comparaison sont évalués dans le tableau 13 suivant :

Tableau 13 : Résultats de test de comparaison des deux pentes des deux droites de régression (gamme standard et gamme placebo chargé)

PARTIE PRATIQUE

Tableau 13.1 : Résultats obtenus sur la gamme standard.

Gamme standard				
% théorique	Masse introduite	Aire du pic	(y _i -y*) ²	(x _i -x') ²
80	80,4	2604377	17908166,13	406,103104
	80,09	2669243	6271378423	418,693444
	80,42	2614538	188830565,1	405,297424
90	90,61	2920193	154022430,2	98,843364
	89,69	2870479	1034748364	117,983044
	90,97	2897903	2155086582	91,814724
100	101,26	3187301	8480246598	0,501264
	100,01	3272334	1132140115	0,293764
	100,64	3271005	139339315,9	0,007744
110	110,02	3630891	4390164368	89,643024
	110,98	3561840	1159554948	108,743184
	111,42	3525232	7222880953	118,113424
120	120,04	3962713	5156492371	379,782144
	120,46	3960340	3109140336	396,328464
	121,27	3896641	1177490595	429,235524
Pente droite standard: a ₁ =		32562,0354		
SCE/n-2		3214571087		
Erreur pente σ _{a1} =		1024,713927		

Tableau 13.2 : Résultats obtenus sur la gamme placebo chargé.

Gamme placebo chargé				
% théorique	Masse introduite	Aire du pic	(y _i -y*) ²	(x _i -x') ²
80	79,81	2503041,000	1393432772	427,1111
	80,94	2606467,000	879289401,6	381,6813
	80,19	2583874,000	976476503,5	411,5488
90	90,61	2948892,000	3624452852	97,3511
	89,69	2857363,000	2735598,951	116,3522
	91,36	2850344,000	3910423705	83,1136
100	101,26	3203869,000	800927799,9	0,6136
	101,04	3242346,000	298312184,7	0,3173
	99,51	3159339,000	268635772,5	0,9344
110	110,41	3558475,000	973555735,7	98,6711
	110,98	3502680,000	1846991640	110,3200
	110,96	3521974,000	530731276,9	109,9003
120	119,92	3904232,000	4934324703	378,0432
	120,91	3857303,000	74192039,96	417,5211
	119,56	3803388,000	360567795,7	364,1736
Pente droite validation: a ₂		32251,74617		
SCE/n-2		1605773060		
Erreur pente σ _{a2} =		731,8994305		

PARTIE PRATIQUE

Tableau 13.3 : Comparaison des pentes

Comparaison des deux pentes a_1 et a_2 des deux droites de régression	t calculé	0,246
	$t^\circ (0,05, 26)$	2,056
	Condition	$t \text{ calculé} < t^\circ (0,05, 26)$

A partir de ce tableau on déduit que :

La pente a_1 de la droite de régression D1 de la gamme standard = 32562,0354.

La pente a_2 de la droite de régression D2 de la gamme placebo chargé = 32251,74617

$t_{\text{calculé}} = 0,246$

$t^\circ (0,05 ; 26) = 2.056$: lu sur la table de Student (annexe II)

2.2. Fonction de réponse

La relation existante entre la réponse (signal) et la concentration du diclofénac de sodium introduite dans l'échantillon, obtenue avec les trois (03) séries des SE, est représentée pour trois modèles mathématiques comme suit :

1^{er} modèle : régression linéaire $y = ax + b$

Tableau 14 : Résultats obtenus pour la fonction $y = ax + b$.

Standard d'étalonnage sans la matrice					
Série 1		Série 2		Série 3	
concentration $\mu\text{g/ml}$	signal	concentration $\mu\text{g/ml}$	signal	concentration $\mu\text{g/ml}$	signal
80,40	2604377	80,18	2487215	80,44	2549489
80,09	2669243	80,75	2535637	80,50	2552563
89,69	2870479	90,88	2908746	90,23	2866991
90,97	2897903	90,23	2900678	90,90	2896226
100,01	3272334	100,50	3268568	100,43	3241557
100,64	3271005	100,07	3231994	100,88	3220818
110,98	3561840	110,43	3539867	110,07	3344305
111,42	3525232	110,11	3532189	110,50	3453029
120,04	3962713	120,25	3989742	119,82	3823730
120,46	3960340	120,10	3900299	120,49	3848235
Pente	32712,6276	Pente	35298,8463	Pente	31174,2041
Ord. l'origine	-27091,097	Ord. l'origine	-312745,728	Ord. l'origine	48993,6809

A partir des données de ce tableau, on trace les courbes d'étalonnage des trois séries de SE :

PARTIE PRATIQUE

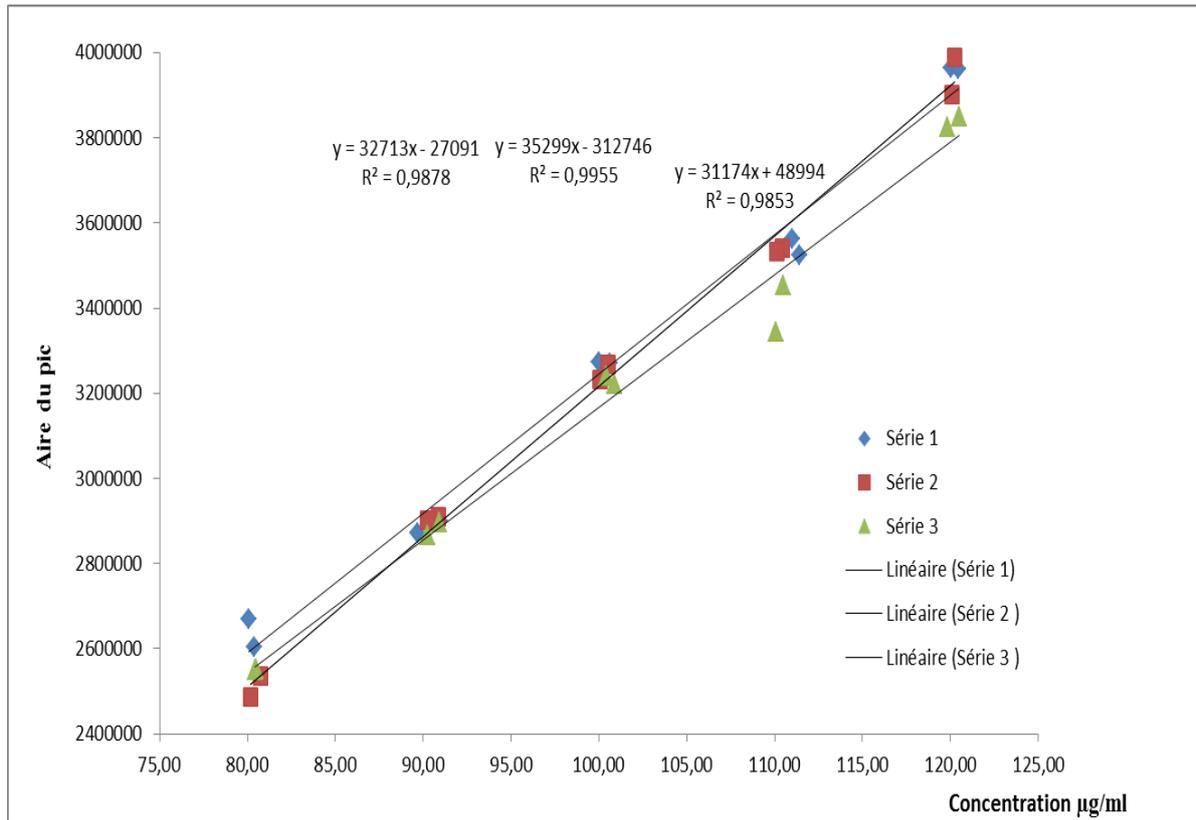


Figure 06 : Courbes d'étalonnages obtenues avec les trois séries des SE.

2^{ème} modèle : logarithme népérien $\ln Y = f(\ln X)$

Tableau 15 : Résultats obtenus pour la fonction $\ln Y = f(\ln X)$

Standard d'étalonnage sans la matrice					
Série 1		Série 2		Série 3	
concentration µg/ml	signal	concentration µg/ml	signal	concentration µg/ml	signal
4,387	14,773	4,384	14,727	4,388	14,751
4,383	14,797	4,391	14,746	4,388	14,753
4,496	14,870	4,510	14,883	4,502	14,869
4,511	14,879	4,502	14,880	4,510	14,879
4,605	15,001	4,610	15,000	4,609	14,992
4,612	15,001	4,606	14,989	4,614	14,985
4,709	15,086	4,704	15,080	4,701	15,023
4,713	15,075	4,701	15,077	4,705	15,055
4,788	15,192	4,790	15,199	4,786	15,157
4,791	15,192	4,788	15,177	4,792	15,163
Pente	0,997041709	Pente	1,102291331	Pente	0,98223638
Ord. l'origine	10,40070381	Ord. l'origine	9,906619337	Ord. l'origine	10,44478733

A partir des données de ce tableau, on trace les courbes d'étalonnage des trois séries :

PARTIE PRATIQUE

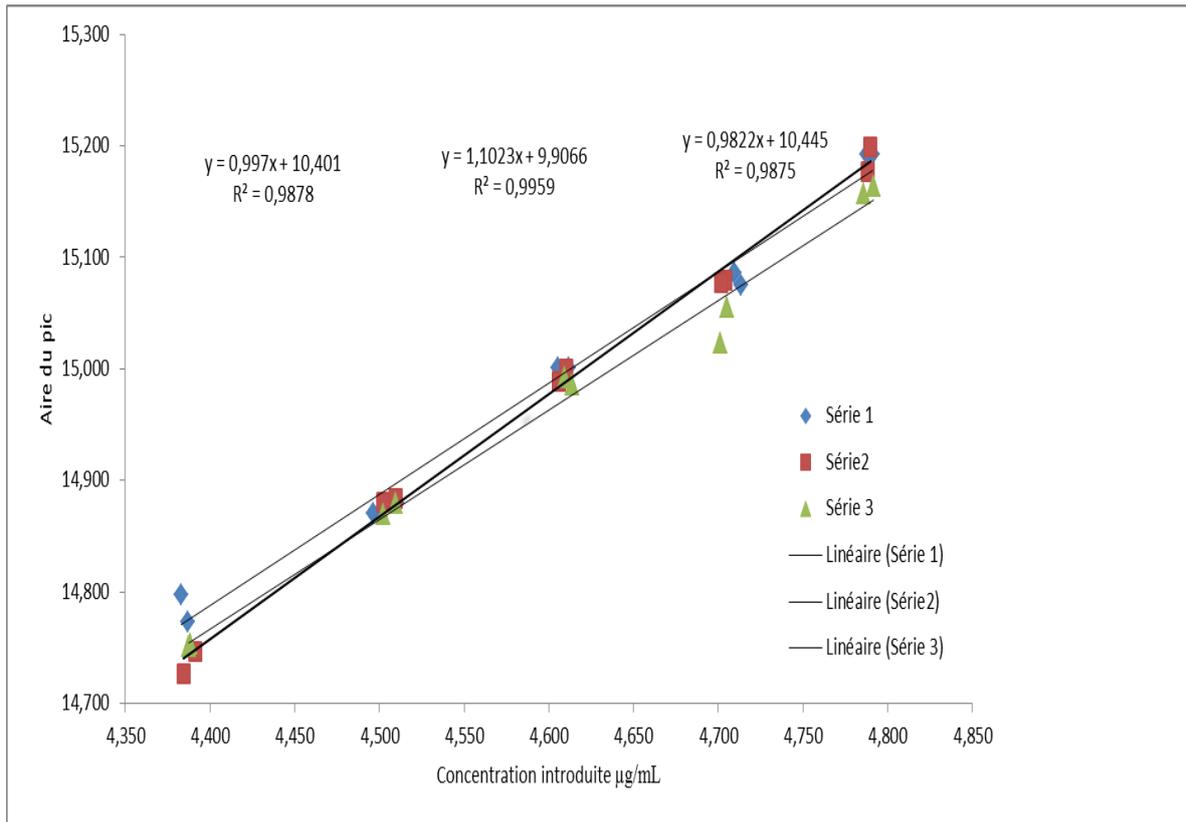


Figure 07 : Courbes d'étalonnages $\ln Y = f(\ln X)$ obtenues sur les trois séries des SE.

3^{ème} modèle : racine carrée $\sqrt{Y} = f(\sqrt{X})$

Tableau 16 : Résultats obtenus pour la fonction $\sqrt{Y} = f(\sqrt{X})$.

Standard d'étalonnage sans la matrice					
Série 1		Série 2		Série 3	
concentration µg/ml	signal	concentration µg/ml	signal	concentration µg/ml	signal
8,967	1613,808	8,954	1577,091	8,969	1596,712
8,949	1633,782	8,986	1592,368	8,972	1597,674
9,470	1694,249	9,533	1705,505	9,499	1693,219
9,538	1702,323	9,499	1703,138	9,534	1701,830
10,000	1808,959	10,025	1807,918	10,021	1800,432
10,032	1808,592	10,003	1797,775	10,044	1794,664
10,535	1887,284	10,509	1881,453	10,491	1828,744
10,556	1877,560	10,493	1879,412	10,512	1858,233
10,956	1990,656	10,966	1997,434	10,946	1955,436
10,975	1990,060	10,959	1974,917	10,977	1961,692
Pente	180,5932314	Pente	197,1396671	Pente	174,9556091
Ord. l'origine	-4,81903796	Ord. l'origine	-178,2705525	Ord. l'origine	29,90519941

PARTIE PRATIQUE

A partir des données de ce tableau, on trace les courbes d'étalonnage correspondantes :

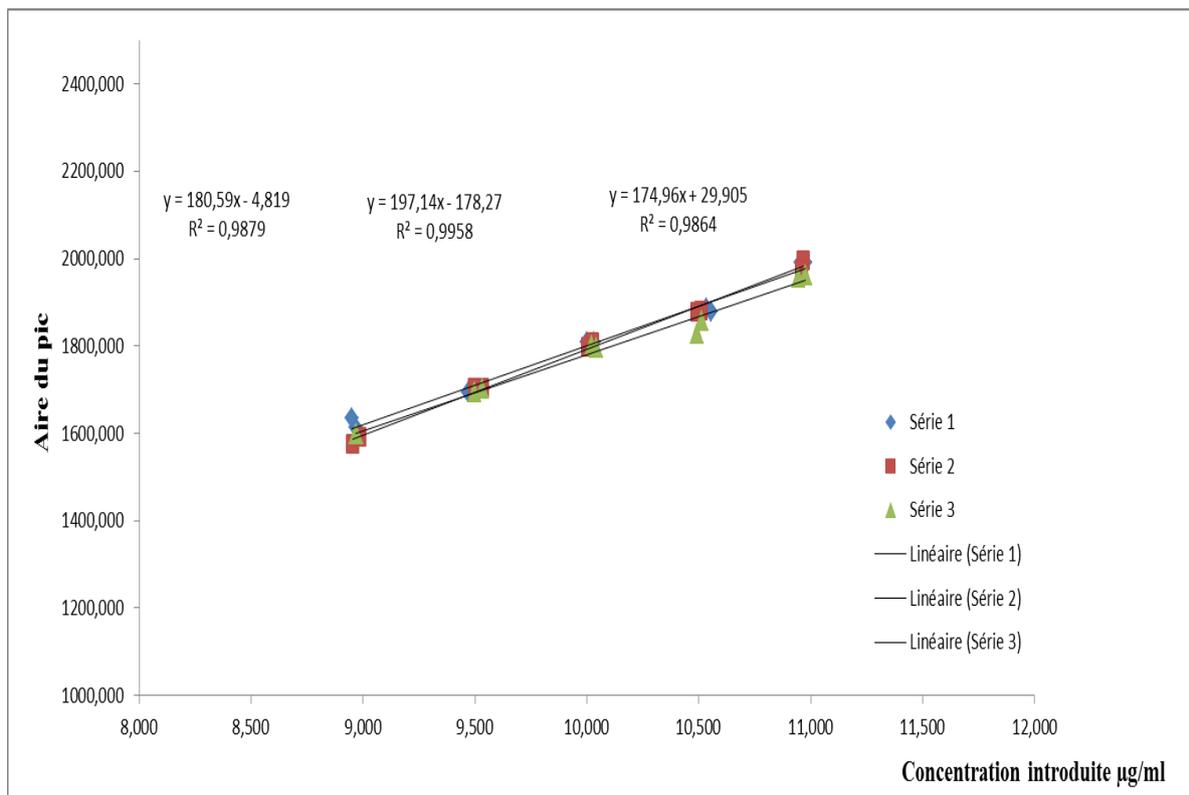


Figure 08 : Courbes d'étalonnages $\sqrt{Y} = f(\sqrt{X})$ obtenues avec les trois séries des SE.

2.3. Critères de choix de la fonction de réponse

Le tableau 17 reprend les modèles de régression sélectionnés. Ces modèles ont été triés en fonction de leur indice d'exactitude :

PARTIE PRATIQUE

Tableau 17 : Modèles d'étalonnages triés par indice d'exactitude.

Modèle	Indice d'exactitude	Limite inférieure et supérieure de quantification (unit)	Indice d'intervalle de dosage	Indice de fidélité	Indice de justesse
Régression linéaire	0.7597	[89.96, 120.2]	0.7592	0.7007	0.8244
Régression linéaire après transformation racine carrée	0.7581	[90.04, 120.2]	0.7573	0.6982	0.8241
Régression linéaire pondérée (1/X)	0.7574	[90.08, 120.2]	0.7564	0.6982	0.8226
Régression linéaire après transformation logarithmique	0.7564	[90.11, 120.2]	0.7555	0.6947	0.8245
Régression linéaire pondérée (1/X ²)	0.7551	[90.15, 120.2]	0.7545	0.6942	0.8218
Régression quadratique pondérée (1/X)	0.7393	[89.98, 120.2]	0.7587	0.6585	0.8087
Régression quadratique pondérée (1/X ²)	0.7391	[90.07, 120.2]	0.7566	0.6572	0.8121
Régression quadratique	0.7383	[89.94, 120.2]	0.7599	0.6594	0.8033
Régression linéaire passant par zéro ajustée en utilisant uniquement le niveau 5	0.4322	[112.9, 120.2]	0.1823	0.9391	0.4714
Régression linéaire passant par zéro ajustée en utilisant uniquement le niveau 1.0	0	ND	0	0	0

Voir dans l'annexe IV le calcul des indices pour le tri des modèles d'étalonnages.

PARTIE PRATIQUE

La suite de notre travail est basée sur le modèle mathématique choisi pour la fonction de réponse. Nous présenterons brièvement la fonction de réponse adéquate et nous détaillerons dans la partie discussion les autres modèles.

2.4. Alignement des observations

Comme pour chaque niveau de concentrations, les quantités introduites ne sont pas identiques : l'alignement des réponses sur la moyenne des concentrations introduites est exigé.

L'alignement des réponses obtenues avec les échantillons de validation est résumé dans le tableau 18 suivant :

Tableau 18 : Alignement des réponses observées avec les trois séries des SV.

Tableau 18.1 : Alignement des réponses observées avec la série 1.

Série 1		
Concentration $\mu\text{g/ml}$	Signal	Alignement
79,81	2503041	2519506,356
80,94	2606467	2585967,087
80,19	2583874	2587908,557
90,61	2948892	2947038,284
89,69	2857363	2885604,902
91,36	2850344	2823955,814
101,26	3203869	3182387,708
101,04	3242346	3228061,486
99,51	3159339	3195104,806
110,41	3558475	3570687,714
110,98	3502680	3496246,517
110,96	3521974	3516194,769
119,92	3904232	3911101,652
120,91	3857303	3831787,15
119,56	3803388	3822034,198

PARTIE PRATIQUE

Tableau 18.2 : Alignement des réponses observées de la série 2.

Série 2		
Concentration µg/ml	Signal	Alignement
80,19	2477863	2484334,455
80,18	2571864	2578688,444
80,75	2493100	2479804,101
90,88	2889012	2875127,787
90,35	2848478	2853302,176
90,23	2790166	2799226,037
100,5	3142061	3144296,594
100,07	3174860	3192274,098
101,12	3192768	3173118,309
110,43	3452205	3443733,277
110,11	3445688	3448511,908
110,03	3525607	3531254,815
120,25	3787093	3783210,127
120,07	3858862	3861332,919
120,1	3783315	3784726,954

Tableau 18.3 : Alignement des réponses observées de la série 3.

Série 3		
Concentration µg/ml	Signal	Alignement
80,44	2432195	2433441,968
80,5	2342211	2341587,516
80,5	2517710	2517086,516
90,23	2814684	2829128,048
90,9	2776338	2769895,331
90,95	2772103	2764101,621
100,43	3055173	3062239,153
100,66	3113836	3113732,086
100,88	3189936	3182973,761
110,07	3394716	3402717,379
110,41	3444940	3442342,15
110,5	3432195	3426791,471
119,82	3690071	3702332,854
120,33	3742966	3739329,01
120,49	3703876	3695251,137

PARTIE PRATIQUE

2.5. Prédiction inverses

Les concentrations en retour avec la fonction de réponse choisie : $y = ax + b$ calculées sont présentées dans le tableau 19 ci-dessous :

Tableau 19 : Prédiction inverses obtenues avec les SV.

Série 1		Série 2		Série 3		Prédiction inverses Xijk, calc			μ_j , calc=1/n $\sum \sum$ Xijk,cal
Concentration $\mu\text{g/ml}$	Signal	Concentration $\mu\text{g/ml}$	Signal	Concentration $\mu\text{g/ml}$	Signal	Série1	Série2	Série3	
79,81	2503041	80,19	2477863	80,44	2432195	77,848	79,240	76,488	78,570
80,94	2606467	80,18	2571864	80,50	2342211	79,879	81,913	73,541	
80,19	2583874	80,75	2493100	80,50	2517710	79,939	79,112	79,171	
90,61	2948892	90,88	2889012	90,23	2814684	90,917	90,311	89,181	88,759
89,69	2857363	90,35	2848478	90,90	2776338	89,039	89,693	87,281	
91,36	2850344	90,23	2790166	90,95	2772103	87,154	88,161	87,095	
101,26	3203869	100,50	3142061	100,43	3055173	98,111	97,936	96,658	98,623
101,04	3242346	100,07	3174860	100,66	3113836	99,508	99,296	98,310	
99,51	3159339	101,12	3192768	100,88	3189936	98,500	98,753	100,531	
110,41	3558475	110,43	3452205	110,07	3394716	109,981	106,419	107,580	108,073
110,98	3502680	110,11	3445688	110,41	3444940	107,706	106,555	108,851	
110,96	3521974	110,03	3525607	110,50	3432195	108,316	108,899	108,352	
119,92	3904232	120,25	3787093	119,82	3690071	120,388	116,037	117,191	117,657
120,91	3857303	120,07	3858862	120,33	3742966	117,963	118,250	118,378	
119,56	3803388	120,10	3783315	120,49	3703876	117,665	116,080	116,964	

2.6. Justesse

Comme indiqué dans le tableau 20 ci-dessous, la justesse est exprimée en termes de biais absolu, de biais relatif (%) ou de taux de recouvrement (%) pour chaque niveau de concentration des standards de validation.

Tableau 20 : Justesse calculée pour chaque niveau de concentration des standards de validation.

Niveau de concentration (ratio)	Moyenne des concentrations introduites (unit)	Moyenne des concentrations calculées (unit)	Biais absolu (unit)	Biais relatif (%)	Taux de recouvrement (%)
1.0	80.39	78.57	-1.819	-2.263	97.74
2.0	90.58	88.76	-1.819	-2.008	97.99
3.0	100.60	98.62	-1.985	-1.973	98.03
4.0	110.40	108.10	-2.360	-2.137	97.86
5.0	120.20	117.70	-2.504	-2.084	97.92

PARTIE PRATIQUE

2.7. Fidélité

La fidélité de notre méthode est évaluée dans des conditions de répétabilité et de fidélité intermédiaire (tableau 21). Elle est calculée pour chaque niveau de concentration, exprimée en écart type et en terme de coefficient de variation est résumée dans le tableau 21 suivant :

Tableau 21 : Fidélité calculée pour chaque niveau de concentration des standards de validation.

Niveau de concentration (ratio)	MSM	MSE1	MSE2	Ecart type de répétabilité	Ecart type intersérie	Ecart type de FI	CV répétabilité	CV fidélité intermédiaire
1.0	11,157	3,949	5,751	1,987	1,550	2,520	2,472	3,135
2.0	1,943	2,032	2,010	1,418	0,000	1,418	1,565	1,565
3.0	0,035	1,588	1,200	1,095	0,000	1,095	1,089	1,089
4.0	1,501	1,247	1,310	1,117	0,291	1,154	1,011	1,045
5.0	2,708	1,469	1,779	1,212	0,642	1,372	1,009	1,142

2.8. Exactitude

Le tableau 22 ci-dessous représente l'exactitude relative calculée pour chaque concentration des standards de validation :

Tableau 22 : Résultats de calcul de l'exactitude.

Exactitude relative ijk			Moyenne de l'exactitude relative ij
Série 1	Série 2	Série 3	
-2,459	-1,185	-4,913	-2,852
-1,311	2,161	-8,644	-2,598
-0,314	-2,029	-1,651	-1,331
0,339	-0,626	-1,163	-0,483
-0,726	-0,728	-3,982	-1,812
-4,603	-2,293	-4,239	-3,712
-3,110	-2,551	-3,756	-3,139
-1,517	-0,774	-2,335	-1,542
-1,015	-2,341	-0,346	-1,234
-0,388	-3,632	-2,262	-2,094
-2,950	-3,229	-1,412	-2,530
-2,383	-1,028	-1,944	-1,785
0,390	-3,504	-2,194	-1,769
-2,437	-1,516	-1,622	-1,859
-1,585	-3,348	-2,926	-2,620

PARTIE PRATIQUE

2.9. Erreur totale et profil d'erreur totale

L'erreur totale et l'erreur totale relative calculées pour chaque niveau de concentration est présentée dans le tableau 23 suivant :

Tableau 23 : Calcul de l'erreur totale pour chaque niveau de concentration des standards de validation.

Niveau de concentration (ratio)	Erreur totale absolue	Erreur totale relative	Erreur maximale observée
1.0	4,339	5,398	14,760
2.0	3,237	3,573	3,390
3.0	3,081	3,062	6,920
4.0	3,514	3,182	3,870
5.0	3,876	3,226	2,620

Le profil de l'erreur totale relative est illustré dans la figure 09 suivante :

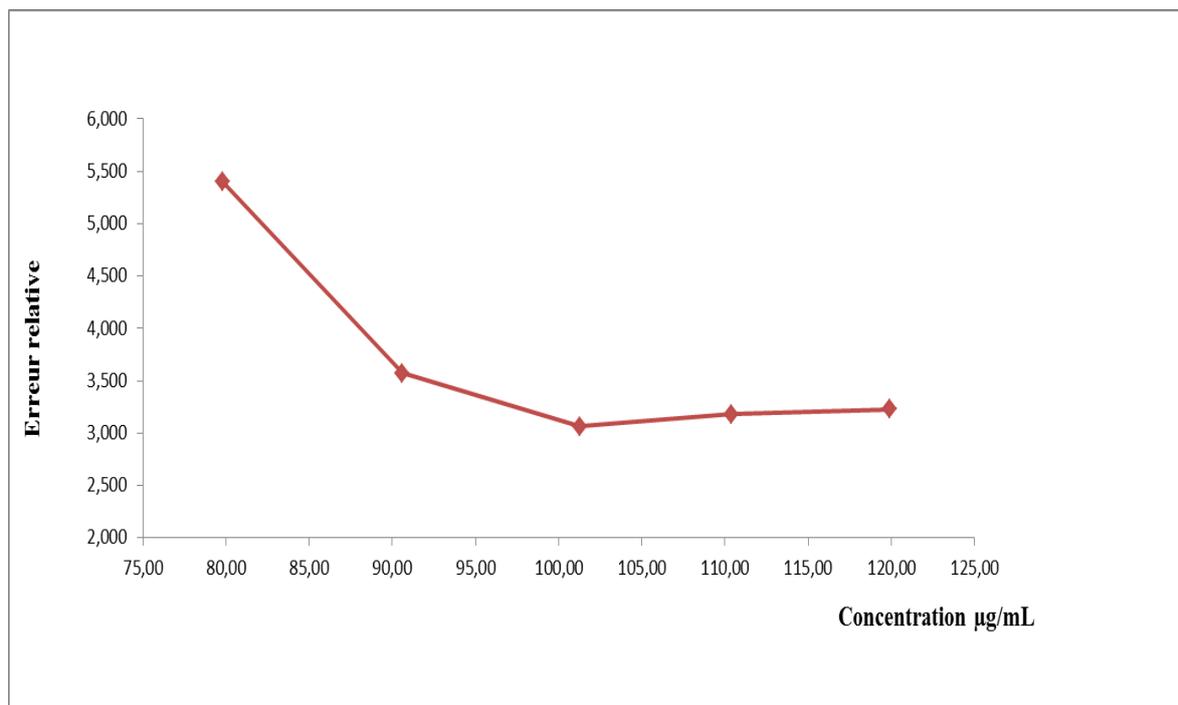


Figure 09 : Profil de l'erreur relative totale.

2.10. Intervalle de tolérance

Les limites de tolérance sont calculées pour chaque niveau de concentration ; les résultats obtenus sont résumés dans le tableau 24 ci-dessous :

PARTIE PRATIQUE

Tableau 24 : Calcul des limites de tolérance pour chaque niveau de concentration j.

Niveau de concentration (ratio)	R _j	B _j	V	Q _t	Limite de tolérance inférieure	Limite de tolérance supérieure
1.0	0,608	0,755	4,999	1,778	-8,357	3,831
2.0	0,000	1,000	7,714	1,617	-4,676	0,660
3.0	0,000	1,000	7,714	1,617	-3,829	-0,117
4.0	0,068	0,942	7,378	1,617	-3,929	-0,345
5.0	0,281	0,834	6,245	1,650	-4,113	-0,055

2.11. Profil d'exactitude

Le profil d'exactitude comme l'indique la figure 10 ; est obtenu en reliant entre elles d'une part les bornes inférieures et d'autre part les bornes supérieures de l'intervalle de tolérance calculées pour chaque niveau de concentration.

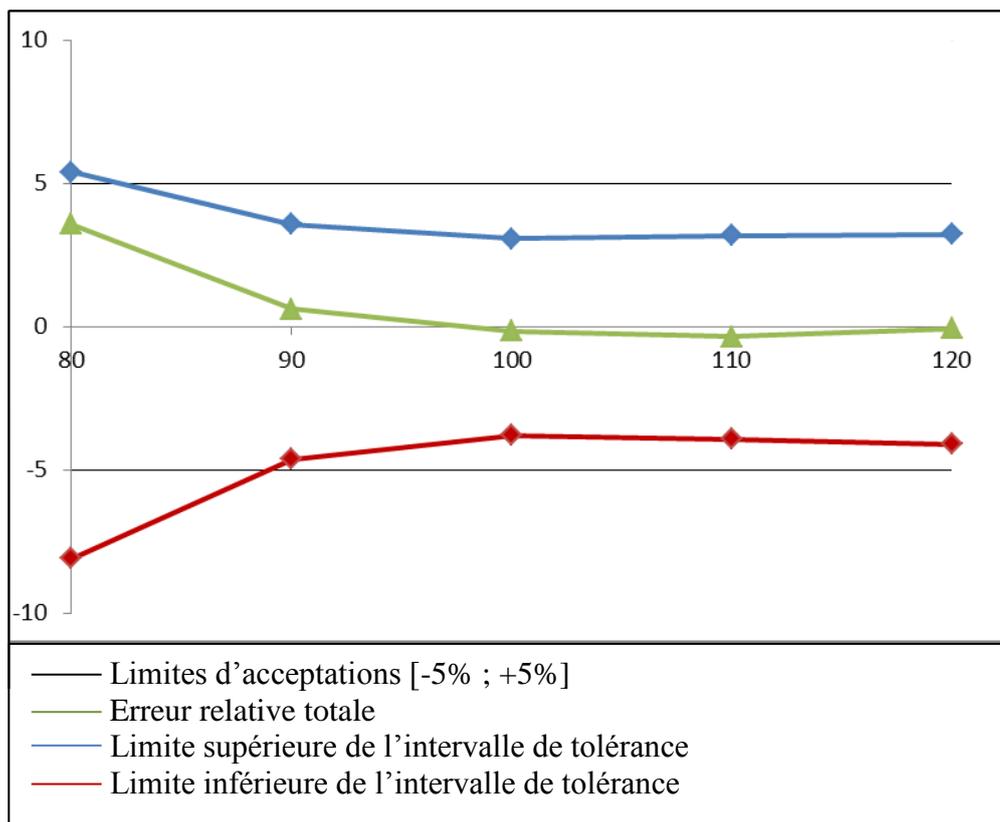


Figure 10 : Tracé du profil d'exactitude.

2.12. Linéarité

Un modèle de régression linéaire (Figure 11) a été ajusté sur les concentrations calculées en fonction des concentrations introduites dans le but d'obtenir l'équation suivante:

$$y = 0.98082x - 0.17061$$

PARTIE PRATIQUE

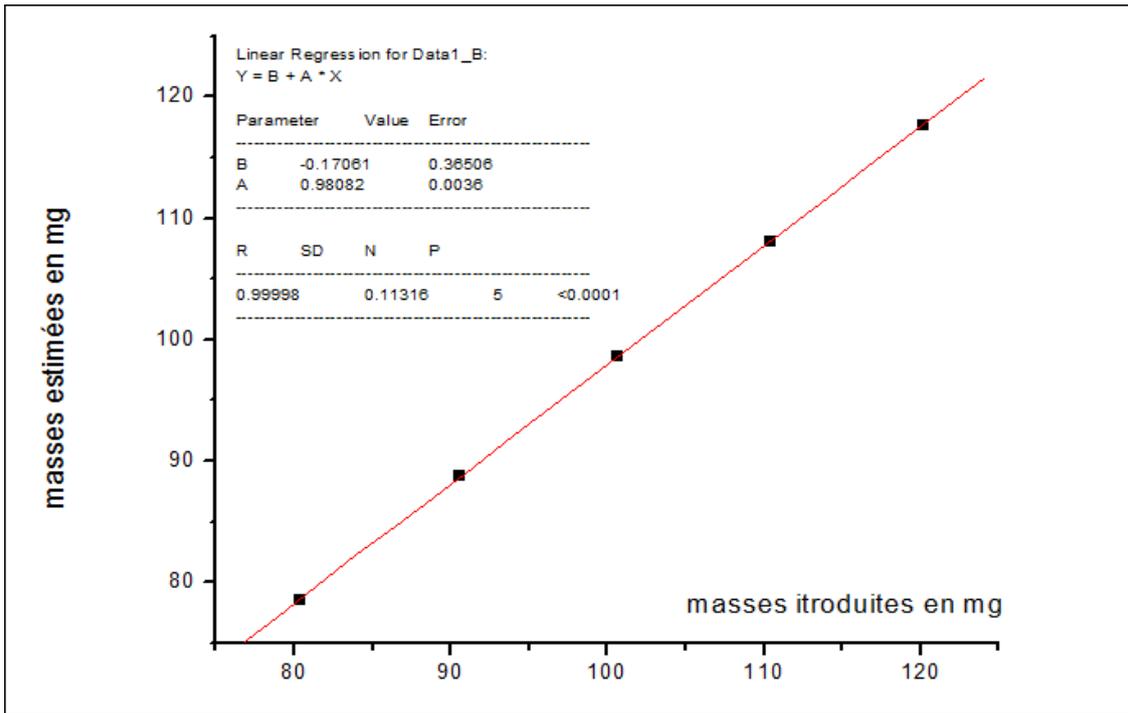


Figure 11 : Profil de linéarité entre les concentrations trouvées et les concentrations introduites.

2.13. Limites de quantification et intervalle de dosage

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

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

Limite inférieure de quantification (LQ_{inf}) (Unit) = 89.96 % soit 89.96 $\mu\text{g/ml}$.

Limite supérieure de quantification (LQ_{sup}) (Unit) = 120.2 % soit 120.2 $\mu\text{g/ml}$.

2.14. Robustesse

Le plan factoriel réalisé est représenté dans le tableau 25 suivant :

PARTIE PRATIQUE

Tableau 25 : Matrice des effets d'un plan factoriel 2³

Essai	Facteurs			Interactions			
	A (teneur)	B (Débit ml/min)	C (longueur d'onde d'excitation nm)	AB	AC	BC	ABC
1	-1	-1	-1	1	1	1	-1
2	1	-1	-1	-1	-1	1	1
3	-1	1	-1	-1	-1	-1	1
4	1	1	-1	1	1	-1	-1
5	-1	-1	1	1	1	-1	1
6	1	-1	1	-1	-1	-1	-1
7	-1	1	1	-1	-1	1	-1
8	1	1	1	1	1	1	1
Niveau bas	95%	1,00	261				
Niveau haut	105%	1,40	265				

Le tableau 26 suivant résume l'analyse faite :

Tableau 26 : Plan d'expérience à trois facteurs et calcul de l'écart type.

Masse (concentration) pour une teneur théorique de 100%		100	mg							
N° de l'essai	Facteur A (teneur en %)	Facteur B (Débit)	Facteur C (longueur d'onde d'excitation)	Masse introduite (concentration) Echantillon	Masse (concentration) Standard	Teneur introduite (%)	Aire (absorbance) échantillon	Aire (absorbance) standard	Masse (Concentration) estimée	Réponse (Teneur en %)
1	95%	1	261	95,02	107,26	95,02	2599081	3097033	90,01	90,01
2	105%	1	261	105,22	107,26	105,22	3010585	3097033	104,27	104,27
3	95%	1,4	261	95,02	107,26	95,02	1896495	2227793	91,31	91,31
4	105%	1,4	261	105,22	107,26	105,22	2185896	2227793	105,24	105,24
5	95%	1	265	95,02	107,26	95,02	3229198	3784628	91,52	91,52
6	105%	1	265	105,22	107,26	105,22	3718833	3784628	105,40	105,40
7	95%	1,4	265	95,02	107,26	95,02	2309360	2764169	89,61	89,61
8	105%	1,4	265	105,22	107,26	105,22	2722640	2764169	105,65	105,65
									Ecartype	7,80
									t°(0,05,7)	2,36

Nous calculerons par la suite l'effet et l'intervalle de confiance pour chaque paramètre, les résultats obtenus sont présentés dans le tableau 27 suivant :

PARTIE PRATIQUE

Tableau 27 : Calcul des limites de confiance pour les effets des paramètres.

Essai	Facteurs			Interactions				
	A	B	C	AB	AC	BC	ABC	
1	-84,14	-84,14	-84,14	84,14	84,14	84,14	-84,14	
2	97,46	-97,46	-97,46	-97,46	-97,46	97,46	97,46	
3	-85,35	85,35	-85,35	-85,35	-85,35	-85,35	85,35	
4	98,37	98,37	-98,37	98,37	98,37	-98,37	-98,37	
5	-85,55	-85,55	85,55	85,55	85,55	-85,55	85,55	
6	98,52	-98,52	98,52	-98,52	-98,52	-98,52	-98,52	
7	-83,76	83,76	83,76	-83,76	-83,76	83,76	-83,76	
8	98,75	98,75	98,75	98,75	98,75	98,75	98,75	
Somme	54,31	0,58	1,25	1,72	1,72	-3,67	2,32	
Effet	6,79	0,07	0,16	0,22	0,22	-0,46	0,29	
Intervalle de confiance	Limite inférieure	0,69	-6,02	-5,94	-5,88	-5,88	-6,55	-5,80
	Limite supérieure	12,88	6,17	6,25	6,31	6,31	5,64	6,38
Facteur significatif (S) ou Non significatif (NS)		S	NS	NS	NS	NS	NS	NS

1. Discussion

1.1. Spécificité

$$t_{\text{calculé}} = 0,246$$

$$t^{\circ}(0,05, 26) \text{ lu sur la table de Student} = 2,056$$

$t_{\text{calculé}} < t^{\circ}(0,05, 26) \implies$ les deux pentes ne sont pas significativement différentes au risque $\alpha = 0,05$ considéré donc absence d'effet matrice : la méthode est spécifique.

1.2. Choix de la fonction de réponse

D'après les indices d'exactitude indiqués au tableau 17 précédent, le modèle d'étalonnage sélectionné est: régression linéaire avec une équation $y = ax + b$.

Les données et les courbes d'étalonnage obtenues pour ce modèle de régression ont été respectivement présentées dans le tableau 14 et la figure 06.

1.3. Profil d'exactitude

- La limite inférieure de l'intervalle de tolérance intercepte la limite d'acceptabilité vers le niveau de concentration 90%. Cela signifie que pour une concentration inférieure à ce niveau, l'analyste ne peut plus garantir que la méthode est capable, en routine, de produire en moyenne une probabilité β de résultats acceptables.

PARTIE PRATIQUE

- La méthode est considérée comme valide pour l'intervalle de dosage où le profil d'exactitude est compris dans les limites d'acceptation fixées à priori. Cette approche garantit que seules maximum 15% des futures mesures d'échantillons inconnus peuvent être en dehors de ces limites.
- Le domaine de validité de la méthode est donc compris entre les niveaux de concentration 90% et 120%.

1.4. Limites de quantification et intervalle de dosage

La méthode est considérée comme valide dans l'intervalle [89,96 µg/ml; 120,2 µg/ml] pour lequel le profil d'exactitude est inclus dans les limites d'acceptation choisies : [-5% ; +5%] avec un risque d'avoir au maximum 15% des mesures en dehors des limites d'acceptation.

1.5. Linéarité

La linéarité de la droite *concentration prédites = f(concentrations introduites)* est confirmée par :

- Un coefficient de détermination acceptable $R^2 = 0.99998$;
- Une pente significativement différente de zéro donc il existe une relation linéaire. De plus elle est comparable à 1 au risque 5% ($a = 0.9882$) ;
- Une ordonnée à l'origine comparable à zéro au risque 5% ($b = - 0.17061$).

1.6. Robustesse

- Paramètre A : l'intervalle de confiance calculé ne contient pas la valeur zéro, cela implique que l'effet du paramètre A est significatif. On conclut que la méthode est sensible aux variations de la teneur en PA.
- Paramètre B et C : l'intervalle de confiance contient la valeur zéro, donc les effets des paramètres B et C ne sont pas significatifs. On conclut que la procédure d'analyse est insensible aux variations du débit et de la longueur d'onde.
- Interactions : tous les effets des interactions sont non significatifs, on peut dire que l'effet de chaque paramètre ne dépend pas du niveau auquel on expérimente avec l'un ou les autres paramètres.
- La méthode de dosage du diclofénac de sodium est jugée robuste pour les variations étudiées des deux paramètres débit de la phase mobile et longueur d'onde de détection.

PARTIE PRATIQUE

Conclusion

La méthode de dosage du diclofénac de sodium dans les suppositoires à 100 mg par HPLC développée dans le présent travail s'est révélée concluante et valide dans l'intervalle de dosage [89,96 µg/ml ; 120,2 µg/ml] au risque 5%.

CONCLUSION GENERALE

Le contrôle analytique avant libération d'un médicament sur le marché est une étape importante et nécessaire pour garantir la qualité du produit qui va être délivré aux patients.

Les laboratoires pharmaceutiques sont tenus de prouver que les méthodes utilisées lors de ce contrôle sont parfaitement valides et fiables, en procédant à leur validation. Celle-ci est non seulement une exigence réglementaire, mais également un critère essentiel de l'assurance de la qualité.

En effet, bien qu'il existe de nombreux documents officiels décrivant les critères de validation à tester, les sources proposant des solutions pratiques en termes de protocoles expérimentaux sont rares.

Le présent travail propose une méthode de dosage du diclofénac de sodium dans les suppositoires à 100 mg par chromatographie liquide à haute performance en utilisant le profil d'exactitude et l'intervalle de tolérance comme outil de décision de validation ; méthode développée par la commission SFSTP publiée en 2006 dans le guide STP Pharma Pratique.

Les résultats obtenus ont répondu à toutes les exigences et performances spécifiques élaborées dans cette approche harmonisée ; ce qui atteste la validité de la méthode utilisée et son aptitude à être utilisée et appliquée en routine par les laboratoires de contrôle qualité pour le dosage du diclofénac de sodium dans les suppositoires à 100 mg.

REFERENCES
BIBLIOGRAPHIQUES

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

1. Talbert, Willoquet, Gervais. Guide Pharmaco Clinique. France. 2013. Anti-inflammatoires non stéroïdiens (AINS) ; p. 165-6
2. Dictionnaire Vidal. 8^{ème} édition. Paris. 2004. Diclofénac ; p.1928-9.
3. Dictionnaire Vidal. 84^{ème} édition. France. 2008. Voltarène ; p.2518-20.
4. Pharmacopée Européenne. 6^{ème} édition. Tome 2. Diclofénac sodique ; p. 1820.
5. Résumé des caractéristiques du produit. Base de données publique des médicaments. [Consulté le dec 2015]. Disponible sur : <http://base-donnees-publique.medicaments.gouv.fr>
6. Bekkai S, Abadi I, Allel K. [les anti-inflammatoires non stéroïdiens AINS]. Annaba : Université Badj Mokhtar de Annaba ; 2009.
7. Anonyme. Les anti-inflammatoires non stéroïdiens. Modalité de prescriptions [en ligne]. 24 juin 2012. Disponible sur : <http://www.rhumato.info>.
8. Haute autorité de santé. Commission de la transparence. [Consulté le 01 mars 2006]. Disponible sur : <http://www.has-sante.fr/portail/upload/docs/application/pdf/ct032538.pdf>
9. Dictionnaire thérapeutique. 1^{ère} édition pour le pharmacien. Algérie ; MEDECINE DIGEST ; juin 2007. Cloménil suppositoires 100 mg ; p. 88-90.
10. Jannin V, Rodier JD. Mise en forme des médicaments. Formulation et fabrication des suppositoires. 2^{ème} édition. Page 77-9. Disponible sur le site : www.techniques-ingenieur.fr
11. A. Le Hir. Abrégé de Pharmacie Galénique. Bonnes Pratiques de Fabrication des Médicaments. 8^{ème} édition. Paris ; 1973-2001.
12. Montagnac E. Galénique-Formes pharmaceutiques-tableaux. Avantages/inconvénients des suppositoires [en ligne]. 2010-2011. Disponible sur : www.ifpvps.fr
13. VIAL J. Journée de Formation Scientifique en Spectrométrie Atomique. Définition de la validation de méthodes et outils associés. Paris. 14 Nov 2006. p. 6.
14. Hubert Ph, Nguyen JJ, Boulanger B, Chapuzet E, Chiap P, Cohen N, et al. SFSTP. Validation des procédures analytiques quantitatives, harmonisation des démarches. PARTIE I ; Généralité ; 2003.
15. Hubert Ph, Nguyen JJ, Boulanger B, Chapuzet E, Chiap P, Cohen N, et al. SFSTP. Validation des procédures analytiques quantitatives, harmonisation des démarches. PARTIE II ; Statistiques ; 2006.
16. SFSTP. Validation des procédures analytiques quantitatives. Juin 1992.
17. Bentchakal A, Matari A. [validation analytique d'une méthode de dosage du paracétamol dans les suppositoires par HPLC]. Tizi Ouzou : Université Mouloud Mammeri ; 2015.
18. Anonyme. La chromatographie en phase liquide LC/HPLC. LCAP. Laboratoire de chimie analytique pharmaceutique-Genève.
19. DENAT F. Professeur. Chromatographie. ICMUB UMR 5260. 9, Av. Alain Savary. BP 47870 21078 Dijon. Franck.Denat@u-bourgogne.fr.
20. Anonyme. HPLC principe et appareillage. Biochimie et biomoléculaire. 20 jan 2010.

ANNEXES

ANNEXE I

**CHROMATOGRAPHIE LIQUIDE HAUTE
PERFORMANCE**

HPLC

ANNEXE I : HPLC

Introduction

La chromatographie est une méthode physique de séparation d'un ou de plusieurs composés d'un mélange en vue de leur identification et de leur quantification. Il existe trois types de chromatographie : chromatographie en phase gazeuse, chromatographie sur couche mince et chromatographie en phase liquide.

La chromatographie en phase liquide a permis de réaliser des analyses qui n'étaient auparavant pas possibles avec les techniques sur couche mince ou en phase gazeuse. Parmi les techniques chromatographiques liquides les plus utilisées actuellement : la Chromatographie Liquide Haute Performance (HPLC) qualifiée d'un outil analytique indispensable utilisée dans des domaines variés.

1. Principe

La chromatographie liquide haute performance est une méthode d'analyse physicochimique qui sépare les constituants d'un mélange par entraînement au moyen d'une phase mobile liquide le long d'une phase stationnaire, grâce à la répartition sélective des solutés entre ces deux phases.

Chaque soluté est donc soumis à une force de rétention (exercée par la phase stationnaire) et une force de mobilité (due à la phase mobile).

La phase stationnaire est un support plus ou moins poreux recouvert d'un gel (liquide greffé) qui a les propriétés désirées pour retenir les molécules de solutés, ces dernières parcourent cette phase avec des temps proportionnels à leur propriétés intrinsèques (taille, structure) ou à leur affinité (polarité).

La phase mobile ou éluant est un liquide qui entraîne les solutés à travers la colonne [17].

2. Appareillage

Une installation HPLC comporte divers modules : un réservoir à solvant contenant la phase mobile, un système de pompage permettant d'effectuer des éluions graduées, un injecteur, une colonne, un détecteur et un système d'acquisition des données.

Ces modules sont reliés entre eux par l'intermédiaire de canalisations de très faible diamètre interne (0.1mm) pour permettre l'écoulement de la phase mobile. Elles peuvent être en acier inoxydable ou en PEEK (polyether-etherketone) [17].

ANNEXE I : HPLC

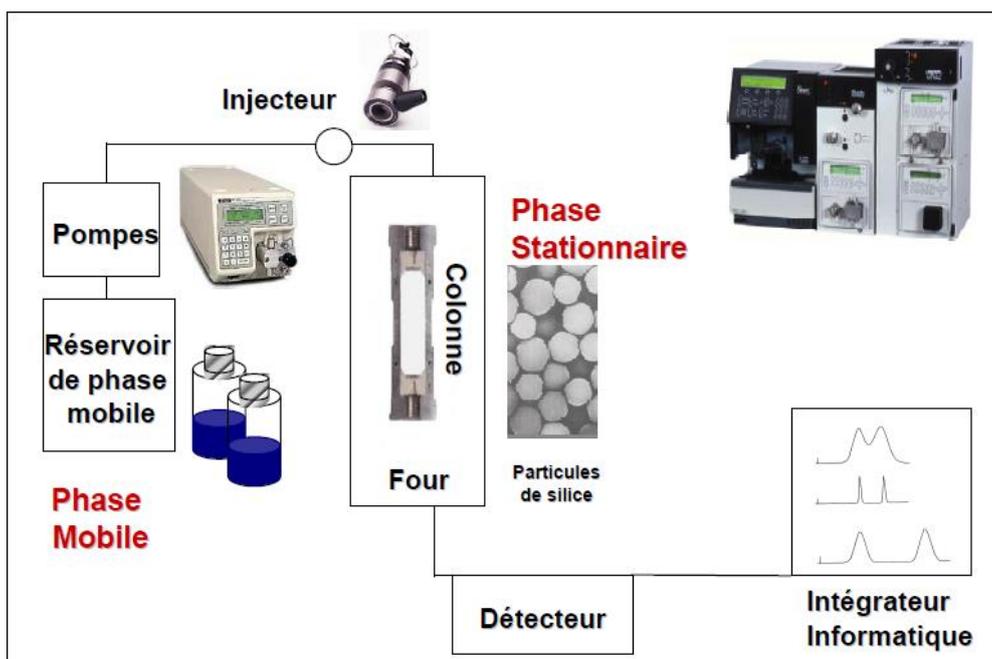


Figure 11 : Composition d'une chaîne d'HPLC [18].

2.1. Réservoir de la phase mobile (éluant)

C'est un flacon en verre ou acier inoxydable d'un volume de 0.5 à 2L dans lequel plonge un tube avec une extrémité filtrante (éliminer les poussières), il est parfois muni d'un système de dégazage (barbotage de gaz inerte) [19].

2.2. Système de pompage

C'est la pièce maîtresse de l'HPLC ; elle permet de produire le débit de phase mobile en mode isocratique ou gradient d'éluant. Son rôle est de provoquer dans la colonne un écoulement continu de la phase mobile compatible avec la séparation chromatographique [17]. Elle est définie par la pression qu'elle permet d'atteindre dans la colonne, son débit, et la stabilité du flux. Actuellement les paramètres d'une pompe sont :

- Débit : 0,01 à 10 ml/min ;
- Stabilité < 1% (<0,2% pour des chromatographies d'exclusion diffusion) ;
- Pression maximale > 350 bars.

Certaines sont pilotées par informatique (bien utile lors de l'utilisation de gradient d'éluant) [20].

2.3. Injecteurs

Le type d'injecteur le plus couramment utilisé comporte une vanne à boucle d'échantillonnage d'une capacité fixe (10, 20, 50 μ l). Cette boucle permet d'introduire l'échantillon sans modifier la pression dans la colonne.

Elle possède 2 positions : la première permet le remplissage (chargement) de la boucle d'injection de volume fixe, la seconde permet la mise en circulation (injection) de l'échantillon dans le système chromatographique.

Le remplissage de la boucle d'injection se fait à l'aide d'une seringue [19].

ANNEXE I : HPLC

2.4. Colonnes

Ceux sont des tubes droits souvent en acier inoxydable ou en verre, de 5 à 25 cm de long et de diamètres différents selon les modèles [17].

La colonne est la partie où se passe la séparation, c'est le cœur du système chromatographique. Elle est souvent précédée d'une pré-colonne (colonne de garde) courte (1 à 2 cm) remplie de la même phase stationnaire qui fixe les composés dont l'affinité avec la phase stationnaire est très élevée et qui ne migre pas dans les conditions utilisées [17].



Figure 12 : Colonnes d'appareil d'HPLC

2.5. Détecteurs

Le détecteur permet de visualiser, de suivre en continu la séparation et mesurer la concentration des solutés [17]. Pour détecter, on utilise différents phénomènes physico-chimiques. Le signal obtenu est enregistré en fonction du temps.

Généralement, on compare le signal obtenu pour la phase mobile et le soluté à celui de la phase mobile seule [20].

Il existe différents types de détecteurs utilisés en HPLC :

2.5.1. Détecteur par spectrophotométrie UV visible

C'est le détecteur le plus utilisé en HPLC. Il mesure l'absorption de la lumière par le soluté à la sortie de la colonne. La réponse est directement proportionnelle à la concentration du soluté élué selon la loi de Beer-Lambert [18].

$$A = \varepsilon \cdot l \cdot C$$

La phase mobile ne doit pas absorber à la longueur d'onde choisie par l'opérateur.

2.5.2. Détecteur par fluorimétrie

Ce mode de détection est plus sélectif et plus sensible que l'absorbance UV visible. Il permet de mesurer l'énergie de fluorescence d'un soluté excité par une radiation ultraviolette. L'intensité de cette fluorescence mesurée est directement proportionnelle à la concentration de l'analyte en solution.

Peu de composés sont fluorescents par eux-mêmes, il est donc souvent nécessaire de les dériver [18].

2.5.3. Détecteur par réfractométrie

Il permet de mesurer de manière continue la différence d'indice de réfraction entre la phase mobile contenant le soluté et la phase mobile pure correspondant à la référence.

ANNEXE I : HPLC

Ce détecteur permet une mesure universelle mais peu sensible. De plus, il est peu pratique car il est très sensible aux fluctuations extérieures (température) et intérieures (densité de la phase mobile) [18].

2.5.4. Détecteur par électrochimie

Ce détecteur permet la détection des substances oxydables ou réductibles (ions métalliques, anions inorganiques, composés nitrés, acides aminés et alcaloïdes) par la mesure du changement de courant entre deux électrodes. Ils ont une excellente sensibilité, permettant la mesure de traces et une gamme étendue de linéarité. En revanche, ils sont sensibles à différents paramètres, comme le débit de l'éluant chromatographique ou le PH et à certaines substances, comme l'oxygène dissous, pouvant perturber la mesure selon le potentiel appliqué [17].

2.6. Intégrateur-enregistreur

Il s'agit d'un petit ordinateur qui récupère les données issues du détecteur, trace les chromatogrammes et intègre la surface des pics.

Une intégration consiste à mesurer la surface sous un pic mais avant tout chercher à séparer correctement les pics avant de les intégrer. La détection d'un pic chromatographique par l'intégrateur dépend de deux paramètres :

- La largeur attendue du pic ;
- Le seuil d'intégration (sensibilité)

La largeur de pic est à peu près prévisible en fonction de la technique d'analyse et des conditions opératoires. Elle détermine la fréquence d'échantillonnage du signal. Le pic est alors découpé en tranches. Le seuil d'intégration est la valeur du signal à partir de laquelle le calculateur repère un début de pic [20].

3. Application de la chromatographie liquide haute performance à l'analyse

Les applications sont innombrables. La méthode permet de séparer des composés de masses molaires variables (de 100 à 200), de nature chimique différentes et même des isomères.

L'HPLC est un très bon complément de la chromatographie en phase gazeuse pour :

- Les substances peu volatiles : molécules de masse molaire > 300 ;
- Substances thermolabiles : comme le médicament issu de la biotechnologie ou les composés d'origine biologique ;
- Les substances ionisées.

L'HPLC couvre tous les domaines d'application. Citons dans les domaines de l'agroalimentaire et de la pharmacie.

3.1. Analyse des chromatogrammes

Un chromatogramme est un diagramme montrant l'évolution du signal du détecteur (proportionnel à la concentration en soluté) en fonction du temps d'éluion (plus rarement du volume d'éluion).

ANNEXE I : HPLC

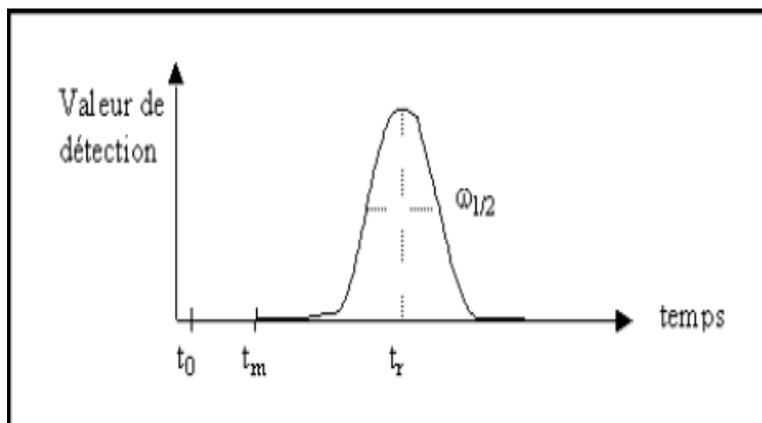


Figure 13 : Chromatogramme [20]

- t_0 : est le temps du début de l'injection ;
- t_m : temps mort ; temps mis par un composé non retenu par la phase stationnaire pour traverser la colonne (temps passé dans la phase mobile) ;
- t_r : temps de rétention ; temps mis par un soluté pour traverser la colonne. C'est le temps passé dans la phase stationnaire et dans le volume mort de la colonne. Ce temps est caractéristique d'un soluté dans des conditions d'analyse données. La surface du pic est en fonction de la quantité du constituant dont il est la trace ;
- t'_r : temps de rétention réduit ; temps passé par un soluté dans la phase stationnaire, soit :

$$t'_r = t_r - t_m$$

- $\omega_{1/2}$: la largeur du pic ; mesurée à mi-hauteur : exprimée en unité de temps ;
- La largeur du pic à la base exprimée en unité de temps : déterminée par l'intersection des tangentes au point d'inflexion à la courbe gaussienne et de la ligne de base ;
- h : la hauteur du pic ;
- Ecart type relatif des aires du pic :

$$\sigma = \frac{1}{16} \sum (y_i - Y')^2$$

Avec : y_i est l'aire du pic pour l'injection i donné par l'intégration du pic.

$Y' = 1/16 (y_1 + y_2 + \dots + y_6)$ la moyenne des aires du pic.

On peut calculer l'écart type relatif en pourcentage :

$$\% \text{ RSD} = 100\sigma/Y'$$

3.2. Analyse qualitative

- **Coefficient de partage K** : (dans le cas de chromatographie de partage)

A un instant donné, le soluté est à la concentration C_m dans la phase mobile et C_s dans la phase stationnaire. Leur rapport à l'équilibre est appelé coefficient de partage K :

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

ANNEXE I : HPLC

Ce coefficient est en fonction de trois types d'affinité :

- Celle entre le soluté et la phase mobile ;
 - Celle entre le soluté et la phase stationnaire ;
 - Celle entre les phases mobile et stationnaire.
- **Le facteur de capacité K'** (ou facteur de rétention)

C'est le rapport entre la quantité du soluté dans la phase stationnaire et la quantité de soluté dans la phase mobile.

$$K' = \frac{C_s \times V_s}{C_m \times V_m} = K \times \frac{V_s}{V_m}$$

V_s : volume de la phase stationnaire

V_m : volume de la phase mobile ou volume mort

K' : est aussi déterminé expérimentalement par le rapport de temps de rétention réduit sur le temps mort :

$$K' = \frac{t_r - t_m}{t_m}$$

3.2.1. Notion d'efficacité ou performances d'une colonne

La largeur d'un pic est caractéristique de l'efficacité de la séparation : plus le pic est fin plus la chromatographie est efficace. L'efficacité est exprimée par :

- Le nombre de plateaux théoriques N : contenus dans la colonne (nombre des opérations que subit le soluté pour traverser la colonne chromatographique). Plus N est grand plus la colonne est efficace, elle est traduite par la finesse des pics obtenus. Sa détermination est réalisée pour chaque composé par la relation suivante :

$$N_{th} = 5.54 \left(\frac{t_r}{\omega_{1/2}} \right)^2 = 16 \left(\frac{t_r}{\omega} \right)^2$$

$\omega_{1/2}$: Largeur du pic à mi-hauteur

ω : Largeur de pic à la base

- La hauteur équivalente à un plateau théorique : HEPT, qui est défini comme :

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

L : longueur de la colonne

N : nombre de plateau théorique

3.2.2. Qualité de la séparation

Une bonne séparation se traduira par une séparation distincte des pics correspondant à chacun des produits.



ANNEXE I : HPLC

- **La sélectivité (a)** : entre deux pics A et B

Elle mesure la capacité de la colonne à séparer les maximums des pics. Plus elle est supérieure à 1, plus les temps de rétention sont éloignés.

Elle est définie comme le rapport des temps de rétention réduits.

$$a = \frac{t'_r B}{t'_r A}$$

a est toujours supérieur à 1 car on choisit $t'_r B > t'_r A$

- **La résolution (R)**

Elle quantifie la qualité de la séparation en caractérisant le fait qu'il y ait ou non chevauchement de deux pics contigus.

$$R = \frac{t'_r B - t'_r A}{\omega B + \omega A}$$

$R < 1$: mauvaise résolution ;

$1 < R < 1.4$: résolution acceptable ;

$1.4 < R < 1.6$: résolution optimale ;

$R > 1.6$: résolution trop bonne car le temps d'analyse est rallongé.

3.3. Analyse quantitative

Cette analyse est basée sur le fait que l'aire des pics chromatographiques est proportionnel à la concentration ou à la quantité de produit analysé.

Dans la pratique on injecte les composés en solution et on préfère utiliser les concentrations plutôt que les masses. Il y a proportionnalité entre la masse injectée et la concentration du soluté, à condition de toujours injecter le même volume de solution.

On écrit donc : $A = K_c C$

A = aire du pic

K_c = coefficient de réponse du détecteur

C = concentration du composé injecté [17].

Conclusion

Le succès de l'HPLC est dû à la meilleure exploitation des mécanismes d'interactions, aux grandes efficacités et au grand choix des phases stationnaires de plus en plus fines ($3\mu\text{m}$) ainsi qu'au progrès important effectués dans le domaine de l'appareillage.

ANNEXE II

TABLE DE STUDENT

ANNEXE II

TABLE DE STUDENT

La table donne la probabilité α pour que t égale ou dépasse, en valeur absolue, une valeur donnée, en fonction du nombre de degrés de liberté (ddl).

Exemple : avec $ddl = 10$, pour $t = 2,228$, la probabilité est $\alpha = 0,05$

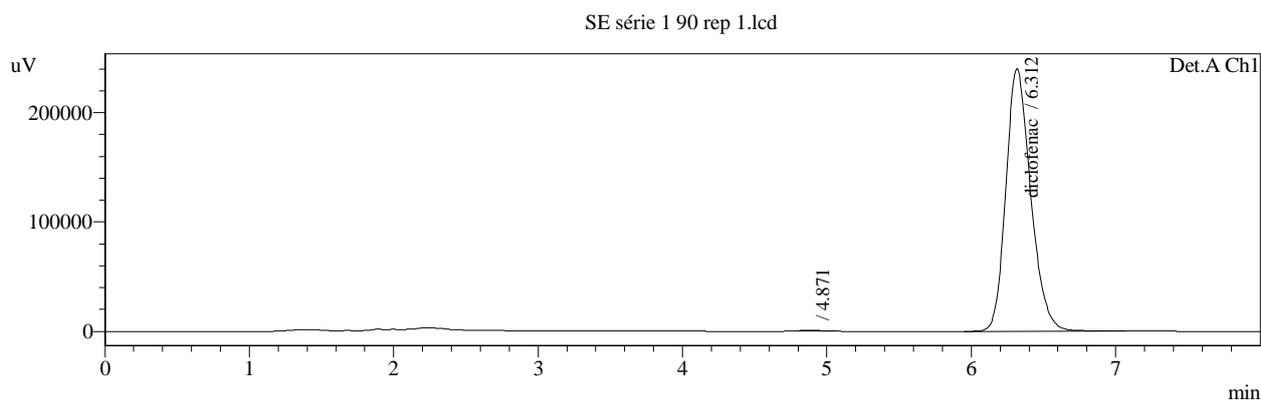
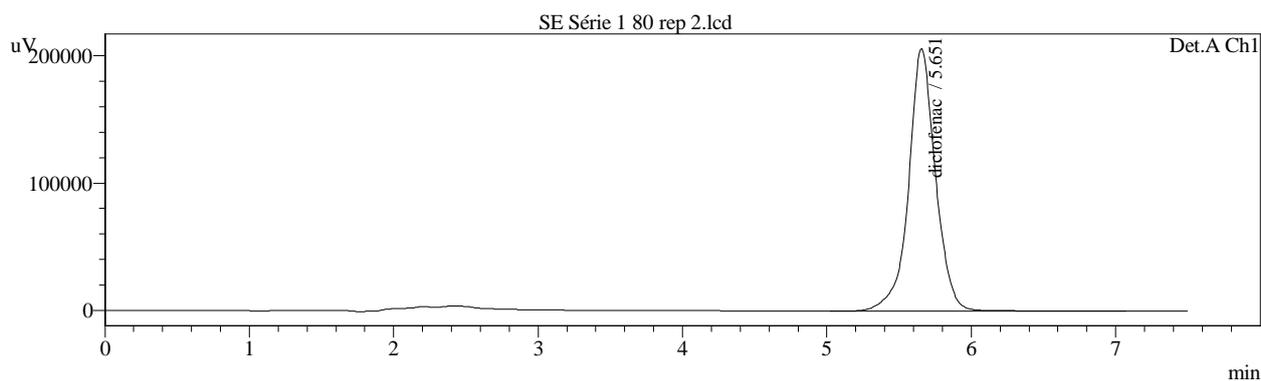
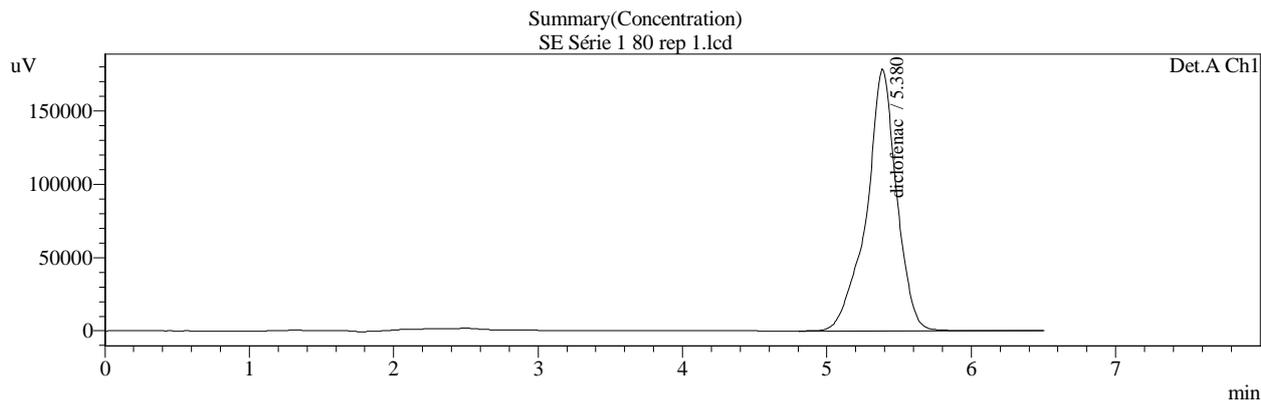
α ddl	0,90	0,50	0,30	0,20	0,10	0,05	0,02	0,01	0,001
1	0,158	1,000	1,963	3,078	6,314	12,706	31,821	63,656	636,578
2	0,142	0,816	1,386	1,886	2,920	4,303	6,965	9,925	31,600
3	0,137	0,765	1,250	1,638	2,353	3,182	4,541	5,841	12,924
4	0,134	0,741	1,190	1,533	2,132	2,776	3,747	4,604	8,610
5	0,132	0,727	1,156	1,476	2,015	2,571	3,365	4,032	6,869
6	0,131	0,718	1,134	1,440	1,943	2,447	3,143	3,707	5,959
7	0,130	0,711	1,119	1,415	1,895	2,365	2,998	3,499	5,408
8	0,130	0,706	1,108	1,397	1,860	2,306	2,896	3,355	5,041
9	0,129	0,703	1,100	1,383	1,833	2,262	2,821	3,250	4,781
10	0,129	0,700	1,093	1,372	1,812	2,228	2,764	3,169	4,587
11	0,129	0,697	1,088	1,363	1,796	2,201	2,718	3,106	4,437
12	0,128	0,695	1,083	1,356	1,782	2,179	2,681	3,055	4,318
13	0,128	0,694	1,079	1,350	1,771	2,160	2,650	3,012	4,221
14	0,128	0,692	1,076	1,345	1,761	2,145	2,624	2,977	4,140
15	0,128	0,691	1,074	1,341	1,753	2,131	2,602	2,947	4,073
16	0,128	0,690	1,071	1,337	1,746	2,120	2,583	2,921	4,015
17	0,128	0,689	1,069	1,333	1,740	2,110	2,567	2,898	3,965
18	0,127	0,688	1,067	1,330	1,734	2,101	2,552	2,878	3,922
19	0,127	0,688	1,066	1,328	1,729	2,093	2,539	2,861	3,883
20	0,127	0,687	1,064	1,325	1,725	2,086	2,528	2,845	3,850
21	0,127	0,686	1,063	1,323	1,721	2,080	2,518	2,831	3,819
22	0,127	0,686	1,061	1,321	1,717	2,074	2,508	2,819	3,792
23	0,127	0,685	1,060	1,319	1,714	2,069	2,500	2,807	3,768
24	0,127	0,685	1,059	1,318	1,711	2,064	2,492	2,797	3,745
25	0,127	0,684	1,058	1,316	1,708	2,060	2,485	2,787	3,725
26	0,127	0,684	1,058	1,315	1,706	2,056	2,479	2,779	3,707
27	0,127	0,684	1,057	1,314	1,703	2,052	2,473	2,771	3,689
28	0,127	0,683	1,056	1,313	1,701	2,048	2,467	2,763	3,674
29	0,127	0,683	1,055	1,311	1,699	2,045	2,462	2,756	3,660
30	0,127	0,683	1,055	1,310	1,697	2,042	2,457	2,750	3,646
40	0,126	0,681	1,050	1,303	1,684	2,021	2,423	2,704	3,551
80	0,126	0,678	1,043	1,292	1,664	1,990	2,374	2,639	3,416
120	0,126	0,677	1,041	1,289	1,658	1,980	2,358	2,617	3,373
∞	0,126	0,675	1,037	1,282	1,645	1,960	2,327	2,577	3,293

ANNEXE III

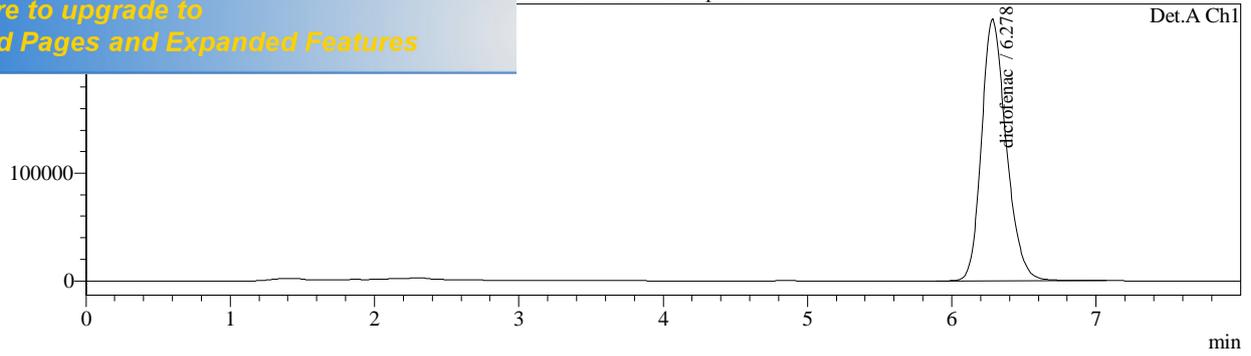
DONNEES BRUTES DE LA VALIDATION ANALYTIQUE

SE et SV: Série N° 01

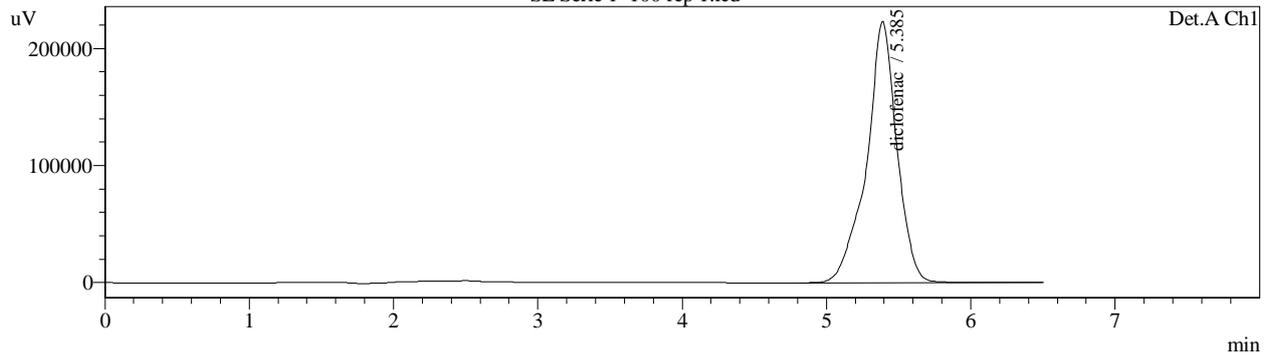
Sample Name : dico
Sample ID : STD
Tray# : 11
Vial# : 14
Injection Volume : 20 uL
Data Filename : SE Série 1 120 rep 2.lcd
Method Filename : METHODE12.km
Batch Filename : DICL SODIQUE serie 1.cb
Report Filename : Default.lcr
Date Acquired : 01/05/2016 19:23:16
Data Processed : 01/05/2016 19:30:48



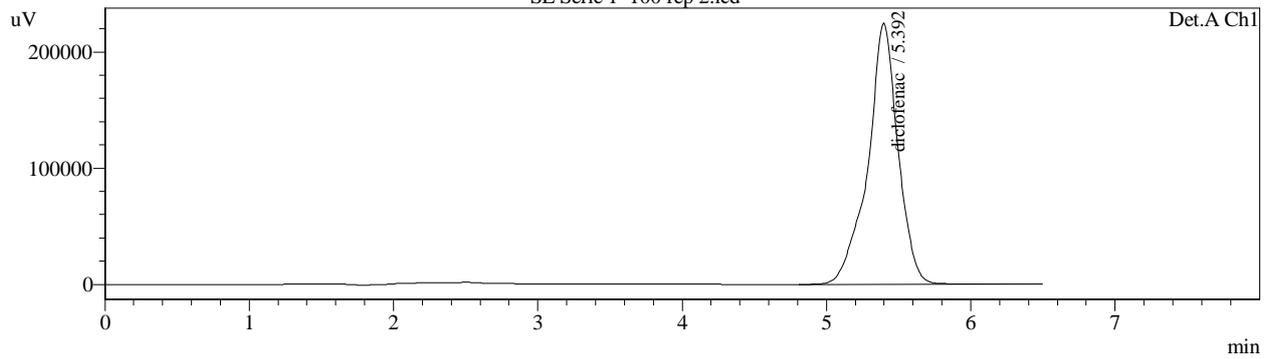
SE série 1 90 rep 2.lcd



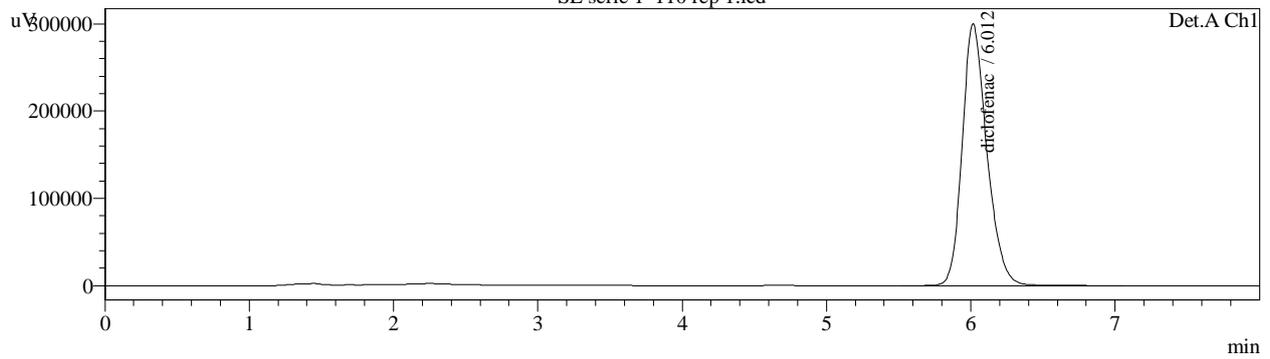
SE Série 1 100 rep 1.lcd



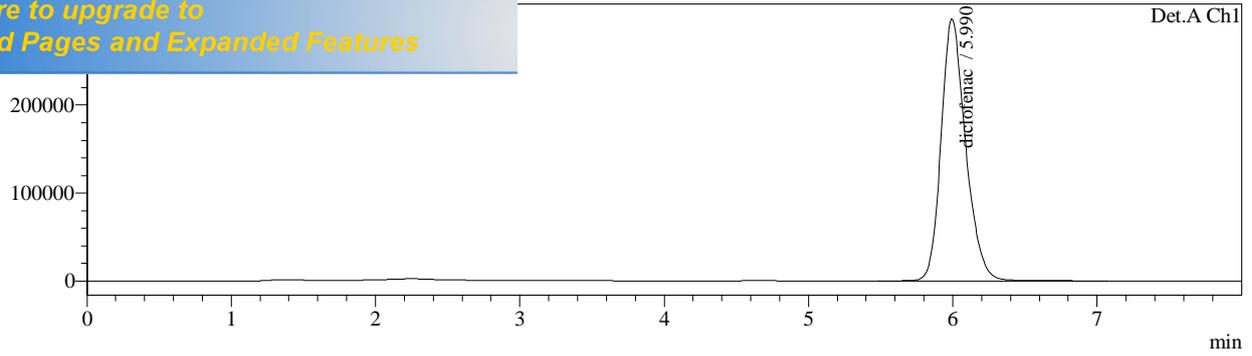
SE Série 1 100 rep 2.lcd



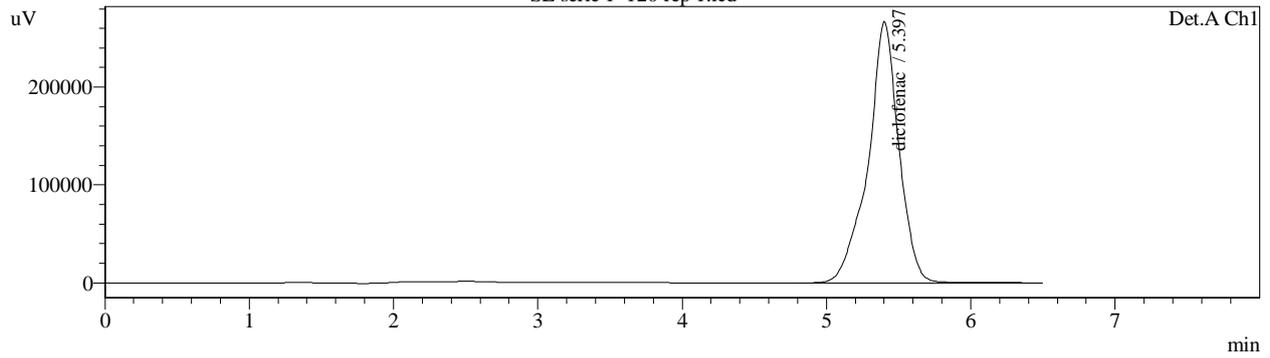
SE série 1 110 rep 1.lcd



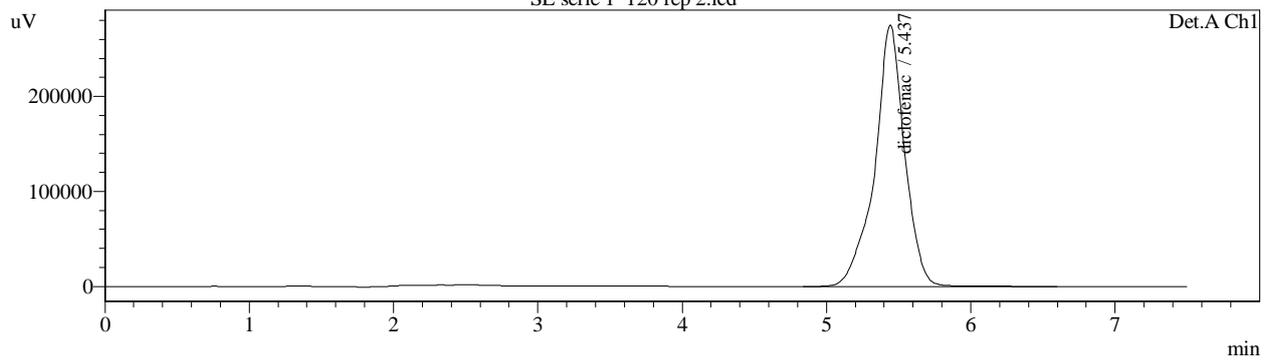
SE série 1 110 rep 2.lcd



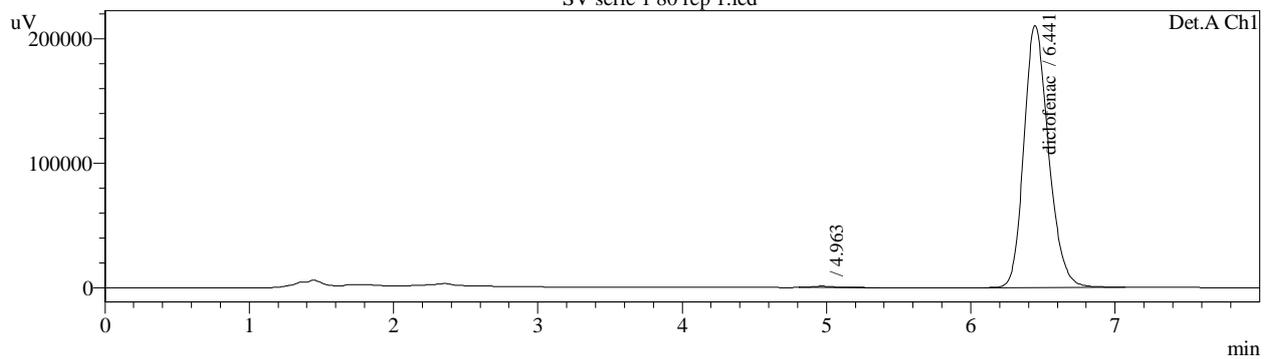
SE série 1 120 rep 1.lcd

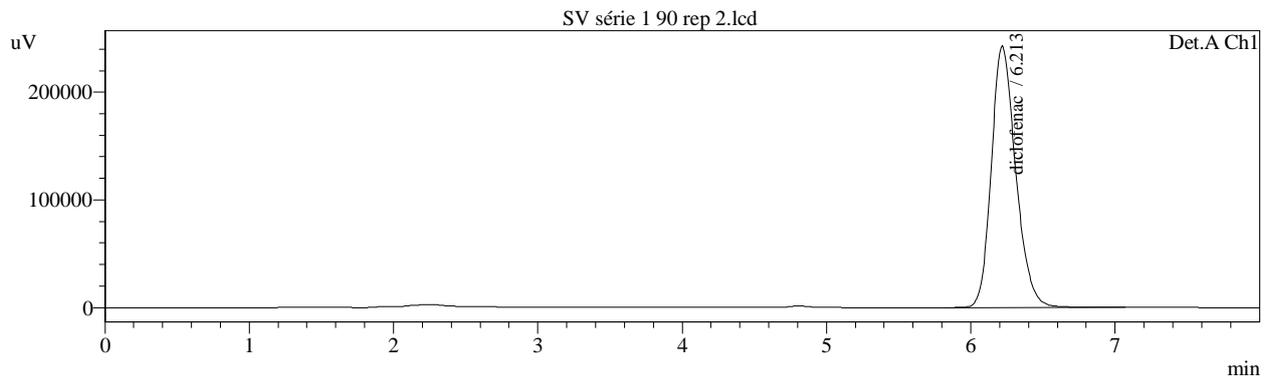
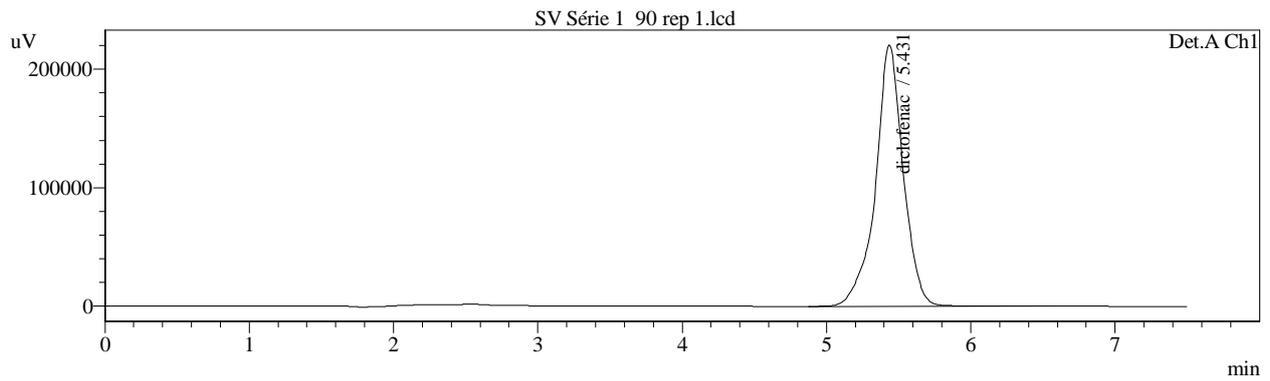
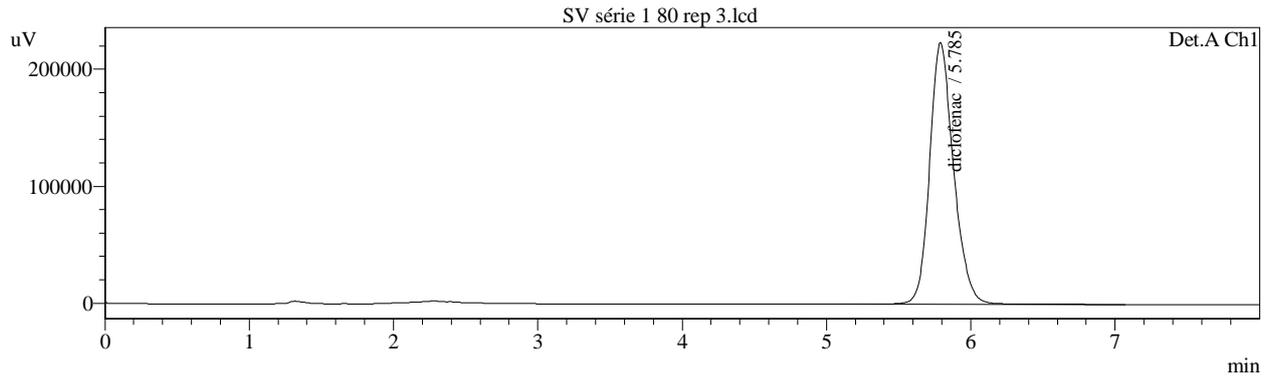
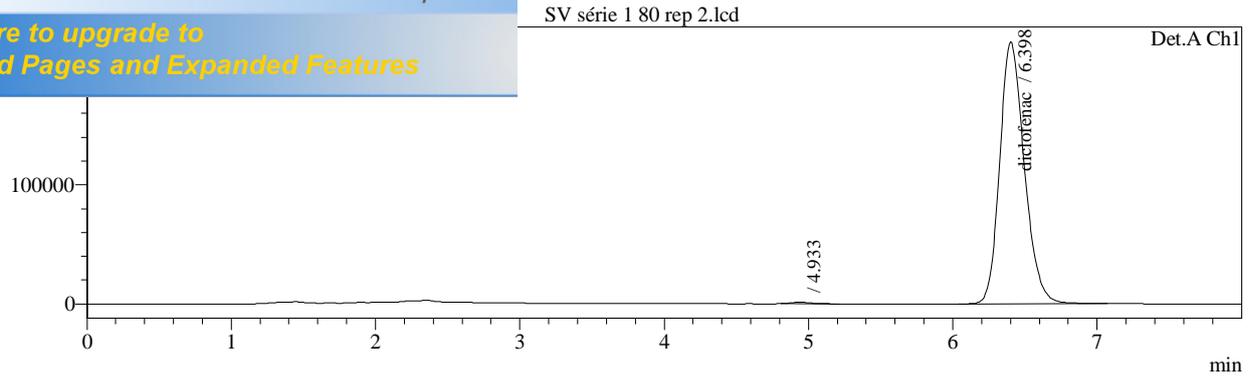


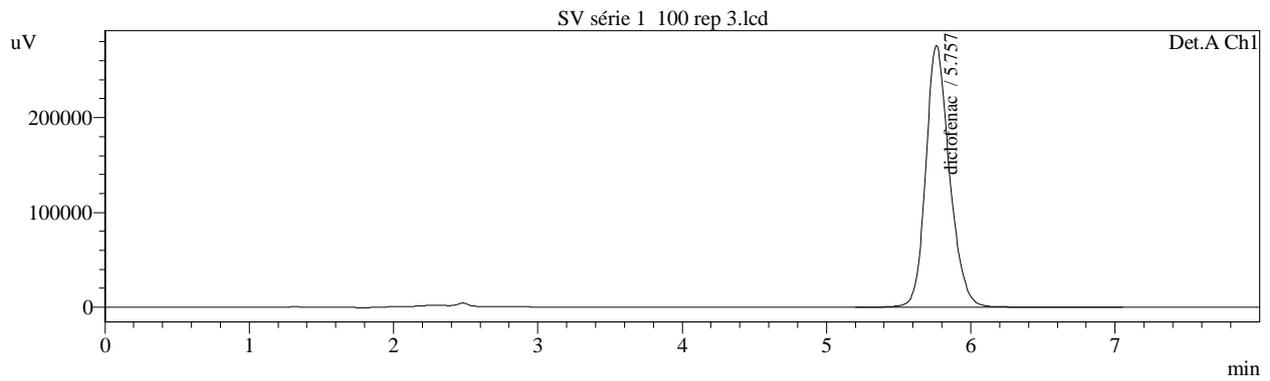
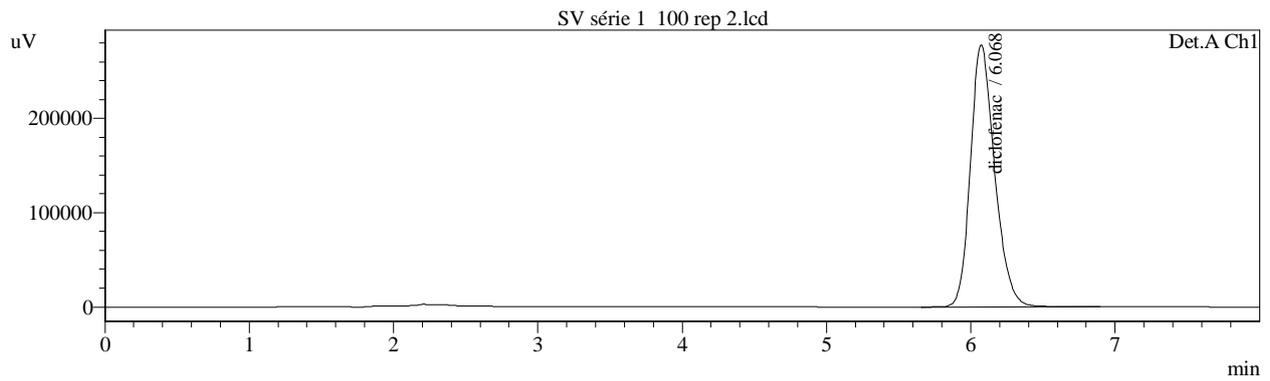
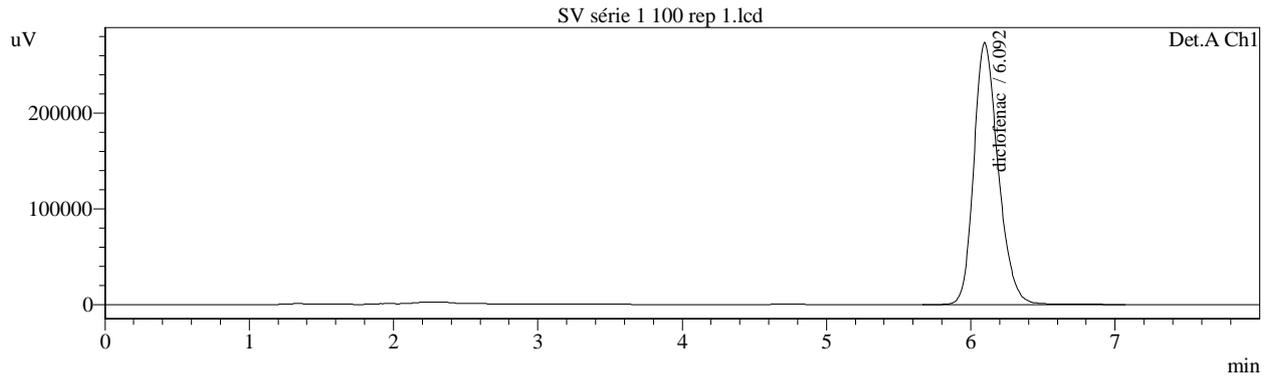
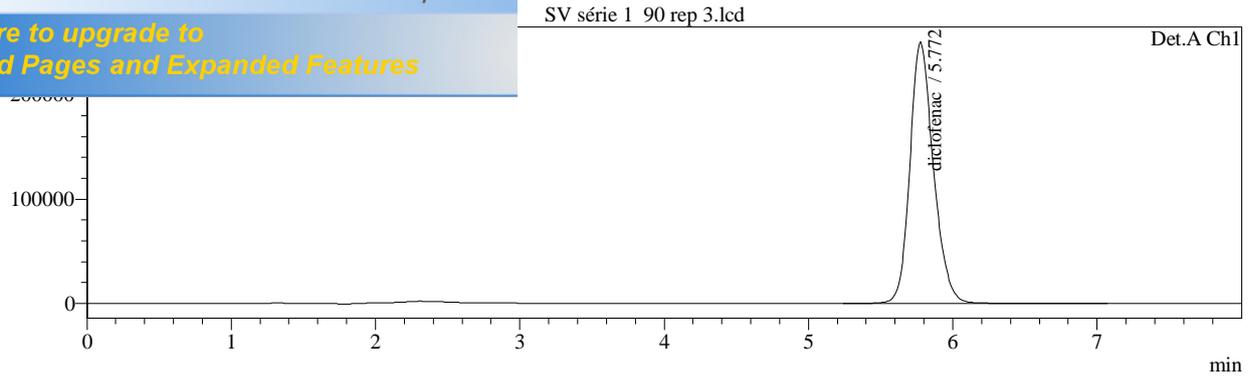
SE série 1 120 rep 2.lcd

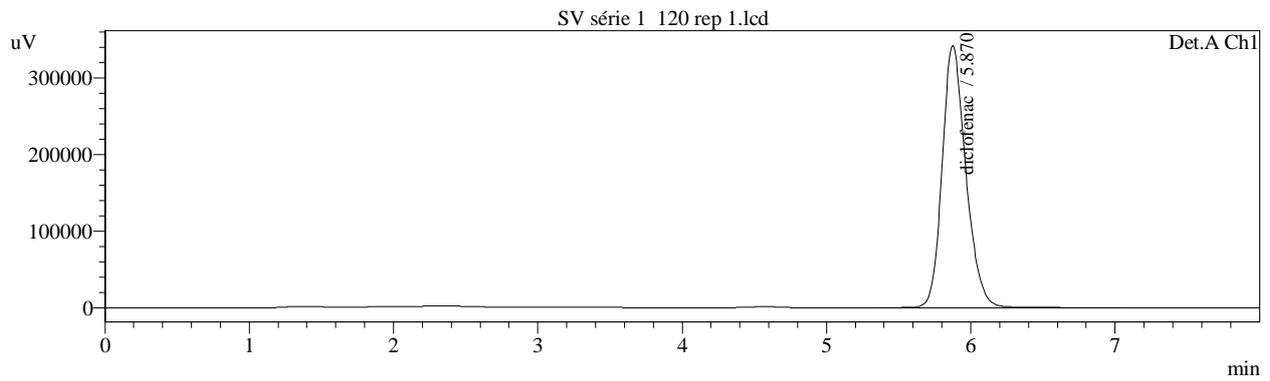
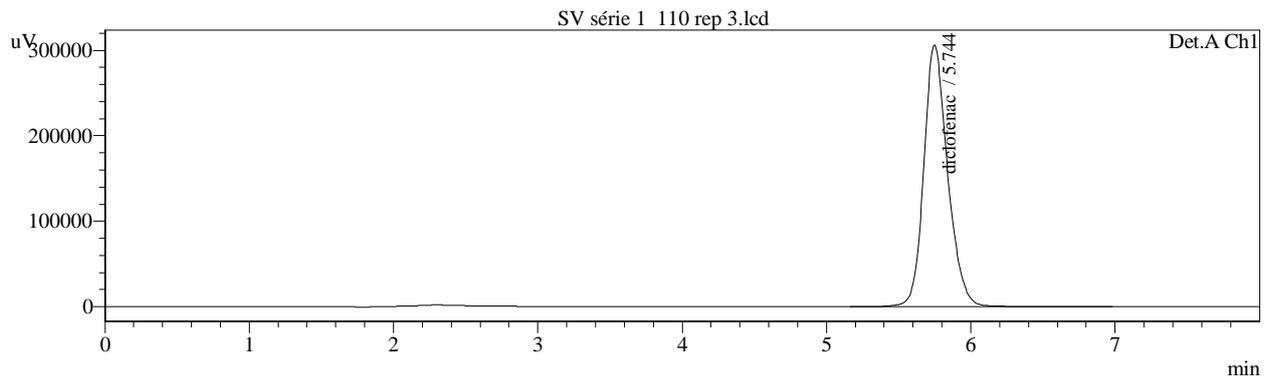
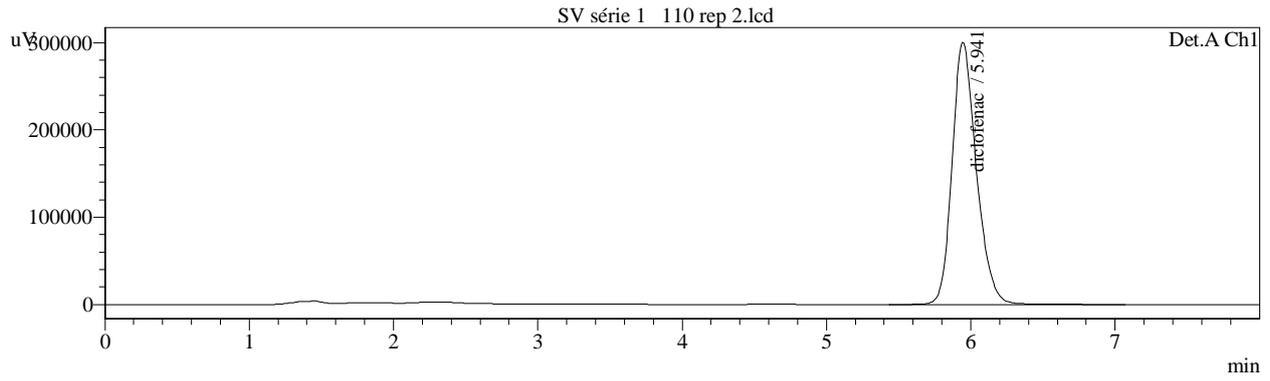
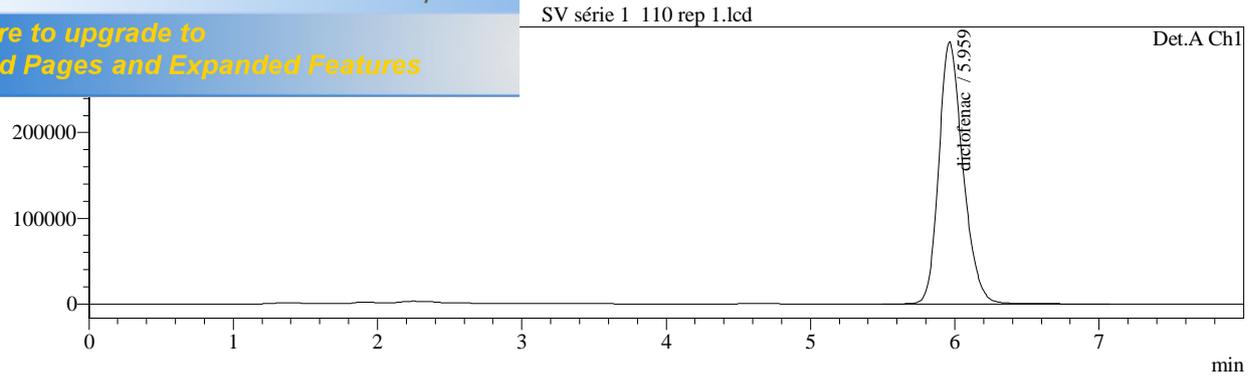


SV série 1 80 rep 1.lcd

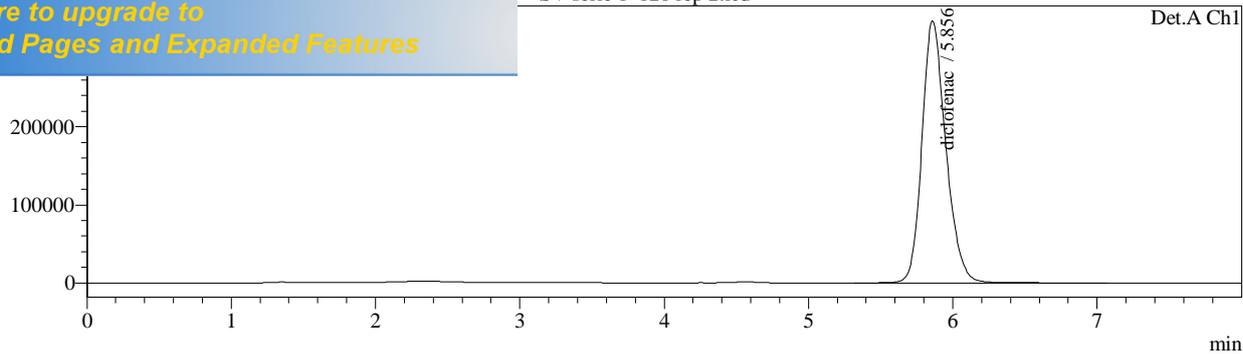




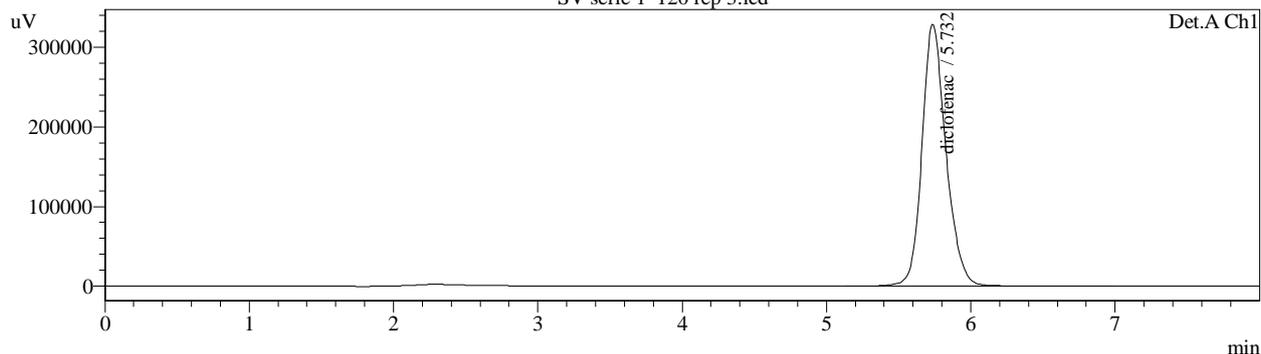




SV série 1 120 rep 2.lcd



SV série 1 120 rep 3.lcd

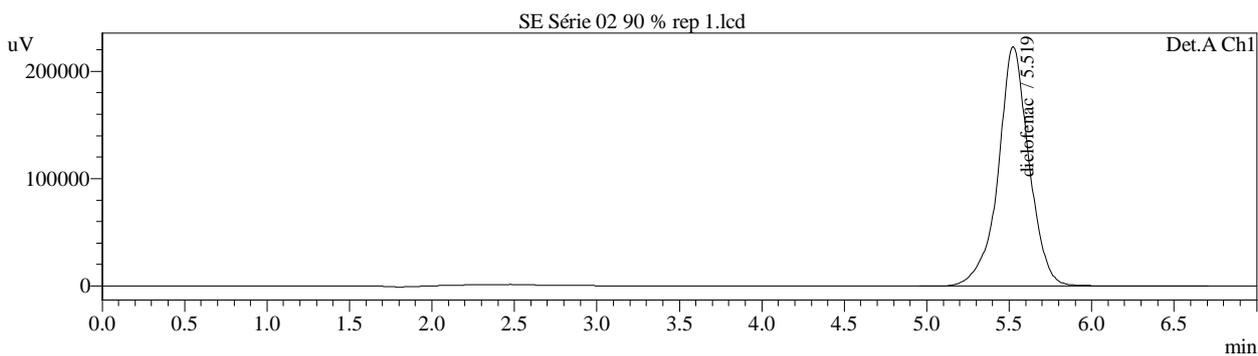
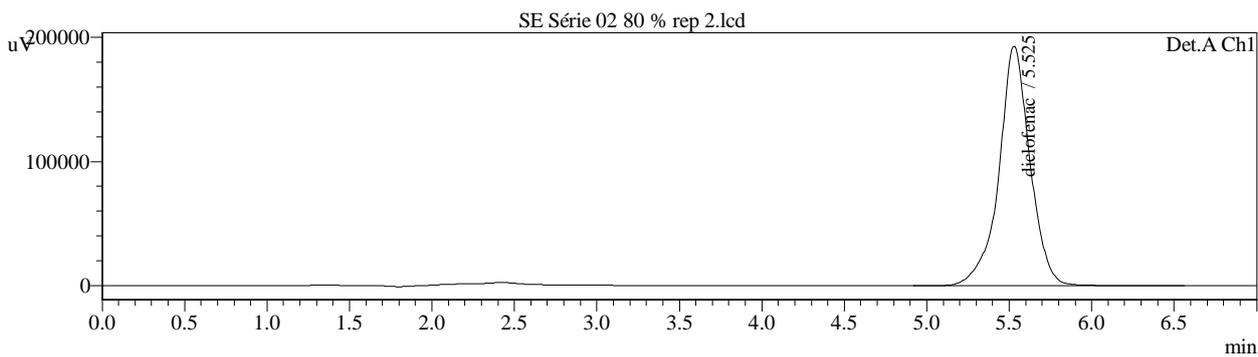
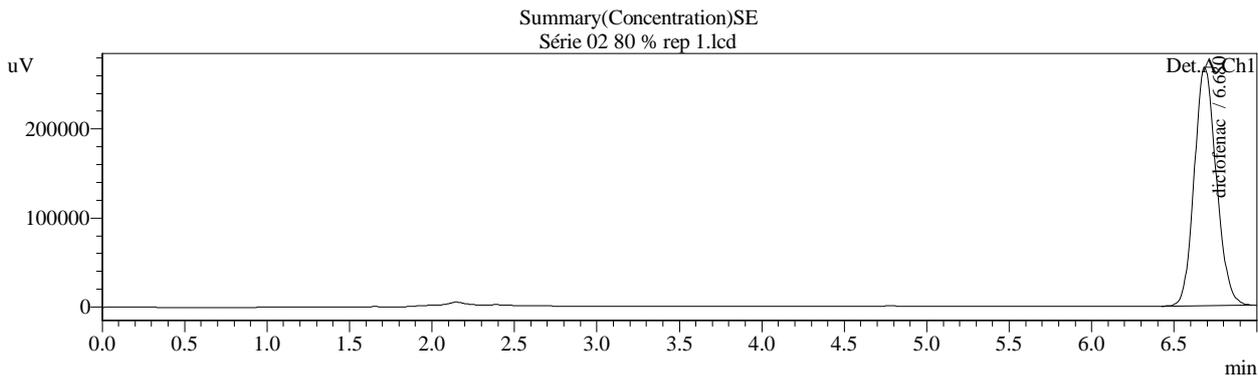


<< Detector A >>

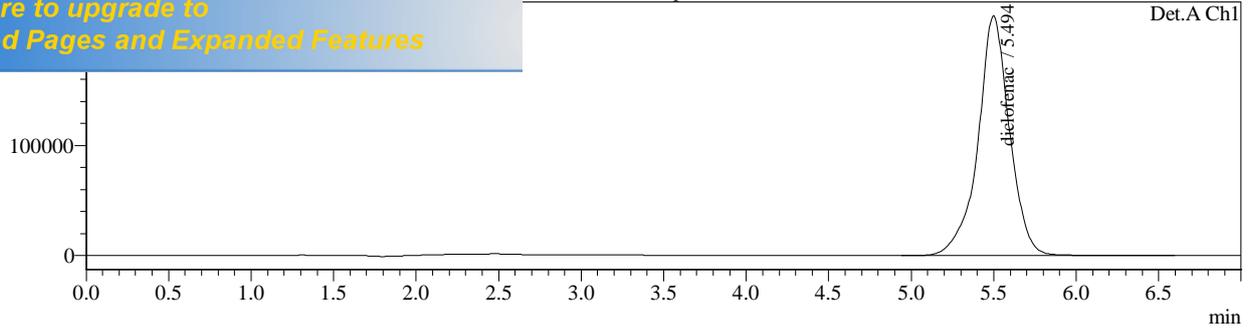
Title	Sample Name	Sample ID	diclofenac
SE Série 1 80 rep 1.lcd	diclo	STD	2604377
SE Série 1 80 rep 2.lcd	diclo	STD	2669243
SE Série 1 90 rep 1.lcd	diclo	STD	2870479
SE Série 1 90 rep 2.lcd	diclo	STD	2897903
SE Série 1 100 rep 1.lcd	diclo	STD	3272334
SE Série 1 100 rep 2.lcd	diclo	STD	3271005
SE Série 1 110 rep 1.lc	diclo	STD	3561840
SE Série 1 110 rep 2.1	diclo	STD	3525232
SE Série 1 120 rep 1.lcd	diclo	STD	3962713
SE Série 1 120 rep 2.lcd	diclo	STD	3960340
SV Série 1 80 rep 1.lcd	diclo	STD	2503041
SV Série 1 80 rep 2.lcd	diclo	STD	2606467
SV Série 1 80 rep 3.lcd	diclo	STD	2583874
SV Série 1 90 rep 1.lcd	diclo	STD	2948892
SV Série 1 90 rep 2.lcd	diclo	STD	2857363
SV Série 1 90 rep 3.lcd	diclo	STD	2850344
SV Série 1 100 rep 1.lcd	diclo	STD	3203869
SV Série 1 100 rep 2.lcd	diclo	STD	3242346
SV Série 1 100 rep 3.lcd	diclo	STD	3159339
SV Série 1 110 rep 1.lcd	diclo	STD	3558475
SV Série 1 110 rep 2.lcd	diclo	STD	3502680
SV Série 1 110 rep 3.lcd	diclo	STD	3521974
SV Série 1 120 rep 1.lcd	diclo	STD	3904232
SV Série 1 120 rep 2.lcd	diclo	STD	3857303
SV Série 1 120 rep 3.lcd	diclo	STD	3803388
Average			3227962
%RSD			14.645
Maximum			3962713
Minimum			2503041
Standard Deviation			472726

SE et SV: Série N°02

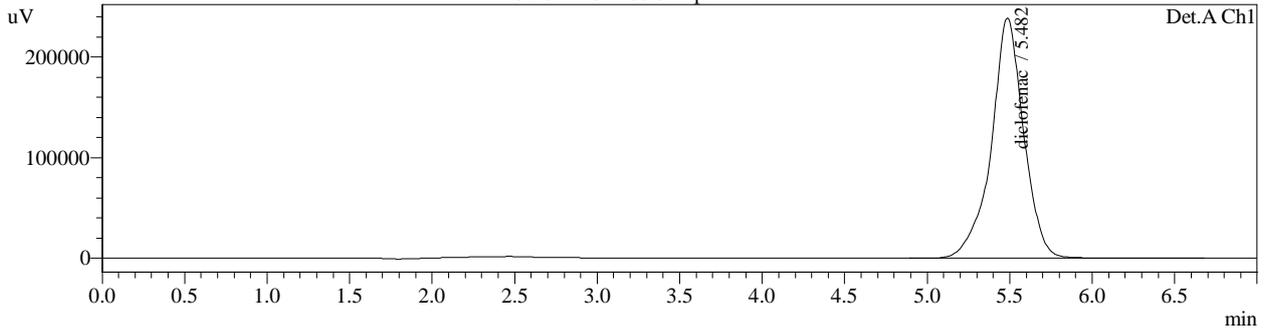
Sample Name : dico
 Sample ID : SE 2
 Tray# : 11
 Vial# : 31
 Injection Volume : 20 uL
 Data Filename : SE 2 80 rep 1.lcd
 Method Filename : METHODE12.km
 Batch Filename : DICL SODIQUE.lcb
 Report Filename : Default.lcr
 Date Acquired : 27/04/2016 16:47:46
 Data Processed : 01/05/2016 12:41:21



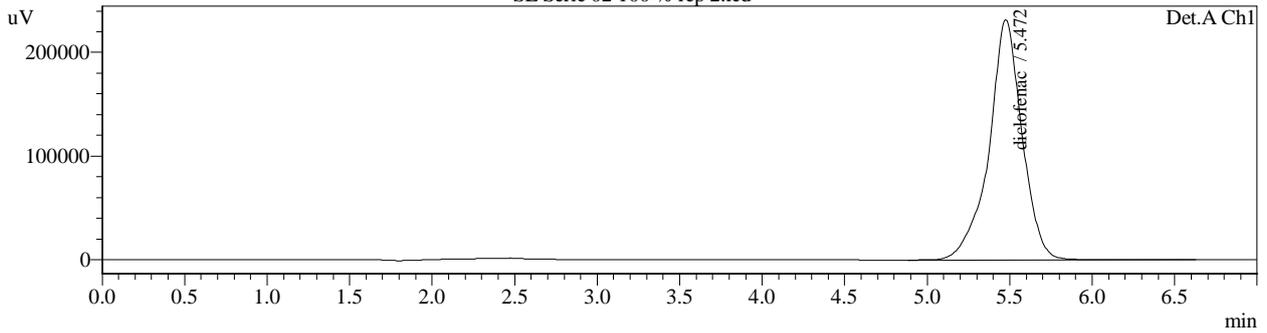
3 Série 02 90 % rep 2.lcd



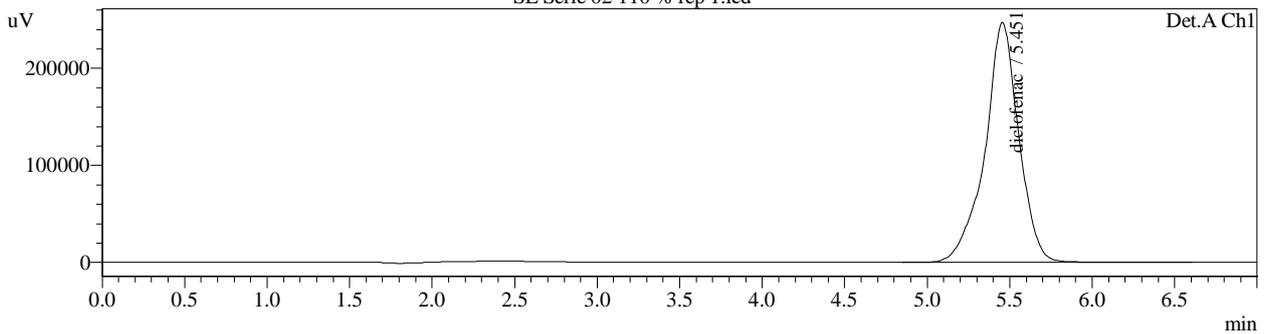
SE Série 02 100 % rep 1.lcd



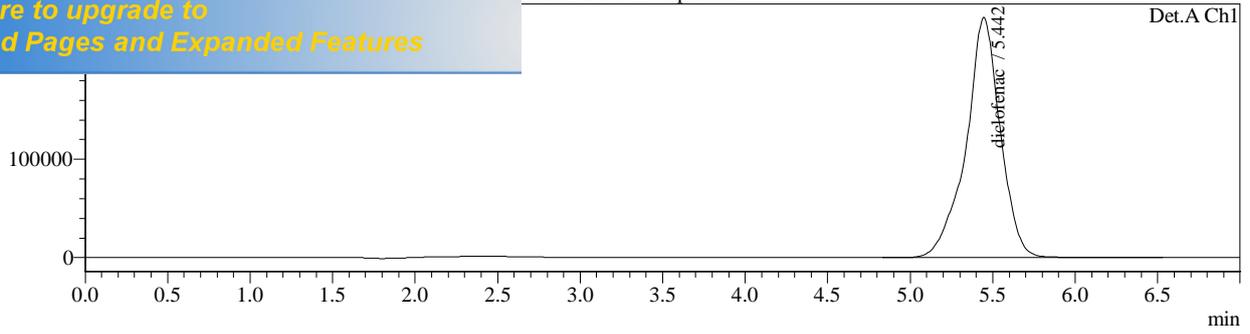
SE Série 02 100 % rep 2.lcd



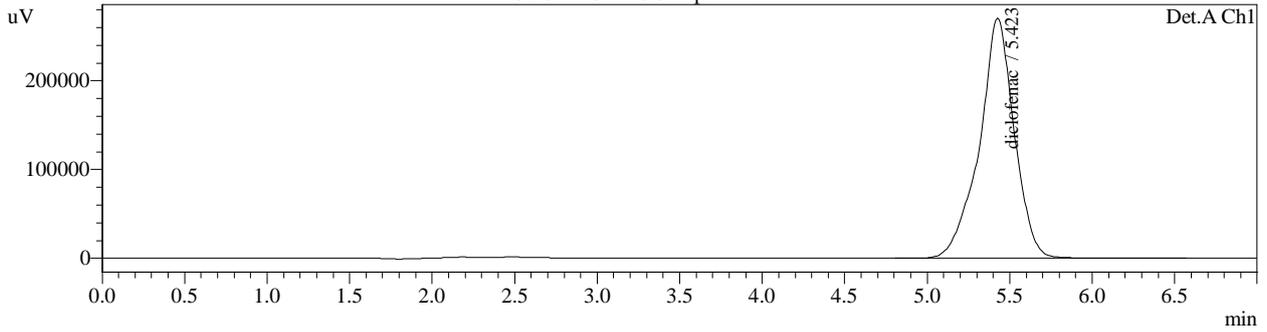
SE Série 02 110 % rep 1.lcd



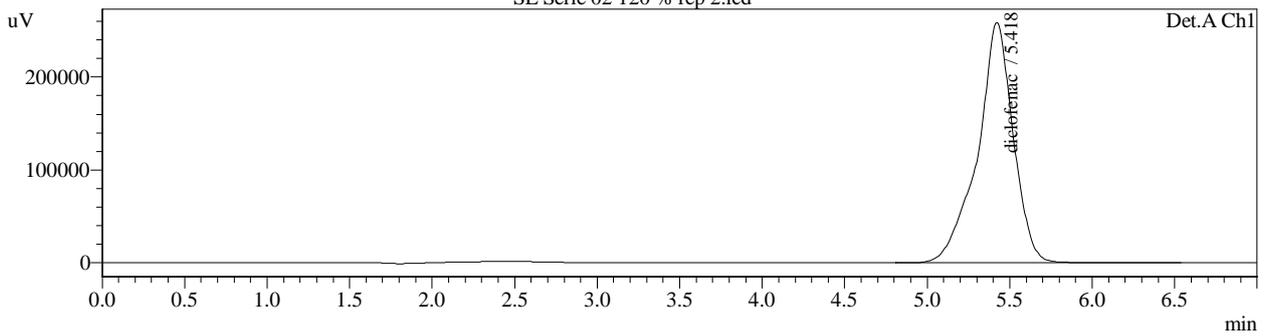
Série 02 110 % rep 2.lcd



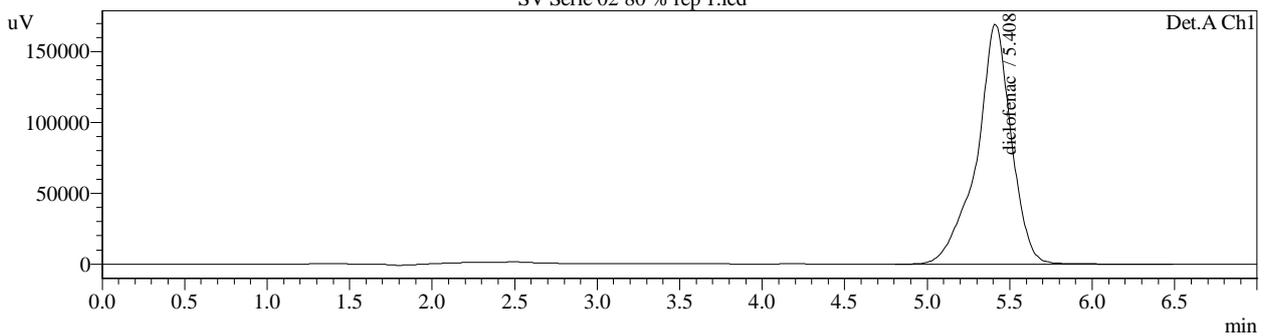
SE Série 02 120 % rep 1.lcd



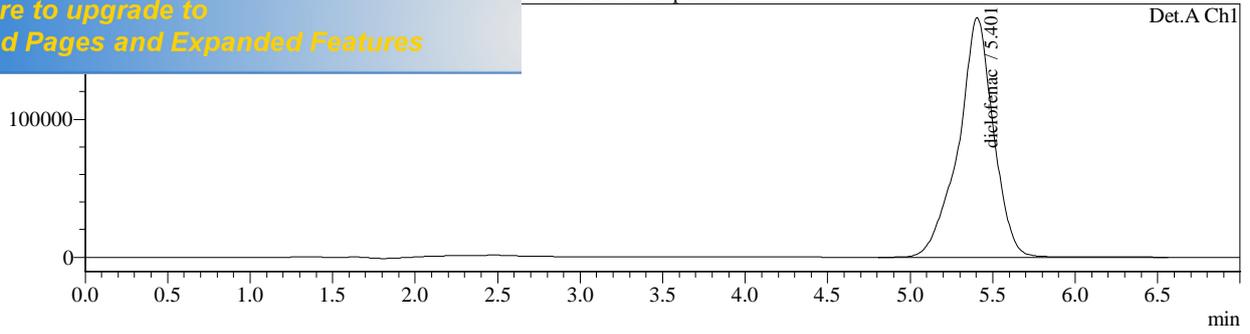
SE Série 02 120 % rep 2.lcd



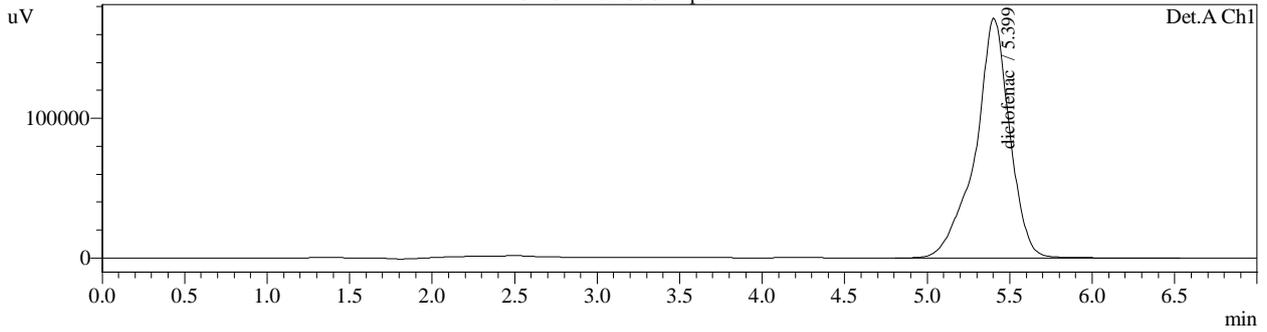
SV Série 02 80 % rep 1.lcd



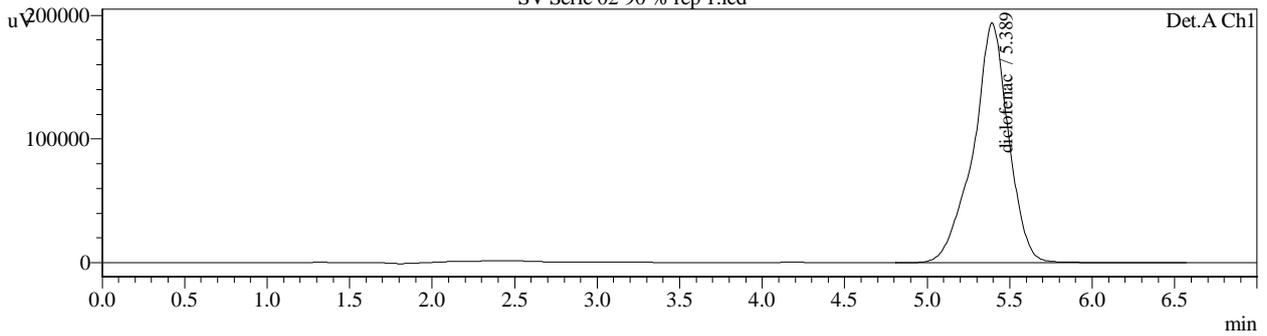
7 Série 02 80 % rep 2.lcd



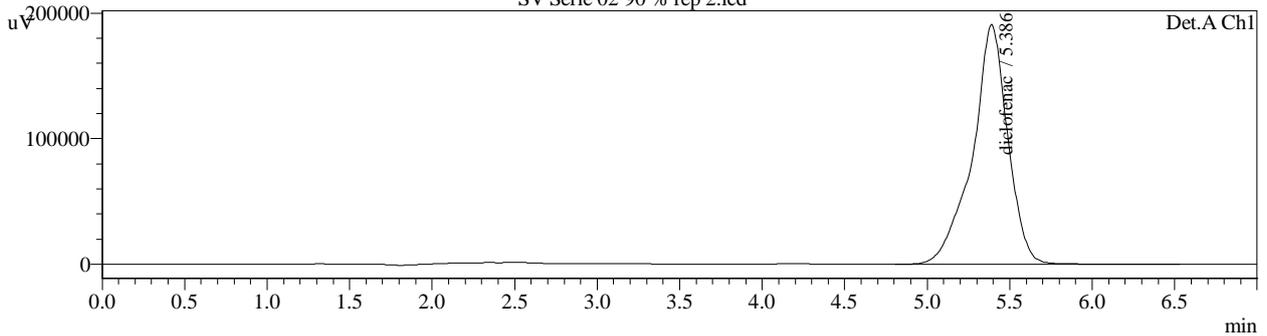
SV Série 02 80 % rep 3.lcd



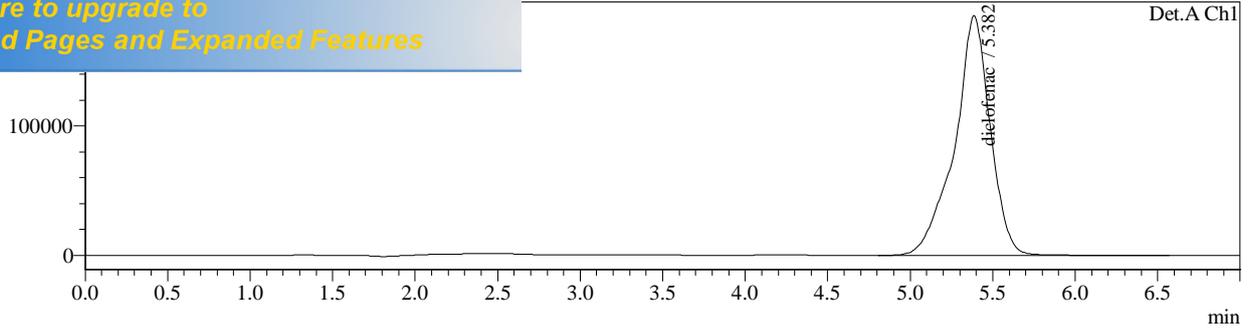
SV Série 02 90 % rep 1.lcd



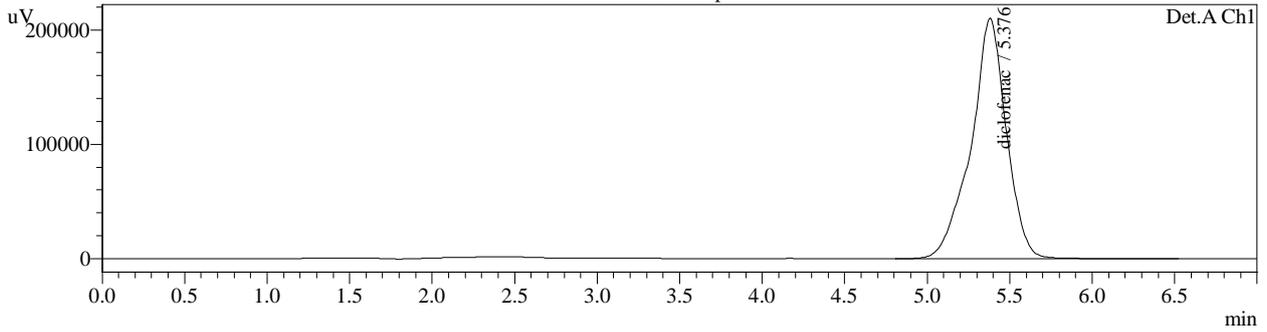
SV Série 02 90 % rep 2.lcd



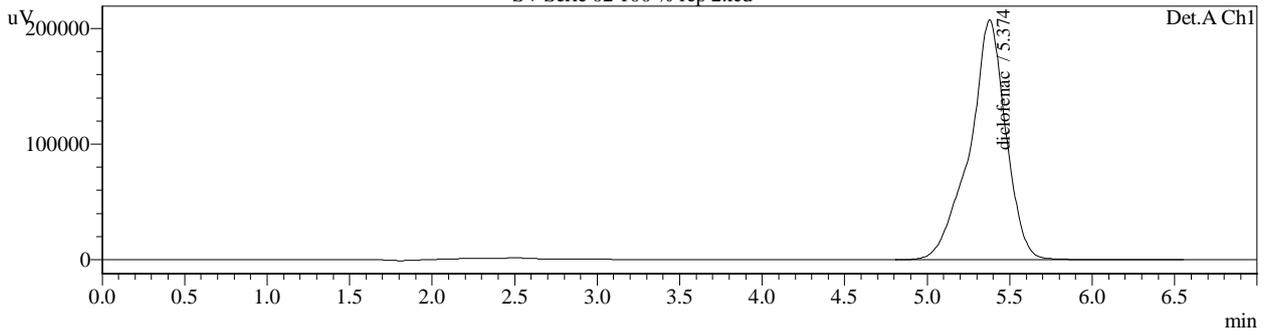
SV Série 02 90 % rep 3.lcd



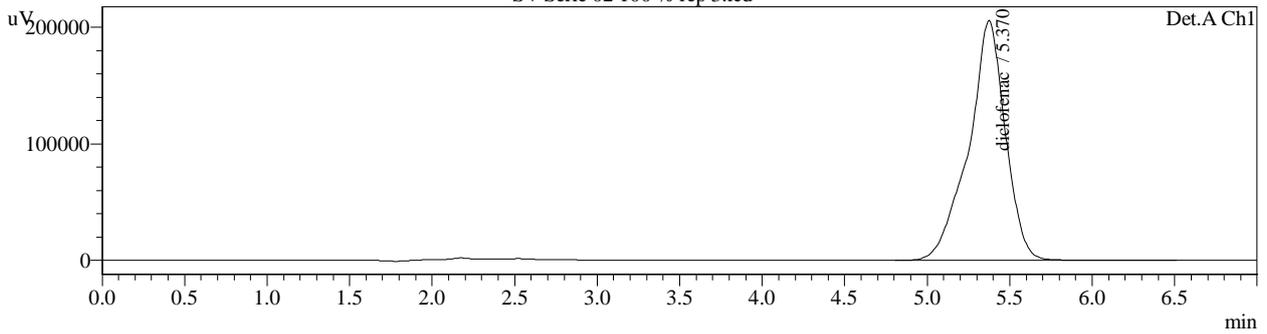
SV Série 02 100 % rep 1.lcd



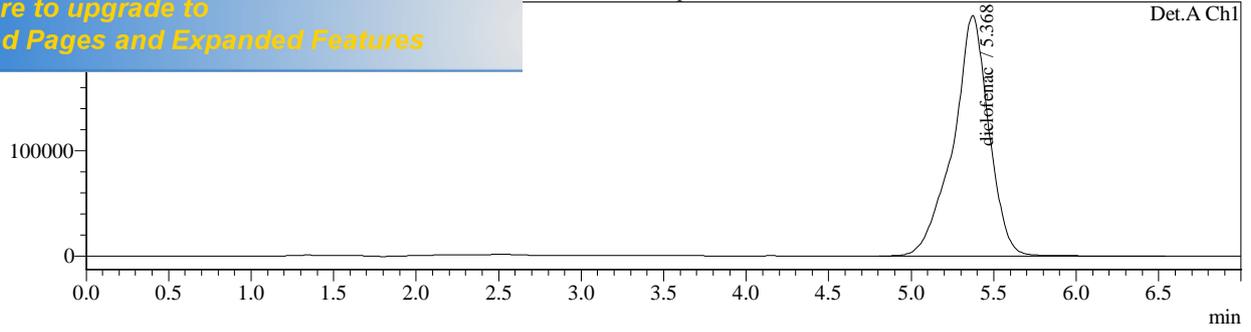
SV Série 02 100 % rep 2.lcd



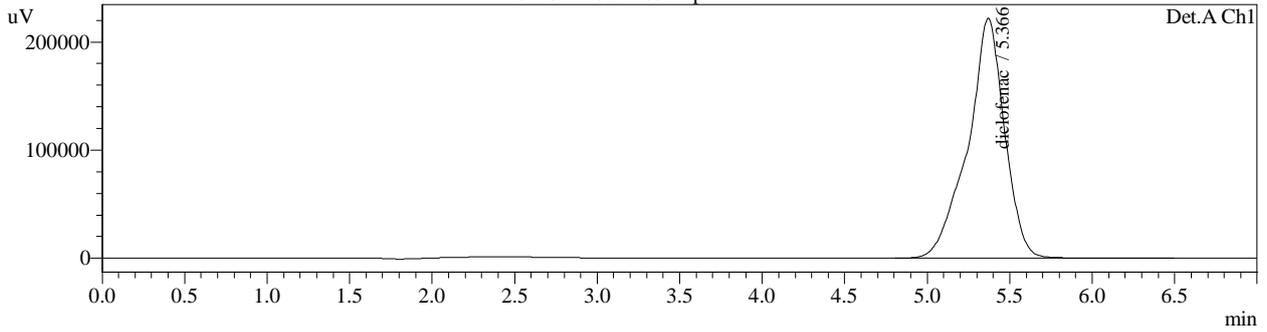
SV Série 02 100 % rep 3.lcd



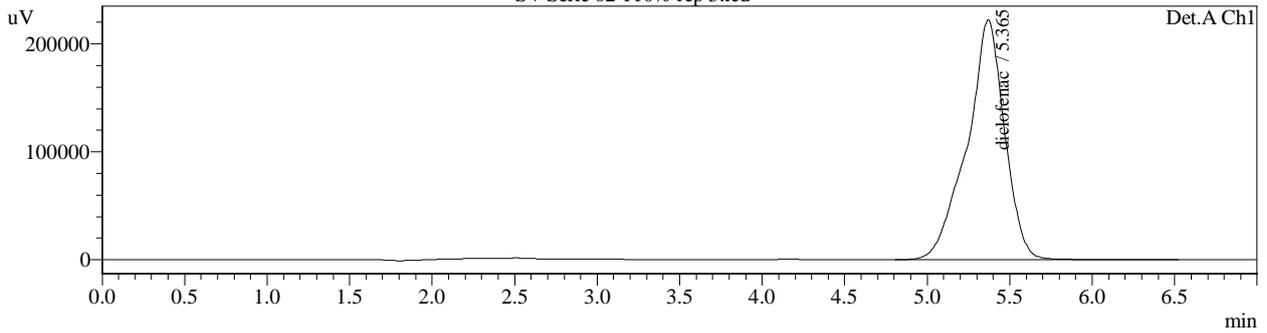
Série 02 110% rep 1.lcd



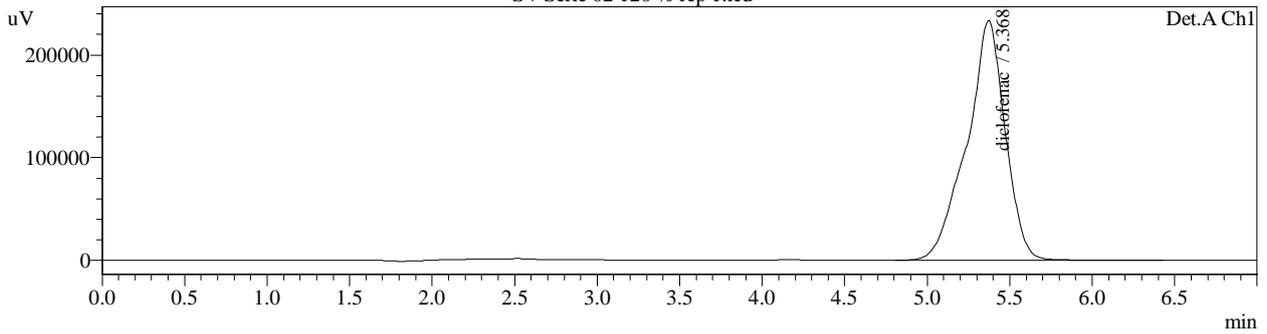
SV Série 02 110% rep 2.lcd



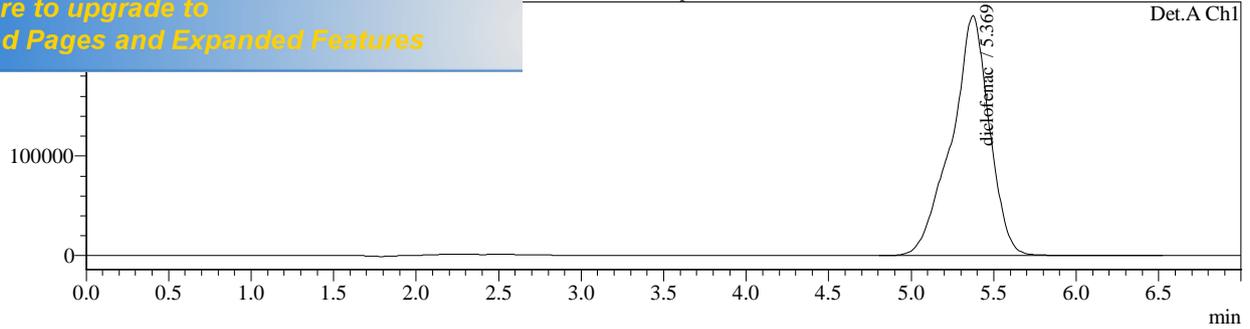
SV Série 02 110% rep 3.lcd



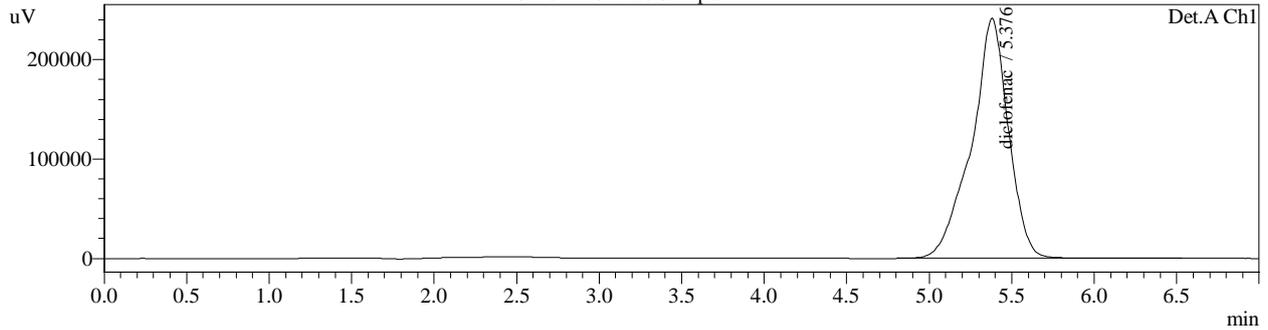
SV Série 02 120 % rep 1.lcd



Série 02 120 % rep 2.lcd



SV Série 02 120 % rep 3.lcd

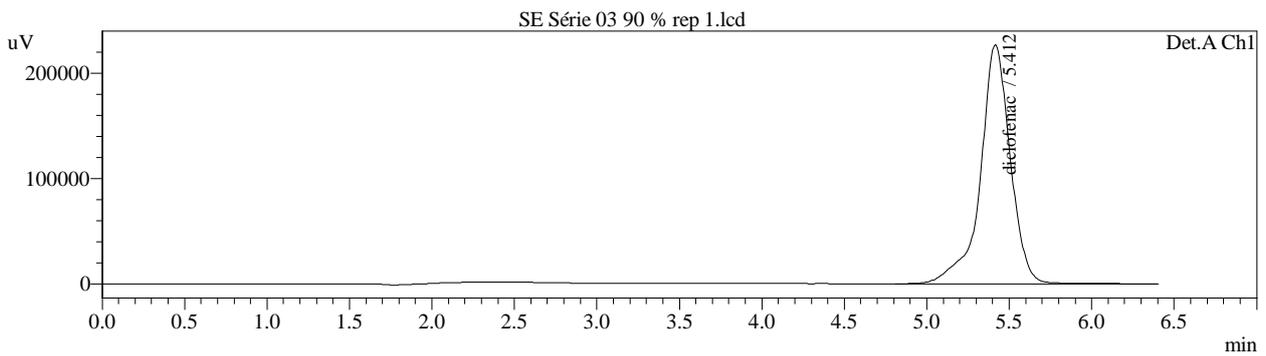
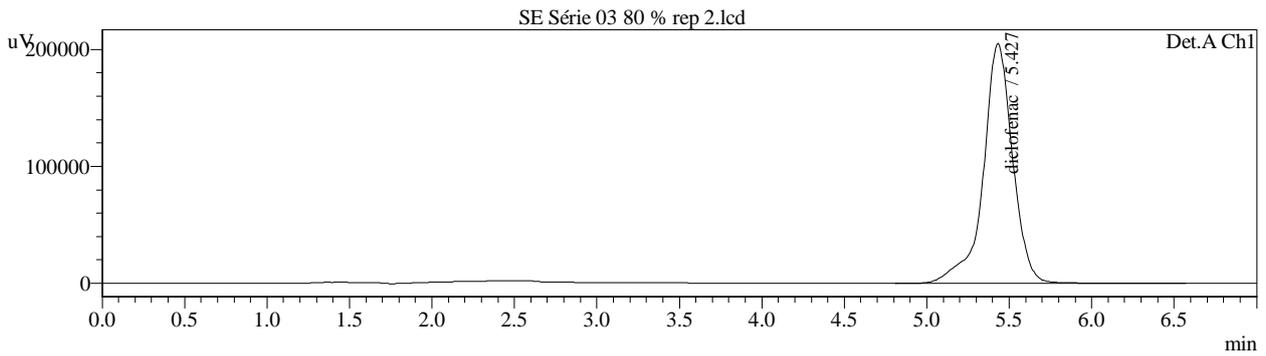
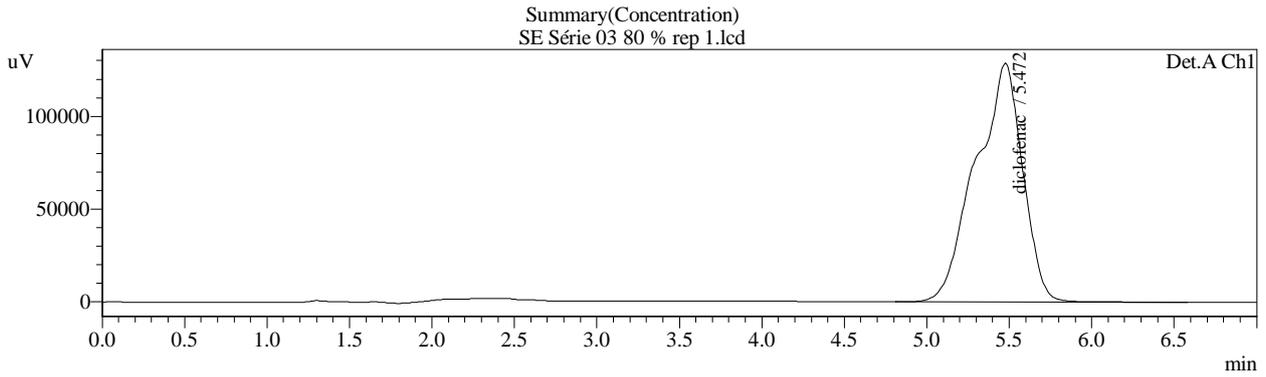


<< Detector A >>

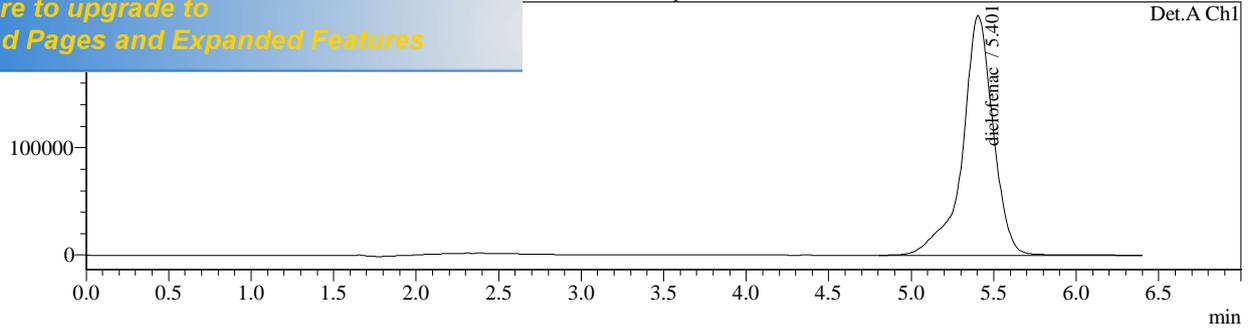
Title	Sample Name	Sample ID	diclofenac
SE Série 02 80 % rep 1.lcd	Diclofenac série	SE	2487215
SE Série 02 80 % rep 2.lcd	Diclofenac série	SE	2535637
SE Série 02 90 % rep 1.lcd	Diclofenac série	SE	2908746
SE Série 02 90 % rep 2.lcd	Diclofenac série	SE	2900678
SE Série 02 100 % rep 1.lcd	Diclofenac série	SE	3268568
SE Série 02 100 % rep 2.lcd	Diclofenac série	SE	3231994
SE Série 02 110 % rep 1.lcd	Diclofenac série	SE	3539867
SE Série 02 110 % rep 2.lcd	Diclofenac série	SE	3532189
SE Série 02 120 % rep 1.lcd	Diclofenac série	SE	3989742
SE Série 02 120 % rep 2.lcd	Diclofenac série	SE	3900299
SV Série 02 80 % rep 1.lcd	Diclofenac série	SV	2477863
SV Série 02 80 % rep 2.lcd	Diclofenac série	SV	2571864
SV Série 02 80 % rep 3.lcd	Diclofenac série	SV	2493100
SV Série 02 90 % rep 1.lcd	Diclofenac série	SV	2889012
SV Série 02 90 % rep 2.lcd	Diclofenac série	SV	2848478
SV Série 02 90 % rep 3.lcd	Diclofenac série	SV	2790166
SV Série 02 100 % rep 1.lcd	Diclofenac série	SV	3142061
SV Série 02 100 % rep 2.lcd	Diclofenac série	SV	3174860
SV Série 02 100 % rep 3.lcd	Diclofenac série	SV	3192768
SV Série 02 110% rep 1.lcd	Diclofenac série	SV	3452205
SV Série 02 110% rep 2.lcd	Diclofenac série	SV	3445688
SV Série 02 110% rep 3.lcd	Diclofenac série	SV	3525607
SV Série 02 120 % rep 1.lcd	Diclofenac série	SV	3787093
SV Série 02 120 % rep 2.lcd	Diclofenac série	SV	3858862
SV Série 02 120 % rep 3.lcd	Diclofenac série	SV	3783315
Average			3189115
%RSD			15.179
Maximum			3989742
Minimum			2477863
Standard Deviation			484065

SE et SV: Série N°03

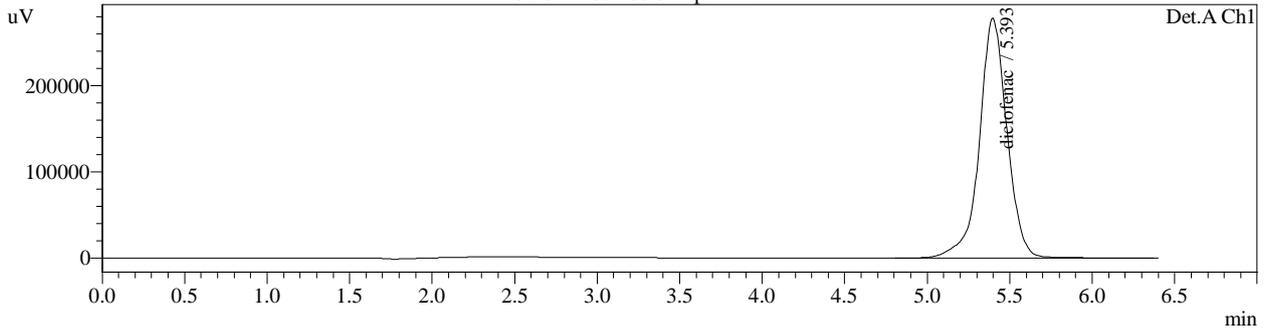
Sample Name : dico
Sample ID : SE 2
Tray# : 11
Vial# : 31
Injection Volume : 20 uL
Data Filename : SE 2 80 rep 1.lcd
Method Filename : METHODE12.km
Batch Filename : DICL SODIQUE.lcb
Report Filename : Default.lcr
Date Acquired : 27/04/2016 16:47:46
Data Processed : 01/05/2016 12:41:21



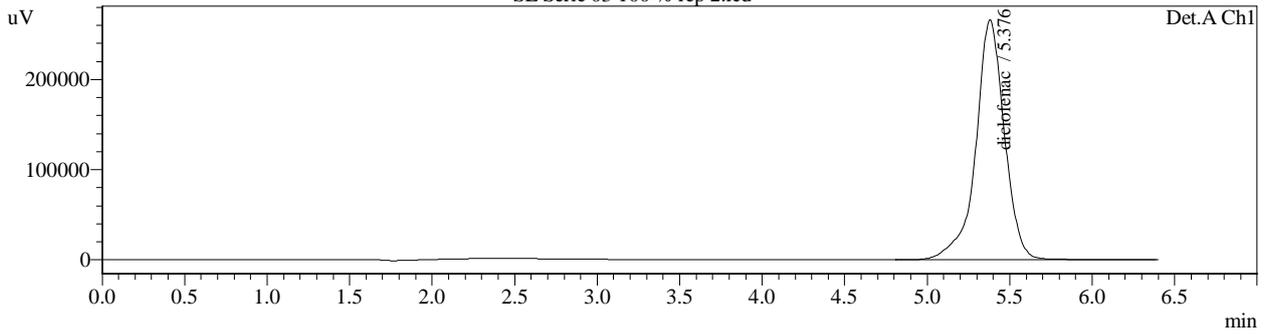
3 Série 03 90 % rep 2.lcd



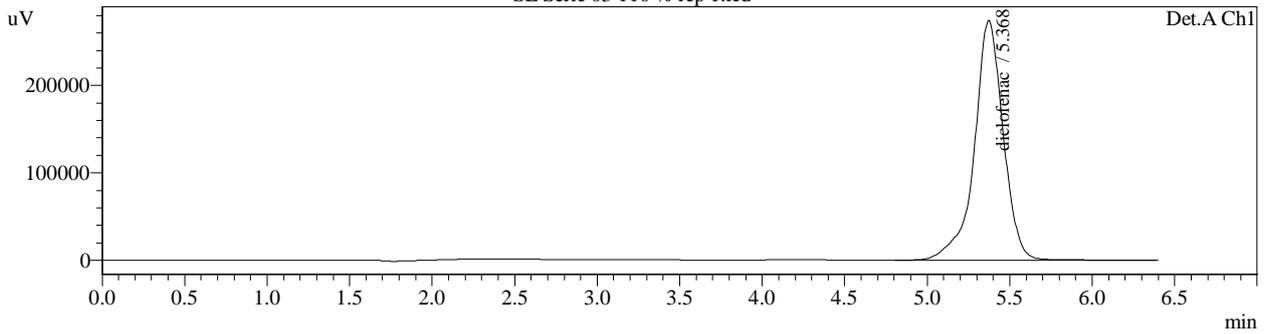
SE Série 03 100 % rep 1.lcd



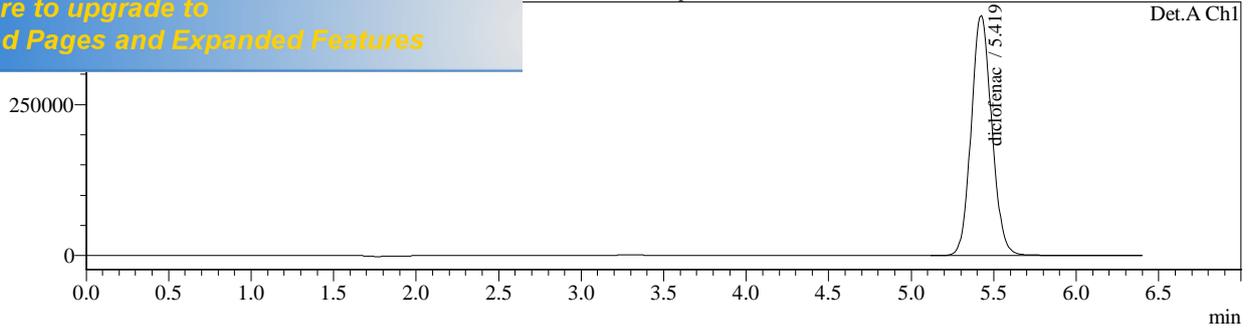
SE Série 03 100 % rep 2.lcd



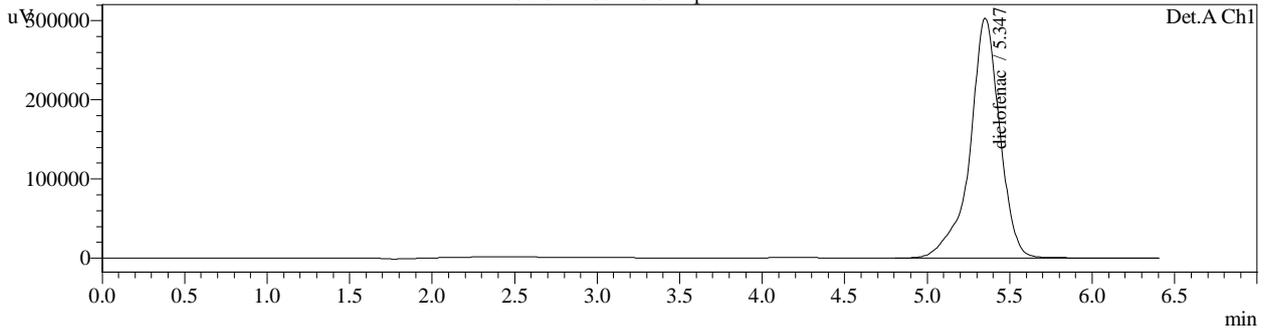
SE Série 03 110 % rep 1.lcd



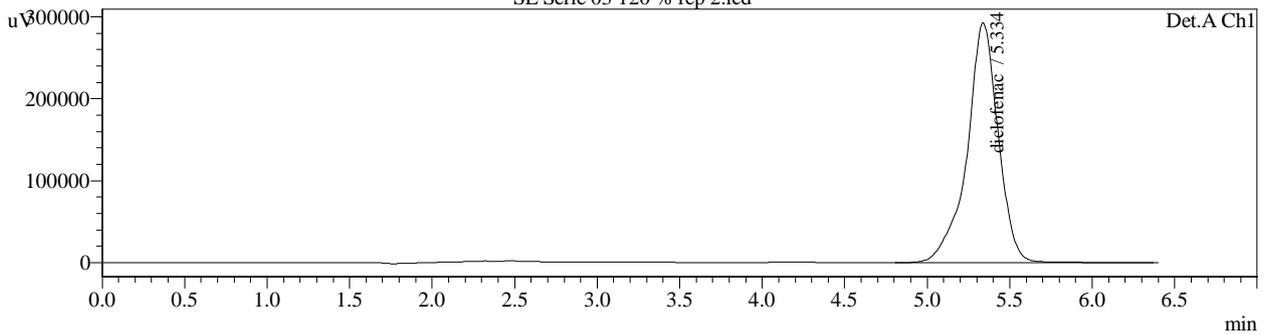
Série 03 110 % rep 2.lcd



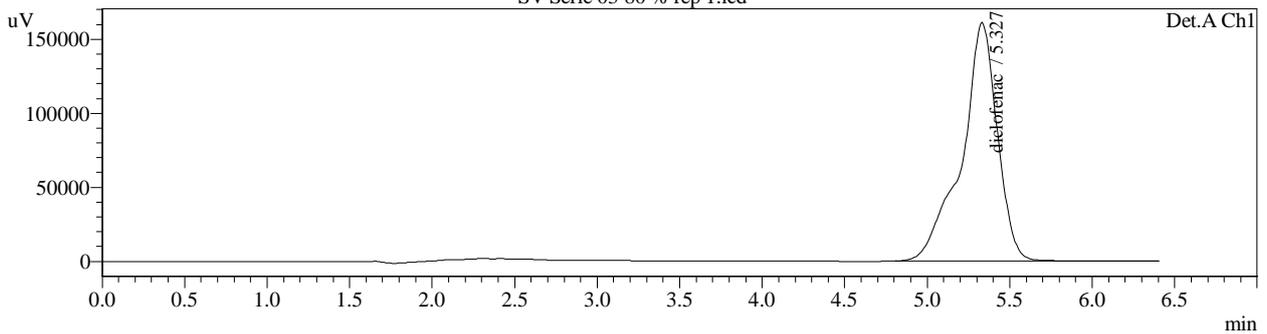
SE Série 03 120 % rep 1.lcd



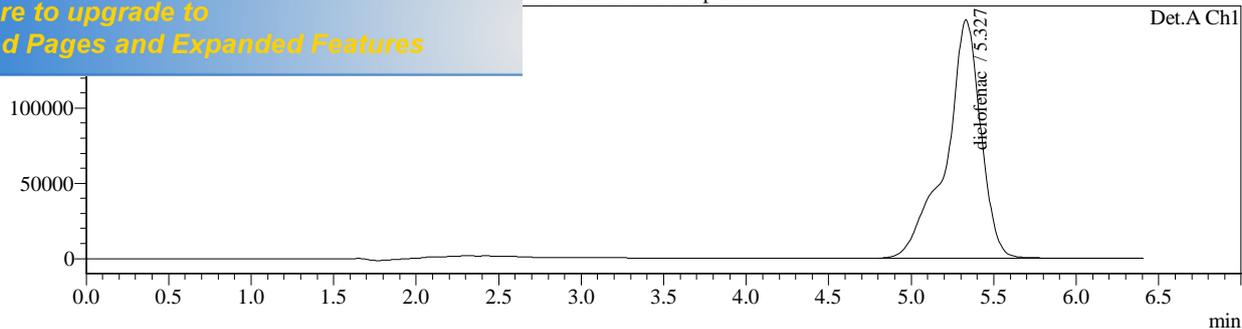
SE Série 03 120 % rep 2.lcd



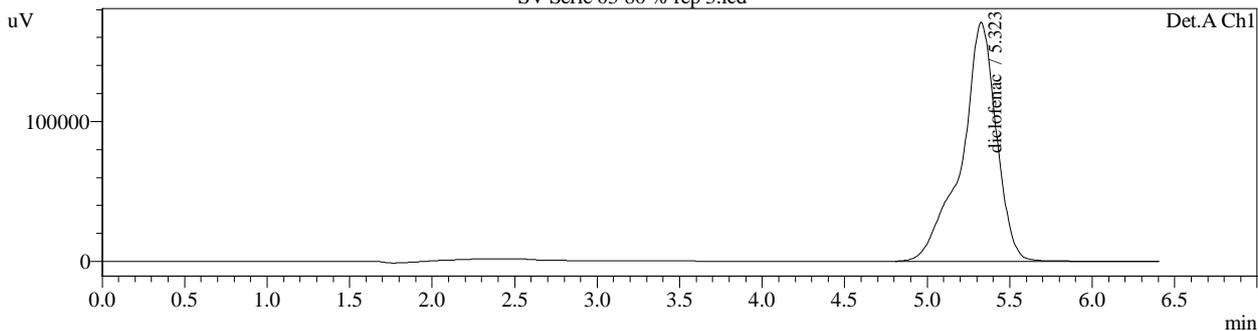
SV Série 03 80 % rep 1.lcd



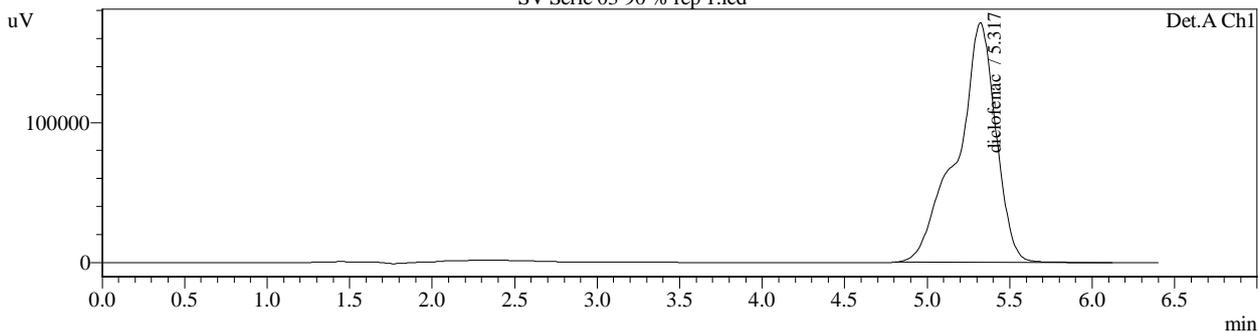
SV Série 03 80 % rep 2.lcd



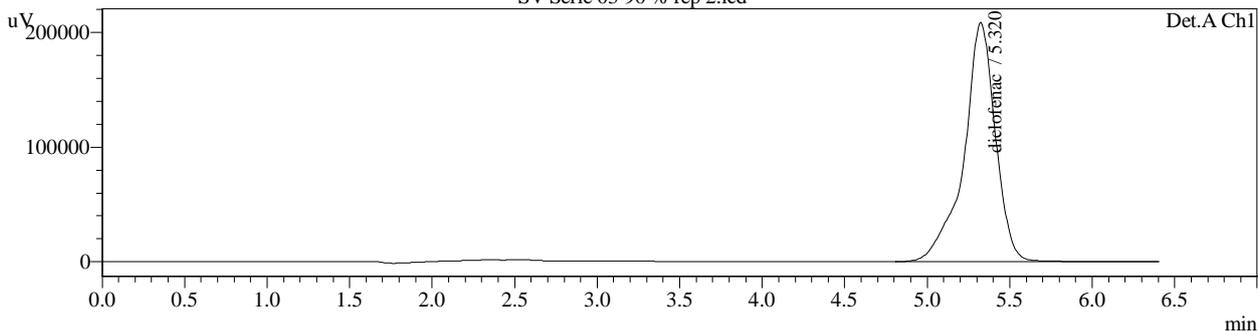
SV Série 03 80 % rep 3.lcd



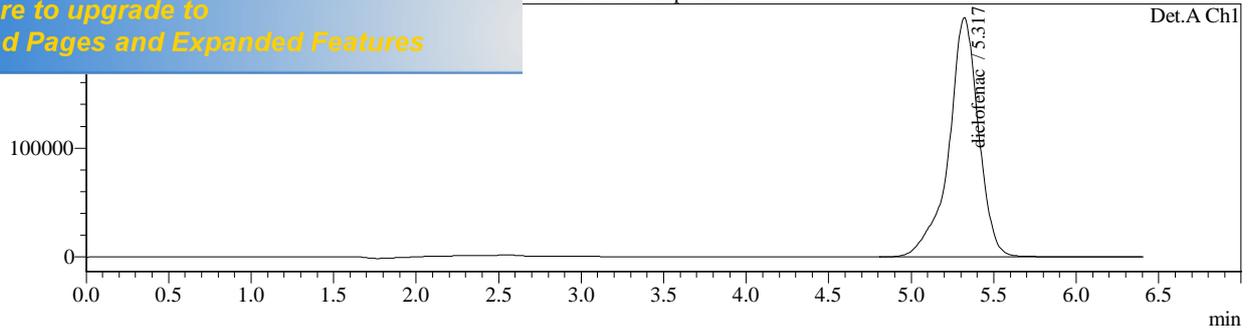
SV Série 03 90 % rep 1.lcd



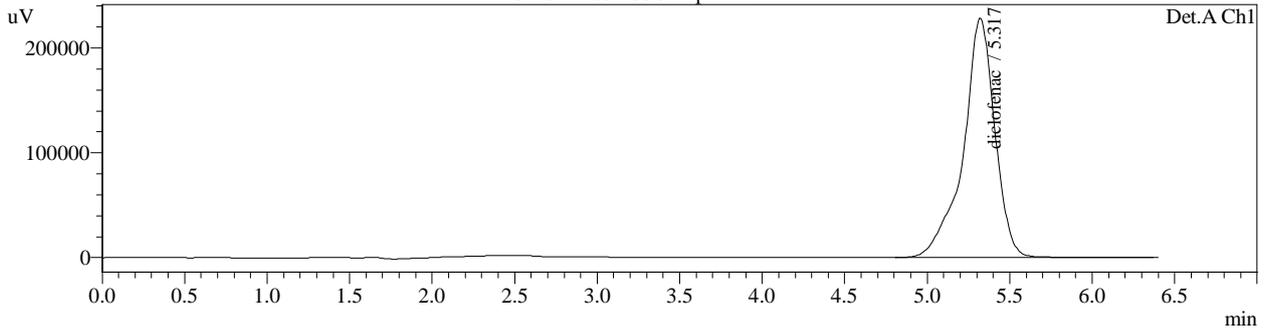
SV Série 03 90 % rep 2.lcd



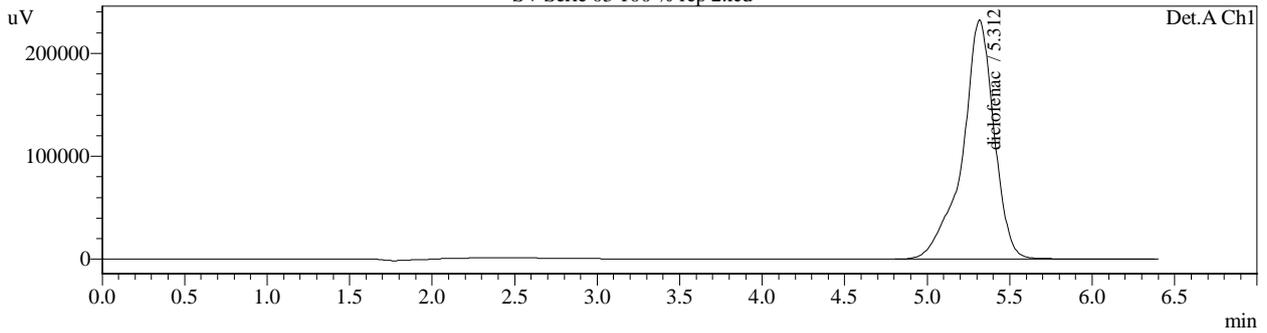
7 Série 03 90 % rep 3.lcd



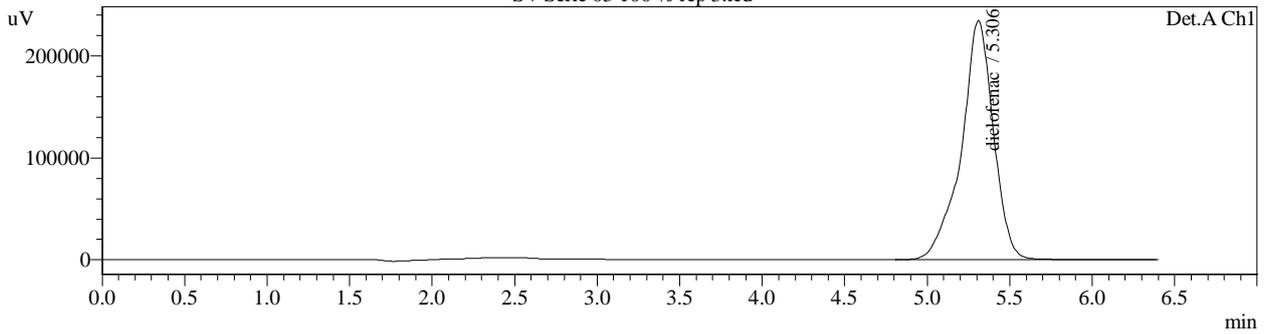
SV Série 03 100 % rep 1.lcd



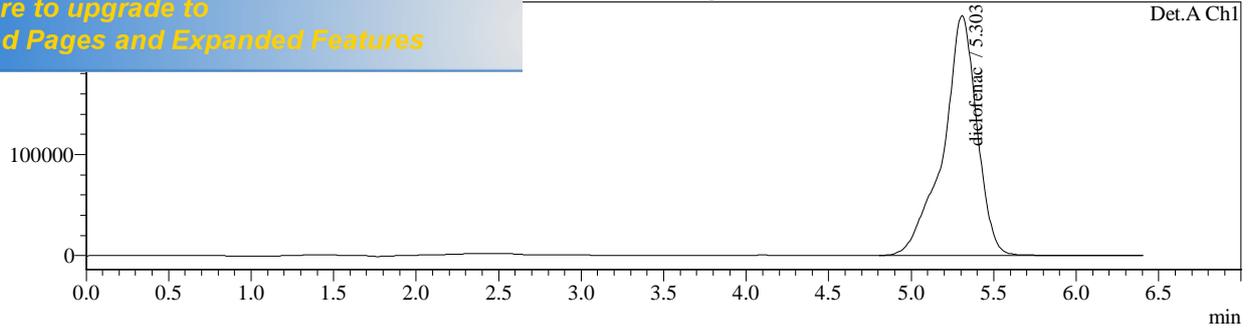
SV Série 03 100 % rep 2.lcd



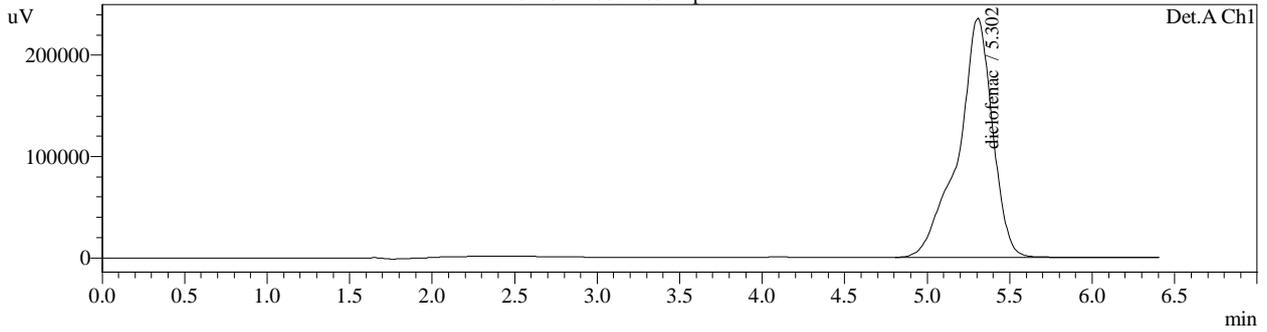
SV Série 03 100 % rep 3.lcd



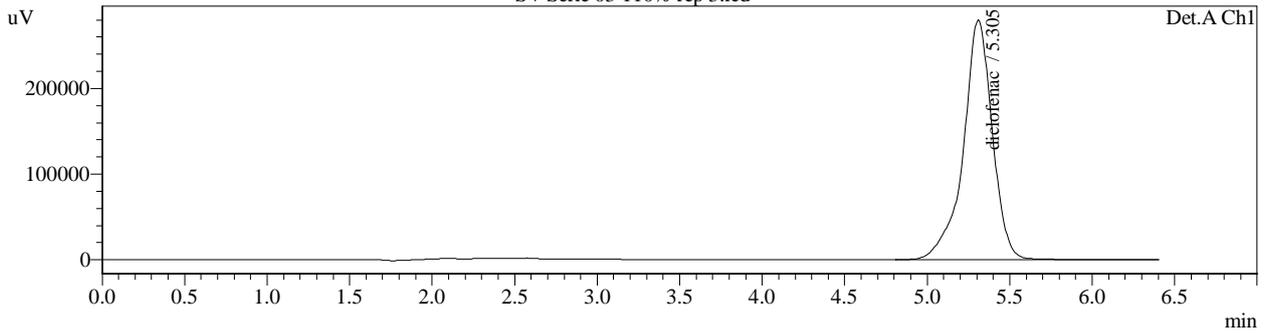
SV Série 03 110% rep 1.lcd



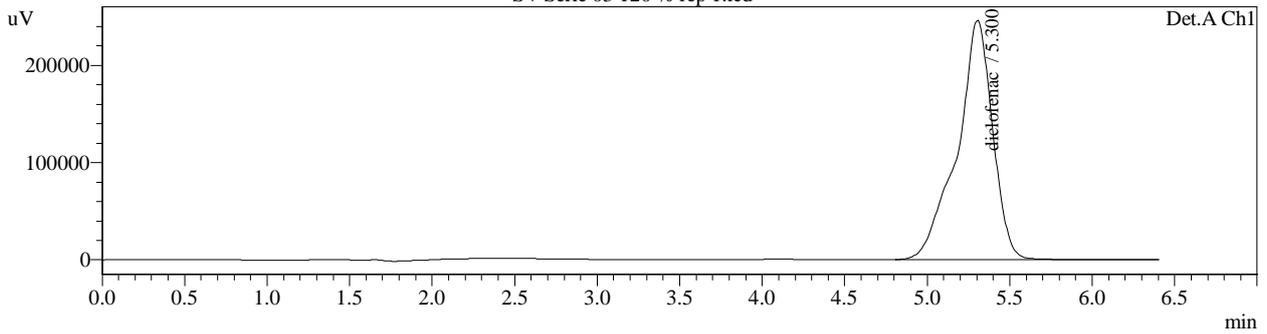
SV Série 03 110% rep 2.lcd



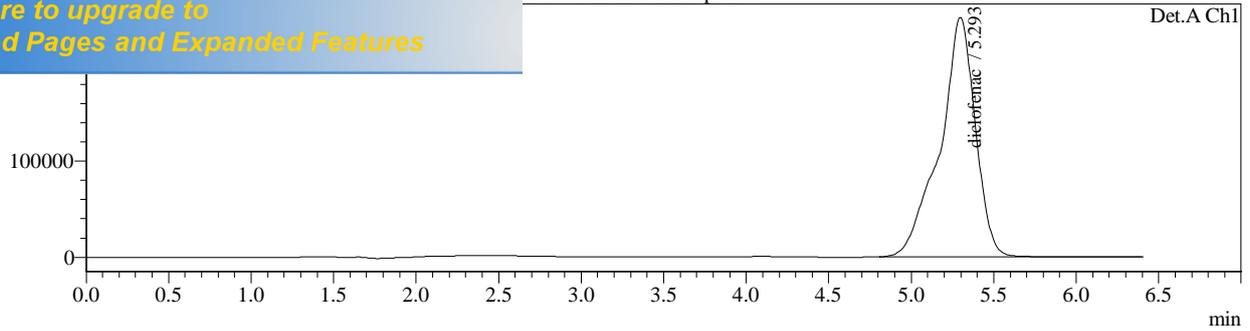
SV Série 03 110% rep 3.lcd



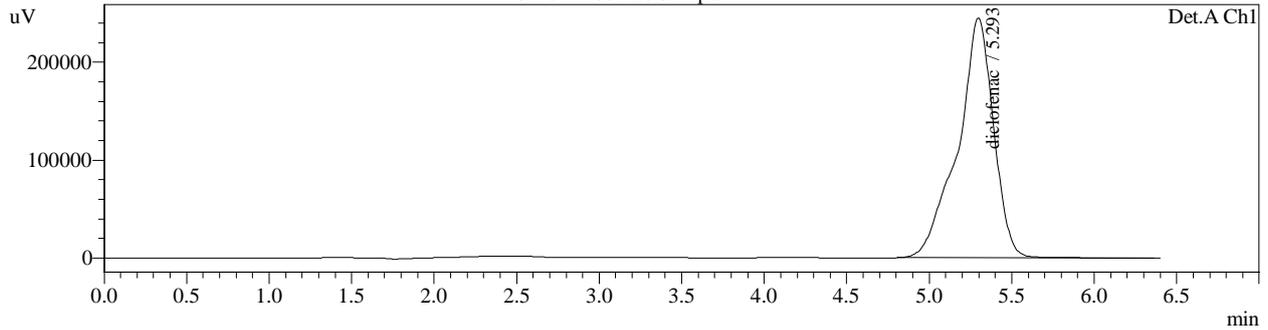
SV Série 03 120 % rep 1.lcd



SV Série 03 120 % rep 2.lcd



SV Série 03 120 % rep 3.lcd



<< Detector A >>

Title	Sample Name	Sample ID	diclofenac
SE Série 03 80 % rep 1.lcd	Diclofenac série	SE	2549489
SE Série 03 80 % rep 2.lcd	Diclofenac série	SE	2552563
SE Série 03 90 % rep 1.lcd	Diclofenac série	SE	2866991
SE Série 03 90 % rep 2.lcd	Diclofenac série	SE	2896226
SE Série 03 100 % rep 1.lcd	Diclofenac série	SE	3241557
SE Série 03 100 % rep 2.lcd	Diclofenac série	SE	3220818
SE Série 03 110 % rep 1.lcd	Diclofenac série	SE	3344305
SE Série 03 110 % rep 2.lcd	Diclofenac série	SE	3453029
SE Série 03 120 % rep 1.lcd	Diclofenac série	SE	3823730
SE Série 03 120 % rep 2.lcd	Diclofenac série	SE	3848235
SV Série 03 80 % rep 1.lcd	Diclofenac série	SV	2432195
SV Série 03 80 % rep 2.lcd	Diclofenac série	SV	2342211
SV Série 03 80 % rep 3.lcd	Diclofenac série	SV	2517710
SV Série 03 90 % rep 1.lcd	Diclofenac série	SV	2814684
SV Série 03 90 % rep 2.lcd	Diclofenac série	SV	2776338
SV Série 03 90 % rep 3.lcd	Diclofenac série	SV	2772103
SV Série 03 100 % rep 1.lcd	Diclofenac série	SV	3055173
SV Série 03 100 % rep 2.lcd	Diclofenac série	SV	3113836
SV Série 03 100 % rep 3.lcd	Diclofenac série	SV	3189936
SV Série 03 110% rep 1.lcd	Diclofenac série	SV	3394716
SV Série 03 110% rep 2.lcd	Diclofenac série	SV	3444940
SV Série 03 110% rep 3.lcd	Diclofenac série	SV	3432195
SV Série 03 120 % rep 1.lcd	Diclofenac série	SV	3690071
SV Série 03 120 % rep 2.lcd	Diclofenac série	SV	3742966
SV Série 03 120 % rep 3.lcd	Diclofenac série	SV	3703876
Average			3128796
%RSD			14.713
Maximum			3848235
Minimum			2342211
Standard Deviation			460349

ANNEXE IV

CALCULS DES INDICES POUR LE TRI DES MODELES D'ETALONNAGE

ANNEXE IV

1. Indice d'intervalle de dosage

L'intervalle de dosage (ID) est l'intervalle à l'intérieur duquel la méthode est valide. Il est obtenu en calculant la différence entre la borne supérieure et inférieure des limites de quantification. L'indice d'intervalle de dosage est un nombre sans dimension variant dans l'intervalle [0,1]. L'indice prend la valeur 1 si la procédure d'analyse est apte à doser sur la totalité de l'intervalle envisagé (concentration minimale et maximale introduites). Il est calculé selon la formule :

$$D(\text{ID}) = \frac{ID}{C_{\max} - C_{\min}}$$

Où C_{\max} et C_{\min} sont la plus grande et la plus petite concentration introduite.

Remarque: si un seul niveau de concentration est introduit, l'indice d'intervalle de dosage est fixé à 0 ou 1.

2. Indice de fidélité

L'aire utilisée pour le calcul de l'indice de fidélité est l'aire, à l'intérieur des limites de quantification, entre la limite inférieure et supérieure du profil d'exactitude. Cette aire est calculée par la règle des trapèzes. L'indice de fidélité est sans dimension et varie dans l'intervalle [0,1]. Plus cet indice est proche de 1, plus la méthode est fidèle. Il est calculé selon la formule :

$$D(\text{aire}) = \begin{cases} \frac{2\lambda(C_{\max} - C_{\min}) - \text{aire}}{2\lambda(C_{\max} - C_{\min})} & \text{si aire} < 2\lambda(C_{\max} - C_{\min}) \\ 0 & \text{sinon} \end{cases}$$

Où λ est la limite d'acceptation et C_{\max} and C_{\min} sont les concentrations maximale et minimale.

3. Indice de justesse

La somme du carré des biais (SCB) est calculée en sommant le carré des biais estimés à chaque niveau de concentration. L'indice de justesse est un nombre sans dimension variant dans l'intervalle [0,1] où 1 est l'optimum et signifie qu'il n'y a pas de biais pour tous les niveaux de concentrations observés. L'indice est calculé de la façon suivante :

$$D(\text{SCB}) = \begin{cases} 1 - \frac{\text{SCB}}{m\lambda^2} & \text{si SCB} \leq m\lambda^2 \\ 0 & \text{sinon} \end{cases}$$

Où λ est la limite d'acceptation de la méthode, et m est le nombre de niveau de concentration.

4. Indice d'exactitude

Ces 3 indices sont compilés dans l'indice d'exactitude qui correspond à la moyenne géométrique D^* des indices respectifs. L'indice d'exactitude varie de 0 à 1. Plus l'indice est proche de 1 meilleure est la méthode. Ce chiffre sans dimension est seulement utilisé pour comparer les différents modèles d'étalonnage et non pour comparer les procédures analytiques.

L'indice est calculé de la façon suivante:

$$D^* = \sqrt[3]{D(\text{aire}) \times D(\text{ID}) \times D(\text{SCB})}$$

RESUME

Le contrôle qualité des produits pharmaceutiques constitue une exigence réglementaire à laquelle doivent répondre tout les laboratoires pharmaceutiques. Pour ce faire, ces derniers utilisent des méthodes analytiques qui doivent être valides.

Le but de cette thèse est de mettre au point et de valider une méthode de dosage du diclofénac de sodium dans les suppositoires à 100 mg par chromatographie liquide à haute performance en utilisant le profil d'exactitude et l'intervalle de tolérance comme outils de décision de validation ; démarche harmonisée proposée par une commission SFSTP publiée en 2006 dans le guide STP Pharma Pratique.

La technique développée s'est avérée spécifique, linéaire, sensible, robuste et exact dans l'intervalle [89,96 µg/ml ; 120,2 µg/ml] avec un risque d'avoir au maximum 15% des mesures en dehors des limites d'acceptations fixées à [-5% ; +5%]. Cela atteste la validité de la méthode utilisée et son aptitude à être appliquée en routine par les laboratoires de contrôle qualité pour le dosage du diclofénac de sodium dans les suppositoires à 100 mg.

Mots clés : diclofénac de sodium, suppositoire, validation analytique, profil d'exactitude, HPLC.

ABSTRACT

Quality control of pharmaceutical products is an important and necessary step. Pharmaceutical laboratories are required to prove that analytical procedures used for this control are valid.

The purpose of this thesis is to develop and validate an assay method for determining sodium diclofenac in suppositories of 100 mg by high performance liquid chromatography using the accuracy profile and tolerance interval as decision tools for validation; harmonized approach proposed by a SFSTP commission published in 2006 in STP Pharma Pratiques guides.

The technique developed was specific, linear, sensitive, robust and accurate in the range [89,96 µg/ml ; 120,2 µg/ml] with risk of having a maximum 15% of the measures outside the acceptance limits [-5% ; +5%]. Which demonstrates the validity of the method used and its ability to be used and applied routinely by quality control laboratories for the determination of sodium diclofenac in suppositories 100 mg.

Key words: sodium diclofenac, suppositories, analytical validation, accuracy profile, HPLC.