

ANNÉE UNIVERSITAIRE : 2016/2017

REMERCIEMENTS

REMERCIEMENTS

*Tout d'abord, nous tenons à remercier **LE BON DIEU** le tout puissant et miséricordieux, de nous avoir donné la force et la patience afin d'accomplir ce modeste travail.*

Nous désirons adresser nos remerciements les plus chaleureux à notre encadreur

Dr MAMOU MARZOUK,

nous avons eu la chance de travailler avec vous et de bénéficier de vos connaissances et votre compétence, nous vous remercions pour les précieux conseils que vous nous avez prodigués pour votre aide et votre orientation durant toute la période du travail.

Nous voudrions également vous témoigner notre gratitude pour votre confiance, votre patience qui ont constitué un apport considérable sans lequel ce travail n'aurait pas pu être mené au bon port.

Nos sincères remerciements s'étendent également à

Mr A. TIGHRINE

*Doctorant en Biochimie Sciences Alimentaires, Microbiologie à l'UMMTO
pour son aide, ses efforts et le temps qu'il nous a consacré,*

Nous voudrions aussi remercier

Dr M. BOURSOUTI et Dr K. AKLI

résidents en Chimie Analytique, pour leur aide et leurs encouragements afin de mener à bien ce travail,

Nos vifs remerciements vont également aux membres du jury

Pr GHARBLA, Dr HADHOUM.N, Dr BEN SI SAID.H

pour l'intérêt qu'ils ont porté à notre étude et pour avoir fait l'honneur d'accepter de faire partie de notre jury et d'examiner notre travail.

Enfin, nous adressons nos plus sincères remerciements à tous nos proches et amis et à toutes les personnes qui nous ont encouragées de près ou de loin d'une manière ou d'une autre à la réalisation de ce mémoire.

Merci à tous et à toutes.

DEDICACES

DEDICACES

Je dédie ce mémoire de fin d'étude

A ma très chère mère,

*affable, honorable, aimable : tu représentes pour moi le symbole de la bonté par excellence,
la source de tendresse et l'exemple du dévouement qui n'a pas cessé de m'encourager et de
prier pour moi.*

A mon cher père,

*aucune dédicace ne saurait exprimer l'amour, l'estime, le dévouement et le respect que j'ai
toujours eu pour vous. Rien au monde ne vaut les sacrifices et tous les efforts consentis pour
mon éducation et ma formation.*

*Je tiens à vous témoigner ma reconnaissance et l'expression de mes sincères
sentiments et de mon éternelle gratitude*

.

A ma sœur Hassiba, à mon frère Karim

pour leur grand amour et leur soutien, avec mes vœux de les voir réussir dans la vie

A toute ma famille, très spécialement mon oncle Hafid

A mes amies et sœurs de cœur Kenza, Katia

à qui je souhaite tout ce qu'il y a de meilleurs au monde

A ma très chère amie Wahiba,

ensemble nous avons pu mener ce travail à terme

A tous ceux qui me sont chers.

Fatíha

DEDICACES

C'est à cœur ouvert et une immense joie que je dédie ce mémoire de fin d'études

A la mémoire de mon défunt père.

À ma très chère mère,

source de tendresse, de patience et de générosité,,,

Ce travail est le fruit de vos sacrifices, votre soutien inconditionnel et vos précieux conseils.

A ma regrettée belle-mère,

A mon beau-père,

*vous m'avez accueilli à bras ouverts dans votre famille. je vous dédie ce travail en témoignage
de l'attachement et de l'affection que je porte pour vous*

A mon cher mari Abdelhakim,

*sans ton aide, tes conseils, tes encouragements et ta patience ce travail n'aurait pas vu le
jour.*

A ma petite fille d'amour Zina Maria,

*A ma belle-sœur Farida, ton soutien moral, ta gentillesse sans égal, ton profond attachement
m'ont permis de réussir mes études.*

A ma chère grand-mère,

A mes chers frères Kaci et Brahim et leurs épouses,

A mes chères sœurs Sabrina, Nadjia, Zahia,

qu'ils trouvent ici l'expression de mes sentiments de respect et de reconnaissance.

A tous mes neveux et nièces

A toute ma famille et ma belle-famille,

A ma très chère amie Fatiha,

A mes amies,

A tous ceux qui me sont chers

Wahiba

TABLE DES MATIERES

Table des matières	i
Liste des abréviations	v
Liste des figures	vii
Liste des tableaux	ix
Introduction générale	01
Objectifs	03

Partie théorique

Chapitre I : Paracétamol -Tramadol

A. Paracétamol	04
1. Introduction	04
2. Historique	04
3. Propriétés	05
3.1. Physicochimiques.....	05
3.2. Pharmacologiques	05
3.2.1. Pharmacocinétiques	05
3.2.2. Pharmacodynamiques.....	07
4. Mécanisme d'action	07
5. Indications thérapeutiques.....	09
6. Posologies	09
7. Interactions médicamenteuses	09
8. Effets indésirables et toxicités.....	10
8.1. Effets indésirables	10
8.2. Toxicité.....	10
9. Grossesse et allaitement	10
B. Tramadol.....	11
1. Introduction	11
2. Historique	11
3. Propriétés	11
3.1. Physicochimiques.....	11
3.2. Pharmacologiques	12
3.2.1. Pharmacocinétiques	12
3.2.2. Pharmacodynamiques.....	13

4. Mécanisme d'action	14
5. Indications thérapeutiques	14
6. Posologies.....	14
7. Effets indésirables et toxicités	15
7.1. Effets indésirables	15
7.2. Toxicité	15
8. Interactions médicamenteuses	16
9. Grossesse et allaitement	16
C. Association paracétamol et tramadol.....	17
1. Posologies	17
2. Effets indésirables	17

Chapitre II : les comprimés

1. Historique des comprimés	18
2. Définition	18
3. Les différents aspects des comprimés	18
4. Caractéristiques organoleptiques des comprimés	18
4.1. Formes et dimensions	19
4.2. Couleurs et marquage.....	19
4.3. Structure	19
5. Composition des comprimés	19
5.1. Le principe actif	19
5.2. Les excipients	19
6. Fabrication des comprimés	20
6.1. Le mélange de poudres	20
6.2. La granulation	20
6.3. La compression	21
7. Avantage et inconvénients	22

Chapitre III : validation analytique

1. Définition	23
2. Le but de la validation	23
3. Aspect réglementaire et normatif	23
4. Critères de la validation	24
4.1. Spécificité/ sélectivité.....	25
4.2. Exactitude.....	25

4.3. Linéarité	25
4.4. Fidélité.....	25
4.5. Justesse (biais)	26
4.6. Sensibilité	26
4.7. Limite de détection.....	26
4.8. Limite de quantification	26
5. Les 10 étapes pour valider une méthode avec le profil d'exactitude	27
6. Etude statistique de la validation analytique	28
6.1. Spécificité.....	28
6.1.1. Protocol	28
6.1.2. Etude statistique	28
6.2. Fonction de réponse	31
6.3. Alignement des observations	33
6.4. Prédiction inverses.....	34
6.5. Calcul de la justesse et de la fidélité	35
6.5.1. Modèle.....	35
6.5.2. Justesse	36
6.5.3. Fidélité	37
6.6. Calcul de l'exactitude.....	37
6.6.1. Erreur totale et profil de l'erreur totale	37
6.7. Calcul de l'intervalle de tolérance.....	38
6.8. Profil d'exactitude	39
6.8.1. Calcul	39
6.8.2. Choix de la fonction de réponse	40
7. Linéarité	40
8. Limites de quantification.....	40

Partie pratique

Introduction	41
1. Matériel et méthodes.....	41
1.1. Matériel.....	41
1.1.1. Matières premières et réactifs.....	41
1.1.2. Appareillage et équipement.....	42
1.1.3. Verrerie.....	42
1.1.4. Autres.....	42

1.2. Méthodes.....	43
1.2.1. Préparation des solutions.....	43
1.2.2. Conditions chromatographiques.....	44
2. Résultats	45
2.1. Spécificité.....	45
2.2. Fonction de réponse.....	50
2.3. Critères de choix de la fonction de réponse.....	58
2.4. Alignement des observations.....	60
2.5. Prédiction inverses.....	66
2.6. Justesse.....	68
2.7. Fidélité.....	69
2.8. Exactitude.....	69
2.9. Erreur totale et profil d'erreur totale.....	71
2.10. Intervalle de tolérance.....	72
2.11. Profil d'exactitude.....	73
2.12. Linéarité.....	75
2.13. Limites de quantification et intervalle de dosage.....	76
3. Discussions	77
3.1. Spécificité.....	77
3.2. Choix de la fonction de réponse.....	77
3.3. Profil d'exactitude.....	78
3.4. Limites de quantification et intervalle de dosage.....	78
3.5. Linéarité.....	78
Conclusion générale.....	80

Références bibliographiques

Annexes

Résumé

LISTE DES ABREVIATIONS

AINS	: Anti Inflammatoires Non Stéroïdiens
AM404	: Acide Gras N-arachidonoylphenolamine amide
AMM	: Autorisation de Mise sur le Marché
NAPAP	: N-Acetylparaaminophenol
AVC	: Accident Vasculaire Cérébral
BPF	: Bonnes Pratiques de Fabrication
CB1	: Récepteurs Cannabinoïdes
CCM	: Chromatographie sur Couche Mince
COX	: Cyclo Oxygénase
COX1	: Cyclo Oxygénase 1
COX2	: Cyclo Oxygénase 2
COX-3	: Cyclo Oxygénase 3
CYP450	: Cytochrome P450
DCI	: Dénomination Commune Internationale
FAAH	: fatty acid amide hydrolase
FDA	: Food and Drug Administration
H1	: Hypothèse 1
H2	: Hypothèse 2
HC1	: Acide Chlorhydrique
HPLC	: High Performance Liquid Chromatography
ICH	: International Conference of Harmonization
ID	: Intervalle de Dosage
IMAO	: Inhibiteurs de la Monoamine Oxydase
INR	: International Normalized Ratio
ISO	: International Standard Organization
ISRS	: Inhibiteurs Sélectifs des Récepteurs de la Sérotonine
M1	: Métabolite principal 1
M2	: Métabolite 2
NAPQI	: N-acétyl-parabenzoinone –imine
NDT	: N- desmethyltramadol

ODT	: O- desmethyltramadol
OMS	: Organisation Mondiale de la Sante
PA	: Principe Actif
PGG2	: Prostaglandine G ₂ Synthase
PGHS	: Prostaglandine H ₂ Synthase
POX	: Peroxydase
R	: grade Réactif
SCR	: Substance Chimique de Référence
SE	: Standard d'Etalonnage.
SFSTP	: Société Française des Sciences Techniques et Pharmaceutiques
SNC	: Système Nerveux Central
SV	: Standard de Validation
TRPV1	: Transit Receptor Potential Vanilloid-1
UV	: Ultraviolet –Visible

LISTE DES FIGURES

Figure1 : Voies métaboliques du paracétamol	06
Figure 2 : Schéma de la première hypothèse du mécanisme d'action du paracétamol	07
Figure 3: Schéma de la deuxième hypothèse du mécanisme d'action du paracétamol.	08
Figure 4: Schéma de la troisième hypothèse du mécanisme d'action du paracétamol	08
Figure 5: Différentes possibilités pour la fabrication des comprimés	22
Figure 6 : Logigramme permettant de sélectionner un protocole de validation.....	30
Figure7: Droites d'étalonnage sur standard et forme reconstituée du paracétamol	46
Figure 8 : Droites d'étalonnage sur standard et forme reconstituée du tramadol	48
Figure 9 : Courbes d'étalonnages obtenues avec la fonction $y = ax$ pour les trois séries des SE du paracétamol.....	50
Figure 10 : Courbes d'étalonnages obtenues avec la fonction $y = ax + b$ pour les trois séries des SE du paracétamol	51
Figure 11 : Courbes d'étalonnages obtenues avec la fonction $LnY = (LnX)$ pour les trois séries des SE du paracétamol	52
Figure 12 : Courbes d'étalonnages $\sqrt{Y} = (\sqrt{X})$ obtenues avec les trois séries des SE du paracétamol	53
Figure 13 : Courbes d'étalonnages $y = ax$ obtenues avec les trois séries des SE du tramadol .	54
Figure 14 : Courbes d'étalonnages $y = ax + b$ obtenues avec les trois séries des SE du tramadol	55
Figure 15: Courbes d'étalonnages $LnY = (LnX)$ obtenues avec les trois séries des SE du tramadol.....	56
Figure 16 : Courbes d'étalonnages $\sqrt{Y} = (\sqrt{X})$ obtenues avec les trois séries des SE du tramadol.....	57
Figure 17: Tracé du profil d'exactitude pour la régression linéaire $y = ax$ passant par 0 du paracétamol	58
Figure 18 : Tracé du profil d'exactitude pour la régression linéaire $y = ax + b$ du paracétamol	59
Figure 19 : Tracé du profil d'exactitude pour la fonction racine carrée $\sqrt{Y} = f(\sqrt{X})$ du paracétamol	59
Figure 20 : Tracé du profil d'exactitude pour la fonction logarithme népérien $Ln Y = (Ln X)$ du paracétamol	60

Figure 21 : Tracé du profil d'exactitude pour la régression linéaire $y = ax$ passant par 0 du tramadol.....	60
Figure 22 : Tracé du profil d'exactitude pour la régression linéaire $y = ax + b$ du tramadol .	61
Figure 23 : Tracé du profil d'exactitude pour la fonction racine carrée $\sqrt{Y} = f(\sqrt{X})$ du tramadol.....	61
Figure 24 : Tracé du profil d'exactitude pour la fonction logarithme népérien $\ln Y = (\ln X)$ du tramadol.....	62
Figure 25 : Profil de l'erreur totale relative du paracétamol	71
Figure 26 : Profil de l'erreur totale relative du tramadol	72
Figure 27 : Tracé du profil d'exactitude pour la régression linéaire $y = ax+b$ du paracétamol	73
Figure 28 : Tracé du profil d'exactitude du tramadol pour la fonction logarithme népérien $\ln=\ln Y$	74
Figure 29 : Profil de linéarité entre les concentrations trouvées et les concentrations introduites du paracétamol	75
Figure 30 : Profil de linéarité entre les concentrations trouvées et les concentrations introduites du tramadol.....	75

LISTE DES TABLEAUX

Tableau I : Propriétés physicochimiques du paracétamol.	05
Tableau II : Propriétés physicochimiques du tramadol.	12
Tableau III : Posologie du Tramadol.....	15
Tableau IV : Interactions médicamenteuses	16
Tableau V : Avantages et inconvénients des comprimés.....	22
Tableau VI : Critères de la validation en fonction du type d'analyse	24
Tableau VII : Choix du nombre de standards d'étalonnage et de validation en fonction du protocole choisi	30
Tableau VIII : Exemples de fonction de réponses.....	32
Tableau IX : Règles d'alignement pour différentes fonctions de réponses	33
Tableau X : Calcul des prédictions inverses pour différentes fonctions de réponses	34
Tableau XI : Calcul des prédictions inverses pour la droite ayant subi une transformation logarithmique ou racine carrée	35
Tableau XII : Matériels du laboratoire de chimie analytique utilisés dans le présent travail	42
Tableau XIII : Tableau représentant les masses théoriques correspondantes aux niveaux de concentration des principes actifs	43
Tableau XIV : Résultats du test de comparaison des deux pentes des deux droites de régression (gamme standard et gamme placebo chargé) du paracétamol	45
Tableau XIV.I : Résultats obtenus sur la gamme standard	45
Tableau XIV.II : Résultats obtenus sur la gamme placebo chargé	46
Tableau XIV.III : Comparaison des pentes.....	47
Tableau XV : Résultats du test de comparaison des deux pentes des deux droites de régression (gamme standard et gamme placebo chargé) du tramadol	47
Tableau XV.I : Résultats obtenus sur la gamme standard	47
Tableau XV.II : Résultats obtenus sur la gamme placebo chargé	48
Tableau XV.III : Comparaison des pentes	49
Tableau XVI : Résultats obtenus pour la fonction $y = ax$ du paracétamol	50
Tableau XVII : Résultats obtenus pour la fonction $y = ax + b$ du paracétamol	51
Tableau XVIII : Résultats obtenus pour la fonction $\ln Y = (\ln X)$ du paracétamol	52
Tableau XIX : Résultats obtenus pour la fonction $\sqrt{Y} = (\sqrt{X})$ du paracétamol.....	53
Tableau XX : Résultats obtenus pour la fonction $y = ax$ du tramadol	54
Tableau XXI : Résultats obtenus pour la fonction $y = ax + b$ du tramadol	55

Tableau XXII : Résultats obtenus pour la fonction $LnY = (LnX)$ du tramadol	56
Tableau XXIII : Résultats obtenus pour la fonction $\sqrt{Y} = (\sqrt{X})$ du tramadol	57
Tableau XXIV : Aligement des réponses observées avec les trois séries des SV du paracétamol	64
Tableaux XXV : Aligement des réponses observées avec les trois séries des SV du tramadol	65
Tableau XXVI : Prédiction inverses obtenues avec les SV du paracétamol.....	66
Tableau XXVII : Prédiction inverses obtenues avec les SV du tramadol	67
Tableau XXVIII : Justesse calculée pour chaque niveau de concentration des standards de validation du paracétamol	68
Tableau XXIX : Justesse calculée pour chaque niveau de concentration des standards de validation du tramadol.....	68
Tableau XXX : Fidélité calculée pour chaque niveau de concentration des standards de Validation du paracétamol	69
Tableau XXXI : Fidélité calculée pour chaque niveau de concentration des standards de Validation du tramadol.....	69
Tableau XXXII : Résultats de calcul de l'exactitude du paracétamol.....	70
Tableau XXXIII : Résultats de calcul de l'exactitude du tramadol	70
Tableau XXXIV : Calcul de l'erreur totale pour chaque niveau de concentration des standards de validation du paracétamol	71
Tableau XXXV : Calcul de l'erreur totale pour chaque niveau de concentration des standards de validation du tramadol	71
Tableau XXXVI : Calcul des limites de tolérance pour chaque niveau de concentration j du paracétamol	72
Tableau XXXVII : Calcul des limites de tolérance pour chaque niveau de concentration j du tramadol.....	72

INTRODUCTION GENERALE

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

Chaque laboratoire est tenu de prouver que les méthodes d'analyses employées pour le contrôle des médicaments sont parfaitement valides et fiables et de s'assurer qu'elles répondent bien aux objectifs assignés.

En effet si la validité d'une méthode analytique n'est pas confirmée, la décision de conformité ou non des produits finis basée sur les données obtenues par le contrôle qualité en utilisant cette procédure analytique devient contestable. C'est pourquoi l'assurance de la fiabilité de la méthode garantie par la validation est non seulement une exigence réglementaire, mais également un critère essentiel de l'assurance de la qualité.

Pour cela toute nouvelle méthode d'analyse mise au point au sein d'un laboratoire doit faire l'objet d'une validation analytique, avant sa mise en routine, cette dernière repose sur un ensemble de mesures expérimentales, et de tests statistiques qui permettent de prouver qu'une procédure est suffisamment exacte et fiable et de nos jours de nouvelles tendances et de nouveaux concepts scientifiques apparaissent et proposent de revoir les bases mêmes de la validation analytique pour une démarche harmonisée, avec notamment l'apparition de l'utilisation du profil d'exactitude comme outil de décision, permettant de simplifier l'approche de la validation d'une procédure analytique tout en contrôlant le risque associé à son utilisation.

Généralement les méthodes d'analyses ont pour objet de doser et de s'intéresser à un seul principe actif, cependant développer une méthode de dosage simultané de deux ou de plusieurs principes actifs dans une forme pharmaceutique ne peut être que bénéfique pour les laboratoires de contrôle qualité dans l'industrie pharmaceutique. L'objectif de cette démarche est d'aider les spécialistes en industrie pharmaceutique, à réduire le temps et le coût de l'analyse.

Dans notre étude nous nous sommes particulièrement intéressées à l'association du paracétamol qui est un analgésique antipyrétique de palier I, indiqué en première intention dans la prise en charge de la douleur et du tramadol qui est un analgésique opioïde d'action centrale, de palier II. L'association de ces deux analgésiques à dose fixe est indiquée dans la prise en charge des douleurs modérées à intenses ou ne répondant pas à l'utilisation des antalgiques de palier I seuls.

Le contenu de ce présent manuscrit est réparti en deux grandes parties, une partie bibliographique et une partie expérimentale.

La partie bibliographique est scindée en trois chapitres :

Chapitre I : Paracétamol et tramadol comprimé

Chapitre II : Les comprimés

Chapitre III : Validation analytique

La partie expérimentale est consacrée à la partie pratique de notre travail qui comprend la mise au point et la validation d'une méthode de dosage simultané du paracétamol et tramadol dans des comprimés à 325mg de paracétamol et 37.5 mg de tramadol par HPLC. Nous allons discuter et présenter les résultats obtenus et conclure à la fin la validité de la méthode analytique objet de l'étude.

OBJECTIFS

L'objectif de notre étude est de mettre au point et de valider une technique analytique de dosage simultané de deux principes actifs dans des comprimés à dose fixe de 325mg de paracétamol et 37.5 mg de tramadol par Chromatographie Liquide à Haute Performance (HPLC) en vue d'être appliquée en routine en utilisant le profil d'exactitude comme outil de décision, décrit 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.



PARTIE THEORIQUE



CHAPITRE I

PARACETAMOL - TRAMADOL COMPRIME

A. Paracétamol

1. Introduction

Le paracétamol est une substance active aux propriétés analgésiques et antipyrétiques non salicylés qui rentre dans la composition de nombreuses spécialités pharmaceutiques, il est classé par l'OMS comme antalgique de palier 1 « analgésique non opioïde », utilisé seul ou en association avec d'autres antalgiques.

Il est envisagé en première intention dans le traitement symptomatique de la fièvre et la prise en charge des douleurs d'intensité faible à modérée, et a fait preuve d'efficacité sur un large éventail de douleurs aiguës ou chroniques par excès de nociception.

C'est l'antalgique de référence chez les jeunes enfants, personnes âgées, les femmes enceintes ou allaitantes en raison de sa bonne tolérance et son bon rapport bénéfices/risques associé à de moindres effets secondaires avec un profil d'innocuité favorable.

2. Historique

Acetylaminophenol, mieux connu aujourd'hui sous le nom d'acétaminophène (paracétamol, NAPAP), molécule synthétisée et nommée par Harmon Northrop Morse en 1878. Ce composé reconnu pour ses vertus antipyrétiques a été créé dans le but de substituer l'écorce de Cinchona dont dérive la quinine qui était très utilisée à l'époque, et qui devenait rare et chère.

L'effet antipyrétique de l'acétanilide fut découvert fortuitement au cours d'une étude menée par le professeur Adolf KUSSMAUL et ses deux étudiants Arnold CAHN et Paul HEPP à l'université de Strasbourg sur l'effet antiparasitaire du naphthalène,

Cependant, l'acétanilide se révèle très toxique ainsi plusieurs recherches ont été entreprises afin de générer des dérivés moins néfastes.

En 1887 la compagnie Bayer commercialise l'acétophenetidine sous le nom de phénacétine dont l'utilisation a été interdite par la suite en raison de son effet néphrotoxique.

En 1889, Karl MORNER découvre que le NAPAP possède des propriétés antipyrétiques qui sera délaissé pendant près de 60 ans en raison d'une étude réalisée en 1893 par Joseph VON MERING, comparant les propriétés antalgiques et antipyrétiques du NAPAP et de la phénacétine. Il arrive à une conclusion erronée que le NAPAP est plus néphrotoxique que la phénacétine. Plus tard Lester et Green berg à l'Université Yale (1947), Flinn et Brodie à l'Université de New York (1948) démontreront que le NAPAP est un dérivé déséthylé de la phénacétine, il fut trouvé dans les urines des personnes ayant consommé de la phénacétine et son innocuité est démontrée à la fin des années 1940.

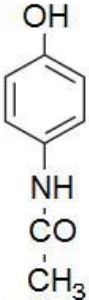
En 1955, la Food and Drug Administration accorde l'autorisation de vente de ce médicament aux États-Unis, en 1957 au Canada. Depuis ce jour, la vente d'antipyrétiques, dont le NAPAP, ne cesse de croître.

Au début des années 1960, la sécurité liée à la prise du NAPAP est grandement meilleure, sa popularité augmente de façon significative à partir de cette décennie, et depuis 2011, le paracétamol est le médicament le plus consommé dans le monde [1, 2].

3. Propriétés

3.1. Propriétés physicochimiques

Tableau I : Propriétés physicochimiques du paracétamol [2 ; 3].

DCI	Paracétamol
Nom chimique	N-(4-Hydroxyphényl) acétamide
Formule chimique brute	$C_8H_9NO_2$
Formule chimique développée	
Masse molaire	151,2 g/mole
pKa	9,5 à 25°C
Point de fusion	168 °C à 172 °C
Aspect	Poudre cristalline, blanche ou sensiblement blanche, inodore, de saveur amère.
Solubilité	Assez soluble dans l'eau, facilement soluble dans l'alcool, très peu soluble dans l'éther et le chloroforme.
Absorption dans l'U.V	Un maximum d'absorption dans l'UV (éthanol) à 240nm

3.2. Propriétés pharmacologiques

3.2.1. Propriétés pharmacocinétiques

Absorption

Le paracétamol est rapidement et presque totalement résorbé au niveau de l'intestin grêle proximal. Il subit un faible effet du premier passage hépatique. Le pic plasmatique est obtenu en 15 minutes à 2 heures. La biodisponibilité absolue par voie orale est voisine de 80 % [4,5].

Distribution

Le paracétamol traverse librement la barrière placentaire et hémato-encéphalique et se distribue ainsi rapidement dans tous les tissus. La liaison aux protéines plasmatiques est faible (10%). Le volume de distribution est d'environ 1L/Kg. Le taux plasmatique requis pour une activité analgésique est estimé entre 10 et 20 mg/l [4].

Métabolisme

Le paracétamol est métabolisé essentiellement au niveau du foie en suivant deux voies métaboliques majeures qui sont la glucuroconjugaison et la sulfoconjugaison. Moins de 5% sont transformées par le cytochrome P450(CYP 2E1, 1A2 et 3A4) en N-acétyl-para-benzoquinone -imine (NAPQI), composé hautement réactif, dont l'accumulation est responsable de nécrose centrolobulaire hépatique, est rapidement détoxifié par le glutathion et éliminé par voie urinaire, après conjugaison à la cystéine ou l'acide mercaptopurique.

Chez l'enfant, la glucuroconjugaison est immature, la biotransformation est donc essentiellement par sulfoconjugaison, par contre, chez le sujet âgé, la capacité de conjugaison n'est pas modifiée [4, 6].

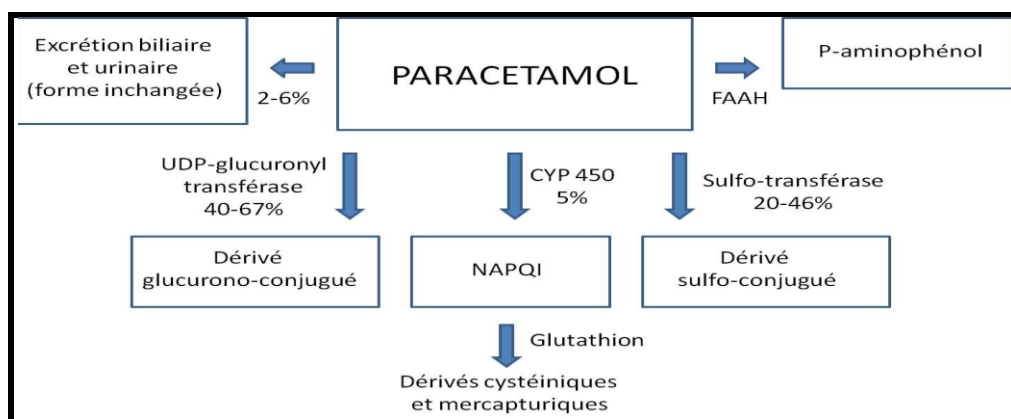


Figure1 : Voies métaboliques du paracétamol [5]

Elimination

L'élimination des métabolites est essentiellement urinaire (sécrétion tubulaire) puisque 90% de la dose administrée est excrétée par voie urinaire. Moins de 5% du paracétamol absorbé est éliminé sous forme inchangée, la majorité étant réabsorbée au niveau tubulaire après filtration glomérulaire. La demi-vie d'élimination est d'environ deux heures, en cas d'insuffisance rénale sévère l'élimination du paracétamol et de ses métabolites est retardée [4].

3.2.2. Propriétés Pharmacodynamiques

Il a deux actions principales :

- **Action antalgique** : le paracétamol agirait en bloquant les chémorécepteurs des terminaisons nerveuses. L'effet antalgique apparaît 30 min après l'absorption, atteint un maximum en 2 heures 30 min et disparaît en 4 heures. L'action antalgique du paracétamol concerne les douleurs d'intensité moyenne, accompagnées ou non d'un syndrome inflammatoire [6].
- **Action antipyrétique** : le paracétamol inhibe l'action des pyrogènes endogènes au niveau des centres hypothalamiques thermorégulateurs et augmente la thermolyse périphérique par le biais d'une inhibition des prostaglandines [6].

4. Mécanisme d'action

Le mécanisme complet du paracétamol reste inconnu, il existe plusieurs hypothèses qui le décrit :

- **Première hypothèse H1 : Inhibition des cyclo-oxygénases**

Le paracétamol agit en inhibant au niveau central la production des prostaglandines, impliquées dans le processus de la douleur et de la fièvre par le biais d'une action inhibitrice sur l'enzyme prostaglandine H₂ synthase (PGHS), qui comporte notamment un site actif (cyclo oxygénase) ou (COX), cible de la majorité des AINS, et un site (peroxydase) ou (POX) sur lequel agit le paracétamol.

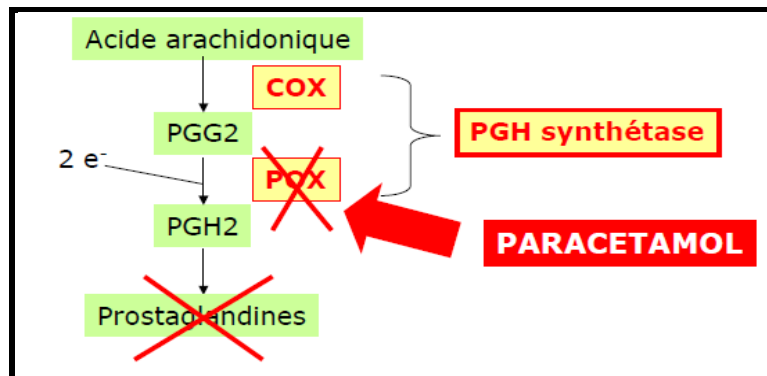


Figure 2 : Schéma de la première hypothèse du mécanisme d'action du paracétamol [17].

- **Deuxième hypothèse H2** : Le paracétamol n'a pas d'action directe sur le COX1 et le COX2, les deux formes de COX sur lesquelles agissent les AINS. On soupçonne l'existence d'une nouvelle isoenzyme, la COX-3, sur laquelle agit spécifiquement le paracétamol et qui explique pourquoi le paracétamol réduit la fièvre et la douleur tout en étant dénué d'activité anti inflammatoire et antiplaquettaire. Cette hypothèse n'a pas été prouvée chez l'homme.

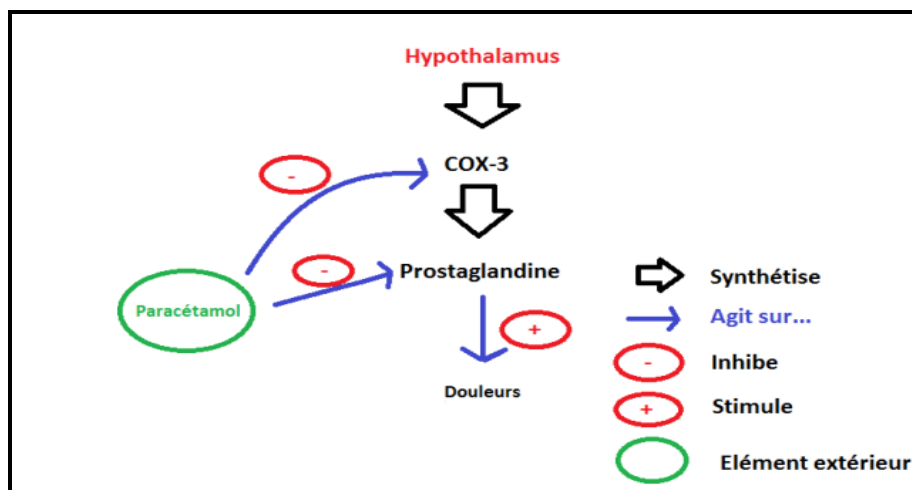


Figure 3: Schéma de la deuxième hypothèse du mécanisme d'action du paracétamol.

- **Troisième hypothèse H3 :** Une récente étude propose un nouveau mécanisme d'action. Sur le plan métabolique, au niveau du cerveau le paracétamol est desacétylé en p-aminophénol, puis conjugué avec l'acide arachidonique au niveau cérébral et spinal pour synthétiser le métabolite actif l'AM404 (l'acide gras N-arachidonoylphénolamine amide), sous l'action de l'enzyme FAAH (fatty acid amide hydrolase). L'AM404 inhiberait la COX-1 et la COX-2 et serait de plus un activateur du TRPV1 (Transit Receptor Potential Vanilloid-1), récepteur canal cationique dont l'activation prolongée conduirait à une désensibilisation et à un effet antalgique.

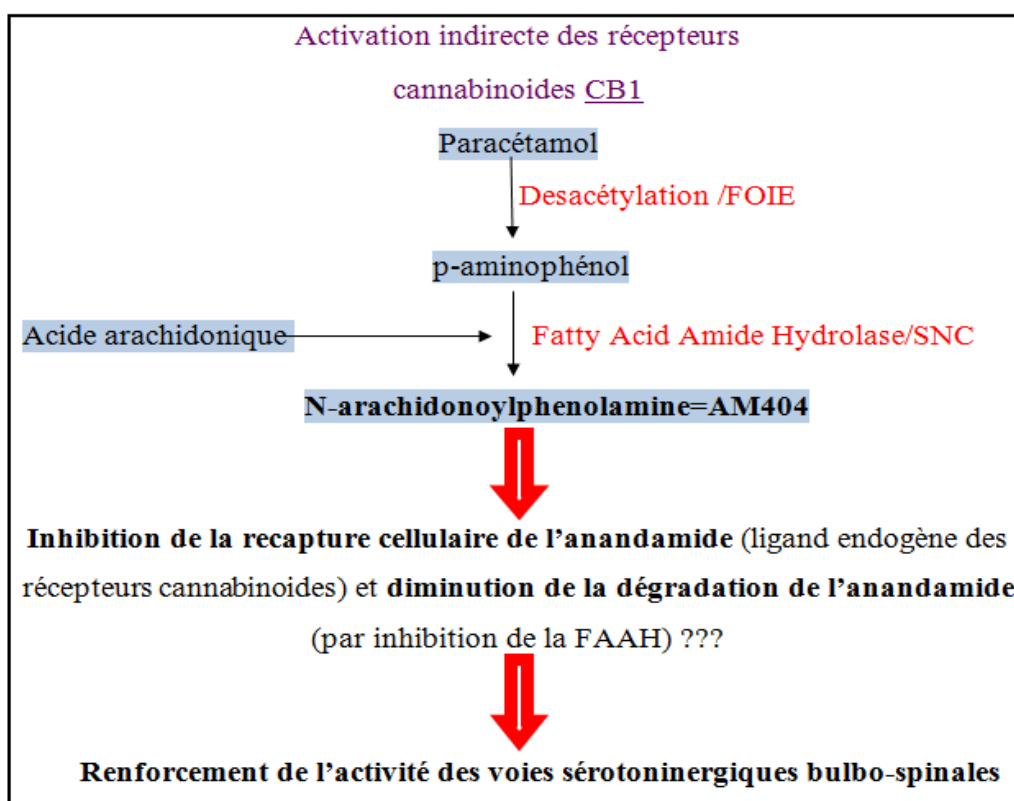


Figure 4 : Schéma de la troisième hypothèse du mécanisme d'action du paracétamol [17]

– **Quatrième hypothèse H4** : Action centrale via un mécanisme sérotoninergique.

Le paracétamol diffusant facilement à travers la membrane hémato-encéphalique, il aurait une action sérotoninergique centrale en agissant au niveau des neurones sérotoninergiques descendants de la moelle épinière qui exercent au niveau spinal un contrôle inhibiteur sur les voies de la douleur, cette théorie s'appuie sur l'inhibition de l'effet antalgique lors de plusieurs expérimentations concordantes : la lésion des voies sérotoninergiques bulbo-spinales, l'inhibition de la synthèse de sérotonine, ou l'administration intra-thécale ou systémique d'antagonistes des récepteurs sérotoninergiques provoquant une diminution de l'effet antalgique du paracétamol [5,7].

5. Indications thérapeutiques

L'utilisation du paracétamol est multiple : il exerce une action antalgique dans le traitement symptomatique des douleurs aiguës et chroniques d'intensité légère à modérée tels que les maux de tête, les migraines, les douleurs dentaires, les douleurs des symptômes prémenstruels. Son autre indication est le traitement symptomatique de la fièvre. C'est l'antipyrétique envisagé en première intention chez l'enfant [5, 8].

6. Posologies

Par voie orale, la dose par prise est comprise entre 500 et 1000 mg chez l'adulte, avec une dose journalière maximale de 4000 mg à un intervalle de 4 heures entre deux prises.

Chez l'enfant le paracétamol est l'antalgique non opioïde le plus sûr, il est utilisable à la posologie de 60mg/kg/jr à répartir en 4 prises orales ou rectales [4].

7. Interactions médicamenteuses

La prise du paracétamol à dose maximale pendant au moins 4 jours et d'anticoagulants oraux expose à un risque d'augmentation de l'effet de l'anticoagulant oral et du risque hémorragique ce qui nécessite un contrôle régulier de l'INR (International Normalized Ratio) et une adaptation éventuelle de la posologie de l'anticoagulant oral pendant le traitement par le paracétamol et après son arrêt [9].

8. Effets indésirables et toxicité

8.1. Effets indésirables

En effet, en dehors d'une possible toxicité hépatique grave à haute dose, d'une toxicité pour le rein, suspectée depuis longtemps, la prise du paracétamol augmenterait le risque de maladies cardiovasculaires (infarctus, AVC), il a été également mis en évidence un risque digestif accru, notamment de développer un ulcère. Il est mentionné de rares cas de réactions d'hypersensibilité à type de choc anaphylactique (érythème, urticaire) et de très exceptionnels cas de thrombopénie, leucopénie et neutropénie [9, 10].

8.2. Toxicité

Un surdosage, à partir de 10 g de paracétamol en une seule prise chez l'adulte et 150 mg/kg de poids corporel en une seule prise chez l'enfant (selon la susceptibilité des patients), provoque une cytolyse hépatique.

Toutefois, le paracétamol peut entraîner des lésions hépatiques même à doses thérapeutiques, s'il est administré sur de longues périodes, surtout chez des patients aux fonctions hépatiques préalablement altérées ou chez les sujets âgés [2, 11].

9. Grossesse et allaitement

Le paracétamol peut être utilisé au cours de la grossesse et de l'allaitement aux doses recommandées sur de courtes périodes [9].

I. Tramadol

1. Introduction

Le tramadol est un analgésique opioïde central de synthèse, classé par l’OMS parmi les antalgiques de pallier II dont l’efficacité est supérieure aux analgésiques du pallier I.

Il est prescrit dans le traitement des douleurs aiguës, mais aussi dans le traitement des algies chroniques.

C’est un analogue de la codéine, il a une activité proche de celle-ci, et un agoniste des récepteurs morphiniques, il agit sur les récepteurs de la morphine sans pour autant limiter l’activité des autres morphiniques.

Cependant, il peut entraîner une dépendance qui semble plus faible que celle d'autres morphinomimétiques, à ce titre il convient de l'employer avec précaution.

Les différentes présentations thérapeutiques de la molécule rendent son utilisation clinique aisée tant par voie entérale que parentérale ainsi que par voie locorégionale [12, 13].

2. Historique

Le chlorhydrate de tramadol a été synthétisé en 1962 dans les laboratoires de Grünenthal, en Allemagne. Son autorisation de mise sur le marché (AMM) sous le nom de Tramal® obtenue en 1977. Il a été introduit très récemment en France, son AMM a été délivré le 11 avril 1997. En 2013, une équipe française a identifié le tramadol à l’état naturel dans les racines d’un pêcher africain (*Nauclea latifolia*), à la concentration de 0,4%. Pour la première fois, un médicament de synthèse est découvert dans une source végétale à des concentrations cliniquement significatives. Actuellement, le tramadol est commercialisé dans cent pays à travers le monde [12].

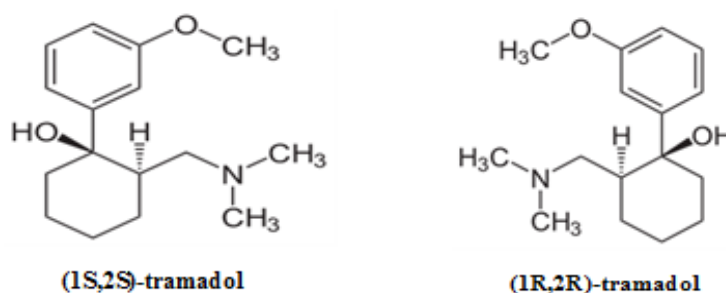
3. Propriétés

3.1. Propriétés physicochimiques

Aspect : le chlorhydrate de tramadol est une poudre cristalline blanche, pratiquement inodore avec un goût amer [14].

Nom chimique est : (1R,2R)-2-[(diméthylamino)-méthyl]-1-(3-méthoxyphényl)-cyclohexanol [3].

Structure chimique : Proche de la codéine et de la morphine [14].



Chiralité

Le tramadol a deux centres chiraux dans le cycle cyclohexane, par conséquent il existe quatre différents stéréo-isomères : (1R, 2R), (1S, 2S), (1R, 2S) et le (1S, 2R) stéréo-isomère ;

Il est commercialisé sous forme d'un mélange racémique contient des quantités égales de deux énantiomères (1R, 2R) et (1S, 2S) [14].

Tableau II : Propriétés physicochimiques du tramadol.

pKa [14]	Le tramadol est une base faible avec un pKa de 9,41.
- Formule brute du tramadol ; [15] - Poids moléculaire du tramadol (base)	$C_{16}H_{25}NO_2$; 263.4 g.mol^{-1}
- Formule moléculaire d'hydrochlorure tramadol ; [13] - Poids moléculaire d'hydrochlorure tramadol (sel)	$C_{16}H_{25}NO_2 \cdot HCl$ 299.8 g.mol^{-1}
Solubilité [3]	Facilement soluble dans l'eau et méthanol et peu soluble dans l'acétone
Point de fusion	$180 - 184^{\circ}C$ [3]

3.2. Propriétés pharmacologiques

3.2.1. Pharmacocinétiques

Absorption

Après administration orale du tramadol, l'absorption est rapide et supérieure à 90% avec une biodisponibilité d'environ 70% à 90%. La différence entre le tramadol absorbé et le tramadol disponible non métabolisé est probablement due au faible effet de premier passage. L'effet de premier passage après administration orale est au maximum de 30 % [11].

La concentration plasmatique maximale après administration orale, rectale et intramusculaire est atteinte en 1-2 heures, 3 heures et 45 minutes, Respectivement.

Les préparations à libération prolongée ont des pics plasmatiques après 4 à 6 heures [12, 14].

Distribution

Le tramadol a une forte affinité pour les tissus, avec un volume de distribution après administration orale de $2,7 \text{ L.kg}^{-1}$. Sa liaison aux protéines plasmatiques est de 20 %. Il traverse la barrière hémato encéphalique et le placenta. Il est retrouvé aussi avec son métabolite principal (M1), en faible quantité dans le lait maternel 16 heures après administration [12, 16].

Métabolisme

60 à 70% de la dose du tramadol ingérée est métabolisée, le reste est éliminé sous forme inchangée. Le métabolisme se fait dans le foie via deux voies enzymatiques principales impliquant le cytochrome P450 3A4 (CYP3A4) et le cytochrome P450 2D6 (CYP2D6).

Le tramadol est métabolisé par O-déméthylation (catalysée par l'enzyme CYP2D6) en métabolite M1, et par N-déméthylation (catalysée par l'enzyme CYP3A) en métabolite M2

Le métabolite M1 est ensuite métabolisé par N-déméthylation et conjugaison avec l'acide glucuronique. Le niveau de CYP2D6 détermine la voie métabolique du tramadol, en présence de concentrations élevées de cette enzyme, le tramadol est déméthylé sur le site de l'oxygène phénolique pour donner le métabolite actif M1. Avec des concentrations enzymatiques basses, la déméthylation se produit au niveau de l'azote du groupe amino pour donner un métabolite inactif M2 via le CYP3A4 et 2B6.

M1: O-desmethyltramadol (ODT),

M2 : N-desmethyltramadol (Nortramadol ou NDT),

Le métabolite M1 possède des propriétés antalgiques, il est plus puissant que la molécule mère [12].

Elimination

Le tramadol est essentiellement éliminé par voie rénale (90 %) : environ 30 % est éliminé dans les urines sous forme inchangée et 60 % sous forme de métabolites et une petite partie par voie biliaire (10 %).

Les demi-vies moyennes d'élimination du tramadol est de $6,3 \pm 1,4$ heures et celle du M1 est de $7,4 \pm 1,4$ heures selon que la molécule est administrée par voie orale ou intraveineuse.

L'atteinte de la fonction rénale et hépatique se traduira par un allongement significatif de cette demi-vie par rapport au sujet sain [16].

3.2.2. Propriétés pharmacodynamiques

L'effet antalgique du tramadol est lié à la fois au composé racémique initial et au métabolite M1. Il a une action centrale analgésique avec deux mécanismes d'action distincts mais complémentaires, opioïde et non opioïde. Il agit comme un agoniste pur et non sélectif des récepteurs opioïdes μ (mu), κ (kappa), δ (delta).

L'affinité du tramadol pour le récepteurs μ est 6000 fois plus faible que la morphine, sa structure proche de la codéine avec un groupement méthyle sur la partie phénolique lui confère une faible affinité (10 fois moins importante) pour les récepteurs μ , alors que son métabolite M1, dépourvu de groupement méthyle, a une affinité 200 fois plus forte pour les récepteurs opioïdes que le médicament original.

En plus de sa composante antalgique, il possède comme la codéine des propriétés antitussives [12, 16].

4. Mécanisme d'action

Le chlorhydrate de tramadol est un antalgique de palier II selon la classification de l'OMS.

C'est un antalgique à double action centrale, indiqué pour le soulagement de la douleur d'intensité moyenne à modérément forte :

- Une action opioïde centrale : c'est un agoniste opioïde faible (action sélective et prédominante sur les récepteurs μ)
- Une action monoaminergique, par inhibition de la recapture de la sérotonine et de la noradrénaline.

Les propriétés individuelles et conjointes de ses deux énantiomères expliquent le double mécanisme d'action du tramadol ;

- **L'énantiomère (+)** : a une forte affinité pour les récepteurs μ et c'est un inhibiteur puissant de la recapture synaptique de la sérotonine
- **L'énantiomère (–)** : a une affinité moindre pour les récepteurs μ et c'est un inhibiteur puissant de la recapture synaptique de la noradrénaline [13].

5. Indications thérapeutiques

Le tramadol est indiqué dans le traitement des douleurs modérées à intenses, aiguës ou chroniques de l'adulte essentiellement les douleurs néoplasiques, arthrosiques, postopératoires et neuropathiques. Hors AMM, il est utilisé dans d'autres indications, il aurait un effet antidépresseur qui serait dû majoritairement à son implication dans la voie noradrénergique. Le tramadol, en combinaison avec de l'adrénaline, a été utilisé comme anesthésique local en chirurgie buccale et maxillo-faciale [9, 12].

6. Posologies

Comme pour tous les médicaments antalgiques, la posologie du tramadol doit être adaptée à l'intensité de la douleur et à la réponse clinique de chaque patient en tenant compte des pathologies intriquées. Les différentes posologies du tramadol sont représentées dans le tableau III ci-dessous [17, 15] :

Tableau III : Posologie du Tramadol.

Forme gélule	Forme solution buvable	Forme solution injectable
-Douleurs aiguës : dose d'attaque de 100 mg, suivie de 50 ou 100 mg toutes les 4 à 6 heures sans dépasser 400 mg/24 heures. -Douleurs chroniques : dose d'attaque de 50 ou 100 mg, suivie de 50 ou 100 mg toutes les 4 à 6 heures sans dépasser 400 mg/24 heures.	Indiqué à partir de 3 ans [12] Posologie habituelle : 1 à 2 mg/kg/prise, trois à quatre fois/jour. Dose maximale : 8 mg/kg/jour. Ne pas dépasser 100 mg/prise et 400 mg/jour même si le poids est supérieur à 50 kg.	- Douleurs intenses : dose d'attaque de 100 mg, puis des doses complémentaires de 50 mg peuvent être administrées toutes les 10-20 minutes sans dépasser une dose totale de 250 mg (en comptant la dose d'attaque). Ultérieurement, il est possible d'administrer 50 ou 100 mg toutes les 4-6 heures sans dépasser une dose totale quotidienne de 600 mg. Douleurs modérées : 50 ou 100 mg durant la première heure.

7. Effets indésirables et toxicité

7.1. Effets indésirables

Les effets indésirables les plus fréquemment rencontrés sont ceux de la classe des opioïdes tels que : nausées, vomissements, somnolence, céphalées, vertiges, hypersudation, constipation et convulsions principalement après l'administration de doses élevées ou après un traitement concomitant par des médicaments qui peuvent abaisser le seuil épileptogène ou qui déclenchent eux-mêmes des convulsions [17].

7.2. Toxicité

Les symptômes de l'intoxication aiguë par tramadol correspondent à l'extension de ses effets pharmacologiques : Ils associent une somnolence pouvant aller jusqu'au coma avec dépression respiratoire (syndrome opiacé) a été observé à partir de 800 mg chez l'adulte, des convulsions, confusion, un myosis et un retentissement cardiovasculaire marqué par une tachycardie, une hypertension artérielle et rarement un collapsus.

La dose toxique du tramadol est estimée à 500 mg chez l'adulte, chez l'enfant la dose n'est pas connue, cette toxicité est majorée lors de l'ingestion concomitante de fluoxétine et amitriptyline qui sont des inhibiteurs enzymatiques du métabolisme du tramadol. La dose létale minimum observée est de 3 à 5 g [18, 19].

8. Interactions médicamenteuses

Tableau IV : Interactions médicamenteuses [16 ; 18].

L'association contre indiquée	L'association est déconseillée	Associations à prendre en compte
Les IMAO : risque de syndrome sérotoninergique, dans la mesure où les IMAO bloquent le métabolisme intracellulaire de la noradrénaline et de la sérotonine, son usage concomitant avec le tramadol pourrait induire des effets secondaires sévères.	<ul style="list-style-type: none"> - Les produits abaissant le seuil épileptogène ; - Morphiniques agonistes antagonistes (buprénorphine) entraînent une diminution de l'effet antalgique par blocage compétitif des récepteurs ; - Carbamazépine et les inducteurs enzymatiques entraînant une diminution de l'intensité et de la durée de l'effet analgésique ; - l'alcool : l'association peut causer une forte somnolence. 	<ul style="list-style-type: none"> - les autres analgésiques morphiniques agonistes ; - les antitussifs <i>morphine like</i> (pholcodine), antitussifs morphiniques vrais (codéine) - benzodiazépines, barbituriques, autres médicaments sédatifs, ISRS ; - Les antiacides, - Les anti-vitamines k ; - la quinidine et cimétidine.

9. Grossesse et allaitement

Il est préférable de ne pas l'utiliser pendant le premier trimestre de la grossesse. À partir du deuxième trimestre, une utilisation prudente est ponctuellement possible. Durant le dernier trimestre, l'utilisation chronique du tramadol peut induire, quelle que soit la dose, un syndrome de sevrage chez le nouveau-né. Enfin, à la fin de la grossesse, des doses élevées, même lorsque le traitement est de courte durée, peuvent entraîner une dépression respiratoire chez le nouveau-né. Si un traitement par tramadol est nécessaire pendant plusieurs jours, l'allaitement doit être interrompu. En cas de traitement au long cours, celui-ci est totalement contre-indiqué [17].

II. Association paracétamol-tramadol

Comprimé pelliculé à 325 mg de paracétamol et 37,5 mg de chlorhydrate de tramadol, c'est une association d'un analgésique opioïde de palier II d'action centrale (tramadol) et d'un antalgique de palier I (paracétamol).

Ces deux analgésiques occupent de multiples sites d'analgésie et présentent des propriétés pharmacocinétiques complémentaires, combinant ainsi un soulagement rapide à un effet analgésique prolongé. L'utilisation de cette association s'est révélée offrir une analgésie supérieure à celle, isolée, de chacun de ses composants et ce, sans augmenter les effets secondaires ou la toxicité.

La raison de cette supériorité analgésique ne semble pas due à un simple effet d'addition. En fait, le rapport fixe des doses de l'association de paracétamol et de tramadol a été choisi dans la fourchette où la synergie entre ses deux composants s'est avérée se produire. La combinaison de paracétamol et de tramadol a offert un soulagement efficace des douleurs, ainsi qu'une large marge d'innocuité. Il est remarquable qu'aucun signe de tolérance à l'action analgésique n'ait été observé,

En outre, l'association est exempte de la toxicité vis-à-vis d'organes cibles, par comparaison aux médicaments opioïdes classiques, elle réduit la constipation et l'intolérance précoce aux opioïdes grâce à un faible risque d'abus qui permet la réussite d'une analgésie à long terme.

L'utilisation du paracétamol et du tramadol est recommandée dans le traitement des affections modérément à intensément douloureuses, en particulier dans les douleurs d'ostéoarthrose, et ce aussi bien à long terme que pendant les brefs accès de cette maladie quand le paracétamol seul ne procure plus une analgésie suffisante [20].

1. Posologies

Réservé à l'adulte et l'adolescent (à partir de 12 ans), la dose est adaptée en fonction de l'intensité de la douleur et de la sensibilité individuelle du patient.

La dose initiale recommandée est de 2 comprimés, les doses complémentaires peuvent être administrées en fonction des besoins sans dépasser 8 comprimés par jour. Les prises doivent être espacées d'au moins 6 heures [32].

2. Effets indésirables

-Troubles gastro-intestinaux (vomissement, constipation, douleurs abdominales, nausées), dyspnée.

-Sensations vertigineuses, somnolence, sueurs, prurit, céphalées, tremblement, modification de l'humeur et trouble du sommeil.



CHAPITRE II

LES COMPRIMES

1. Historique des comprimés

La forme comprimé a été inventée par William Brockedon en 1843 en Grande Bretagne, par compactage de poudre entre deux poinçons. Cette forme s'est rapidement développée en Allemagne et aux Etats Unis ainsi qu'au Canada. En France la forme «comprimé» va se répandre tardivement, elle a été longtemps ignorée aussi bien par les pharmaciens d'officine que par les industriels et les universités où son intérêt fait l'objet de nombreuses controverses. En 1883 les laboratoires Acard à Paris, ont commercialisé des tablettes de chlorure de potassium obtenues par compression, fabriquées en petite quantité par les laboratoires industriels.

Après des débuts lents, le comprimé finit par s'imposer à la réalité économique, le prix de revient d'un comprimé est moins élevé que celui d'une pilule ou d'un cachet, la stabilité est meilleure, le conditionnement est plus facile, les machines de production sont plus performantes.

En 1919, un industriel Maurice Bouvet a publié un livre sur la production industrielle des comprimés qui va permettre de vulgariser cette forme, et de plus en plus des formules ont été commercialisées sous forme de comprimés ; les ouvrages de pharmacie galénique lui ont consacré plus d'importance, et le comprimé est enfin inscrit au Codex en 1936 [21].

2. Définition

D'après la Pharmacopée Européenne « Les comprimés sont des préparations solides contenant une unité de prise d'une ou plusieurs substances actives. Ils sont obtenus en agglomérant par compression un volume constant de particules ou par un autre procédé de fabrication approprié tel que l'extrusion, le moulage ou la cryodessiccation (lyophilisation). Les comprimés sont destinés à la voie orale. Certains sont avalés ou croqués, d'autres sont dissous ou désagregés dans de l'eau avant administration, certains, enfin, doivent séjourner dans la bouche pour y libérer la substance active. » [3].

3. Les différents aspects des comprimés

On distingue plusieurs catégories de comprimés pour administration par voie orale : enrobés, non enrobés, effervescents, solubles, dispersibles, orodispersibles, comprimé à libération modifiée, gastro-résistants, à utiliser dans la cavité buccale et les lyophilisats oraux.

4. Caractéristiques organoleptiques des comprimés

Afin d'éviter toute confusion chez les patients et le personnel soignant chaque comprimé est caractérisé par sa forme, ses dimensions, sa couleur et son marquage.

4.1. Formes et dimensions

« Les comprimés se présentent généralement sous la forme d'un cylindre droit dont les faces inférieures et supérieures peuvent être plates ou convexes et les bords biseautés ».

Cependant, il existe d'autres formes de comprimés qui sont définies par la matrice et les poinçons au cours de la compression [3 ; 22].

4.2. Couleurs et marquages

Les comprimés peuvent prendre différentes couleurs mais généralement ils se présentent sous la coloration blanche. Ces couleurs correspondent à celle du mélange de matières premières, principe actif ou excipients ou à la coloration de l'enrobage. La coloration joue un rôle esthétique et constitue un critère d'identification des comprimés. Tout changement de couleur peut traduire une altération du médicament (non adéquation avec le RCP) [22].

Le marquage des comprimés peut se faire à l'aide de motifs en relief (embossed tablet), de gravures (engraved tablet), ou des impressions (imprinted tablet) [FDA, 2014]. Ce ci facilite leur identification.

Ils peuvent porter aussi une ou plusieurs barres de cassures (lignes de sécabilité) on parle alors de comprimés sécables, cette barre assure la division des comprimés en fractions uniformes. L'efficacité de la barre de cassure doit être démontrée par l'essai d'uniformité des fractions [22].

4.3. Structure

Les comprimés présentent des structures variées, nus ou enrobés, quand l'enrobage est très mince, le comprimé est dit pelliculé.

La structure du comprimé peut jouer un rôle déterminant dans le contrôle de la libération du principe actif et dépend donc de la stratégie de formulation employée pour une délivrance optimale des substances actives [22].

5. Composition des comprimés

5.1. Le principe actif : est la molécule qui possède un effet thérapeutique, des propriétés curatives ou préventives à l'égard des maladies humaines ou animales. Il est utilisé en vue de restaurer, corriger ou modifier des fonctions physiologiques en exerçant une action pharmaceutique, immunologique ou métabolique. Il est un des composants essentiels du médicament [23].

5.2. Les excipients : sont des matières premières qui rentrent dans la composition des préparations pharmaceutiques à un titre différent de celui des principes actifs. Ils correspondent soit à une entité chimique définie, soit à un mélange plus ou moins complexe, d'origine synthétique ou naturelle [23].

Ils peuvent être diluants, liants, désagrégeants, agents d'écoulement, lubrifiants, composés pouvant modifier le comportement de la préparation dans le tube digestif, colorants autorisés par l'Autorité compétente, aromatisants [3].

6. Fabrication des comprimés

Tout médicament doit être fabriqué au sein d'un établissement pharmaceutique en respectant les Bonnes Pratiques de Fabrication.

La fabrication des comprimés nécessite la réalisation de plusieurs étapes dites opérations unitaires, qui sont :

- Le mélange des poudres de matières premières,
- La granulation,
- La compression qui peut être suivie ou non d'une étape d'enrobage [23].

6.1. Le mélange des poudres

Le mélange des poudres des matières premières s'effectue après leur pesée et a lieu dans un mélangeur. On distingue trois types de mécanisme de mélange :

Mélange par diffusion : un mécanisme lent dans lequel des particules sont déplacées puis redistribuées suite à l'initiation d'un choc.

Mélange par convection : une force extérieure telle qu'une pale d'agitation permet de mettre en mouvement un ensemble de particules.

Mélange par cisaillement : une action mécanique qui permet de mélanger grâce à la création de plans de glissement de couches de particules.

La ségrégation, également appelée démélange, qui est le processus inverse du mélange, un phénomène non souhaitable pour les industriels, car il conduit souvent à des rejets de lots. Néanmoins, il est possible de l'éviter grâce au procédé de granulation [23].

6.2. La granulation

En pratique, la grande majorité des principes actifs nécessitent à la fois la présence d'adjuvants, et un traitement spécial, la granulation pour l'obtention des deux qualités essentielles des comprimés, qui sont : une cohésion entre les grains suffisante et un délitement facile.

Elle conduit à la préparation de granulés dont certains peuvent être destinés à la fabrication de comprimés. Eventuellement, la modification de la texture initiale du mélange de poudre pour augmenter sa densité, ceci pour l'obtention d'un meilleur écoulement dans la matrice, une meilleure conservation de l'homogénéité et une porosité supérieure qui favorise la dissolution. Ces caractéristiques dépendent des matières premières utilisées pour la fabrication du médicament.

La granulation s'effectue dans des granulateurs rotatifs ou oscillants selon deux procédés :

- **La granulation par voie humide** : les diluants sont mélangés avec le principe actif, les liants introduits dans le liquide de mouillage (eau ou alcool), les délitants et les lubrifiants qui doivent se répartir à la surface des grains peuvent être ajoutés avant la compression.
- **La granulation par voie sèche** : n'est utilisée que lorsque le PA ne supporte ni l'humidité ni le séchage par la chaleur ou qu'il est trop soluble dans l'eau ou l'alcool. Tout peut être mélangé ensemble sauf le lubrifiant qui peut être ajouté ultérieurement au grain [24].

6.3. La compression

Est l'étape finale conduisant à l'obtention de comprimés, c'est une technologie qui consiste à transformer une poudre en comprimés par réduction du volume du lit de poudre en éliminant une partie de l'air inter particulaire. Ceci permet d'augmenter la surface de contact entre les particules et de faciliter les liaisons interparticulaires. La cohésion du comprimé résultera donc des mécanismes de liaisons, induisant des points solides ou des forces d'attraction entre les particules du mélange. L'importance de ces mécanismes varie en fonction de la nature des particules. La compression est réalisée sur des machines altératives ou rotatives, le principe de la compression de poudres est le même et se décline en quatre étapes de procédé de mise en forme par compression simple en matrice. On distingue l'étape d'alimentation de la poudre dans la matrice, l'arasage de cette poudre, la compression et l'éjection du comprimé.

Les paramètres à prendre en considération pour l'étape de compression sont nombreux :

- Des paramètres liés aux caractéristiques intrinsèques des particules de la poudre : tailles, formes et comportements mécaniques (fragile ou ductile).
- Les paramètres des procédés : la vitesse de compression, la forme des poinçons, et le temps d'application de la force influencent aussi sur les propriétés des comprimés [23 ; 24].

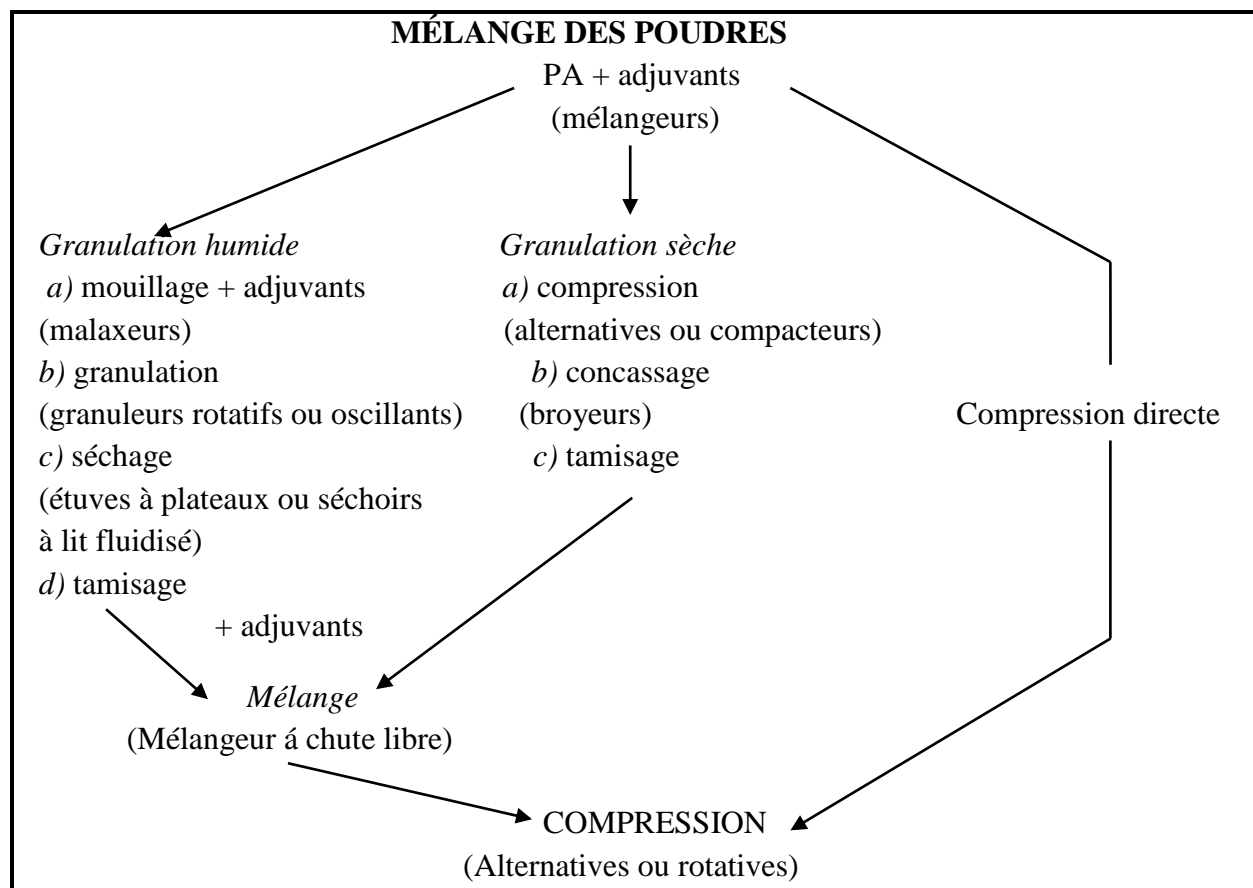


Figure 5 : Différentes possibilités pour la fabrication des comprimés [24].

7. Avantages et inconvénients des comprimés [24].

Tableau V : Avantages et inconvénients des comprimés.

Avantages	Inconvénients
<ul style="list-style-type: none"> - Emploi facile ; - Dosage précis par unité de prise ; - Milieu sec et condensé favorisant une bonne conservation des matières première ; - Forme intéressante pour les PA peu solubles ; - Fabrication industrielle à grande échelle d'où prix de revient peu élevé ; - PA à saveur désagréable moins perceptible que sous forme liquide et masquage total possible par enrobage ; - Comprimés à couches multiples permettent de résoudre des problèmes d'incompatibilité des PA dans des couches différentes ; - la possibilité de modifier la libération des PA, - Procédés de fabrication connus et contrôlés par les industriels. 	<ul style="list-style-type: none"> - Étapes du développement pharmaceutique délicates (interaction des matières premières) ; - La mise au point de la formulation peut être délicate ; - Non adaptée pour les PA liquides ou déliquescents (sauf si quantité réduite) ; - Grande variété de poudres pharmaceutiques pouvant être utilisées ; - Possible irritation de la muqueuse du tractus gastro-intestinal du patient ; - Dosage fixe ne pouvant pas être modifié au cours du temps ; - Forme concentrée, si le délitement n'est pas rapidement assuré, peut être nuisible pour la muqueuse du tube digestif.



CHAPITRE III

VALIDATION ANALYTIQUE

1. Définition

La Validation d'une méthode est la procédure par laquelle on démontre, preuves expérimentales à l'appui, que les performances de la méthode permettent de répondre aux exigences de l'usage auquel elle est destinée. Elle est basée sur une analyse statistique de plusieurs caractères [25].

2. But de la validation

La validation analytique a pour principal objectif de fournir aux laboratoires ainsi qu'aux autorités compétentes les garanties que chaque mesure qui sera réalisée ultérieurement en routine, une fois la procédure validée, sera suffisamment proche de la « vraie valeur » inconnue de l'échantillon ou du moins comprise dans une limite acceptable, en fonction de la finalité de la procédure. Le but est de minimiser le risque tant au niveau du producteur que du futur consommateur [26].

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 Q2 B**: 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) [29].

4. Critères de la validation analytique

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 : [26]

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

Tableau VI : Critères de la validation en fonction du type d'analyse [25].

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 [26].

Dans le cas des méthodes séparatives, on parle plutôt de sélectivité qui est la capacité à différencier et quantifier l'analyte cible en présence d'interférents dans l'échantillon, telles que les techniques chromatographiques, qui sont plutôt sélectives (notion relative) que spécifiques (notion absolue) [25]. Le degré de sélectivité de la procédure de dosage dépend d'ailleurs de la qualité de la séparation chromatographique et de la sélectivité intrinsèque du mode de détection [26].

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 systématiques et aléatoires, 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 [26].

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 [26].

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 (intralaboratoire) et la reproductibilité (interlaboratoire).

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'essai indépendants sont obtenus par la même méthode sur des échantillons d'essai 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'essai indépendants sont obtenus par la même méthode sur des échantillons d'essai 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'essai sont obtenus par la même méthode sur des échantillons d'essais identiques dans **différents laboratoires**, avec différents opérateurs et utilisant des équipements différents [26].

4.5. Justesse (biais)

La justesse exprime l'étroitesse de l'accord entre la valeur moyenne obtenue à partir d'une série de résultats d'essais et une valeur qui est acceptée soit comme une valeur conventionnellement vraie, soit comme une valeur de référence acceptée (exemple : standard international, standard d'une pharmacopée).

La mesure de la justesse est généralement exprimée en termes de recouvrement et de biais absolu ou relatif (erreur systématique) [26].

4.6. 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 [26].

4.7. 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 [26].

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 [26].

5. Les 10 étapes pour valider une méthode avec le profil d'exactitude

1. Disposer du mode opératoire et définir le mesurande ;
2. Définir le domaine de validation (gamme de concentrations) et l'objectif attendu de la méthode sous la forme d'un intervalle d'acceptabilité ;
3. Sélectionner des échantillons de validation dont les valeurs de référence sont connues ;
4. Choisir un plan d'expérience de validation ;
5. Pour les méthodes indirectes, choisir du plan d'expérience d'étalonnage ;
6. Collecter les données ;
7. Pour les méthodes indirectes, calculer les concentrations retrouvées par étalonnage inverse ;
8. Calculer les critères de validation à partir des concentrations retrouvées : principalement les écarts-types de fidélité de fidélité intermédiaire et des biais de justesse ;
9. Calculer les intervalles de tolérance et construire le profil d'exactitude ;
10. Interpréter les résultats et décider si la méthode est valide ou non [28].

6. Etude statistique de la validation analytique

La validation de techniques analytiques repose sur l'étude et la validation de plusieurs critères qui sont : spécificité, linéarité, exactitude, fidélité, limite de quantification et de détection. Cette méthodologie est basée sur les critères décrits dans le guide élaboré par la SFSTP et ICH Q2(R1). Ces derniers reposent sur l'utilisation du profil d'exactitude, qui intègre de façon statistiquement correcte dans un seul graphique l'ensemble des éléments essentiels de la validation. Cette démarche permet de simplifier l'approche de la validation d'une procédure analytique tout en contrôlant le risque associé à son utilisation [27].

6.1. Spécificité

6.1.1. 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 [29].
- **6.1.2. 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 paracétamol et le tramadol
- 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) [29].

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 calculé est comparé à la valeur t° (α ; 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.

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) [29].

En ce qui concerne la préparation des SE et SV, celle-ci dépend du protocole de validation choisi. Le logigramme de **la figure 06** suivante, présente la démarche proposée dans le guide SFSTP 2003 pour sélectionner un protocole expérimental de validation en fonction des contraintes ou des spécificités liées à la procédure de dosage sous épreuve. [26]

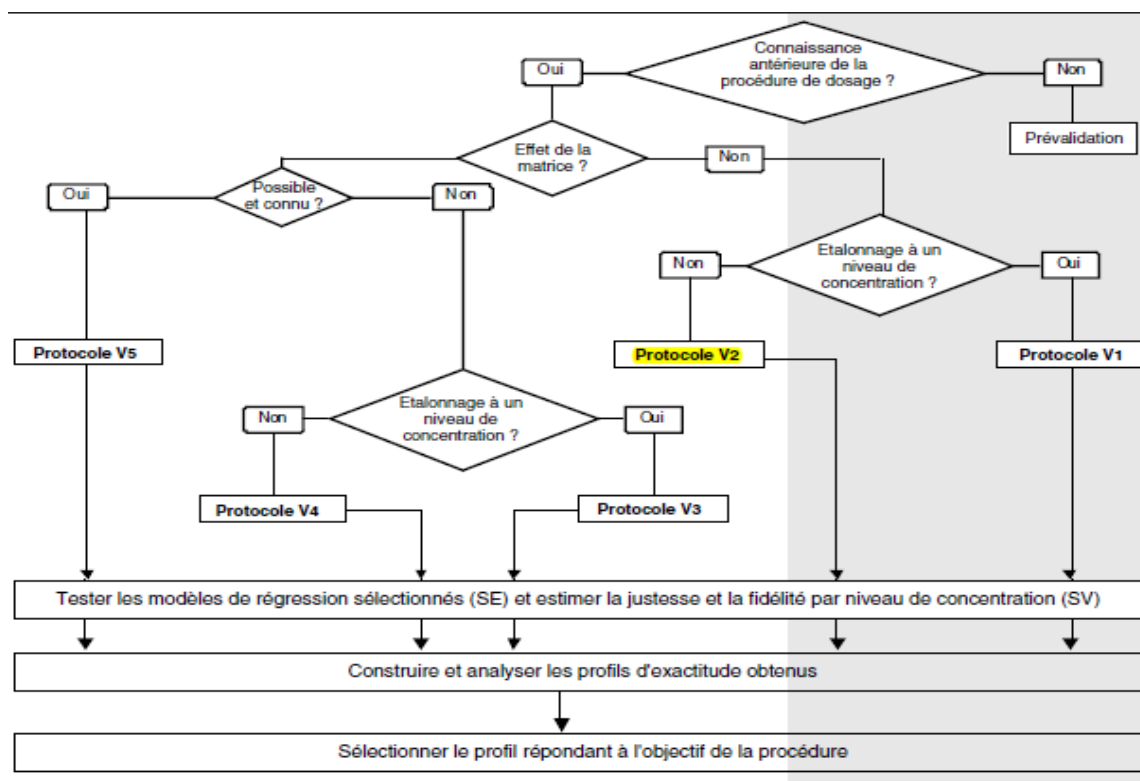


Figure 6 : Logigramme permettant de sélectionner un protocole de validation. [26]

SE : standard d'étalonnage.

SV : standard de validation.

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

Tableau VII : Choix du nombre de standards d'étalonnage et de validation en fonction du protocole choisi [26].

Standards	Niv. de conc.	Protocole				
		V1	V2	V3	V4	V5
SE. Etalonnage sans la matrice	Bas	2	2	2	2	
	Médian	2 ⁽¹⁾	2 ⁽²⁾	2 ⁽¹⁾	2 ⁽²⁾	
SE. Etalonnage avec la matrice	Bas				2	2
	Médian			2 ⁽¹⁾	2 ⁽²⁾	2 ⁽²⁾
SV. Validation avec la matrice	Bas	3	3	3	3	3
	Médian	3	3	3	3	3
Nbre minimum séries Nbre total essais (min.)		3	3	3	3	3
		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.

6.2. 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) de l'analyte 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 suivant. Le choix dépend du type de méthode (méthode physicochimique, bioanalytique, immunodosage) [27].

Tableau VIII : Exemples de fonction de réponses. [27]

Type	Equation	Paramètres/ Parameters	Linéaire/ linear
Droite passant par l'origine/ straight line through	$Y = \beta X$	Pente β	Oui/Yes
Droite/Straight line	$Y = \alpha + \beta X$	Ordonnée à l'origine α Pente 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	$Y = \alpha + \frac{\delta - \alpha}{1 + \left[\left(\frac{X}{\gamma}\right)^{\beta^\Psi}\right]}$	$\alpha, \beta, \gamma, \delta, \Psi$	Non/No

Très vraisemblablement, la plupart des méthodes physicochimiques auront recours à la droite (passant par 0 ou non). Pour les méthodes bio-analytiques, 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 ci-dessus [27]

6.3. 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 :

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

\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 IX : Règles d'alignement pour différentes fonctions de réponses [27].

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

6.4. Prédiction inverses

Avant d'effectuer les prédictions inverses, c'est à dire calculer des concentrations en retour avec la fonction de réponse, il est préférable de s'assurer qu'au sein d'un niveau de concentration, les concentrations sont toutes identiques.

Les prédictions inverses pour les différents modèles de régression s'obtiennent comme suit :

Tableau X : Calcul des prédictions inverses pour différentes fonctions de réponses [27].

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

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. Par exemple, après une transformation logarithmique ou racine carrée de la droite les concentrations calculées se font de la manière suivante :

Tableau XI : Calcul des prédictions inverses pour la droite ayant subi une transformation logarithmique ou racine carrée [27]

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

6.5. Calcul de la justesse et de la fidélité [27]

6.5.1. Modèle

La justesse d'une méthode analytique (par opposition à celle d'un résultat) exprime l'étroitesse de l'accord entre la moyenne (par opposition à celle d'une observation unique) 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 (ou des standards d'étalonnage eux-mêmes en phase de pré-validation). Cette estimation est réalisée à chacun des j niveaux de concentration considérés à l'aide du modèle statistique suivant :

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

Où

X_{ijk} est la k -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 σ_{Bj}^2 .

ε_{ijk} est l'erreur expérimentale, considérée comme une variable aléatoire ayant une distribution normale de moyenne 0 et de variance σ_{Wj}^2 .

L'erreur expérimentale est supposée indépendante de la série.

Les variances σ_{Bj}^2 et σ_{Wj}^2 représentent les variances intersérie 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 , σ_{Bj}^2 et σ_{Wj}^2 du modèle.

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

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

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

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

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

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

$x_{ijk,cal}$: 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) :

Si $MSE_j < MSM_j$ alors :

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

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

Si non :

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

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

6.5.2. 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 : [27]

$$biais_j = \bar{\mu}_j - \bar{x}_j$$

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

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

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

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

6.5.3. 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 intersérie donne une estimation de la variance de fidélité intermédiaire : [27]

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

Fidélité intermédiaire : $\hat{\sigma}_{IP,j}^2 = \hat{\sigma}_{W,j}^2 + \hat{\sigma}_{B,j}^2$

6.6. 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

$$Exactitude = x - \mu$$

Avec ;

x : concentration prédite

μ : concentration introduit

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

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

L'erreur maximale relative observée pour chaque modèle sur l'ensemble des séries montre l'impact du choix de la fonction de réponse sur l'exactitude des résultats. [27]

6.6.1. Erreur totale et profil de l'erreur totale

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

$$x = \mu + |biais|_{procédure} + fidélité\ intermédiaire\ procédure$$



$$x - \mu = |biais|_{procédure} + fidélité\ intermédiaire\ procédure$$



$$x - \mu = erreur\ totale\ procédure$$

L'erreur totale d'une procédure analytique évalue son aptitude à produire des résultats exacts. Donc l'estimation de l'erreur totale d'une procédure est fondamentale pour juger de la validité d'une méthode [27].

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 [27].

6.7. Calcul de l'intervalle de tolérance

L'important en validation, ce n'est pas la validité des résultats que nous obtenions 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.

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 :

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

Où :

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

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

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

$$v = \frac{(R + 1)^2}{\frac{(R + 1/n)^2}{p - 1} + \frac{1 - 1/n}{pn}}$$

$$Q_t \left(v; \frac{1+\beta}{2} \right)$$

n : nombre de répétitions

p : nombre de séries

Le même intervalle en échelle relative devient :

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

Deux termes sont contenus dans l'intervalle de tolérance : l'un étant la justesse et l'autre étant, à un facteur près, le coefficient de variation de fidélité intermédiaire. C'est la raison pour laquelle cet intervalle peut ainsi être considéré comme une expression de l'exactitude des résultats. Mais l'intervalle de tolérance intègre une dimension supplémentaire, celle de chance (ou risque) pour des résultats futurs, conditionnellement à des résultats passés.

La méthode peut dès lors être considérée comme exacte au niveau de chance β pour le niveau de concentration en question, si l'intervalle de tolérance est inclus dans les limites $[-\gamma, \gamma]$ définies à priori en fonction des objectifs de la méthode [27].

6.8. Profil d'exactitude

6.8.1. Calcul

Le profil d'exactitude de la méthode s'obtient en reliant d'une part les bornes L_j entre elles d'autre part les bornes U_j entre elles

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

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

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 [27].

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

6.8.2. 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 (-5%, + 5%) retenues pour notre étude. Par ailleurs, parmi les fonctions de réponses acceptables, on pourra remarquer que certaines fournissent des résultats meilleurs que d'autres. Ce seront ces dernières qui devront être retenues.

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 [27].

7. 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 [27].

8. 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 (LLOQ) et haute (ULOQ) 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 [27].



PARTIE PRATIQUE



MATERIELS ET METHODES

Introduction

L'objectif du présent travail est de mettre au point et de valider une méthode de dosage simultanée de deux principes actifs « Paracétamol et Tramadol » dans des comprimés par Chromatographie Liquide à 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. Matériel et méthodes**1.1. Matériel****1.1.1. Matières premières et réactifs**

- Paracétamol : principe actif fourni gracieusement par le laboratoire BIOPHARM Industrie.
- Tramadol : principe actif fourni gracieusement par le laboratoire BIOPHARM Industrie.
- Opadry blanc.
- Stéarate de magnésium.
- Amidon.
- Acide chlorhydrique (HCl 37%).
- Acétonitrile grade HPLC.
- Acide phosphorique (85%).
- Hydroxyde d'Ammonium solution (NH₃ à 33%).
- Diéthylamine.
- Eau pure.

1.1.2. Appareillage et équipement

Tableau XII : Matériel du laboratoire de Chimie Analytique utilisé dans le présent travail.

Désignation		Spécification	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	C18	
	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 scientifique Pmax = 4 bar	Filtration de la phase mobile
Bain ultrasons : Sonicateur		Advantage-LAB	Dissolution
Agitateur magnétique		Nahita	Homogénéisation de la phase mobile
Balance de précision		Kern	Pesée
PH metre		Metler Tolido	Ajuster le PH de la phase mobile

1.1.3. Verreries

- Fioles jaugées de 100 ml, 50 ml, 250 ml, 1000 ml et 2000 ml ;
- Pipette jaugée de 5 ml ;
- Pipette graduée de 20 ml et de 10 ml ;
- Bêchers ;
- Éprouvette ;
- Entonnoir

Autres

- Compte-goutte ;
- Spatule ;
- Pissettes à eau ;

1.2. Méthodes

1.2.1. Préparation des solutions

1.2.1.1. Solvant de dilution : solution de HCl 0,1N

A l'aide d'une pipette graduée de 20 ml, prélever 16.6 ml de HCl pur a 37%, verser dans une fiole de 2 L contenant environ 1000 ml d'eau pure puis compléter au trait de jauge avec de le même solvant.

1.2.1.2. Préparation des solutions standards

a. Solutions standards de paracétamol : Dans des fioles de 100 ml, peser les différentes masses correspondant à chaque niveau de concentration du paracétamol, dissoudre dans un volume suffisant du diluant, mettre à l'ultrason pour une dissolution totale puis compléter au trait de jauge avec le même diluant et mettre à l'abris de la lumière.

b. Solution standard de tramadol : Dans des fioles de 100 ml, peser les différentes masses correspondant à chaque niveau de concentration de tramadol, dissoudre dans un volume suffisant du diluant, mettre à l'ultrason pour une dissolution totale puis compléter au trait de jauge avec le même diluant.

Tableau XIII: Tableau présentant les masses théoriques des niveaux de concentration des principes actifs.

Niveaux de concentration en %	80	90	100	110	120
Masse théorique du Paracetamol	260 mg	292 mg	325 mg	358 mg	390 mg
Masse théorique du Tramadol	30 mg	33,75mg	37,5 mg	41,25 mg	45 mg

c. Préparation de la solution placebo :

Amidon de maïs, stéarate de magnésium, Opadry blanc : Qsp 1 comprimé dans 100 ml de diluant. Mettre à l'ultrason pour une dissolution complète, puis filtrer la solution.

d. Solutions des standards d'étalonnage

Dans des fioles de 50 ml, mélanger 5 ml de la solution standard de paracétamol et 5 ml de la solution standard de tramadol, compléter au trait de jauge avec le diluant. Effectuer deux répétitions pour chaque niveau de concentration.

e. Solutions des standards de validation

Dans des fioles de 50 ml, mélanger 5 ml de la solution standard de paracétamol avec 5 ml de la solution standard de tramadol, ajouter 5 ml de la solution placebo, compléter au trait de jauge avec le diluant. Effectuer trois répétitions pour chaque niveau de concentration.

f. Préparation de la phase mobile

Dans une éprouvette graduée de 1L, verser 1L d'eau purifiée, ajouter 10 ml du Diéthylamine et 1,5 ml d'Hydroxyde d'ammonium, agiter et ajuster le pH à 3,0 à l'aide de l'acide phosphorique, ajouter 150 ml Acétonitrile grade HPLC, filtrer puis dégazer.

1.2.2. Conditions chromatographiques :

- Colonne : C18 (250 x 4,6) mm, taille des particules = 5 μ m
- Détection : longueur d'onde 217 nm
- Volume injecté : 20 μ l
- Débit : 1 ml
- Température : ambiante



RESULTATS ET DISCUSSION

2. Résultats

La technique de dosage utilisée dans notre méthode est la Chromatographie Liquide à Haute Performance « HPLC ». (Annexe I).

2.1. Spécificité

- Comparaison des deux pentes des deux droites de régression : les résultats de test de comparaison sont évalués dans les tableaux XIV et XV suivants :

2.1.1. Paracétamol

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

Tableau XIV.I : Résultats obtenus sur la gamme standard.

Gamme standard				
% théorique	Masse introduite (xi)	Aire du pic (yi)	$(y_i - y^*)^2$	$(x_i - x')^2$
80	260,09	6264968	4532548499	4228,033878
	260,07	6266885	4216192795	4230,635211
	260	6377090	2202916684	4239,746178
90	292,03	7053649	1383706832	1094,506944
	292,08	7127194	1236177870	1091,201111
	292,07	7158268	4418369244	1091,861878
100	325,08	7926063	2529987302	0,0011111111
	325,17	7933217	3059808465	0,0032111111
	325,18	7830602	2259762401	0,0044444444
110	358,17	8652999	74508085,7	1092,743211
	358,03	8648760	91124097,4	1083,506944
	358,1	8709096	2413525950	1088,120178
120	390,36	9470962	2010521950	4257,127511
	390,27	9305828	13961244936	4245,391211
	390	9422754	26838811,68	4210,279511
Pente droite standard : $a_1 =$		23749,374		
SCE/n-2		3416710302		
Erreur pente $\sigma_{a_1} =$		326,9995495		
Ordonnée à l'origine $b_1 =$		155317,5199		
Erreur ordonnée $\sigma_{b_1} =$		107377,8545		

Tableau XIV.II : Résultats obtenus sur la gamme placebo chargé (appelée aussi gamme matrice)

Gamme placebo chargé				
% théorique	Masse introduite (xi)	Aire du pic (yi)	(yi-y*) ²	(xi-x') ²
80,00	260,09	6362358,000	2506648224	4232,9771
	260,07	6376514,000	4187576506	4235,5799
	260,04	6263739,000	2240123267	4239,4857
90,00	292,03	6914763,000	31876215033	1097,0227
	292,08	7135934,000	1714727240	1093,7131
	292,15	7112050,000	250069792,6	1089,0880
100,00	325,08	7959711,000	3393777832	0,0051
	325,17	7990256,000	7499632977	0,0003
	325,15	7932599,000	866270284,7	0,0000
110,00	358,17	8687698,000	523846991,4	1090,2323
	358,03	8678386,000	828079125,6	1081,0067
	358,28	8508665,000	41865444850	1097,5086
120,00	390,36	9534264,000	1336241523	4252,1702
	390,27	9659708,000	26961428518	4240,4407
	390,3	9431342,000	4212038143	4244,3488
Pente droite FR : a2 =		24452,42804		
SCE/n-2		10020163101		
Erreur pente σ_{a2} =		559,6364332		
Ordonnée à l'origine b2 =		-47540,44669		
Erreur ordonnée σ_{b2} =		183792,8992		

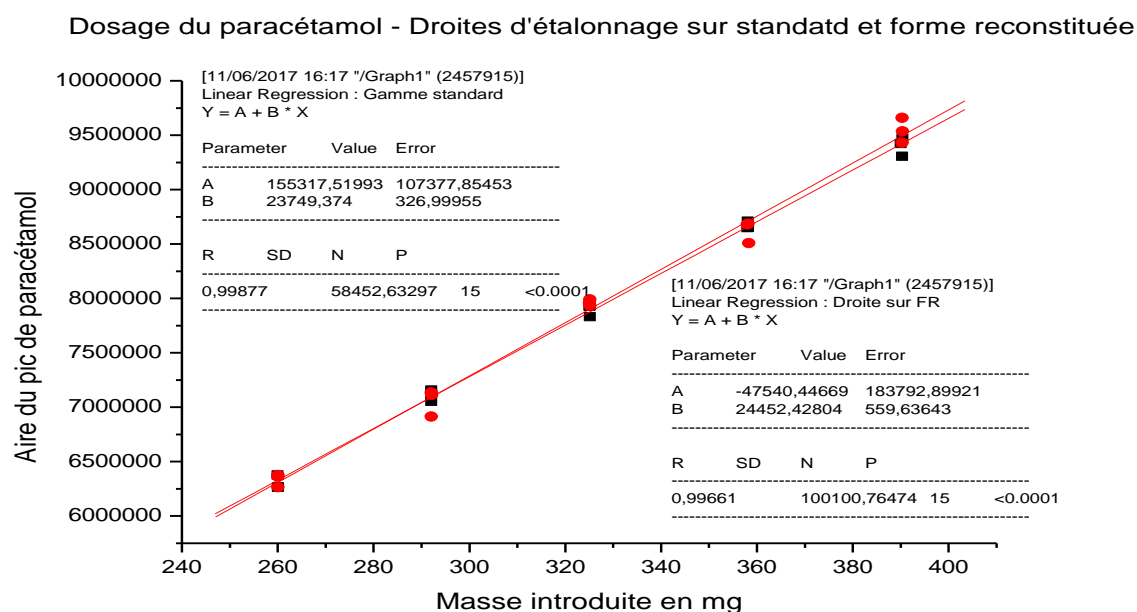


Figure7 : Droites d'étalonnage sur standard et forme reconstituée du paracétamol.

Tableau XIV.III : Comparaison des pentes

Comparaison des pentes a_1 et a_2 des deux droites de régression	t calculé	1,085
	$t^\circ (0,05, 26)$	2,056
	Condition	$t \text{ calculé} < t^\circ (0,05, 26)$
	Résultat	VRAI

A partir de ce tableau on déduit que :

La pente a_1 de la droite de régression D_1 de la gamme standard = **23749,374**

La pente a_2 de la droite de régression D_2 de la gamme placebo chargé = **24452,42804**

Le test de student donne une valeur de $t_{\text{calculé}} = 1.085$

La valeur seuil $t^\circ (0,05 ; 26) = 2.056$ est lue sur la table de Student. (Annexe IV)

1.1.2. Tramadol

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

Tableau XV.I : Résultats obtenus sur la gamme standard.

Gamme standard				
% théorique	Masse introduite (mg)	Aire du pic du tramadol	$(y_i - y^*)^2$	$(x_i - x')^2$
80	30,13	592065,00	9118891,778	55,64165378
	30,06	598087,00	19948394,2	56,69086044
	30,01	593723,00	1318265,389	57,44629378
90	33,86	667042,00	36712051,85	13,90792711
	33,79	674027,00	5712414,056	14,43493378
	33,97	676804,00	1966176,597	13,09957378
100	37,59	751108,00	87,30905615	4,44444E-07
	37,51	751108,00	2768655,891	0,006293778
	37,61	743134,00	70587922,29	0,000427111
110	41,33	841987,00	159875800,5	13,99258711
	41,38	841987,00	134523008	14,36915378
	41,49	817652,00	226121693,3	15,21520044
120	45,06	922029,00	215206067,2	55,81086044
	45,01	922029,00	246983173,4	55,06629378
	45,04	873769	1100366896	55,51243378
Pente droite standard : $a_1 =$		20915,89727		
SCE/n-2		171631499,8		
Erreur pente $\sigma_{a_1} =$		638,3474921		
Ordonnée à l'origine $b_1 =$		-35111,23451		
Erreur ordonnée $\sigma_{b_1} =$		24232,30992		

Tableau XV.II : Résultats obtenus sur la gamme placebo chargé (gamme matrice)

Gamme placebo chargé				
% théorique	Masse introduite (mg)	Aire du pic du tramadol	(yi-y*) ²	(xi-x') ²
80,00	30,13	592591	18060203,76	55,3834
	30,06	568819	706189054,5	56,4301
	30,02	616705	490132303,8	57,0327
90,00	33,86	684066	101879947,9	13,7789
	33,79	685715	173977991,9	14,3035
	33,87	662972	125601952,7	13,7048
100,00	37,59	752128	1048267,384	0,0003
	37,51	731384	326374982,6	0,0038
	37,54	745630	19715496,51	0,0010
110,00	41,33	849895	460203382,3	14,1226
	41,38	841238	138330866,4	14,5009
	41,3	835894	65152562,43	13,8980
120,00	45,06	900280	28030237,09	56,0701
	45,01	904862	103412,5061	55,3238
	45,13	888800	332036582	57,1234
Pente droite FR : a2 =		20678,74274		
SCE/n-2		229756711,1		
Erreur pente σ_{a2} =		738,1488026		
Ordonnée à l'origine b2 =		-26209,78898		
Erreur ordonnée σ_{b2} =		28008,51151		

Dosage du tramadol : Droites d'étalonnage sur standard et forme reconstituée

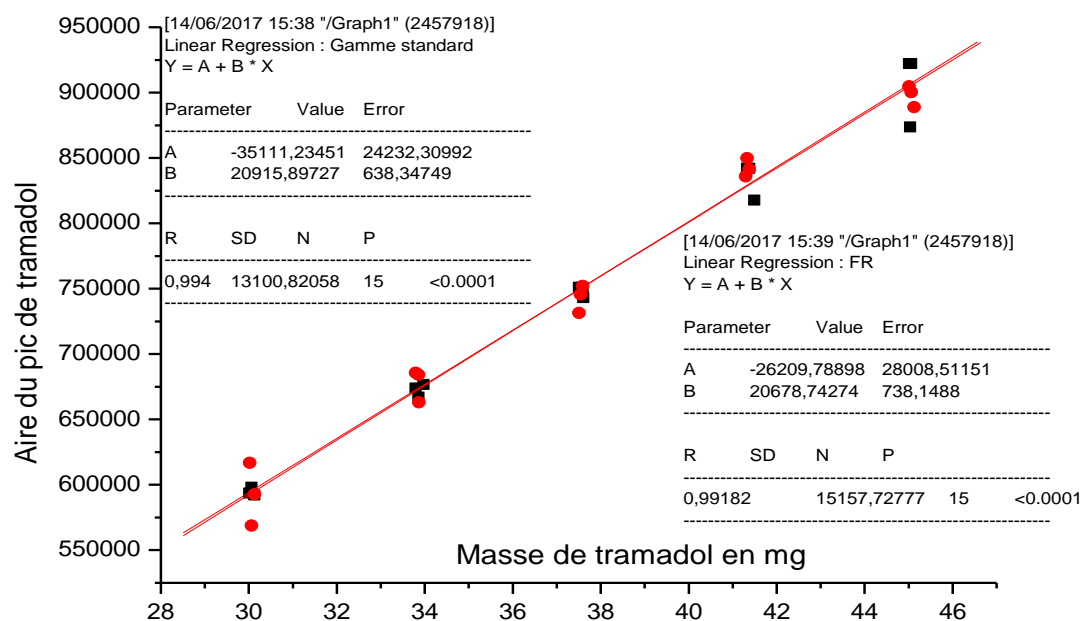


Figure 8 : Droites d'étalonnage sur standard et forme reconstituée du tramadol.

Tableau XV.III : Comparaison des pentes

Comparaison des pentes a1 et a2 :	t calculé	0,243
	t° (0,05, 26)	2,056
	Condition	t calculé < t° (0,05, 26)
	Résultat	VRAI

A partir de ce tableau on déduit que :

La pente a_1 de la droite de régression D_1 de la gamme standard = **20915,89727**

La pente a_2 de la droite de régression D_2 de la gamme placebo chargé = **20678,74274**

tcalculé = 0.243

t° (0,05 ; 26) = 2.056 : lu sur la table de Student (Annexe IV)

2.2. Fonction de réponse

La relation existante entre la réponse de l'instrument (signal qui est l'aire du pic) et la concentration du principe actif introduite dans la solution, obtenue avec les trois (03) séries des SE, est représentée pour quatre modèles mathématiques testés comme suit :

2.2.1. Paracétamol

- **Premier modèle : régression linéaire $y = ax$ passant par 0**

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

Standard d'étalonnage sans la matrice					
Série 1		Série 2		Série 3	
Prise d'essai (Pe) en mg	Aire du pic (A)	Prise d'essai (Pe) en mg	Aire du pic (A)	Prise d'essai (Pe) en mg	Aire du pic (A)
260,09	6264968	260,00	6377090	260,16	6401325
260,07	6266885	260,21	6248706	260,03	6249833
292,03	7053649	292,07	7158268	292,12	7150629
292,08	7127194	292,00	7064378	292,25	7181520
325,08	7926063	325,18	7830602	325,11	7979729
325,17	7933217	325,13	7920384	325,11	7938596
358,17	8652999	358,10	8709096	358,15	8748348
358,03	8648760	358,35	8828982	358,13	8686360
390,36	9470962	390,00	9422754	390,25	9529406
390,27	9305828	390,29	9405401	390,02	9499010
Pente	24184,00	Pente	24094,00	Pente	24408,00
ord, l'origine	0,00	ord, origine	0,00	ord, origine	0,00

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

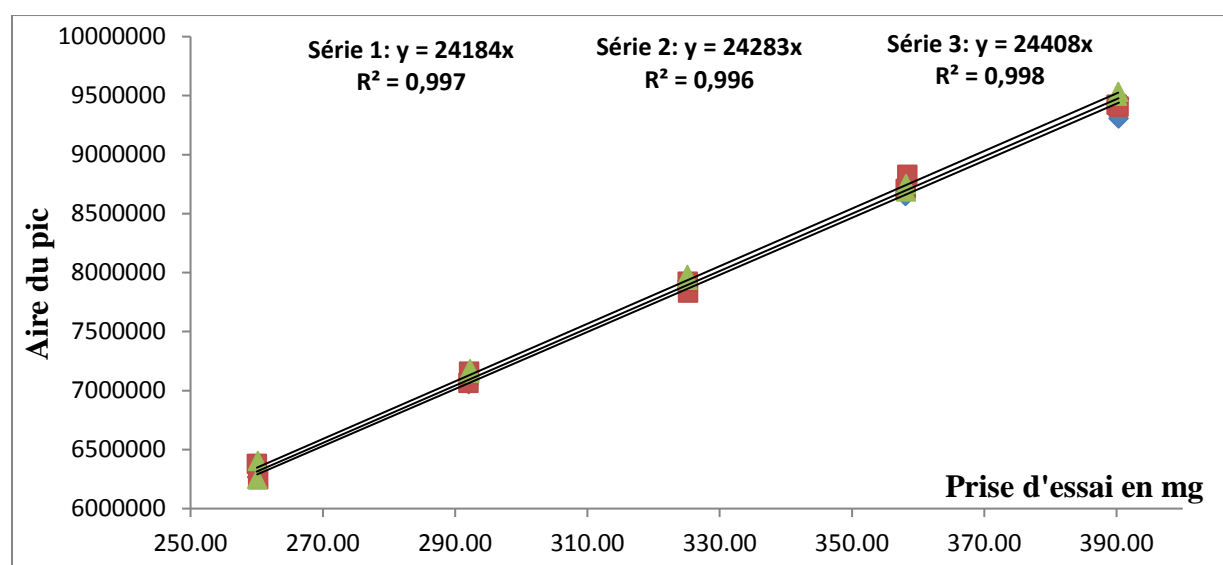
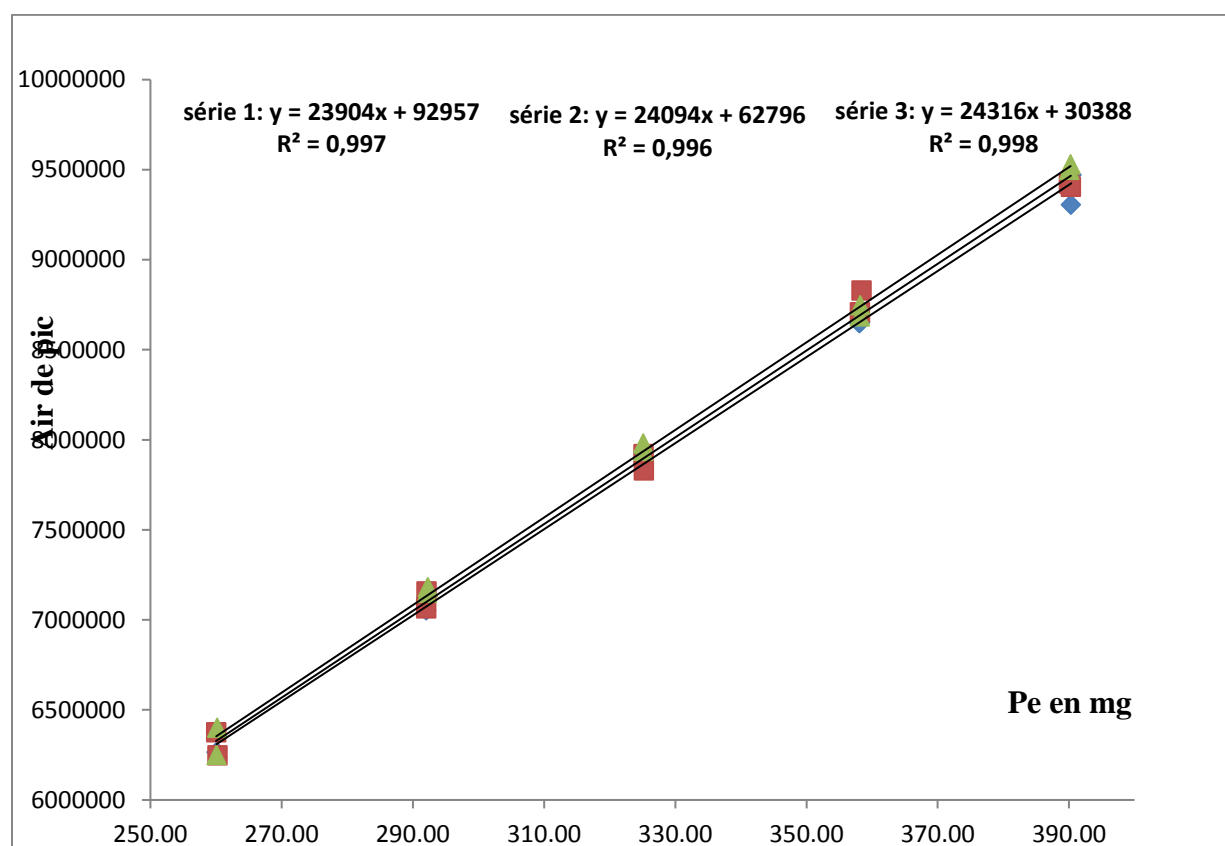


Figure 9 : Courbes d'étalonnages obtenues avec la fonction $y = ax$ pour les trois séries des SE.

– Deuxième modèle : Régression linéaire $y = ax + b$ **Tableau XVII** : Résultats obtenus pour la fonction $y = ax + b$.

Standard d'étalonnage sans la matrice					
Série 1		Série 2		Série 3	
Prise d'essai (Pe) en mg	Aire du pic (A)	Prise d'essai (Pe) en mg	Aire du pic (A)	Prise d'essai (Pe) en mg	Aire du pic (A)
260,09	6264968	260,00	6377090	260,16	6401325
260,07	6266885	260,21	6248706	260,03	6249833
292,03	7053649	292,07	7158268	292,12	7150629
292,08	7127194	292,00	7064378	292,25	7181520
325,08	7926063	325,18	7830602	325,11	7979729
325,17	7933217	325,13	7920384	325,11	7938596
358,17	8652999	358,10	8709096	358,15	8748348
358,03	8648760	358,35	8828982	358,13	8686360
390,36	9470962	390,00	9422754	390,25	9529406
390,27	9305828	390,29	9405401	390,02	9499010
Pente	23904,210	Pente	24094,047	Pente	24316,473
Ord, l'origine	92957,195	Ord, l'origine	62796,348	Ord, l'origine	30387,741

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

**Figure 10** : Courbes d'étalonnages obtenues avec la fonction $y = ax + b$ pour les trois séries des SE.

– Troisième modèle : logarithme népérien $\ln Y = (\ln X)$

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

Standard d'étalonnage sans la matrice					
Série 1		Série 2		Série 3	
Ln (Pe)	Ln (A)	Ln (Pe)	Ln (Pe)	Ln (Pe)	Ln (Pe)
5,561	15,650	5,561	15,668	5,561	15,672
5,561	15,651	5,561	15,648	5,561	15,648
5,677	15,769	5,677	15,784	5,677	15,783
5,677	15,779	5,677	15,771	5,678	15,787
5,784	15,886	5,784	15,874	5,784	15,892
5,784	15,887	5,784	15,885	5,784	15,887
5,881	15,973	5,881	15,980	5,881	15,984
5,881	15,973	5,882	15,994	5,881	15,977
5,967	16,064	5,966	16,059	5,967	16,070
5,967	16,046	5,967	16,057	5,966	16,067
Pente	0,994	Pente	0,995	Pente	0,9989
ord, l'origine	10,130	ord, l'origine	10,128	ord, l'origine	10,109

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

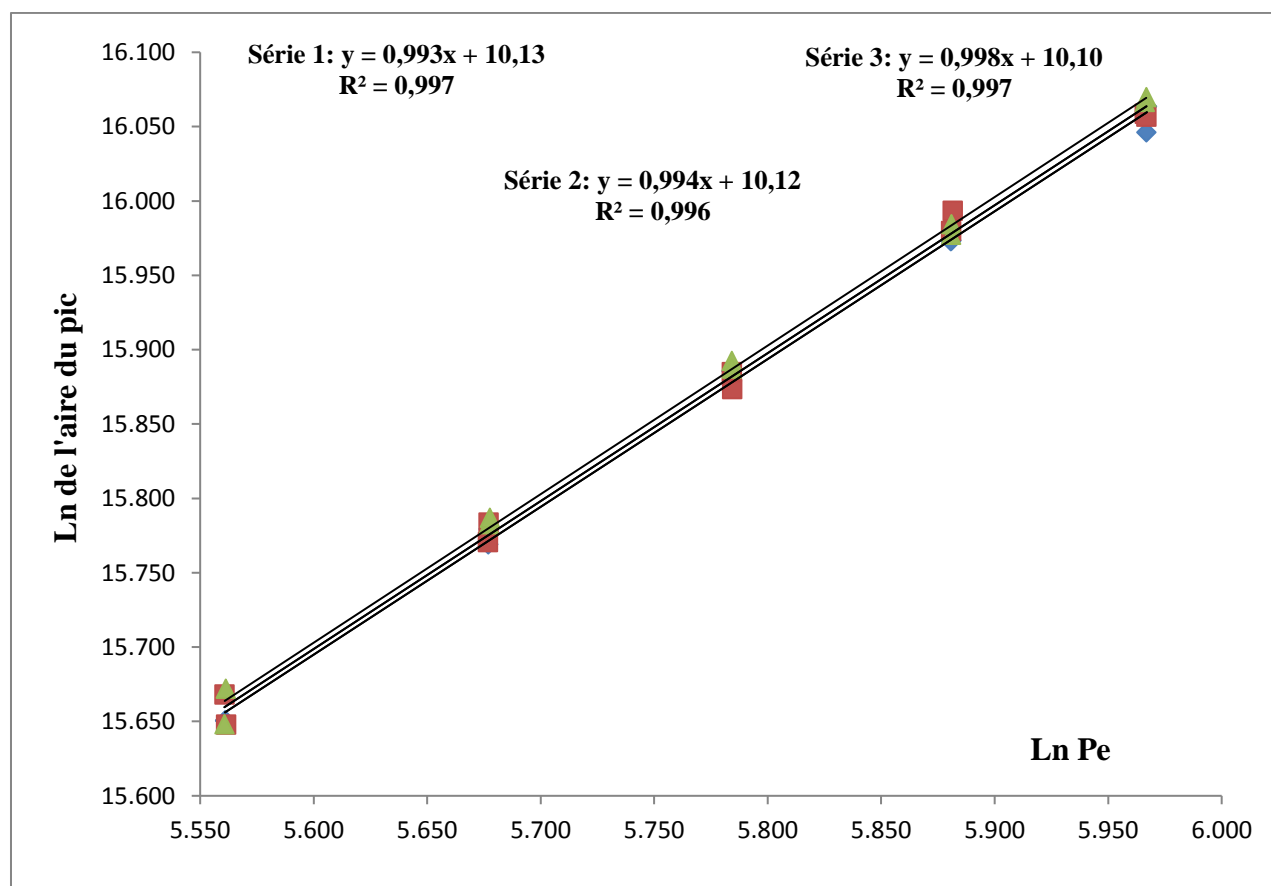
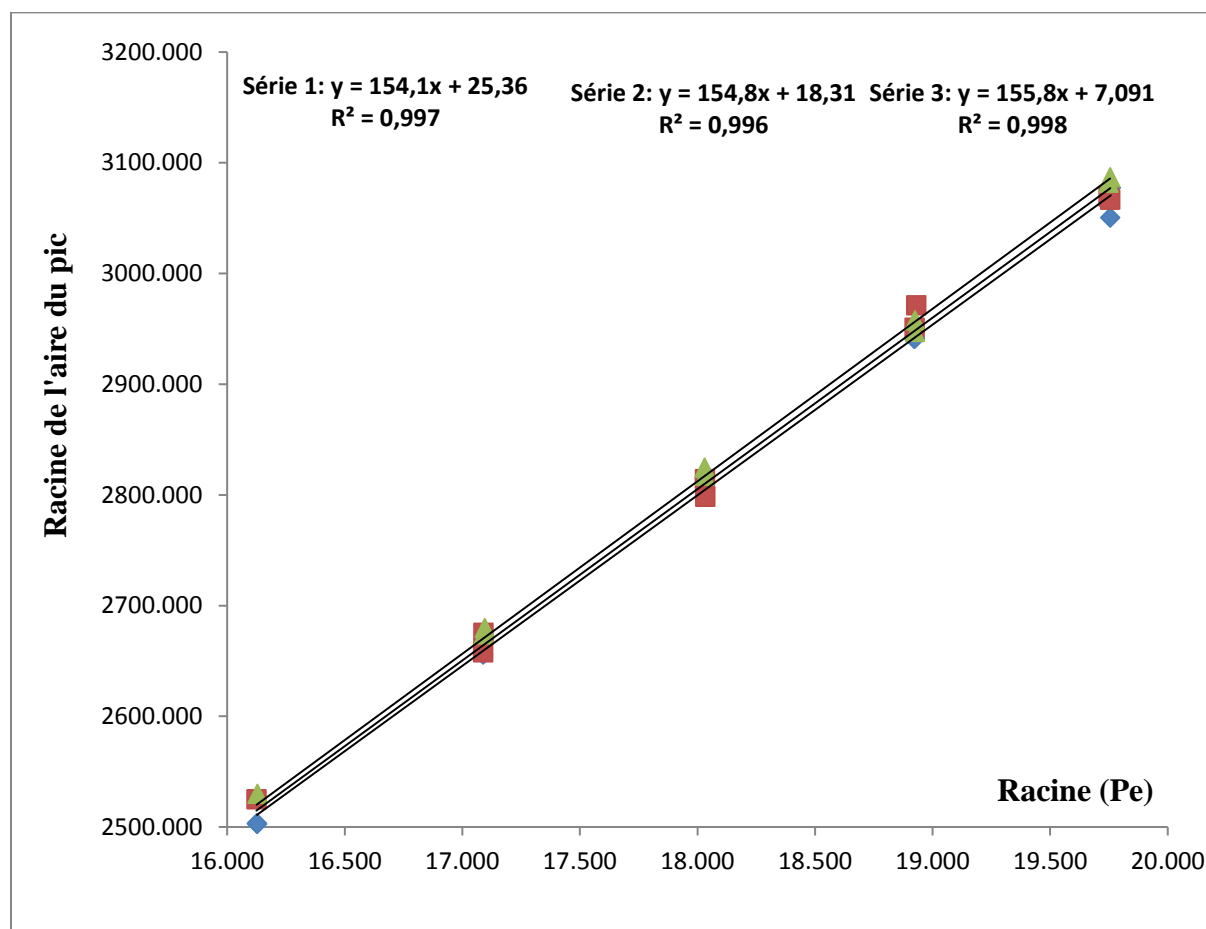


Figure 11: Courbes d'étalonnages obtenues avec la fonction $\ln Y = (\ln X)$ pour les trois séries des SE

– **Quatrième modèle : Racine carrée $\sqrt{Y} = f(\sqrt{X})$** **Tableau XIX** : Résultats obtenus pour la fonction $\sqrt{Y} = (\sqrt{X})$

Standard d'étalonnage sans la matrice					
Série 1		Série 2		Série 3	
Racine (Pe)	Racine (A)	Racine (Pe)	Racine (A)	Racine (Pe)	Racine (A)
16,127	2502,992	16,125	2525,290	16,129	2530,084
16,127	2503,375	16,131	2499,741	16,125	2499,967
17,089	2655,871	17,090	2675,494	17,092	2674,066
17,090	2669,681	17,088	2657,890	17,095	2679,836
18,030	2815,326	18,033	2798,321	18,031	2824,841
18,032	2816,597	18,031	2814,318	18,031	2817,551
18,925	2941,598	18,924	2951,118	18,925	2957,761
18,922	2940,877	18,930	2971,360	18,924	2947,263
19,758	3077,493	19,748	3069,650	19,755	3086,974
19,755	3050,546	19,756	3066,823	19,749	3082,046
Pente	154,128	Pente	154,829	Pente	155,844
ord, l'origine	25,367	ord, l'origine	18,313	ord, l'origine	7,092

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

**Figure 12** : Courbes d'étalonnages $\sqrt{Y} = (\sqrt{X})$ obtenues avec les trois séries des SE.

2.2.2. Tramadol

– **Premier modèle : Régression linéaire $y = ax$ passant par 0**

Tableau XX: Résultats obtenus pour la fonction $y = ax$.

Standard d'étalonnage sans la matrice					
Série 1		Série 2		Série 3	
Prise d'essai (Pe) en mg	Aire du pic (A)	Prise d'essai (Pe) en mg	Aire du pic (A)	Prise d'essai (Pe) en mg	Aire du pic (A)
30,01	593723	30,13	592065	30,01	589352
30,00	580842	30,06	598087	30,00	589352
33,97	676804	33,86	667042	33,77	722940
33,91	678773	33,79	674027	33,87	734766
37,61	743134	37,59	751108	37,53	810583
37,60	753775	37,51	751108	37,51	813402
41,49	817652	41,33	841987	41,30	896237
41,29	764221	41,38	841987	41,25	896237
45,04	873769	45,06	922029	45,03	969234
45,00	843221	45,01	922029	45,02	969234
Pente	19450,00	Pente	20163,00	Pente	21361,00
ord, l'origine	0,00	ord, l'origine	0,00	ord, l'origine	0,00

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

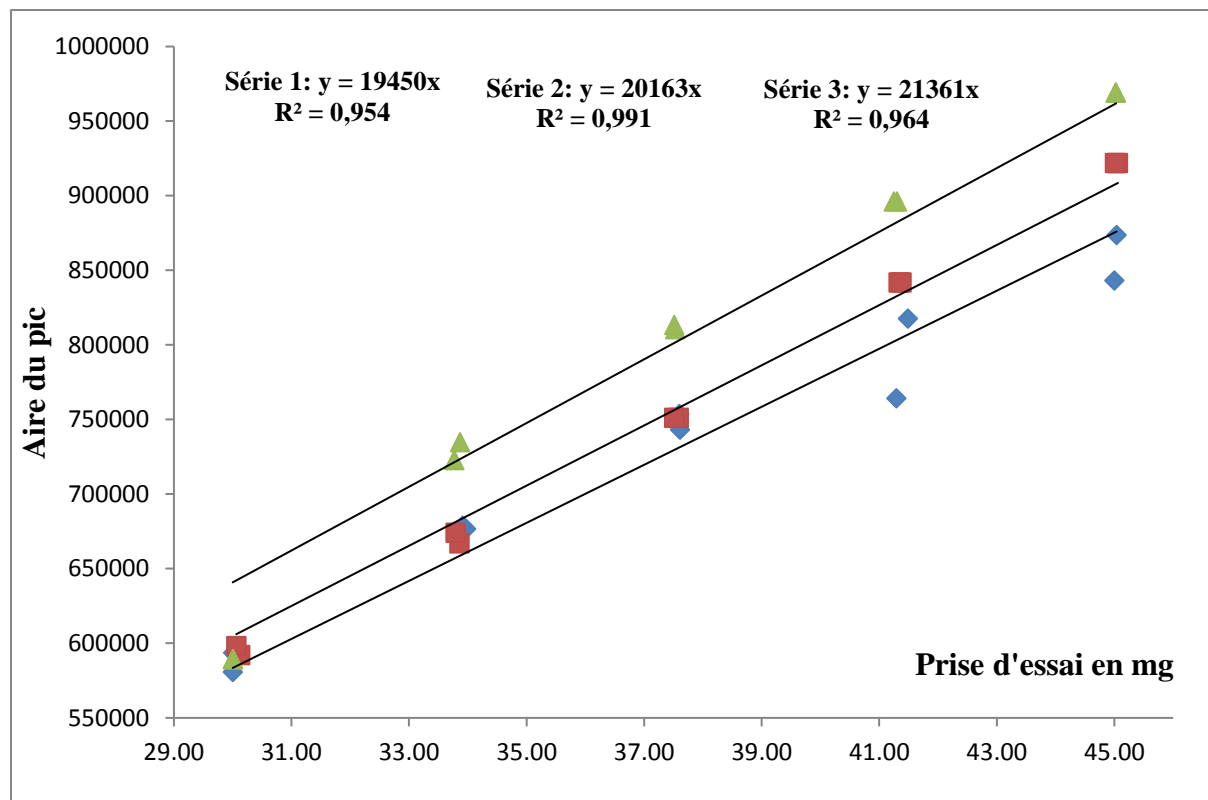
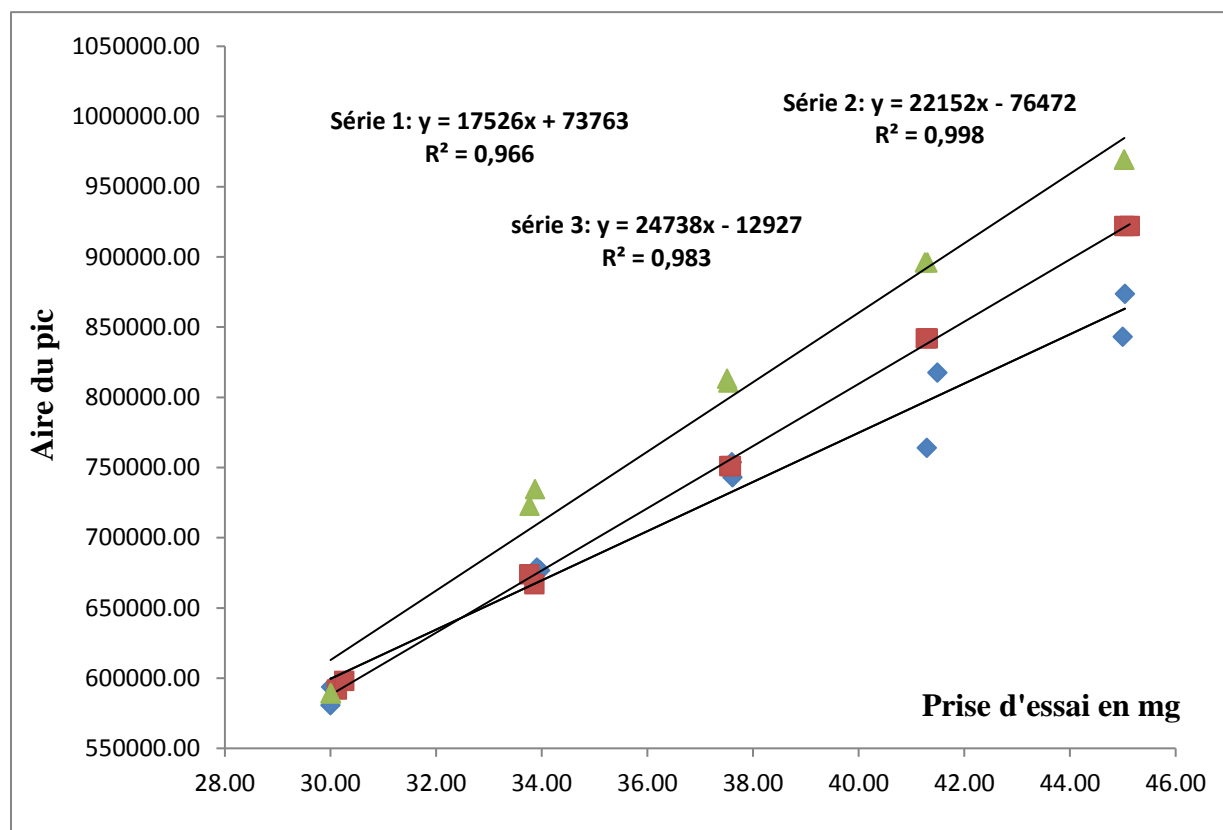


Figure 13 : Courbes d'étalonnages $y = ax$ obtenues avec les trois séries des SE.

– **Deuxième modèle : Régression linéaire $y = ax + b$** **Tableau XXI** : Résultats obtenus pour la fonction $y = ax + b$.

Standard d'étalonnage sans la matrice					
Série 1		Série 2		Série 3	
Prise d'essai en mg	Aire du pic	Prise d'essai en mg	Aire du pic	Prise d'essai en mg	Aire du pic
30,01	593723	30,12	592065	30,01	589352
30,00	580842	30,26	598087	30,00	589352
33,97	676804	33,86	667042	33,77	722940
33,91	678773	33,76	674027	33,87	734766
37,61	743134	37,55	751108	37,53	810583
37,60	753775	37,58	751108	37,51	813402
41,49	817652	41,27	841987	41,30	896237
41,29	764221	41,31	841987	41,25	896237
45,04	873769	45,03	922029	45,03	969234
45,00	843221	45,13	922029	45,02	969234
Pente	17525,757	Pente	22151,788	Pente	24738,441
ord, l'origine	73763,152	ord, l'origine	-76472,338	ord, l'origine	-129275,26

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

**Figure 14**: Courbes d'étalonnages $y = ax + b$ obtenues avec les trois séries des SE.

– Troisième modèle : logarithme népérien $\ln Y = (\ln X)$ Tableau XXII : Résultats obtenus pour la fonction $\ln Y = (\ln X)$

Série 1		Série 2		Série 3	
Ln (Pe)	Ln (A)	Ln (Pe)	Ln (A)	Ln (Pe)	Ln (A)
3,402	13,297	3,406	13,292	3,402	13,320
3,401	13,295	3,403	13,251	3,401	13,360
3,406	13,291	3,402	13,332	3,405	13,368
3,525	13,403	3,522	13,436	3,520	13,502
3,524	13,428	3,520	13,438	3,523	13,506
3,524	13,426	3,523	13,404	3,521	13,502
3,627	13,532	3,627	13,531	3,625	13,595
3,627	13,526	3,625	13,503	3,625	13,603
3,625	13,518	3,625	13,522	3,626	13,601
3,724	13,627	3,722	13,653	3,721	13,685
Pente	1,035	Pente	1,078	Pente	1,080
Ord, l'origine	9,771	Ord, l'origine	9,622	Ord, l'origine	9,686

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

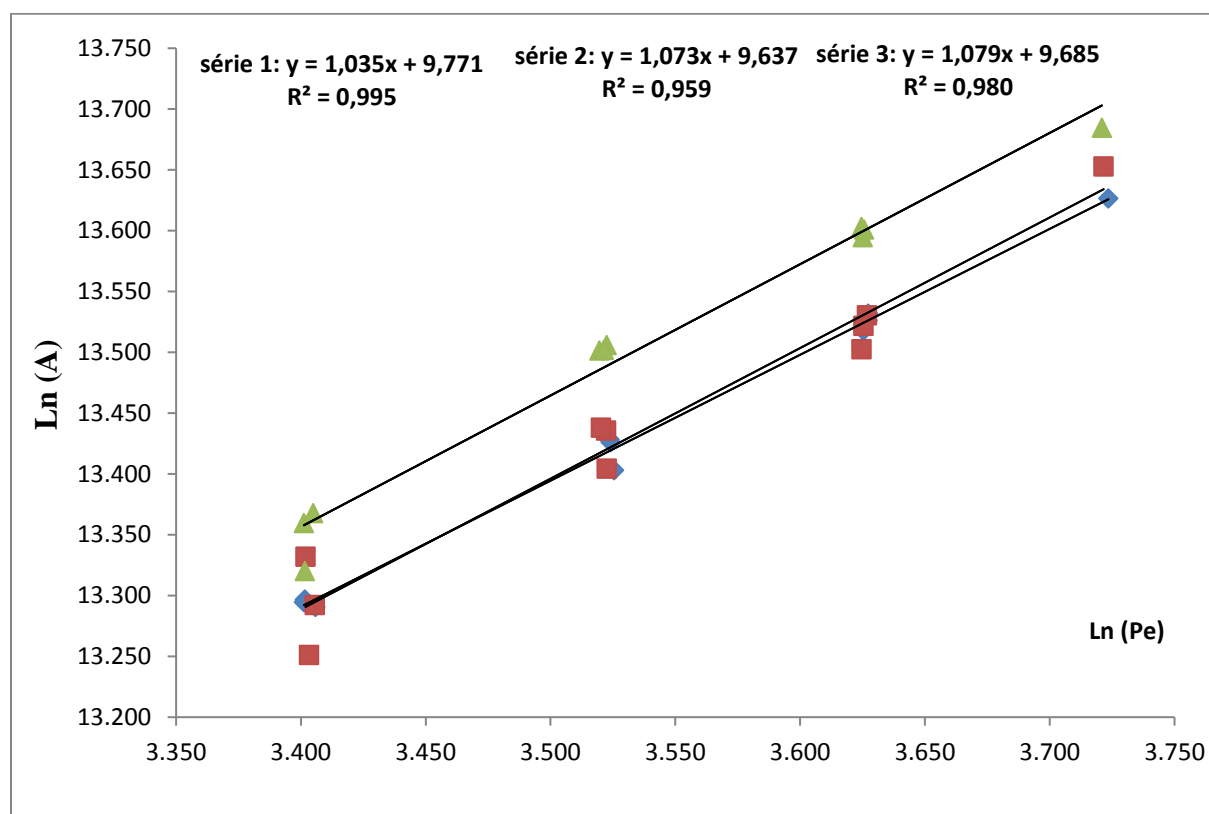


Figure 15: Courbes d'étalonnages $\ln Y = (\ln X)$ obtenues avec les trois séries des SE.

- **Quatrième modèle : Racine carrée $\sqrt{Y} = f(\sqrt{X})$.**

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

Standard d'étalonnage sans la matrice					
Série 1		Série 2		Série 3	
Racine (Pe)	Racine (A)	Racine (Pe)	Racine (A)	Racine (Pe)	Racine (A)
5,478	770,534	5,489	769,458	5,478	767,693
5,477	762,130	5,483	773,361	5,477	767,693
5,828	822,681	5,819	816,726	5,811	850,259
5,823	823,877	5,813	820,991	5,820	857,185
6,133	862,052	6,131	866,665	6,126	900,324
6,132	868,202	6,125	866,665	6,125	901,888
6,441	904,241	6,429	917,598	6,427	946,698
6,426	874,197	6,433	917,598	6,423	946,698
6,711	934,756	6,713	960,223	6,710	984,497
6,708	918,271	6,709	960,223	6,710	984,497
Pente	126,331	Pente	155,339	Pente	172,061
Ord, l'origine	81,482	Ord, l'origine	-82,829	Ord, l'origine	-160,658

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

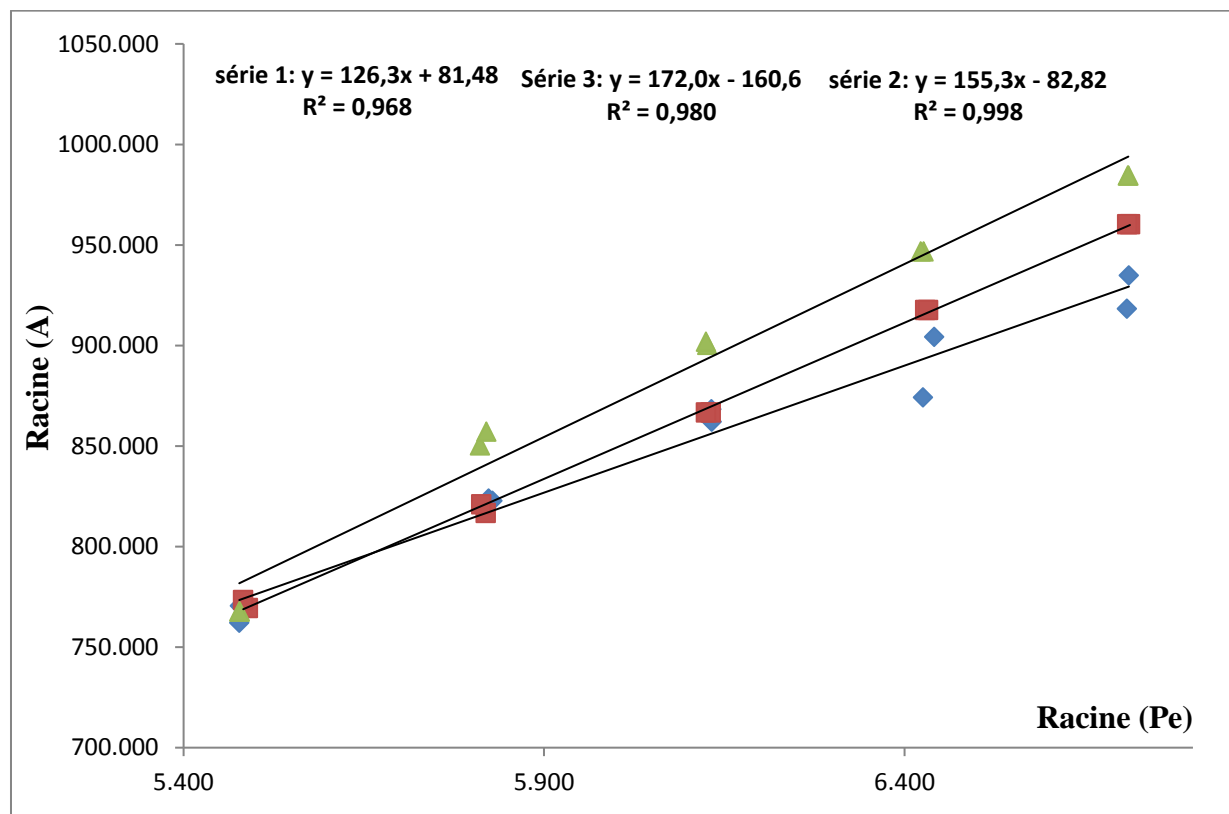


Figure 16 : Courbes d'étalonnages $\sqrt{Y} = (\sqrt{X})$ obtenues avec les trois séries des SE.

2.3. Critères de choix de la fonction de réponse

Pour le choix de la fonction de réponse, qui est capable de produire une proportion suffisante des futurs résultats qui se situeront à l'intérieur de la zone d'acceptabilité $[-5, +5]$, nous pouvons procéder par deux méthodes soit :

- Par le calcul des indices : d'intervalle de dosage, de justesse, de fidélité et d'exactitude. (Annexe V)
- Par comparaison des profils d'exactitude.

Dans le présent travail nous avons généré pour chaque fonction un profil d'exactitude présenté dans les figures 17,18,19,20,21,22,23,24 suivantes :

2.3.1. Paracétamol

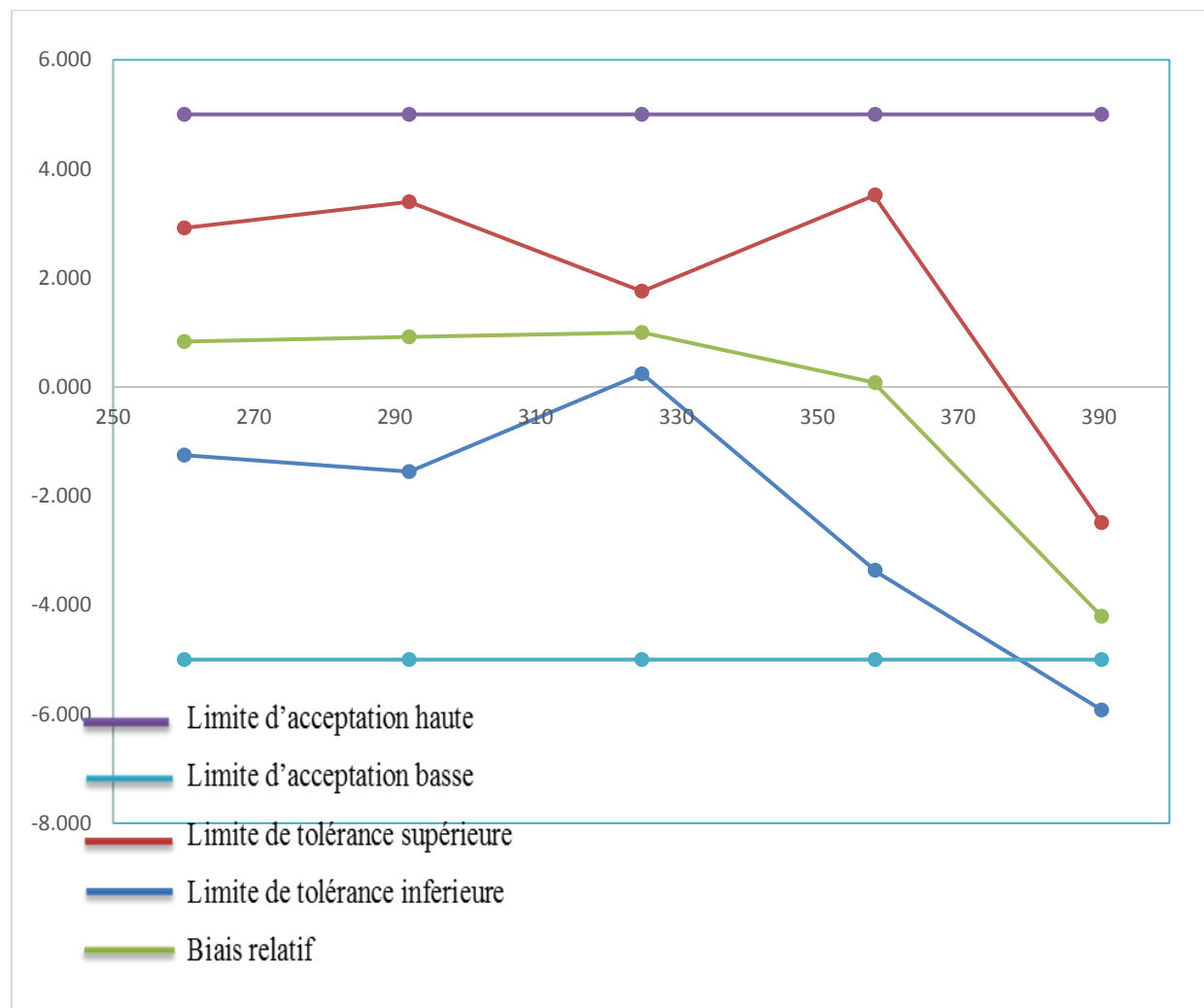


Figure 17: Tracé du profil d'exactitude pour la régression linéaire $y = ax$ passant par 0 du paracétamol.

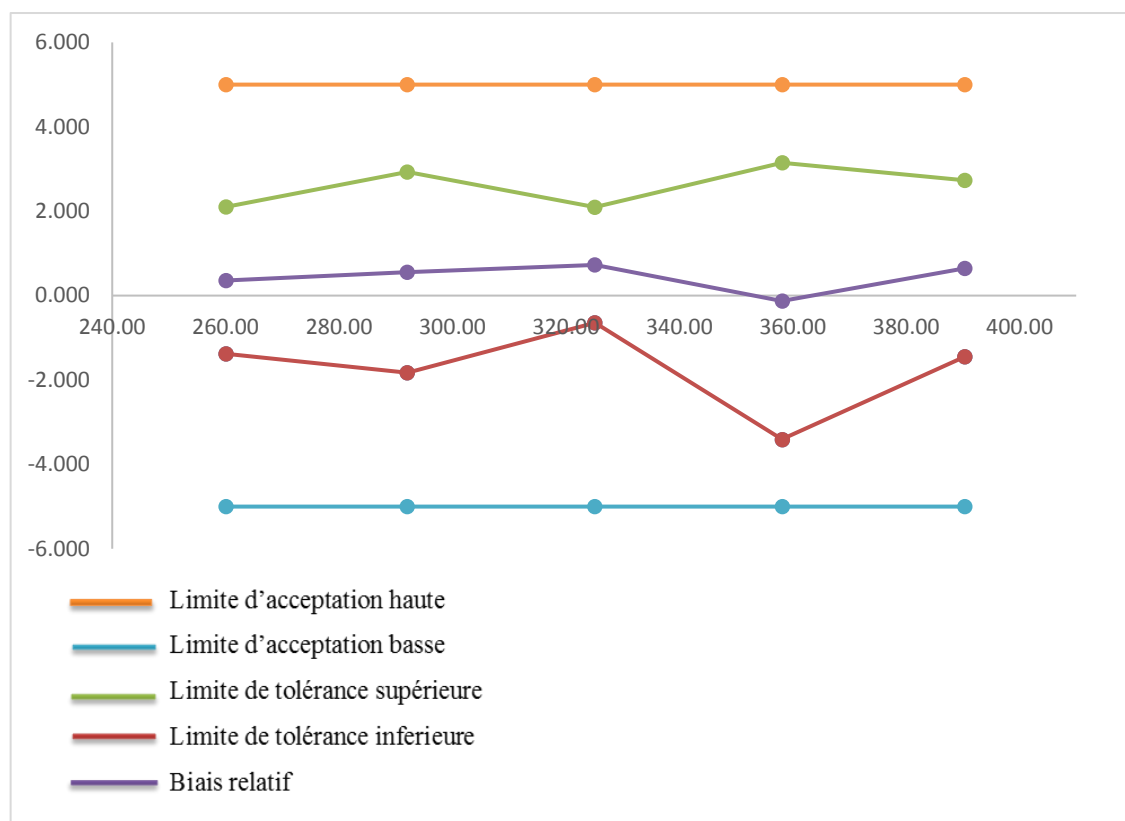


Figure 18 : Tracé du profil d'exactitude pour la régression linéaire $y = ax + b$ du paracétamol.

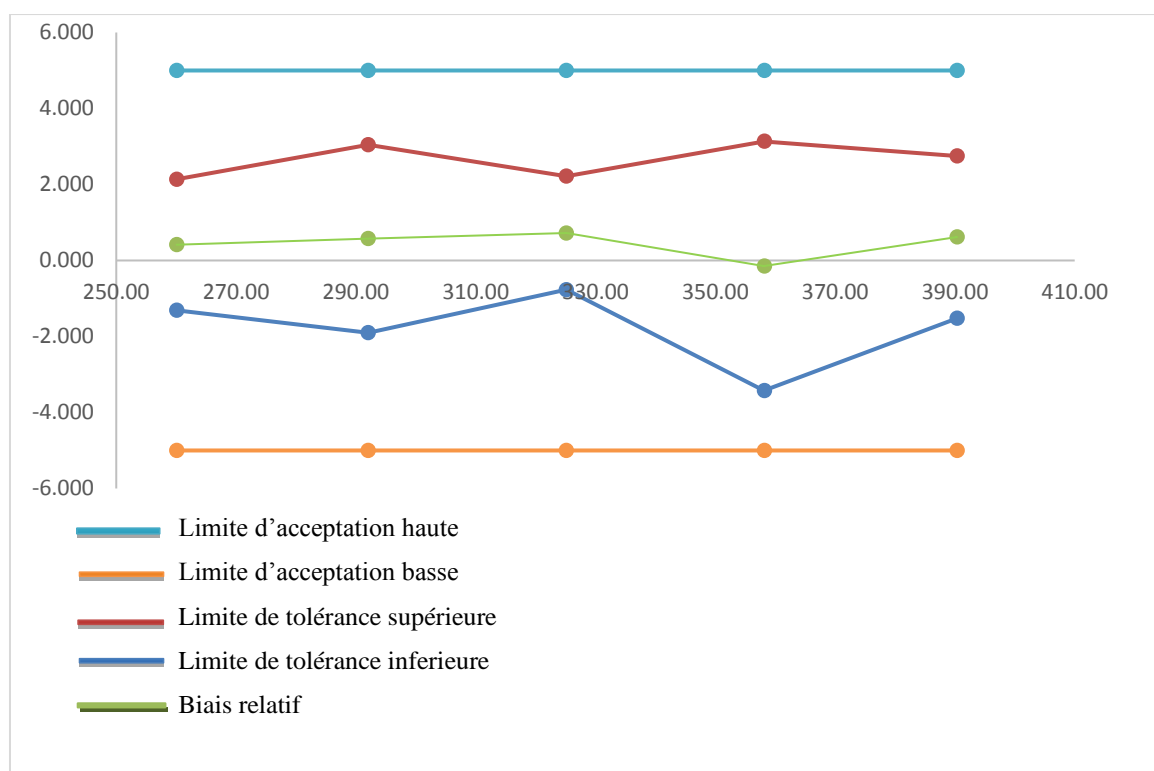


Figure 19: Tracé du profil d'exactitude pour la fonction **racine carrée** $\sqrt{Y} = f(\sqrt{X})$ du paracétamol.

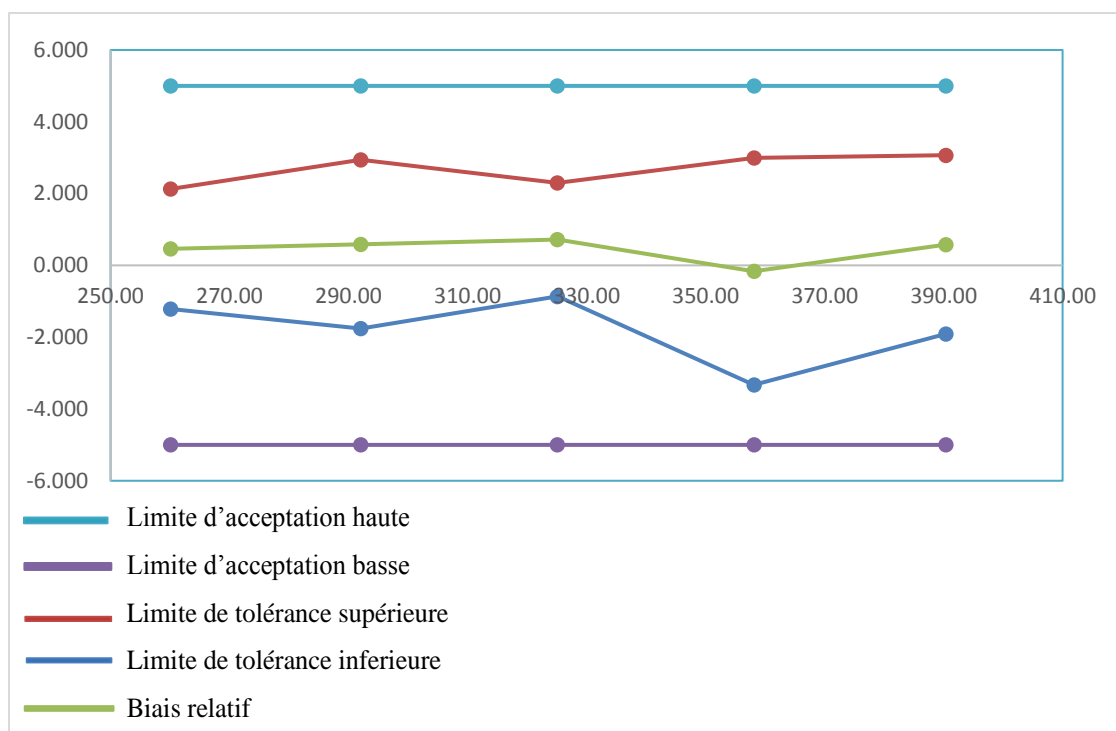


Figure 20: Tracé du profil d'exactitude pour la fonction logarithme népérien $\ln Y = (\ln X)$ du paracétamol.

2.3.2. Tramadol

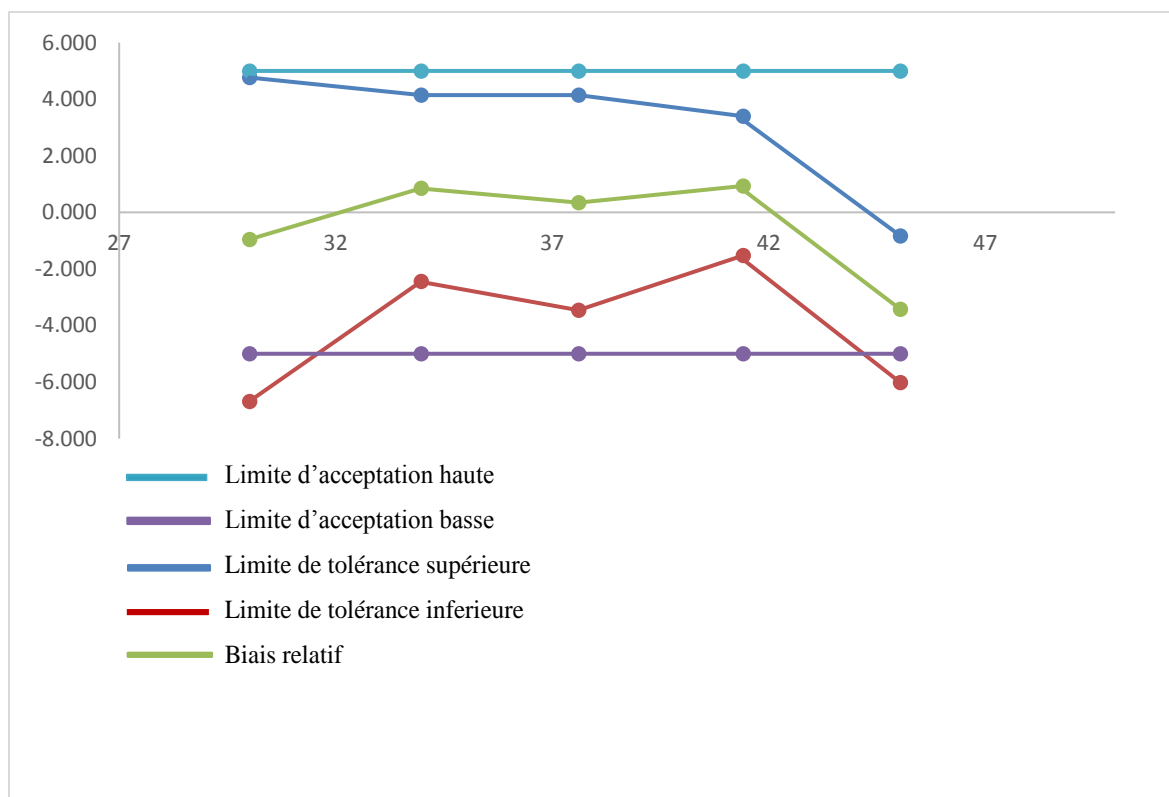


Figure 21 : Tracé du profil d'exactitude pour la régression linéaire $y = ax$ passant par 0 du tramadol.

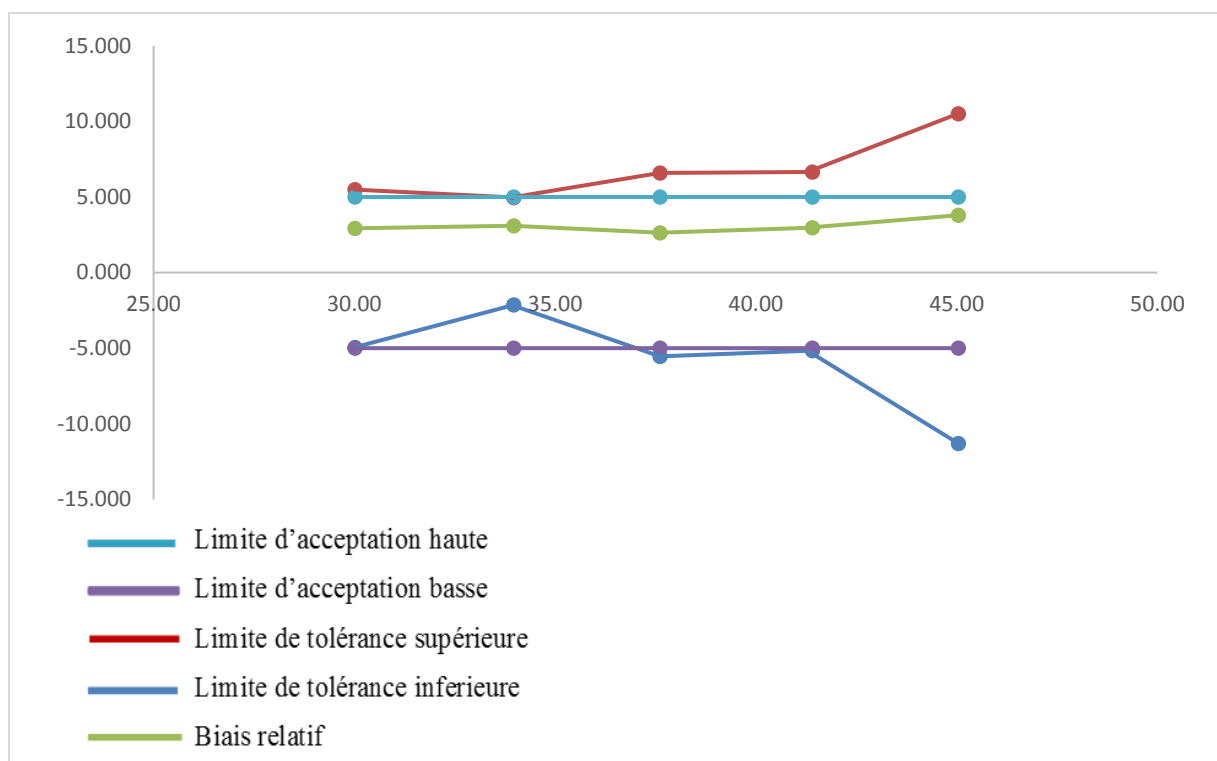


Figure 22: Tracé du profil d'exactitude pour la régression linéaire $y = ax + b$ du tramadol.

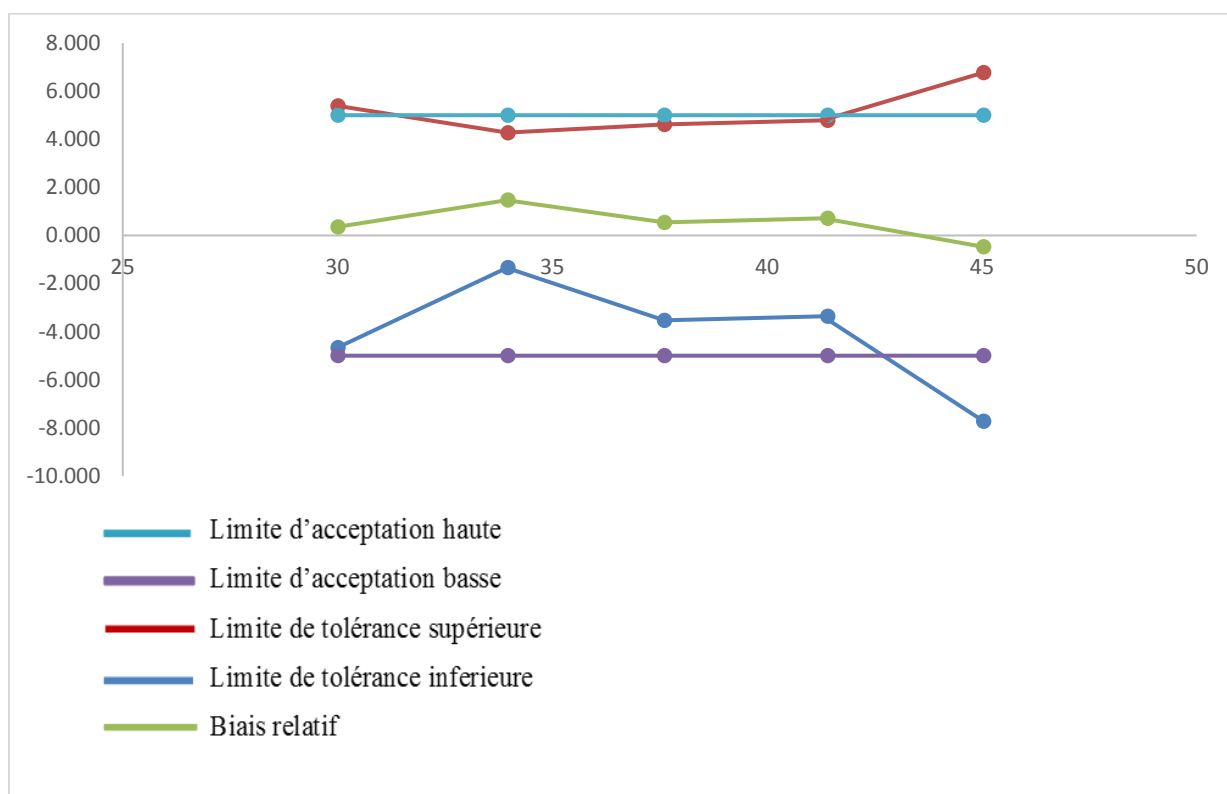


Figure 23 : Tracé du profil d'exactitude pour la fonction **racine carrée** $\sqrt{Y} = f(\sqrt{X})$ du tramadol.

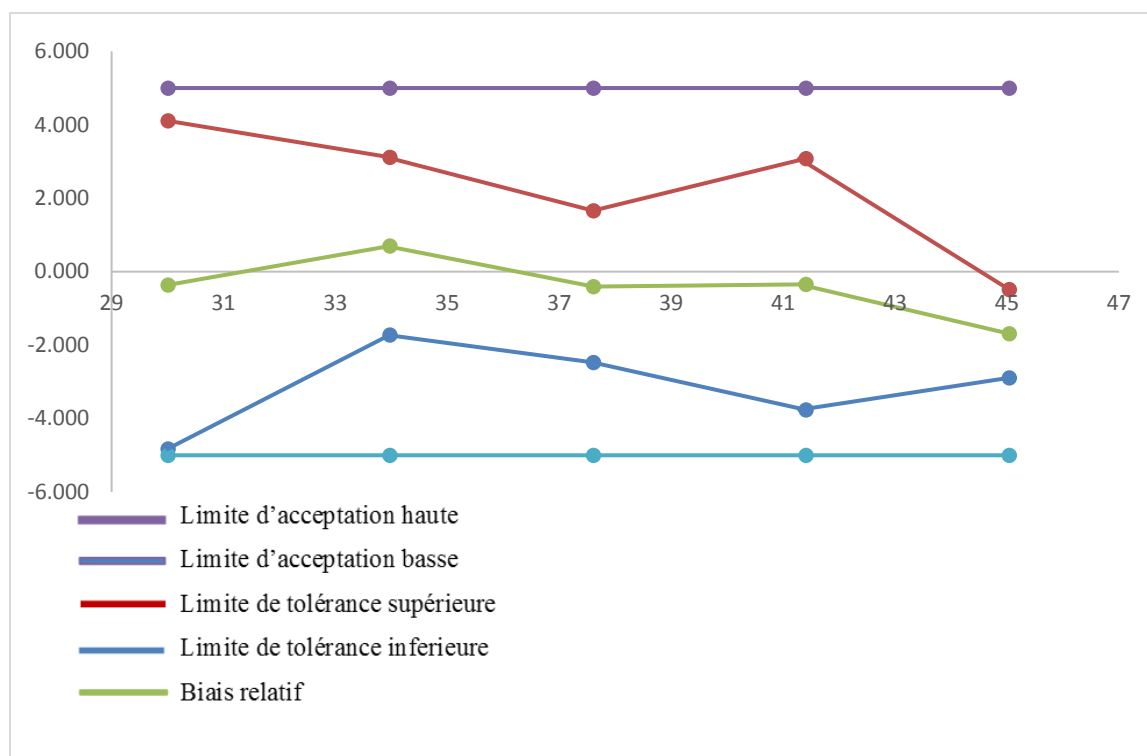


Figure 24 : Tracé du profil d'exactitude pour la fonction **logarithme népérien** $\ln Y = (\ln X)$ du tramadol.

Le choix du profil d'exactitude est basé sur l'objectif de trouver des biais plus proches à zéro, avec un intervalle de tolérance le plus étroit et situé à l'intérieure des limites d'acceptabilité, pour avoir une méthode valide dans l'intervalle de concentration étudiée.

Après avoir examiné soigneusement les profils d'exactitude des différents modèles, nous avons sélectionné :

Pour le paracétamol trois modèles qui répondent à nos objectifs :

- Le modèle linéaire simple.
- Le modèle logarithmique.
- Le modèle racine carrée.

Vu sa simplicité et sa facilité de mise e, œuvre dans l'analyse de routine, le **modèle linéaire simple** est le plus adéquat.

Pour le tramadol le **modèle logarithmique**

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 les tableaux XXIV et XXV suivants :

2.4.1. Paracétamol

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

%	Rep	Série 01			Série 02			Série 03		
		Pe (mg))	Aire du pic	Réponses alignées	Pe (mg))	Aire du pic	Réponses alignées	Pe (mg))	Aire du pic	Réponses alignées
80	1	260,09	6362358	6361800,235	260,00	6411736	6430770,3	260,16	6311376	6309268,572
	2	260,07	6376514	6376434,319	262,21	6389581	6355367,45	260,03	6422761	6423814,714
	3	260,04	6263739	6264376,446	260,16	6373377	6388556,25	260,03	6322996	6324049,714
90	1	292,03	6914763	6916117,572	292,07	7197959	7197878,69	292,12	7218841	7218922,055
	2	292,08	7135934	7136093,361	292,00	7197938	7199544,27	292,25	7214466	7211385,913
	3	292,15	7112050	7110536,067	292,13	7154722	7153196,04	292,00	7131103	7134102,032
100	1	325,08	7959711	7960985,891	325,18	7955303	7954258,93	325,11	7978512	7978430,945
	2	325,17	7990256	7989379,512	325,13	7892968	7893128,63	325,11	8013225	8013143,945
	3	325,15	7932599	7932200,597	325,10	7909212	7910095,45	325,10	7971688	7971850,11
110	1	358,17	8687698	8687458,958	358,10	8728792	8732084,85	358,15	8815741	8814849,396
	2	358,03	8678386	8681493,547	358,35	8807596	8804865,34	358,13	8780874	8780468,725
	3	358,28	8508665	8505796,495	358,26	8742479	8741916,81	358,06	8408364	8409660,879
120	1	390,36	9534264	9533068,79	390,00	9551706	9555159,48	390,25	9665135	9662298,078
	2	390,27	9659708	9660664,168	390,29	9432115	9428581,21	390,02	9552618	9555373,867
	3	390,30	9431342	9431581,042	390,14	9402676	9402756,31	390,13	9522258	9522339,055

2.4.2. Tramadol

Tableaux XXV : Alignement des réponses observées avec les trois séries des SV.

%	Rep	Série 01			Série 02			Série 03		
		Pe (mg))	Aire du pic	Réponses alignées	Pe (mg))	Aire du pic	Réponses alignées	Pe (mg))	Aire du pic	Réponses alignées
80	1	30,01	595382	595382,041	30,12	592591	592591,007	30,01	609419	609419,032
	2	30,00	593986	593986,052	30,26	568819	568818,857	30	633873	633873,043
	3	30,14	591654	591653,907	30,00	616705	616705,136	30,11	639174	639173,924
90	1	33,97	662160	662159,962	33,86	684066	684065,982	33,77	730629	730629,058
	2	33,91	679005	679005,024	33,76	685715	685715,089	33,87	733897	733896,950
	3	33,92	677586	677586,014	33,91	662972	662971,928	33,83	730881	730880,993
100	1	37,61	753108	753107,972	37,55	752128	752128,021	37,53	801906	801906,000
	2	37,6	748916	748915,983	37,58	731384	731383,989	37,51	808657	808657,022
	3	37,54	742537	742537,045	37,58	745630	745629,989	37,55	807085	807084,978
110	1	41,41	827821	827820,910	41,27	849895	849895,011	41,3	877404	877403,982
	2	41,29	825402	825402,035	41,31	841238	841237,968	41,25	886241	886241,036
	3	41,27	801914	801914,055	41,26	835894	835894,021	41,3	879713	879712,982
120	1	45,04	894622	894621,986	45,03	900280	900280,165	45,03	955167	955167,014
	2	45,00	889567	889567,028	45,13	904862	904862,057	45,02	961972	961972,025
	3	45,04	889567	889566,986	45,39	888800	888799,778	45,08	966905	966904,960

2.5. Prédications inverses

Les prises d'essai prédites avec la fonction de réponse choisie sont présentées dans les tableaux XXVI et XXVII ci-dessous :

2.5.1. Paracétamol : $y = ax+b$

Tableau XXVI : Prédications inverses obtenues avec les SV.

%	Rép	Série 1		Série 2		Série 3		Prédications inverses $X_{ijk, calc}$			$\mu_{j, calc} = 1/n \sum \sum x_{ijk, cal}$
		Prises d'essai en mg	Aire du pic	Prises d'essai en mg	Aire du pic	Prises d'essai en mg	Aire du pic	Série1	Série2	Série3	
80	1	260,09	6362358	260,00	6411736	260,16	6311376	262,248	264,297	258,215	261,250
	2	260,07	6376514	262,21	6389581	260,03	6422761	262,861	261,167	262,926	
	3	260,04	6263739	260,16	6373377	260,03	6322996	258,173	262,545	258,823	
90	1	292,03	6914763	292,07	7197959	292,12	7218841	285,438	296,135	295,624	293,705
	2	292,08	7135934	292,00	7197938	292,25	7214466	294,640	296,204	295,314	
	3	292,15	7112050	292,13	7154722	292,00	7131103	293,571	294,280	292,136	
100	1	325,08	7959711	325,18	7955303	325,11	7978512	329,148	327,527	326,858	327,486
	2	325,17	7990256	325,13	7892968	325,11	8013225	330,336	324,990	328,286	
	3	325,15	7932599	325,10	7909212	325,10	7971688	327,944	325,695	326,588	
110	1	358,17	8687698	358,10	8728792	358,15	8815741	359,539	359,810	361,256	357,702
	2	358,03	8678386	358,35	8807596	358,13	8780874	359,290	362,831	359,842	
	3	358,28	8508665	358,26	8742479	358,06	8408364	351,940	360,218	344,592	
120	1	390,36	9534264	390,00	9551706	390,25	9665135	394,914	393,971	396,106	392,704
	2	390,27	9659708	390,29	9432115	390,02	9552618	400,252	388,718	391,709	
	3	390,30	9431342	390,14	9402676	390,13	9522258	390,669	387,646	390,351	

2.5.2. Tramadol : $\ln Y = (\ln X)$

Tableau XXVII : Prédications inverses obtenues avec les SV.

%	Rép	Série 1		Série 2		Série 3		Prédications inverses $X_{ijk, calc}$			$\mu_{j, calc=1/n}$ $\sum \sum x_{ijk, cal}$
		Prises d'essai en mg	Aire du pic	Prises d'essai en mg	Aire du pic	Prises d'essai en mg	Aire du pic	Série1	Série2	Série3	
80	1	30,01	595382	30,12	592591	30,01	609419	30,140	30,063	28,974	29,964
	2	30	593986	30,26	568819	30	633873	30,071	28,939	30,050	
	3	30,14	591654	30	616705	30,11	639174	29,957	31,201	30,282	
90	1	33,97	662160	33,86	684066	33,77	730629	33,399	34,363	34,276	34,103
	2	33,91	679005	33,76	685715	33,87	733897	34,219	34,440	34,418	
	3	33,92	677586	33,91	662972	33,83	730881	34,150	33,375	34,287	
100	1	37,61	753108	37,55	752128	37,53	801906	37,820	37,536	37,362	37,410
	2	37,6	748916	37,58	731384	37,51	808657	37,617	36,571	37,653	
	3	37,54	742537	37,58	745630	37,55	807085	37,307	37,234	37,586	
110	1	41,41	827821	41,27	849895	41,3	877404	41,439	42,060	40,610	41,154
	2	41,29	825402	41,31	841238	41,25	886241	41,322	41,661	40,988	
	3	41,27	801914	41,26	835894	41,3	879713	40,185	41,415	40,708	
120	1	45,04	894622	45,03	900280	45,03	955167	44,664	44,378	43,933	44,323
	2	45	889567	45,13	904862	45,02	961972	44,420	44,588	44,223	
	3	45,04	889567	45,39	888800	45,08	966905	44,420	43,851	44,433	

2.6. Justesse

Comme indiqué dans les tableaux XVIII et XXIX 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.

2.6.1. Paracétamol

Tableau XXVIII : 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	260.31	261,250	0,940	0.361	100,361
2.0	292.092	293,705	0.612	0.552	100,552
3.0	325.12	327,486	2.360	0.726	100,726
4.0	358.17	357,702	-0.468	-0.131	99,869
5.0	390.195	392,704	2.508	0.643	100,643

2.6.2. Tramadol

Tableau XXIX : 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	30,072	29,964	-0,108	-0,359	99,641
2.0	33,866	34,103	0,236	0,698	100,698
3.0	37,561	37,410	-0,151	-0,403	99,597
4.0	45,084	41,154	-0,141	-0,342	99,658
5.0	45.084	44,323	-0,761	-1,688	98,312

2.7. Fidélité

La fidélité de notre méthode est évaluée dans des conditions de répétabilité et de fidélité intermédiaire (tableau 23). Elle est calculée pour chaque niveau de concentration, exprimée en écart type et en terme de coefficient de variation est résumée dans les tableaux XXX et XXXI suivants :

2.7.1. Paracétamol

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

Niveau de concentration (ratio)	MSM	MSE ₁	MSE ₂	Ecart type de répétabilité	Ecart type intersérie	Ecat type de F,I,	CV répétabilité	CV fidélité intermédiaire
1.0	5,448	5,173	5,242	2,274	0,303	2,294	0,874	0,881
2.0	14,980	10,083	11,307	3,175	1,278	3,423	1,087	1,172
3.0	7,209	1,326	2,797	1,152	1,400	1,813	0,354	0,558
4.0	25,934	35,564	33,157	5,964	0,000	5,964	1,665	1,665
5.0	20,021	14,524	15,898	3,811	1,354	4,044	0,977	1,036

2.7.2. Tramadol

Tableau XXXI : Fidélité calculée pour chaque niveau de concentration des standards de Validation

Niveau de concentration (ratio)	MSM	MSE ₁	MSE ₂	Ecart type de répétabilité	Ecart type intersérie	Ecart type de F,I,	CV répétabilité	CV fidélité intermédiaire
1.0	0,086	0,592	0,465	0,682	0,000	0,682	2,268	2,268
2.0	0,127	0,189	0,173	0,416	0,000	0,416	1,229	1,229
3.0	0,199	0,111	0,133	0,333	0,171	0,375	0,888	0,997
4.0	0,734	0,208	0,340	0,456	0,419	0,619	1,104	1,500
5.0	0,076	0,076	0,076	0,275	0,010	0,275	0,610	0,611

2.8. Exactitude

Les tableaux XXXII et XXXIII ci-dessous présentent l'exactitude relative calculée pour chaque niveau de concentration des standards de validation :

2.8.1. Paracétamol

Tableau XXXII : Résultats de calcul de l'exactitude.

%	Répétition	Exactitude relative ijk			Exactitude relative ij
		Série 1	Série 2	Série 3	
80	1	0,830	1,653	-0,748	0,578
	2	1,073	-0,398	1,114	0,596
	3	-0,718	0,917	-0,464	-0,089
90	1	-2,257	1,392	1,200	0,111
	2	0,876	1,440	1,048	1,122
	3	0,486	0,736	0,047	0,423
100	1	1,251	0,722	0,538	0,837
	2	1,589	-0,043	0,977	0,841
	3	0,859	0,183	0,458	0,500
110	1	0,382	0,478	0,867	0,576
	2	0,352	1,250	0,478	0,693
	3	-1,770	0,547	-3,761	-1,661
120	1	1,167	1,018	1,501	1,229
	2	2,558	-0,403	0,433	0,863
	3	0,094	-0,639	0,057	-0,163

2.8.2. Tramadol

Tableau XXXIII : Résultats de calcul de l'exactitude.

%	Répétition	Exactitude relative ijk			Exactitude relative ij
		Série 1	Série 2	Série 3	
80	1	0,432	-0,188	-3,451	-1,069
	2	0,238	-4,367	0,166	-1,321
	3	-0,606	4,003	0,573	1,323
90	1	-1,681	1,485	1,498	0,434
	2	0,912	2,015	1,617	1,515
	3	0,679	-1,577	1,350	0,151
100	1	0,559	-0,037	-0,447	0,025
	2	0,045	-2,684	0,383	-0,752
	3	-0,620	-0,920	0,095	-0,482
110	1	0,069	1,915	-1,672	0,104
	2	0,077	0,850	-0,635	0,097
	3	-2,628	0,375	-1,432	-1,229
120	1	-0,834	-1,449	-2,437	-1,573
	2	-1,288	-1,201	-1,771	-1,420
	3	-1,375	-3,392	-1,436	-2,068

2.9. Erreur totale et profil d'erreur totale

L'erreur totale et l'erreur totale relative calculées pour chaque niveau de concentration sont présentées dans les tableaux XXXIV et XXXV suivants :

2.9.1. Paracétamol

Tableau XXXIV : 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	3,235	1,243	14,760
2.0	5,035	1,724	3,390
3.0	4,173	1,284	6,920
4.0	6,432	1,796	3,870
5.0	4,044	1,679	2,620

Le profil de l'erreur totale relative est illustré dans la figure 17 suivante :

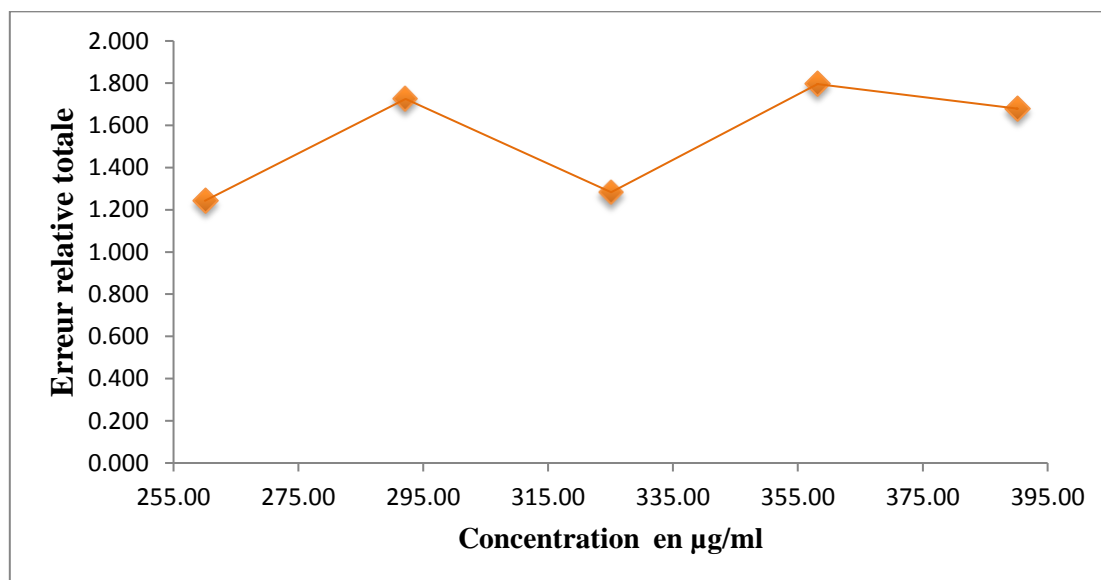


Figure 25 : Profil de l'erreur relative totale du paracétamol

2.9.2. Tramadol

Tableau XXXV : 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	0,790	2,627	7,870
2.0	0,652	1,926	2,150
3.0	0,526	1,400	6,500
4.0	0,761	1,842	3,290
5.0	0,275	2,299	2,690

Le profil de l'erreur totale relative est illustré dans la figure 26 suivante :

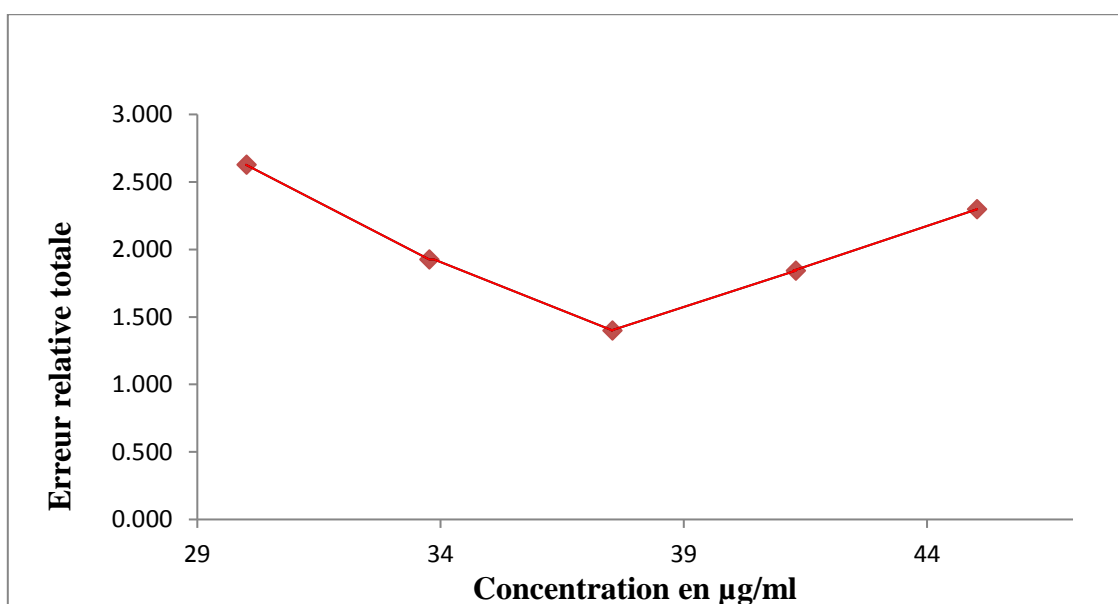


Figure 26 : Profil de l'erreur relative totale du tramadol

2.10. Intervalle de tolérance

Les limites de tolérance sont calculées pour chaque niveau de concentration, les résultats obtenus sont résumés dans les tableaux **XXXVI** et **XXXVII** ci-dessous :

2.10.1. Paracétamol

Tableau XXXVI : 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	0,018	0,983	7,633	1,871	-1,380	2,103
2.0	0,162	0,884	6,863	1,900	-1,828	2,932
3.0	1,479	0,675	3,581	2,206	-0,646	2,098
4.0	0,000	1,000	7,714	1,869	-3,410	3,149
5.0	0,126	0,904	7,060	1,892	-1,447	2,733

2.10.2. Tramadol

Tableau XXXVII : 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	0,000	1,000	7,714	1,87	-4,826	4,108
2.0	0,000	1,000	7,714	1,87	-1,722	3,118
3.0	0,262	0,841	6,337	1,92	-2,468	1,662
4.0	0,844	0,723	4,433	2,07	-3,766	3,082
5.0	0,001	0,999	7,708	1,87	-2,892	-0,485

2.11. Profil d'exactitude

Parmi les différents modèles, nous avons opté pour le model linéaire simple pour le paracétamol et logarithmique pour le tramadol qui sont illustrés par les profils d'exactitude indiqués dans les figures 27 et 28 suivantes :

2.11.1. Paracétamol

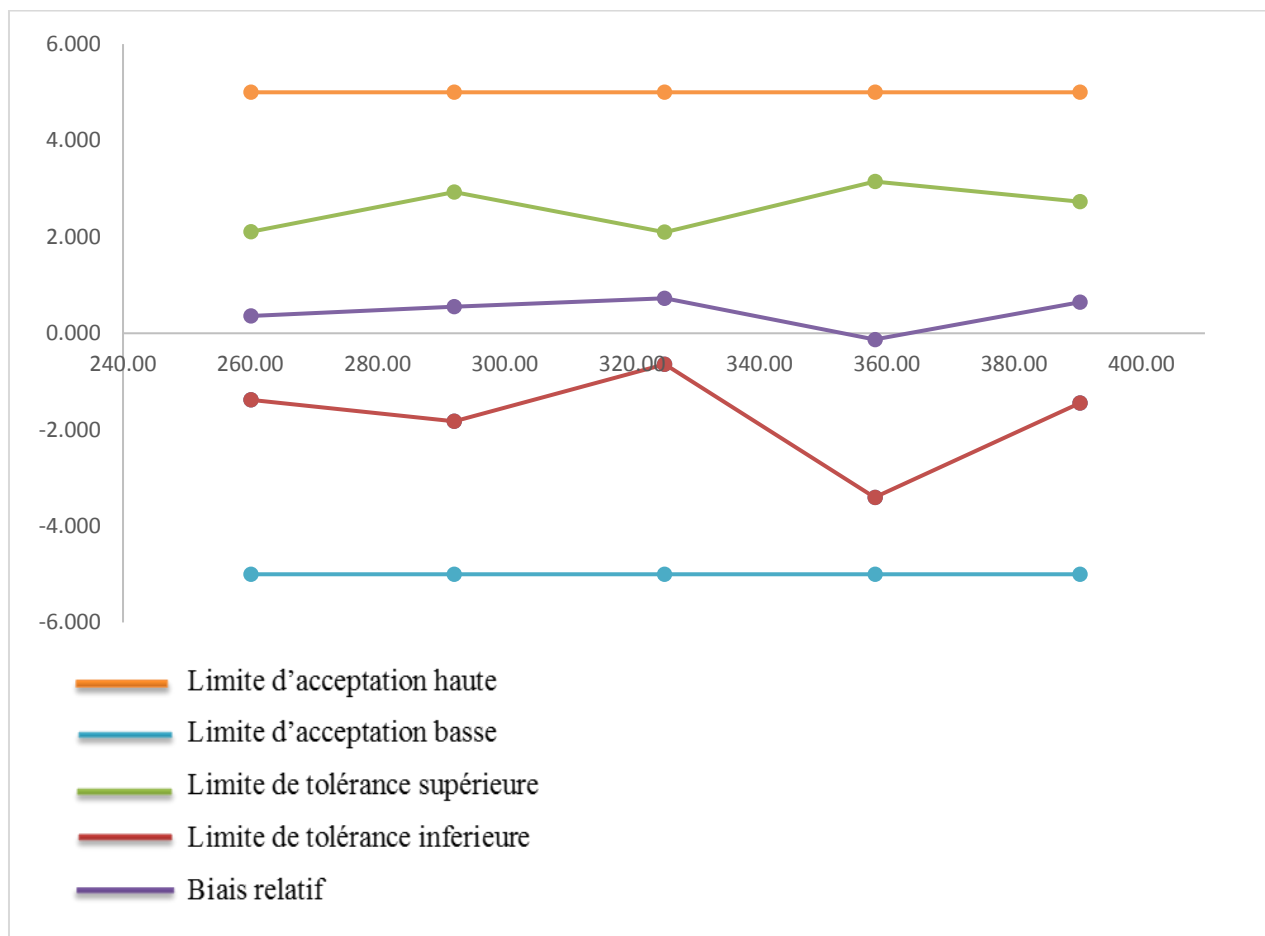


Figure 27 : Tracé du profil d'exactitude pour la régression linéaire $y = ax + b$ du paracétamol.

2.11.2. Tramadol

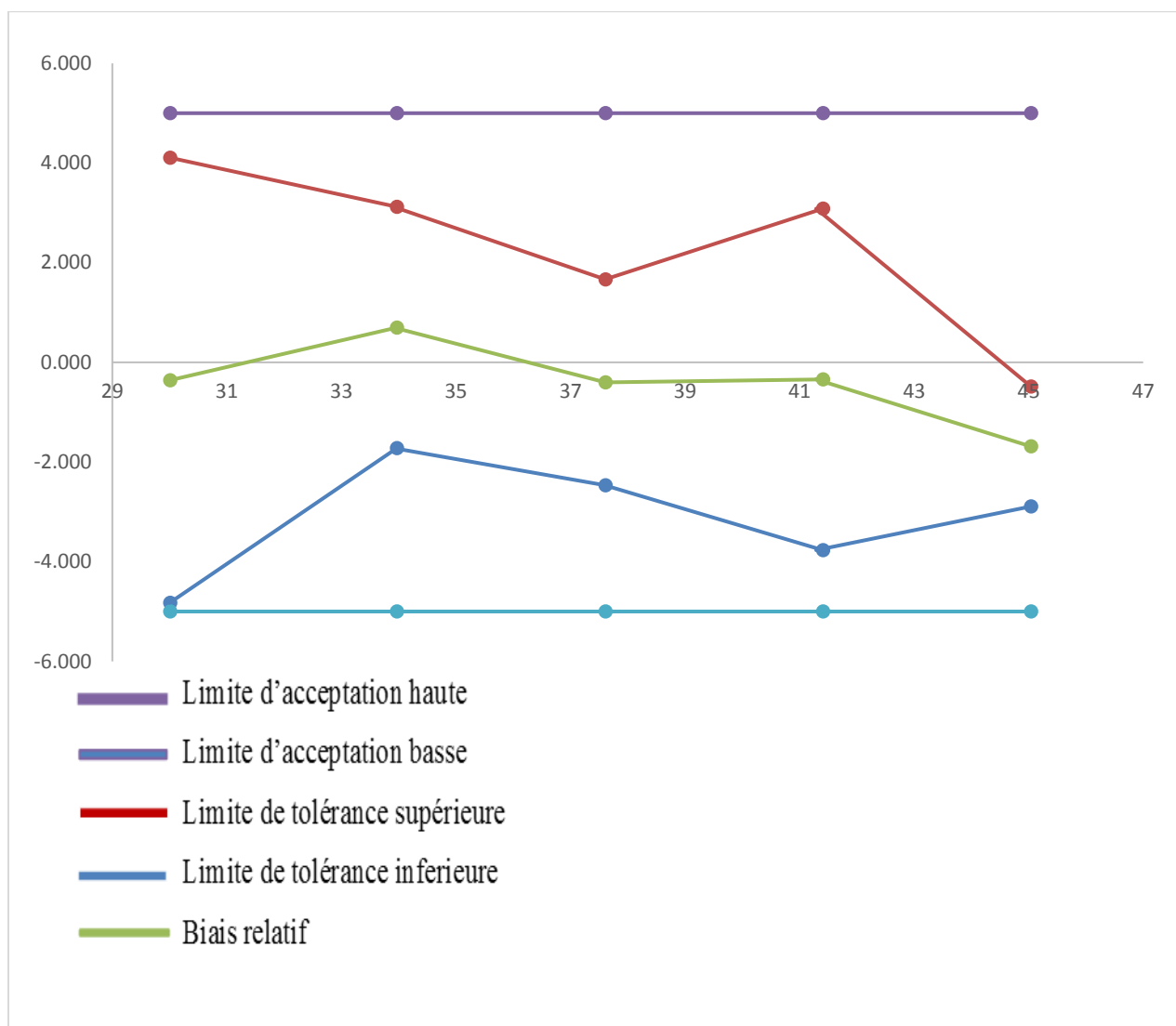


Figure 28 : Tracé du profil d'exactitude pour la fonction **logarithme népérien** $\ln Y = (\ln X)$ du tramadol.

2.12. Linéarité

2.12.1. Paracétamol

Un modèle de régression linéaire (Figure 29) a été ajusté sur les concentrations calculées en fonction des concentrations introduites dans le but d'obtenir l'équation suivante :

$$y = 1.003x + 0.380$$

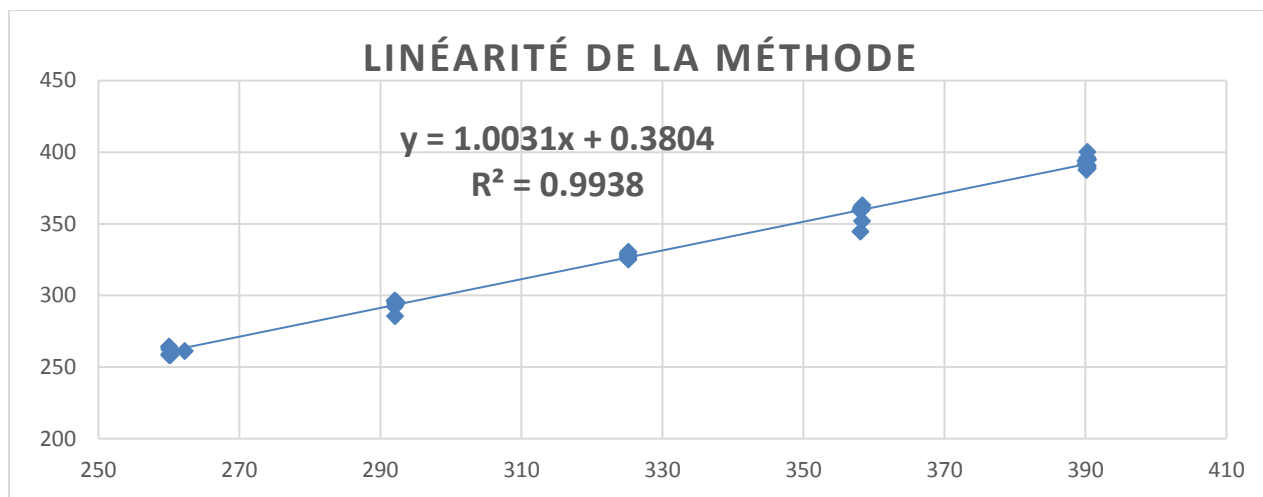


Figure 29 : Profil de linéarité entre les concentrations trouvées et les concentrations introduites du paracétamol.

2.12.2. Tramadol

Un modèle de régression linéaire (Figure 30) a été ajusté sur les concentrations calculées en fonction des concentrations introduites dans le but d'obtenir l'équation suivante:

$$y = 0.954x + 1.525$$

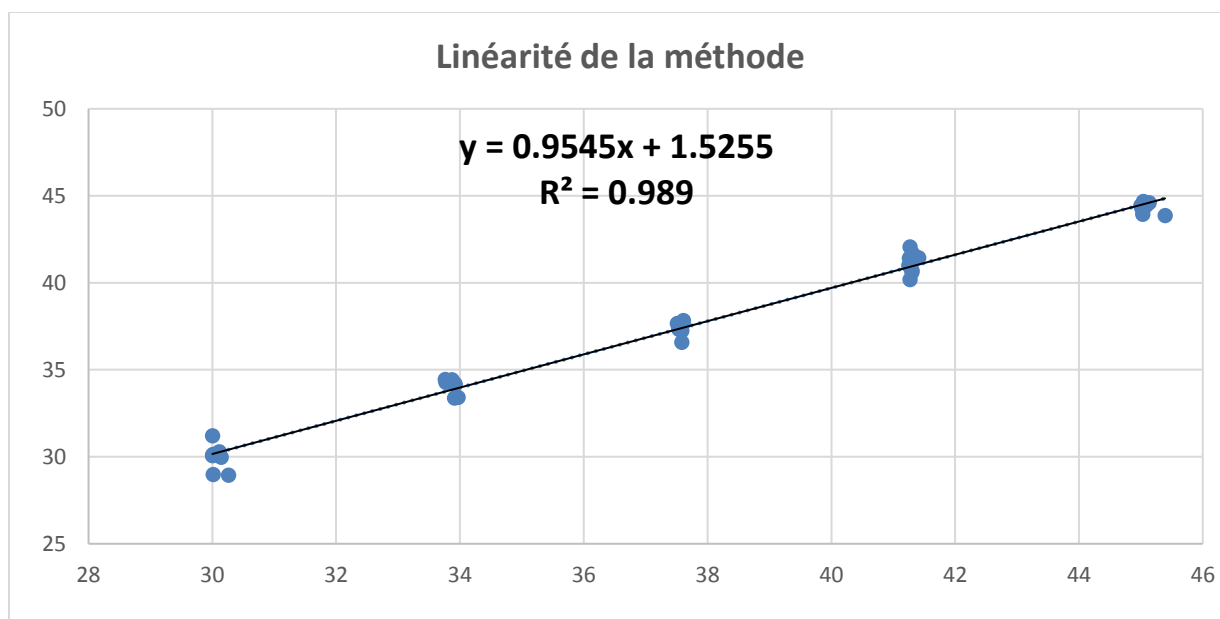


Figure 30 : Profil de linéarité entre les concentrations trouvées et les concentrations introduites du tramadol.

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.

Selon les profils d'exactitude des modèles adéquats représentés précédemment, aucune concentration ne sort de l'intervalle de tolérance, donc nous pouvons considérer la limite de quantification inférieure comme étant la plus petite concentration étudiée, et la limite de quantification supérieure correspond à la plus grande concentration.

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

2.13.1. Paracétamol

Limite inférieure de quantification (LQ_{Inf}) (Unit) = **260 μ g/ml**

Limite supérieure de quantification (LQ_{Sup}) (Unit) = **390 μ g/ml**

2.13.2. Tramadol

Limite inférieure de quantification (LQ_{Inf}) (Unit) = **30 μ g/ml**

Limite supérieure de quantification (LQ_{Sup}) (Unit) = **45 μ g/ml**

3. Discussion

3.1. Spécificité

3.1.1. Paracétamol

Comparaison des deux pentes a_1 et a_2 :

$t_{\text{calculé}} = 1.085$

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

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

3.1.2. Tramadol

$t_{\text{calculé}} = 0.243$

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

$t_{\text{calculé}} < t^\circ (0,05, 26) \implies$ les deux pentes ne sont pas significativement différentes au risque

$\alpha = 0,05$ considéré donc absence d'effet matrice : **la méthode est spécifique**

3.2. Choix de la fonction de réponse

D'après les profils d'exactitudes représentés dans les figures précédentes, le modèle d'étalonnage sélectionné pour :

3.2.1. Le Paracétamol : est soit

Régression linéaire avec une équation $y = ax + b$

Ou

Fonction logarithme népérien $\ln Y = (\ln X)$

Ou

Fonction racine carrée $\sqrt{Y} = f(\sqrt{X})$

En raison de la simplicité du modèle nous avons opté pour la fonction linéaire $y = ax + b$

3.2.2. Le Tramadol :

Nous avons choisi la fonction logarithme népérien $\ln Y = (\ln X)$.

N.B : Il serait plus judicieux de choisir la fonction de régression linéaire $y = ax$ passant par 0 pour la simplicité du model et pour choisir le meme model que le paracétamol , **mais en réduisant l'intervalle de mesure.**

Les données et les courbes d'étalonnage obtenues pour ces modèles de régression ont été respectivement présentées dans le tableau XVII et la figure 10 pour le paracétamol, et le tableau XXII et la figure 15 pour le tramadol.

3.3. Profil d'exactitude

- Les limites de tolérance supérieures et inférieures n'interceptent pas avec les limites d'acceptabilité supérieures et inférieures, donc 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.
- Cela signifie que l'analyste peut garantir que la méthode est capable de produire une proportion de 90% des résultats acceptables et seulement 10% 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 80% et 120%

3.4. Limites de quantification et intervalle de dosage

3.4.1. Paracétamol

La méthode est considérée comme valide dans l'intervalle [260 µg/ml; 390 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 10% des mesures en dehors des limites d'acceptation.

3.4.2. Tramadol

La méthode est considérée comme valide dans l'intervalle [30 g/ml; 45µg /ml] pour lequel le profil d'exactitude est inclus dans les limites d'acceptation choisies : [-5% ; +5%] avec un risque d'avoir au maximum 10% des mesures en dehors des limites d'acceptation.

3.5. Linéarité

3.5.1. Paracétamol

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

- Un coefficient de détermination acceptable $R^2 = 0.993$;
- Une pente significativement différente de zéro donc il existe une relation linéaire. De plus elle est comparable à 1 au risque 5% ($a = 1.003$) ;
- Une ordonnée à l'origine comparable à zéro au risque 5% ($b = 0.380$).

3.5.2. Tramadol

- La linéarité de la droite : concentrations prédites =f (concentrations introduites) est
- Un coefficient de détermination acceptable $R^2 = 0.989$;
- Une pente significativement différente de zéro donc il existe une relation linéaire. De plus elle est comparable à 1 au risque 5% ($a = 0.954$) ;
- Une ordonnée à l'origine comparable à zéro au risque 5% ($b = 1.525$).

La méthode de dosage du paracétamol et du tramadol dans les comprimés à 325 mg de paracétamol et 37.5mg de tramadol par HPLC développée dans le présent travail s'est révélée exacte et valide dans l'intervalle de dosage [260 µg/ml ; 390 µg/ml] pour le paracétamol et [37.5 µg/ml ; 45µg/ml] pour le tramadol au risque 10%.

CONCLUSION GENERALE

Afin d'évaluer la conformité d'un médicament, les industriels procèdent à des opérations de contrôle qualité au cours et au terme de tout le processus de production, tel que la détermination de la teneur en principe actif dans le produit fini.

En industrie pharmaceutique, toute méthode appliquée au contrôle qualité des médicaments doit être validée conformément aux normes internationales, celle-ci fait partie d'une part du système d'assurance qualité qui a pour principal mission de veiller sur la qualité du médicament, d'autre part ; elle aussi est une exigence réglementaire et la phase ultime avant sa mise en routine.

La finalité de notre étude a été de mettre au point et de valider une méthode de dosage simultanée du paracétamol et du tramadol dans des comprimés à dose fixe de 325 mg pour le paracétamol et de 37.5 mg pour le tramadol, et ce par Chromatographie Liquide à Haute Performance en utilisant le profil d'exactitude et l'intervalle de tolérance comme outil de décision de la validation : démarche harmonisée proposée par une commission de la SFSTP publiée en 2006 dans la revue STP Pharma Pratique qui consiste à évaluer l'exactitude d'une manière globale au lieu de mesurer les critères statistiques séparément.

Les résultats obtenus ont répondu à toutes les exigences et performances spécifiques élaborées dans cette approche harmonisée ; ce qui atteste de la validité de la méthode utilisée et son aptitude à être appliquée en routine par les laboratoires de contrôle qualité pour le dosage simultané du paracétamol et du tramadol dans les comprimés dosés respectivement à 325 mg en paracétamol et 37,5 mg en tramadol.



REFFERENCES

BIBLIOGRAPHIQUES

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- [1] Pierre-Yves Tremblay, B. Sc. Toxicologie clinique | Historique de l'acétaminophène | INSPQ - Institut national de santé publique du Québec.
- [2] DRIAD Y. Stabilité du paracétamol: Application à un sachet produit en industrie pharmaceutique [Thèse Pour l'obtention du Diplôme d'Etat de Docteur en Pharmacie]. Nancy : Université Heneri Poincare, Faculté de Pharmacie ; 07 Déc 2009.
- [3] Pharmacopée Européenne 2008. 6^{ème} édition.
- [4] BEAULIEU P, ESCHALIER A. La douleur : Guide pharmacologique et thérapeutique. Page 51.
- [5] BIDAULT M. Prise en charge des intoxications au paracétamol : étude rétrospective sur trois ans dans le service des urgences adultes du CHU de Limoges. [Thèse pour le diplôme d'état de Docteur en Médecine]. Université de Limoges, faculté de médecine ; 17 Oct 2011.
- [6] Matari A, Bentchakal A. Validation analytique d'une méthode de dosage du paracétamol dans les suppositoires par HPLC [Mémoire]. Tizi Ouzou : Université Mouloud Mammeri ; 16 Juin 2015.
- [7] BELLIER R. Toxicité hépatique du paracétamol à dose thérapeutique : revue de littérature et proposition d'un protocole d'évaluation en période poste opératoire [Thèse pour le diplôme d'état de Docteur en médecine]. Université de Limoges, Faculté de Médecine ; 2011.
- [8] Jouet L. Toxicité du paracétamol : résultats d'une étude multicentrique relative aux intoxications volontaires au paracétamol dans les SAU adultes français. Enjeux de la libéralisation du paracétamol [Thèse pour le Diplôme d'État de Docteur en Pharmacie]. Université Angers, département de Pharmacie ; 2014.
- [9] Vuillet A, Ciles H, Buxeraud J, Nouaille Y. Les antalgiques en pratique courante les antalgiques de palier I. Dossier : La douleur et ses médicaments à l'officine. Actualités pharmaceutiques 38 • n° 527 • juin 2013 •
- [10] Buxeraud J. Le paracétamol : ami ou ennemi ? Actualités pharmaceutiques. n° 546 • mai 2015. Disponible sur le site www.bmj.com/company/wp-content/uploads/2015/03/paracet-risks;
- [11] Dictionnaire Vidal 2012.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- [12] Cassier V. Etude rétrospective des intoxications aiguës au tramadol (2007-2013) à partir des données du centre antipoison et de toxicovigilance de Bordeaux ; impact du retrait du dextropropoxyphène [Thèse pour l'obtention du Diplôme d'état de Docteur en Pharmacie]. Université de Bordeaux UFR des Sciences Pharmaceutiques, 7 Mai 2014.
- [13] Khaber AM. Développement pharmaceutique de formes à libération prolongée de tramadol à base de matrice hydrophile : Hydroxy Propyl Methyl Cellulose et Gomme Guar [Mémoire présenté pour l'obtention du diplôme de Magister option Génie des procédés Pharmaceutiques]. Setif : Université Ferhat Abbas, Faculté de Technologie, département de Génie des procédés ; 26 juil 2011.
- [14] Tramadol Update Review Report Agenda item 6.1 Expert Committee on Drug Dependence Thirty-sixth Meeting Geneva, 16-20 June 2014
- [15] HYDROCHLORURE de TRAMADOL ET ACETAMINOPHEN - hydrochlorure de tramadol et comprimé d'acétaminophène. Preferred Pharmaceuticals, Inc. Niger. Disponible sur le site : <http://niger-gouv.org/medicaments/68788-985-tramadol-hydrochloride-and-acetaminophen>
- [16] Gentili M E, Estèbe J P. UTILISATION CLINIQUE DU TRAMADOL. Anesthésie-Réanimation, C.M.C. Saint-Vincent, Volney, 35000 Rennes, D.A.R. 2, C.H.R.U. Pontchaillou, 35000 Rennes, France.
- [17] Elsevier Masson SAS. Les antalgiques en pratique courante, les antalgiques de palier II : Dossier : La douleur et ses médicaments à l'officine. Actualités pharmaceutiques 38 • n° 527 juin 2013. <http://dx.doi.org/10.1016/j.actpha.2013.03.018>
- [18] PICARD H. Intoxication aiguë par chlorhydrate de tramadol à propos de quatre cas [Thèse pour obtenir le grade de Docteur en Médecine]. Nancy : Université Henri Poincaré Nancy 1, Faculté de Médecine , 24 Juin 2013.
- [19] Daniel V. Intoxications médicamenteuses : nouveautés en toxicologie Conférences d'actualisation SFAR 1998. Unité de toxicologie clinique, centre hospitalier universitaire, BP 217, 38043 Grenoble cedex 9
- [20] Marine Le Liepvre. Les associations d'analgésiques offrent des avantages sur les plans de l'efficacité et de l'innocuité dans le traitement des douleurs modérées. Agence Aromates <http://www.gazettelabo.fr/archives/breves/2005/1105/zaldiar.htm>

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- [21] André Frogerais. Histoire des comprimés pharmaceutiques en France, des origines au début du XX^{ème} siècle 51 p. Bibliogr. pp. 41-45. 2013. <hal-00787009v2><https://hal.archives-ouvertes.fr/hal-00787009v2>
- [22] Myriam VO. Les comprimés, une forme d'avenir? [Thèse pour obtenir le Diplôme de Docteur en Pharmacie]. Université de Lorraine, Faculté de Pharmacie ; 25 Sept 2015
- [23] Késsia Yekpe. Relier les attributs de matériaux et les paramètres de procédés de fabrication à un test de contrôle qualité, une application du concept du quality by design [Thèse]. Université de Montpellier 1 ; Université de Sherbrooke ; 22 Juil 2014
- [24] A. Le Hir, J.-C. Chaumeil, D. Brossard. Abrégé de Pharmacie galénique. Bonnes pratiques de fabrication des médicaments. Préface de Pr. M.-M. Janot 9^e édition
- [25] VIAL J. Journée de Formation Scientifique en Spectrométrie Atomique. Définition de la validation de méthodes et outils associés. Laboratoire Environnement et Chimie Analytique de l'ESPCI. Paris. 14 Nov 2006.
- [26] 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
- [27] 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.
- [28] FEINBERG M. Validation des méthodes d'analyse quantitatives au moyen du profil d'exactitude. Dossier : TECHNIQUES DE L'INGENIEUR, l'expertise technique et scientifique de référence
- [29] Mimoun N, Sahraoui N. Validation analytique d'une méthode de dosage du Diclofénac de sodium dans les suppositoires de 100 mg par HPLC [Thèse]. Tizi Ouzou, Université Mouloud Mammeri ; 2016.
- [30] Skoog ; West ; Holler. Chimie analytique. Traduction et révision scientifique de la 7^{ème} édition Américaine par Claudine ; Herman ; Daucot ; Josette ; Weymееers et Dumont ; Freddy. Chromatographie Liquide à Haute Performance.
- [31] Anonyme. Les antalgiques – pharmacologie.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- [32] Résumé des Caractéristiques du Produit (RCP). Base de données publique des médicaments
- [33] Anonyme. HPLC principe et appareillage. Biochimie et biomoléculaire. 20 Jan 2010.
- [34] Anonyme. La chromatographie en phase liquide LC/HPLC. Laboratoire de Chimie Analytique Pharmaceutique de Genève.
- [35] Rouessac F, Rouessac A. ANALYSE CHIMIQUE : Méthodes et techniques instrumentales modernes. 6^{ème} édition.
- [36] Ayoub. Chromatographie Liquide Haute Performance (HPLC). ANALYTICAL TOXICOLOGIE. 28 Oct 2016. Disponible sur le site : <https://www.analyticaltoxicology.com/chromatographie-liquide-haute-performance-hplc>
- [37] Mamou M. Cours Chromatographie Liquide à Haute Performance « HPLC ». Laboratoire de Chimie Analytique département de Pharmacie de Tizi Ouzou.
- [38] Mamou M. Cours Etude théorique de la chromatographie. Laboratoire de Chimie Analytique département de Pharmacie de Tizi Ouzou.



ANNEXES



ANNEXE I

CHROMATOGRAPHIE LIQUIDE HAUTE

PERFORMANCE

HPLC

Introduction :

La chromatographie est une technique analytique séparative, permettant l'identification ou le dosage des constituants d'un mélange et/ou préparative permettant la récupération des composés.

Elle consiste à faire migrer les constituants à séparer sur une phase stationnaire immobile à l'aide d'une phase mobile liquide ou gazeuse de nature différente. Chaque molécule sera plus ou moins rapidement entraînée selon son affinité pour la phase stationnaire et la phase mobile, permettant la séparation des différents constituants présents dans le mélange. A partir de ce principe très général, il existe de très nombreux types de chromatographie en fonction de la nature de la phase stationnaire et de la phase mobile, ainsi que la nature des interactions entre ces phases et les molécules à purifier ou à séparer.

Parmi les techniques chromatographiques les plus employées actuellement dans les laboratoires d'analyse chimiques L'HPLC (Hight-Performance Liquid Chromatography ou Chromatographie Liquide à Haute Performance anciennement appelée Hight-Pressure Liquid Chromatography pour Chromatographie Liquide à Haute Pression). Cette technique est devenue un outil analytique indispensable, elle permet l'identification, la séparation et le dosage des composés chimiques dans un mélange. Son succès est dû à la meilleure exploitation des mécanismes d'interaction, aux grandes efficacités des phases stationnaires de plus en plus fines (3 μ) et aux progrès importants effectués dans le domaine de l'appareillage.

1. Principe de l'HPLC

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

La phase mobile poussée par une pompe sous haute pression, parcourt le système chromatographique. Le mélange à analyser est injecté puis transporté au travers du système chromatographique. Chaque soluté est soumis à une force de rétention exercée par la phase stationnaire et une force de mobilité exercée par la phase mobile. Les composés en solution se répartissent alors suivant leur affinité entre ces deux phases. En sortie de colonne grâce à un détecteur approprié les différents solutés sont caractérisés par un pic. L'ensemble des pics enregistrés est appelé chromatogramme. [6, 33]

2. Appareillage

Une installation HPLC comporte divers modules spécialisés, qui se présentent dans des boîtiers distincts ou intégrés dans un même châssis pour des raisons de moindre encombrement, Ces modules sont reliés entre eux par l'intermédiaire de canalisations de très faible diamètre interne (0,1 mm) pour assurer la circulation de la phase mobile. [36]

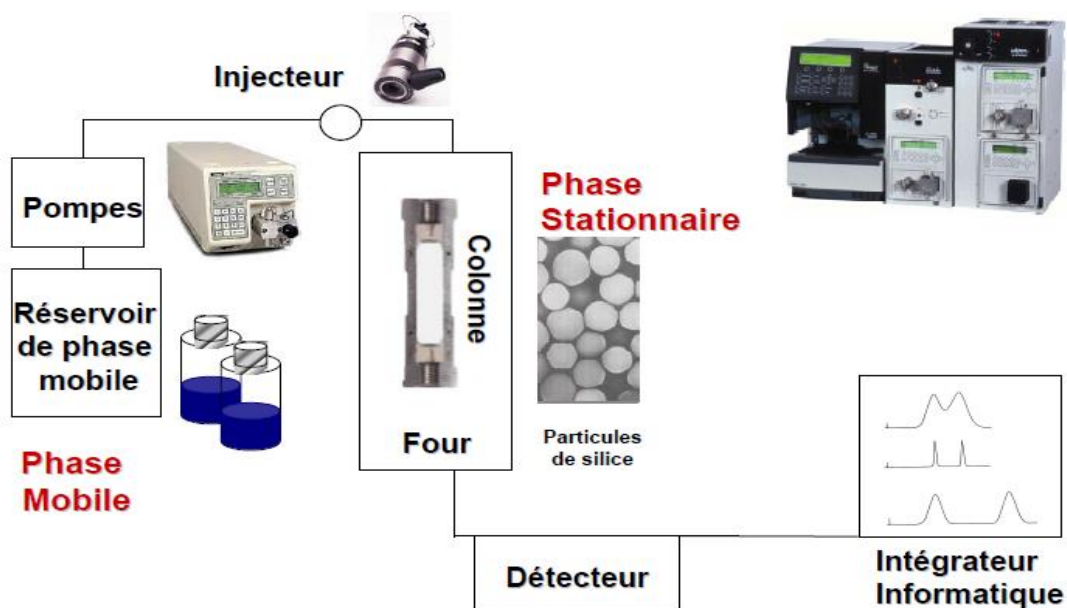


Figure 31 : Installation HPLC. [34]

2.1. Les réservoirs de phases mobiles (éluant) : le plus souvent ce réservoir est une bouteille en verre ou en acier inoxydable étanche dans lequel plonge un tube avec une extrémité filtrante en téflon permettant d'éliminer les poussières et les gaz dissous.

Tous les solvants utilisés comme phase mobile doivent être de qualité HPLC (HPLC grade) cette qualité permet de garantir le degré de pureté ainsi que leur filtration préalable sur des filtres de 0.2 μ .

La filtration préalable du solvant permet d'éviter de nombreux problèmes de fonctionnement de la pompe et de prolonger sa durée de vie, ainsi que le colmatage des filtres et des colonnes.

La contamination du solvant par des gaz (bulles de gaz) perturbe la régularité de la chromatographie et des systèmes de détection. Il est indispensable de dégazer les phases mobiles à l'aide des ultrasons avant leur utilisation. [30, 34, 37]

2.2. Les systèmes de pompage : Toute installation d'HPLC comporte au moins une pompe, pour forcer le passage de la phase mobile à travers la colonne dont le remplissage est très compact. Elle délivre en continu la phase mobile et provoque un écoulement compatible avec

la séparation chromatographique. Elle est définie par la pression qu'elle permet d'atteindre dans la colonne, son débit, et la stabilité du flux. [33]

2.3. Les injecteurs

L'injection d'un volume précis de l'échantillon en tête de colonne doit se faire en un temps bref afin de perturber le moins possible le régime de circulation de la phase mobile qui doit être stable de la colonne au détecteur.

Il existe deux procédés d'injection :

2.3.1. Procédés par injection directe : l'introduction de l'échantillon se fait directement à l'aide d'une microseringue, les quantités sont peu importantes et la pression sont inférieures à 150 bars [37]

2.3.2. Procédés d'injection par boucle : l'échantillon est introduit à la pression ordinaire dans une boucle (petit volume clos) ; qui peut être mis en communication par un système de vannes avec le réservoir de la phase mobile et avec la colonne.

Le type d'injecteur le plus couramment utilisé comporte une vanne à boucle d'échantillonnage d'une capacité fixe (10, 20, 50 μL ...). Elle possède 2 positions : la première permet le remplissage de la boucle d'injection de volume fixe (load), la seconde permet la mise en circulation de l'échantillon dans le système chromatographique (inject). Cette boucle permet d'introduire l'échantillon sans modifier la pression dans la colonne. [33, 35, 37]

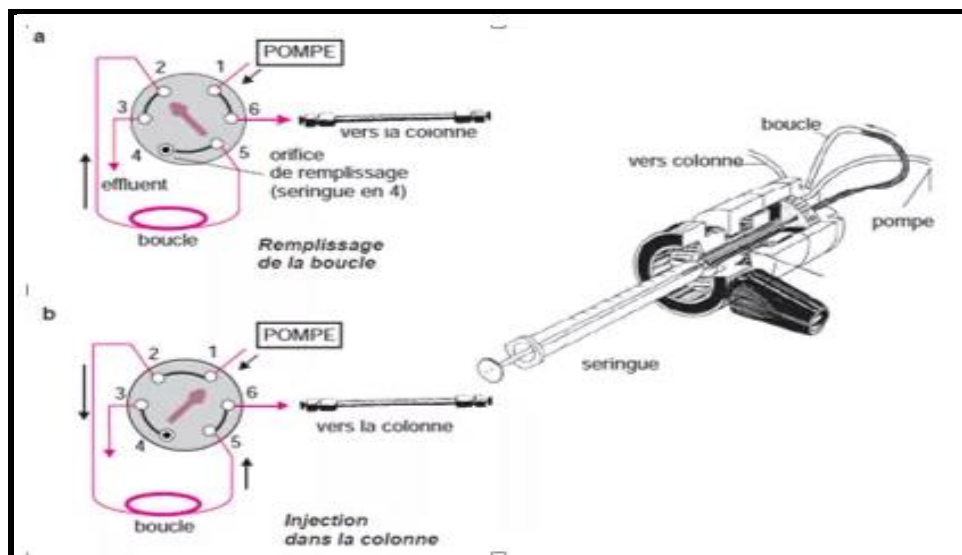


Figure 32: Schéma explicatif du fonctionnement d'une valve d'injection pour HPLC. [36]

2.4. Les colonnes

La colonne est l'élément majeur de la chaîne HPLC, elle se présente en un tube habituellement en acier inoxydable, de 5 à 30 cm de long et de 3 à 4,6 mm de diamètre interne. Le remplissage (en silice, silice greffée ou particules polymériques) à une granulométrie de 3, 5 ou 10 μm .

Le choix, la construction et le remplissage de la colonne est d'une grande importance, car la qualité de la séparation est toujours en fonction de celle de la colonne qui constitue le cœur du système chromatographique

La colonne analytique est souvent précédée d'une pré-colonne, dite colonne de garde, courte (0,4 à 1 cm), remplie de la même phase stationnaire, ce qui sert à retenir certaines impuretés pour permettre d'augmenter la durée de vie de la colonne principale en préservant ses performances. [33, 37]

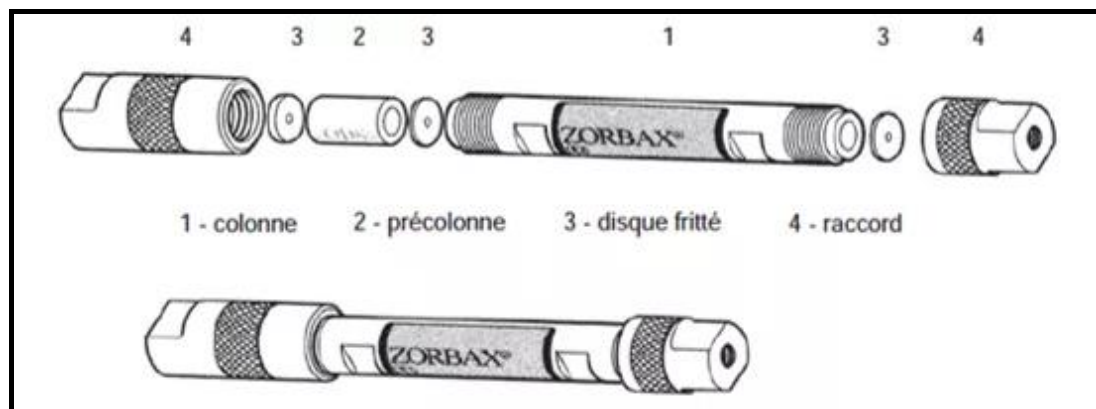


Figure 33 : Aspects extérieurs éclaté et assemblé d'une colonne et pré-colonne pour HPLC

2.5. Les détecteurs

Le détecteur est relié à la sortie de la colonne, il permet de suivre en continu la séparation et de mesurer la concentration des solutés, le signal obtenu est enregistré en fonction du temps.

Le détecteur doit réunir un certain nombre critères pour permettre une analyse quantitative précise :

- ✓ donner pour chaque composé détecté une réponse proportionnelle à sa concentration instantanée, stable dans le temps, rapide et reproductible ;
- ✓ Garantir une bonne sensibilité de détection ;
- ✓ Ne pas altérer la qualité de la séparation.

Il existe différents types de détecteurs :

- **Détecteur universel** : exploitent une modification par les solutés d'une propriété de la phase mobile (indice de réfraction, constante diélectrique et ils sont utilisés pour l'analyse de mélanges inconnus (réfractomètre, conductimètre)
- **Détecteurs spécifiques** : utilisent les propriétés physicochimiques particulières des solutés (absorption, fluorescence, électrochimie), ils ont l'avantage de doser des traces de produits « visibles » parmi d'autres produits non détectés.

Exemple de détecteur :

- **Détecteur par spectrophotométrie UV-visible** : c'est le détecteur le plus utilisé en HPLC, il mesure l'absorption de la lumière par le produit à la sortie de la colonne, il fonctionne à une longueur d'onde constante fixée par l'opérateur.

Pour que ce détecteur soit utilisable il faut que :

- Le produit à détecter absorbe la lumière à une longueur d'onde accessible à l'appareil, et que son coefficient d'absorption soit suffisamment grand.
 - La phase mobile n'absorbe pas la lumière à la longueur d'onde choisie par l'opérateur.
- **Détecteurs fluorométriques** : mesure l'énergie de fluorescence d'un soluté excité par une radiation ultraviolette, l'intensité de fluorescence mesurée est directement proportionnelle à la concentration de l'analyte en solution, ce mode de détection est plus sélectif et plus sensible que l'absorption UV-Visible.

Il existe d'autres types de détecteurs : détecteurs électrochimiques, réfractomètre. [34.37]

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.

La détection d'un pic chromatographique par l'intégrateur, dépend de 2 paramètres :

- La largeur attendue des pics : 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 (sensibilité) : Le seuil d'intégration est la valeur du signal à partir de laquelle le calculateur repère un début de pic.

2.7. Phase stationnaire

La phase stationnaire est constituée de microparticules sphériques ou d'un solide poreux dont la surface au contact de la phase mobile atteint plusieurs centaines de m^2 par gramme, favorisant ainsi les mécanismes de partition avec les différents solutés présents.

De nombreux types de phases stationnaires sont utilisés citons : la silice (plus utilisé), l'alumine, des résines ou polymères à groupements acides ou basiques et des supports chimiquement modifiés, préparés à partir de polymères, de silice ou de graphite poreux.

2.8. Phase mobile

Le choix et la préparation de la phase mobile est d'une grande importance vu qu'elle est le solvant et le vecteur de l'échantillon à analyser dont elle devrait être choisie et préparée en ayant une bonne compatibilité avec l'échantillon et le système.

Suivant un principe général, à une phase stationnaire polaire on oppose une phase mobile peu ou pas polaire et vice-versa. La chromatographie est dite en phase normale dans le premier cas et à polarité de phase inversée dans le second.

3. Application de la Chromatographie Liquide Haute Performance à l'analyse

3.1. Informations apportées par un chromatogramme.

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

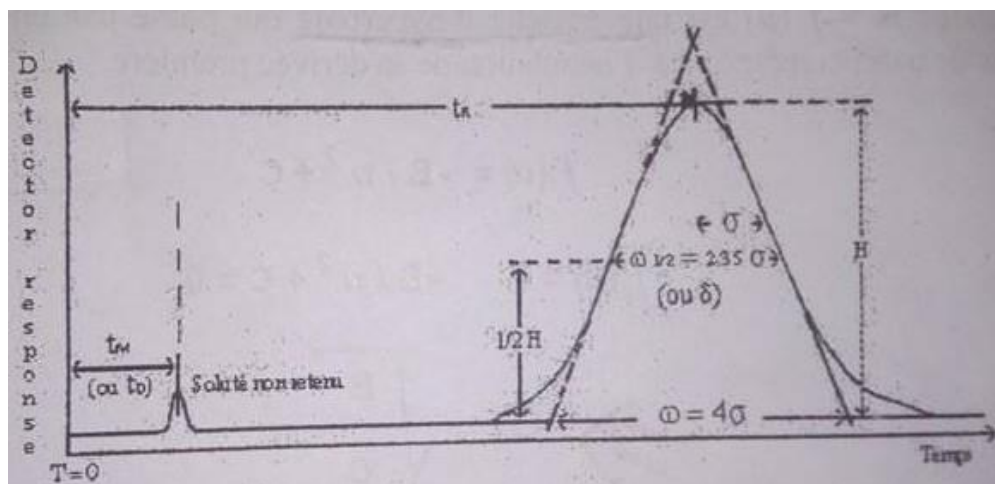


Figure 34 : Chromatogramme [38]

3.1.1. Caractéristiques du chromatogramme. [6, 33, 38]

- **T=0** : Le temps du début de l'injection
- **T_m** : Le temps mort : est le temps mis par un composé non retenu par la phase stationnaire pour traverser la colonne (temps passé dans la phase mobile)
- **t_r** : Le temps de rétention : est le 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 donnée.

La surface du pic est fonction de la quantité du constituant dont il est la trace.

- **t'_r** : Le temps de rétention réduit : est le temps passé par un soluté dans la phase stationnaire, soit :

$$t'_r = t_r - t_m$$

- **ω** : la largeur du pic à la base, mesurée à 13.5 pour cent de la hauteur du pic.
- **ω_{1/2} ou δ** : La largeur du pic à mi hauteur exprimée en unité de temps.
- **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 (y₁ + y₂ + ... + y₆) la moyenne des aires du pic.

On peut calculer l'écart type relatif en pourcentage :

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

3.1.2. Grandeurs de rétention [38]

Ce sont :

- Le temps de rétention t_r ;
- Le volume de rétention ou (volume d'élution) **V_r** : le volume de la phase mobile nécessaire à entraîner le soluté jusqu'à la sortie de la colonne. Sur le chromatogramme, il correspond au volume de la phase mobile qui s'est écoulé entre l'instant de l'injection et celui correspondant au sommet du pic.

Soit **D** le débit de la phase mobile, alors : **V_m = t_r × D**

V_m : volume mort est le volume de la phase mobile de la colonne, il peut être calculé sur le chromatogramme par introduction d'un composé non retenu par la phase stationnaire selon :

$$V_m = t_m \times D$$

3.2. Analyse qualitative

3.2.1. Notion de concentration [33]

- **Le coefficient de partage K :**

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**

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

Ce coefficient est en fonction de 3 types d'affinités :

- Celle entre le soluté et la phase mobile
 - Celle entre le soluté et la phase stationnaire
 - Celle entre les phases mobiles et stationnaire
- **Le facteur de capacité K' :** est le rapport de la quantité d'un soluté dans la phase stationnaire et 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 le rapport du temps passé par un soluté dans la phase stationnaire sur le temps passé par ce même soluté dans la phase mobile.

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

3.2.2. Notion d'efficacité ou performance d'une colonne. [38]

Elle se traduit par la finesse des pics obtenus pour les composés. Plus le pic est fin plus la colonne est efficace. Elle s'exprime par deux grandeurs Net H

- **Nombre de plateaux théoriques N :** il correspond au nombre d'équilibres successifs qu'a subi un composant du mélange.

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

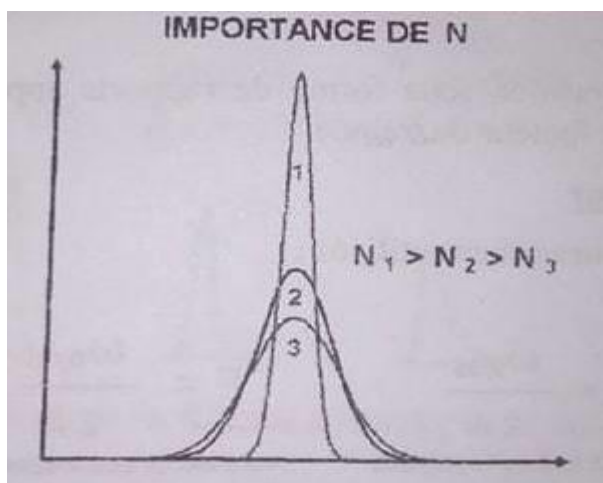
t_r : temps de rétention.

δ : Largeur du pic à mi-hauteur.

Plus le pic est fin, plus le N est grand et donc plus la colonne est efficace.

ANNEXE I : HPLC

N est caractéristique d'un système chromatographique (colonne + solvants + composés à séparer).



- **La hauteur équivalente à un plateau théorique : HEPT ou H** qui est défini comme :

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

L : Longueur de la colonne

N : Nombre de plateaux théoriques

Si l'on tient compte des temps morts, on définit : le nombre de plateaux efficaces N' (= nombre de plateaux théoriques effectifs N_{eff}) :

$$N' = 16 \left[\frac{t_r - t_m}{\omega} \right]^2 = 5.54 \left[\frac{t_r - t_m}{\delta} \right]^2$$

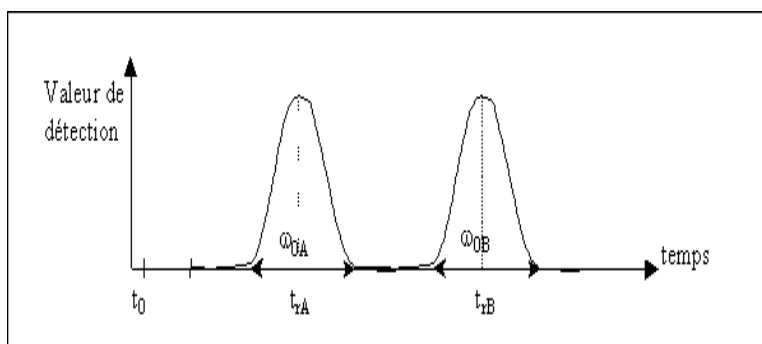
➤ Les facteurs d'élargissement des pics [33]

- **La diffusion turbulente** : l'élargissement est expliqué par le fait qu'il existe différents chemins parcourus par les molécules d'un soluté. La longueur des chemins n'étant pas la même, elles ne mettent pas toutes le même temps pour traverser la colonne : le pic s'élargit. Ce phénomène est fonction des particules et de la régularité du remplissage.
- **La résistance au transfert de masse** : l'élargissement est expliqué par l'accumulation de phase mobile dans les anfractuosités du support. Les molécules qui y diffusent vont moins vite que celles qui n'y diffusent pas.
- **La diffusion longitudinale** : ce phénomène diminue plus la vitesse de la phase mobile augmente. Dans la pratique cette diffusion est négligeable en HPLC.

En conclusion l'efficacité calculée d'une chromatographie, représentée par la HEPT, est fonction de la vitesse de la phase mobile donc du débit, et de la qualité (régularité, remplissage) de la phase stationnaire

3.2.3. Qualité de la séparation [38]

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



• **La sélectivité (α)** : pour préciser la position relative de 2 pics adjacents A et B sur un chromatogramme on exprime le facteur de séparation (ou de sélectivité) α selon :

$$\alpha = \frac{t'_{rB}}{t'_{rA}}$$

Il ne permet pas de savoir à lui seul si la séparation est réellement possible, mais plus α est élevé plus la séparation est facile

En pratique α toujours ≥ 1 car on choisit $t'_{rB} > t'_{rA}$

$\alpha = 1$ pas de séparation

$\alpha > 1$ séparation plus facile que α augmente

• Facteur de résolution (R_s). [38]

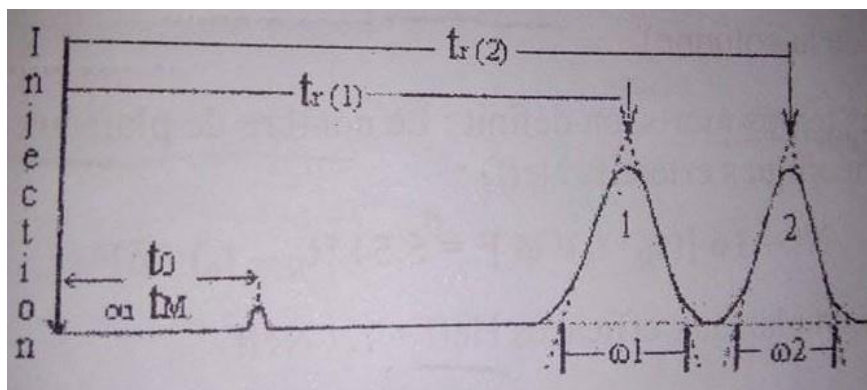
La résolution correspond à une grandeur numérique caractérisant l'aptitude du système chromatographique à séparer 2 composés d'un mélange.

Le facteur de résolution est calculé selon la formule suivante :

$$R_s = \frac{t_{r2} - t_{r1}}{\omega_1 + \omega_2}$$

t_r : temps de rétention de chaque pic

ω : Largeur des pics à la base



On observe : que la séparation entre 2 pics est d'autant meilleure que R_s est plus grand.

$R_s \leq 0.8$: séparation insuffisante

$R_s \leq 1$: chevauchement des pics

$R_s = 1$: 2 pour cent de chevauchement des pics.

$R_s \geq 1.5$: bonne séparation.

3.3. Analyse quantitative [6]

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 écrira donc : $A = K_c C$

A = aire du pic

K_c = coefficient de réponse du détecteur

C = concentration du composé injecté

Conclusion

Le champ d'application de l'HPLC recouvre une grande partie du domaine de la chromatographie en phase gazeuse auquel s'ajoute celui de l'analyse des composés thermosensibles, polaires et de masses moléculaires élevées. Son succès est aussi dû à la possibilité d'agir de manière très précise sur la sélectivité par le choix de la colonne et de la composition de l'éluant, c'est-à-dire à la meilleure exploitation des interactions soluté- phase mobile - phase stationnaire.



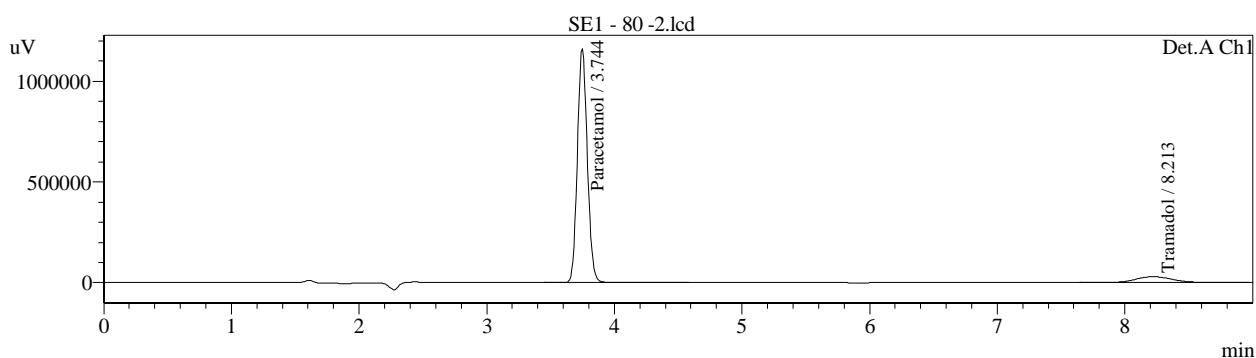
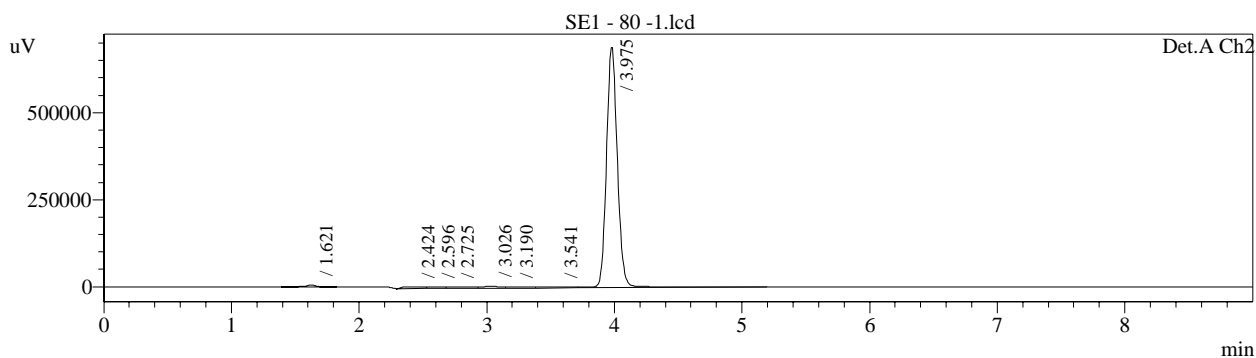
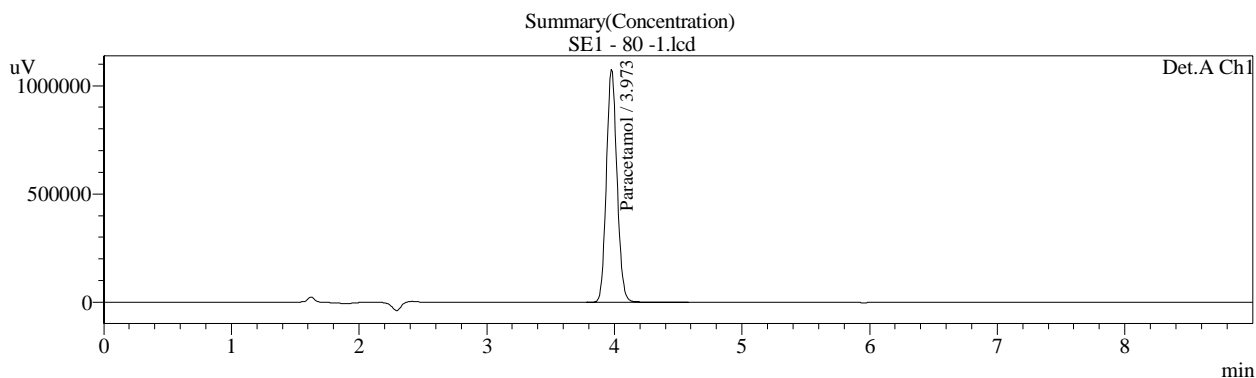
ANNEXE II

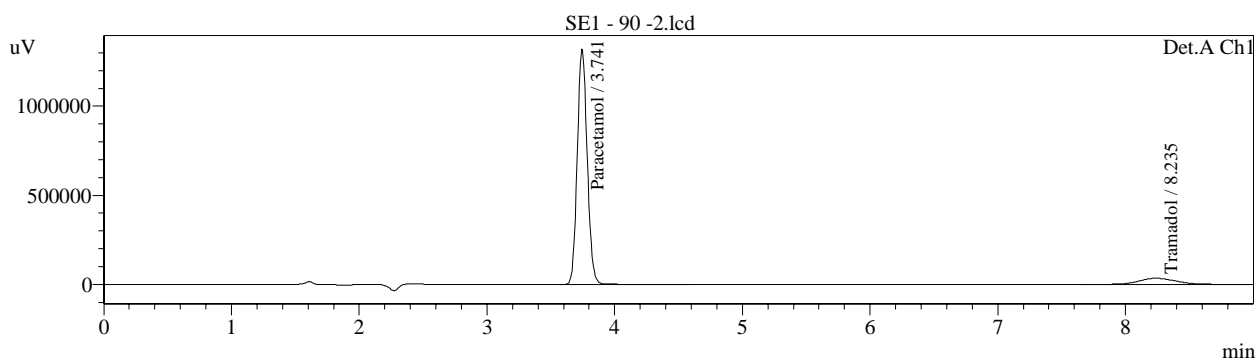
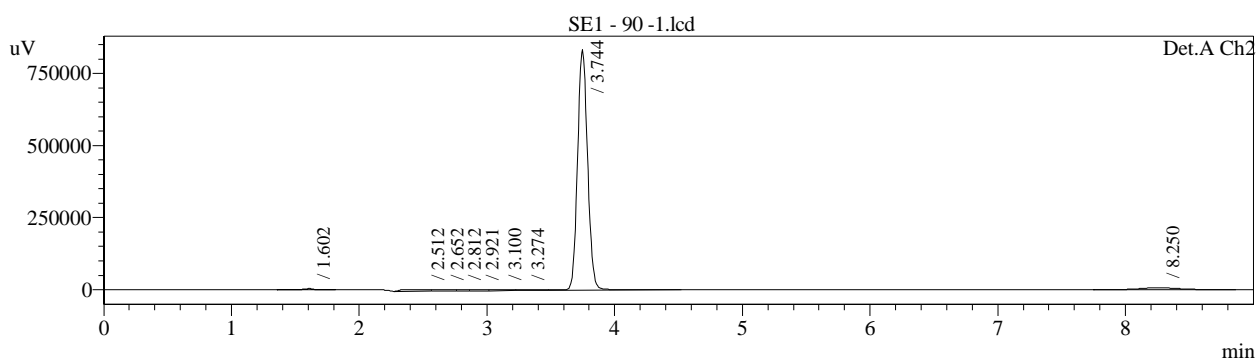
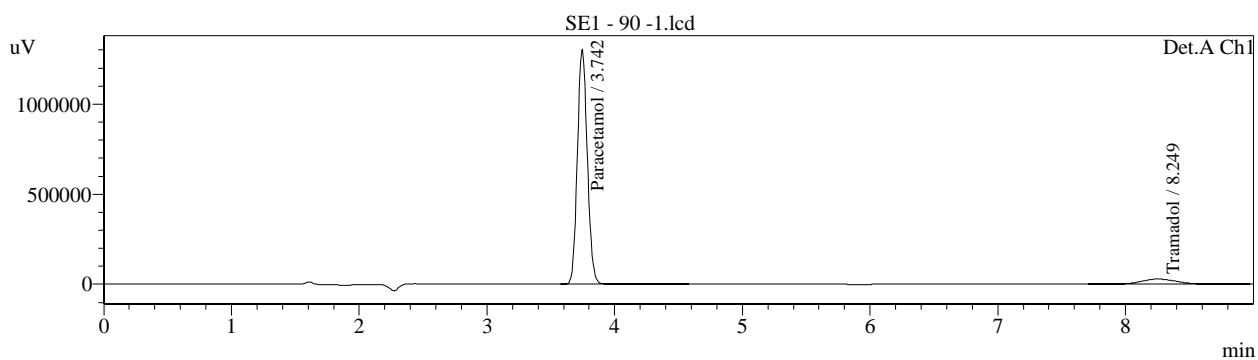
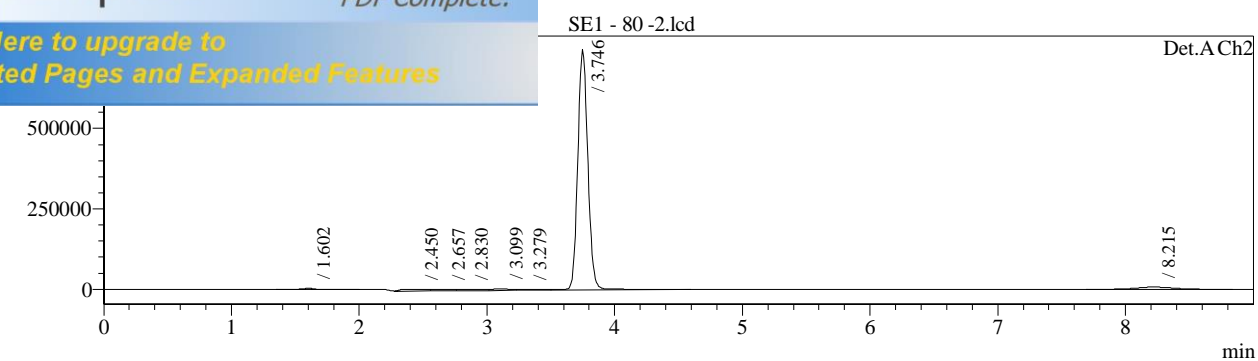
DONNEES BRUTES DE

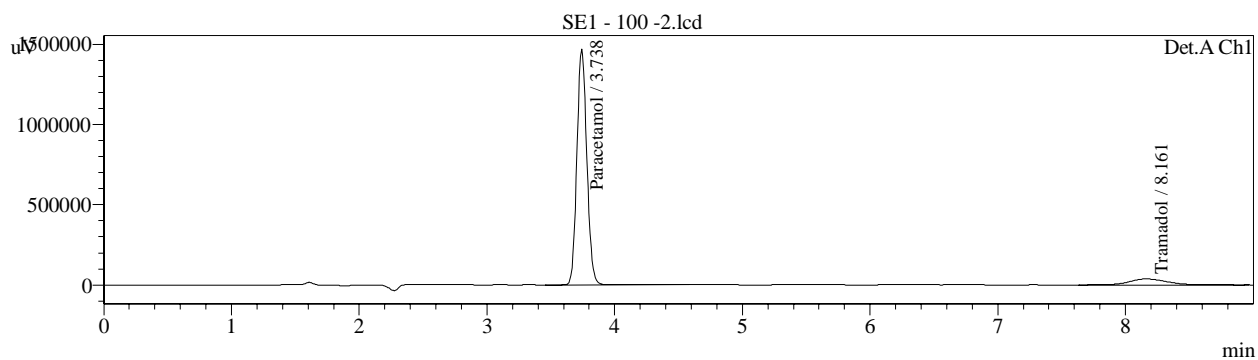
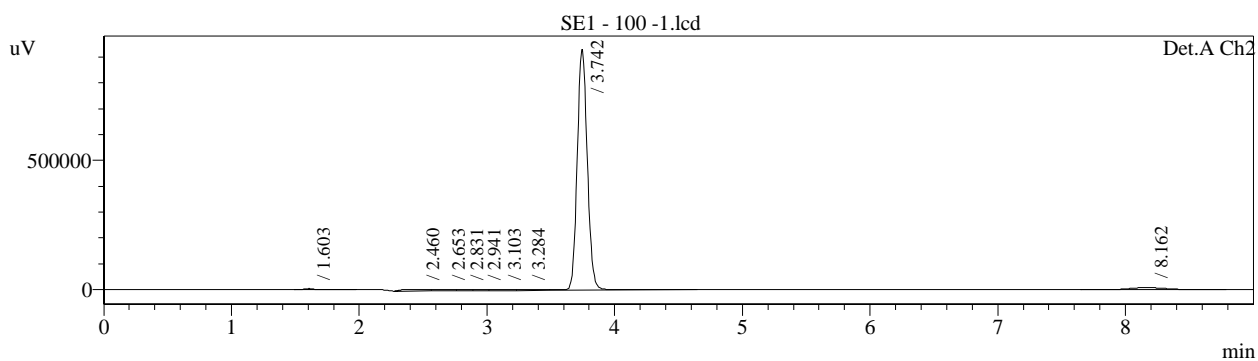
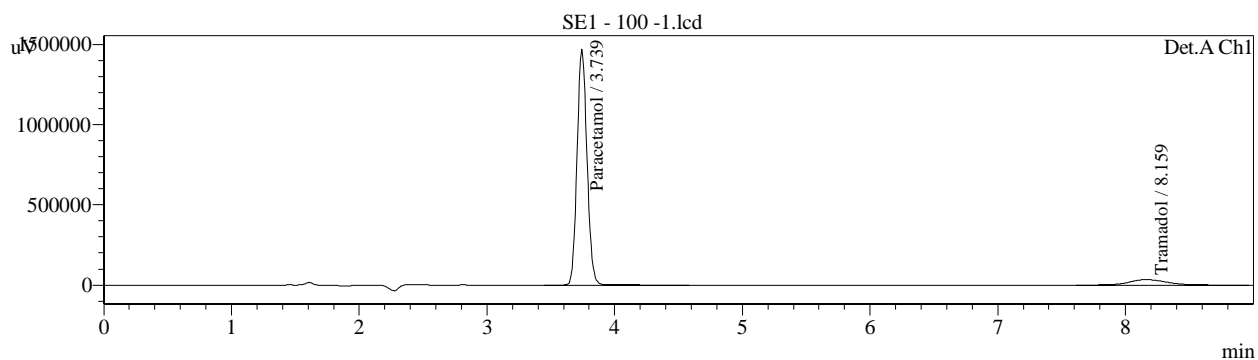
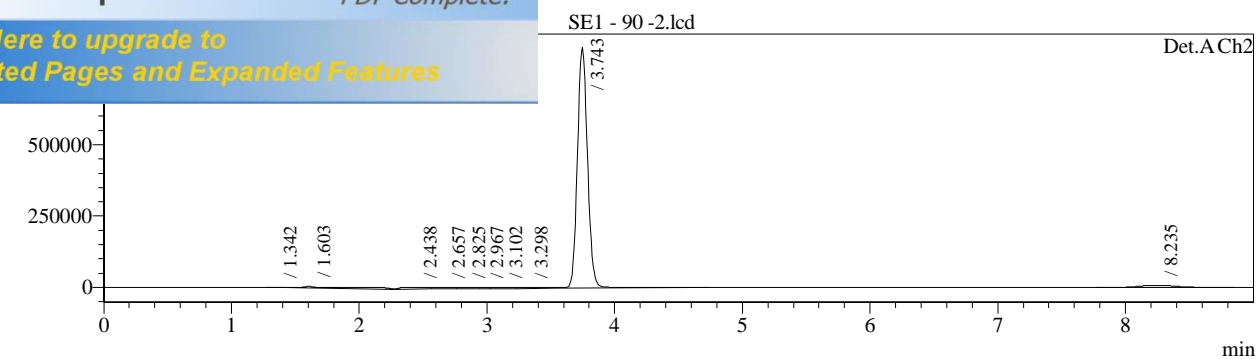
LA VALIDATION ANALYTIQUE

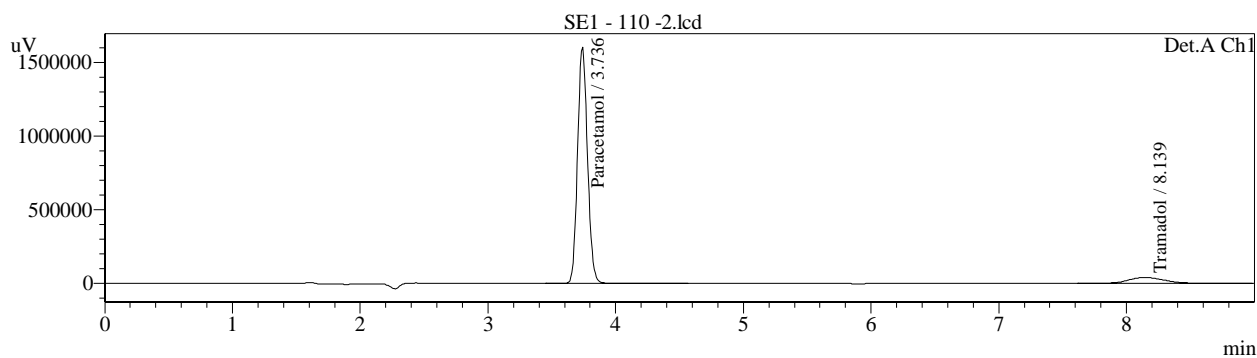
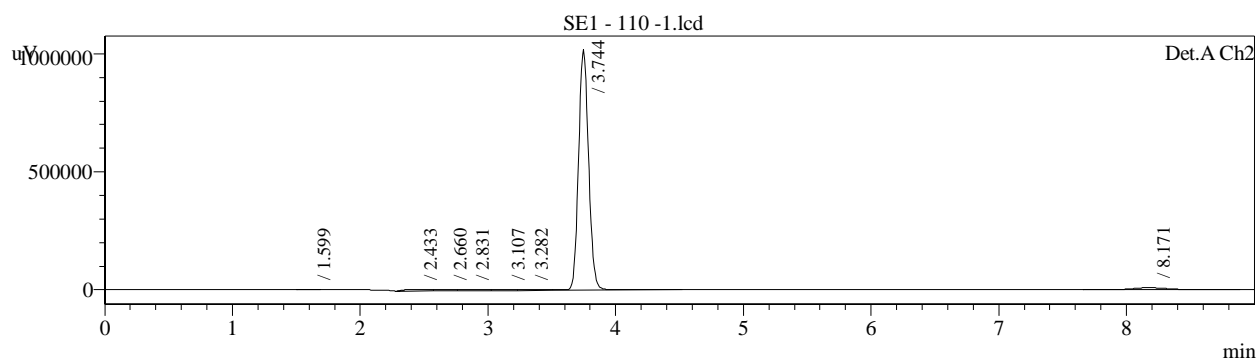
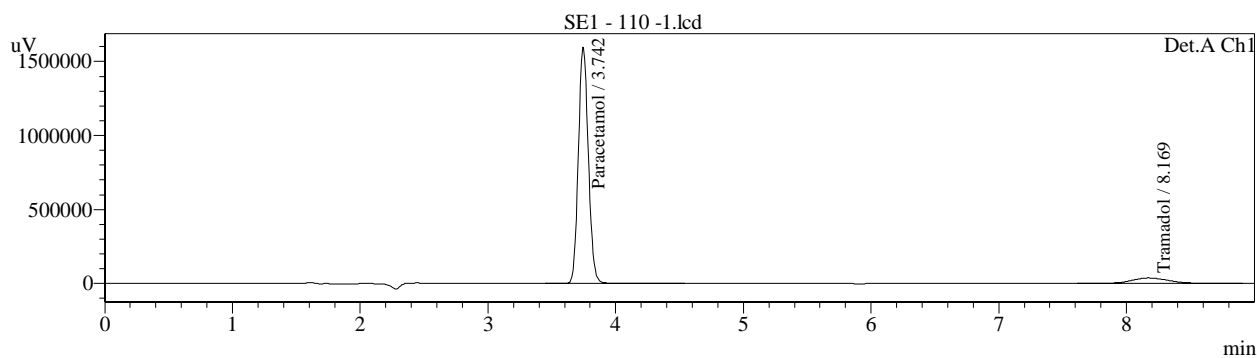
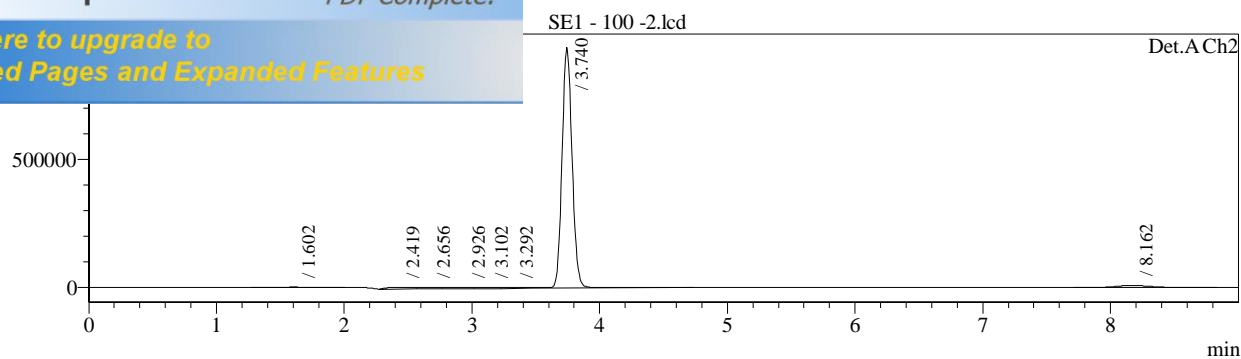
Sample Information

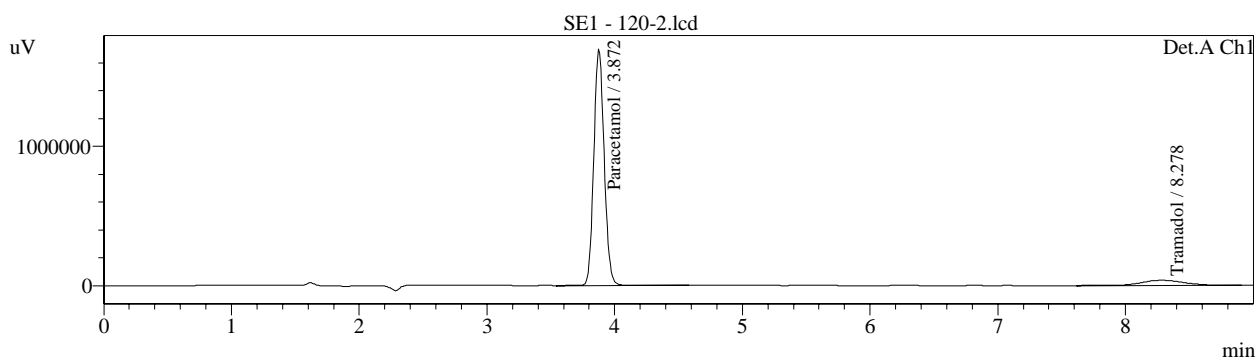
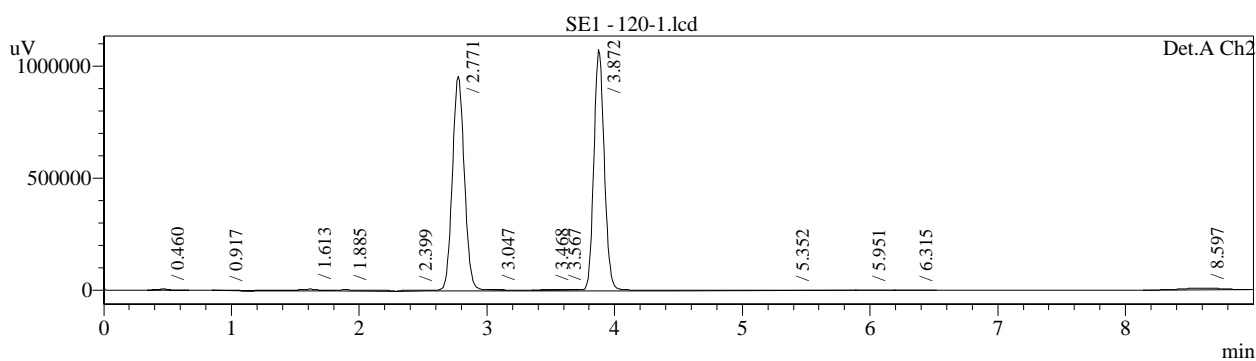
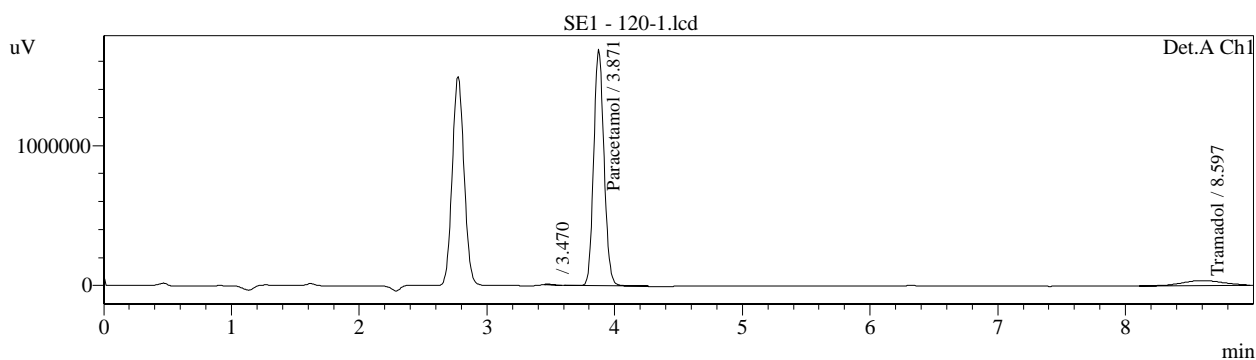
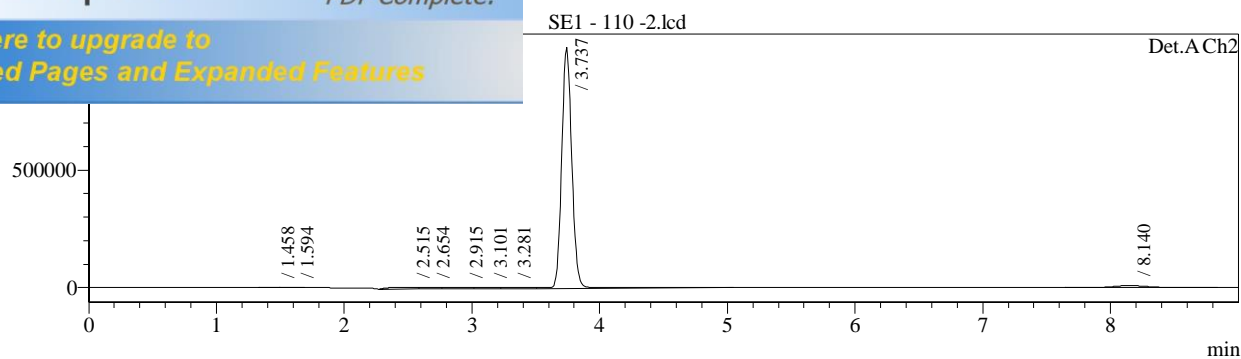
Acquired by : Admin
 Sample Name : Paracetamol et tramadol
 Sample ID : SE 1
 Tray# : 11
 Vail# : 3
 Injection Volume : 20 uL
 Data Filename : SE1 - 80 -1.lcd
 Method Filename : Paracétamol et tramadol.lcm
 Batch Filename : Paracetamol tramadol serie 1.lcb
 Report Filename : Default.lcr
 Date Acquired : 09/05/2017 10:50:46
 Data Processed : 09/05/2017 17:15:35

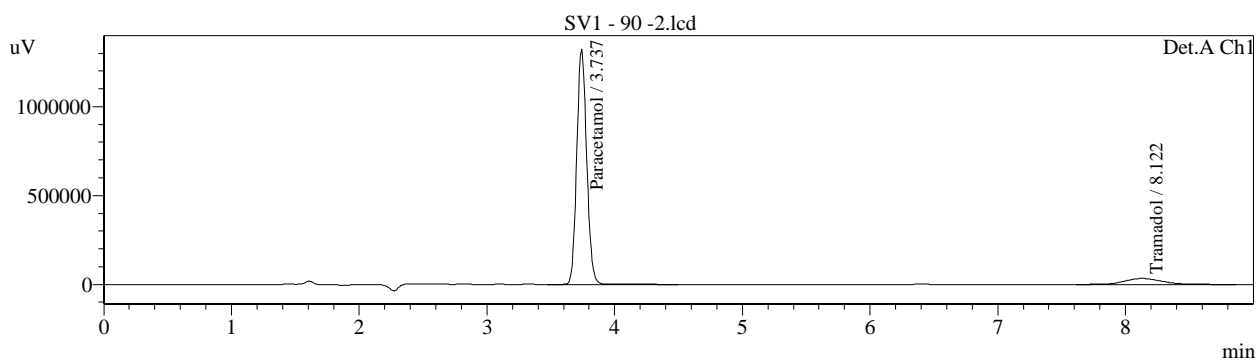
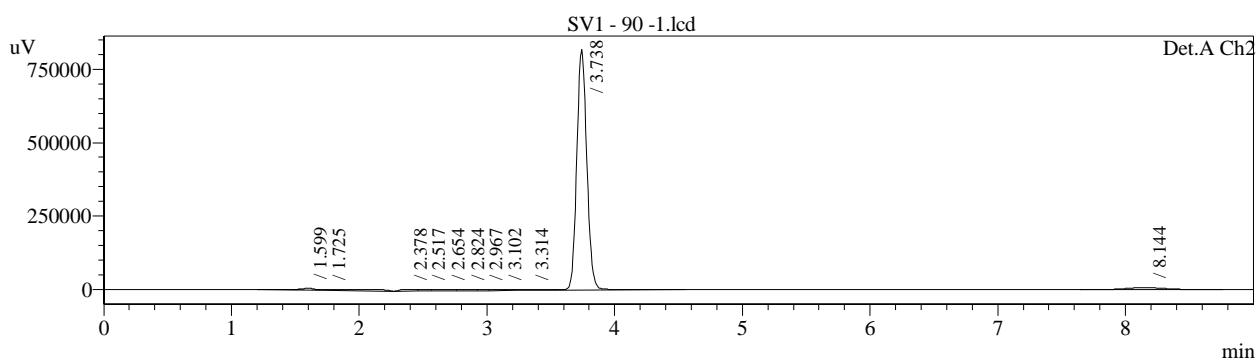
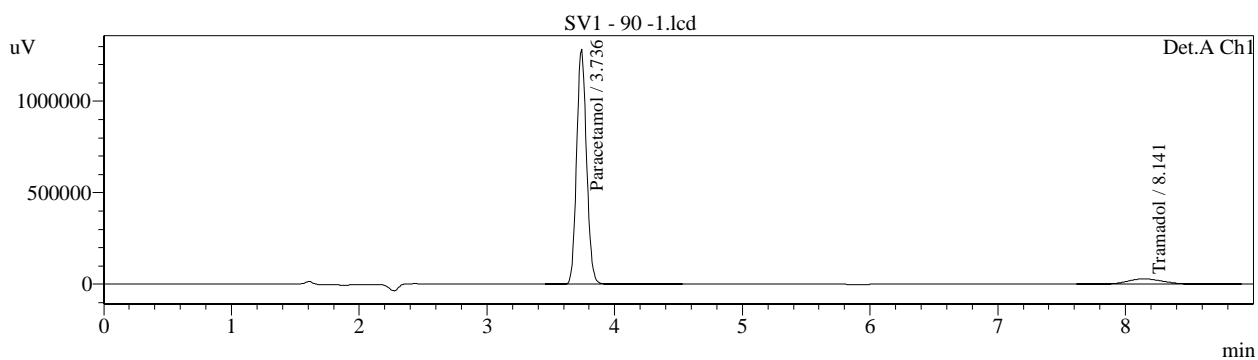
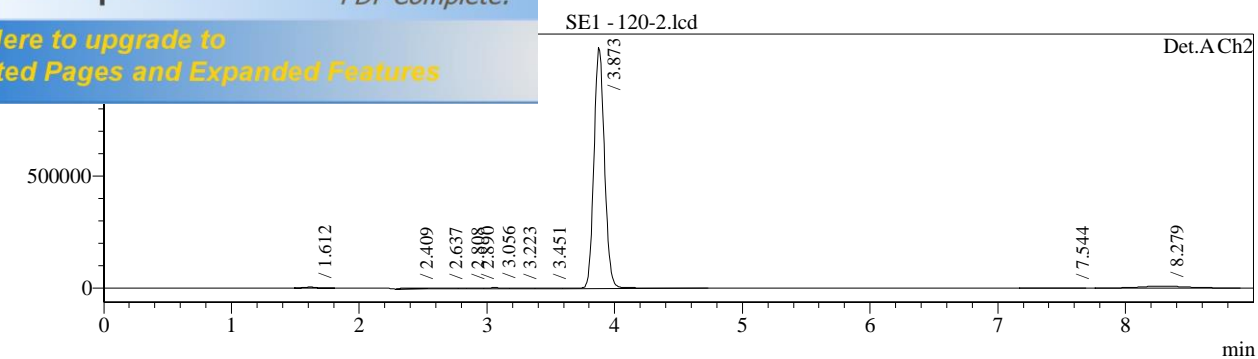


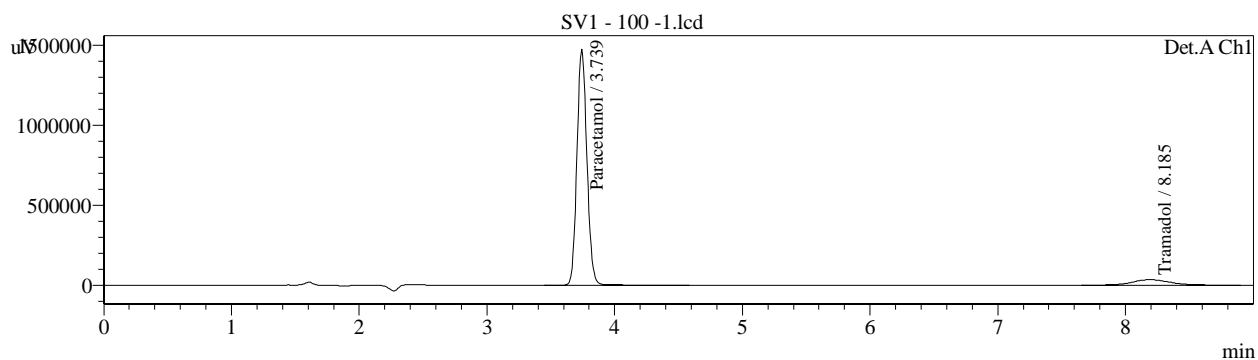
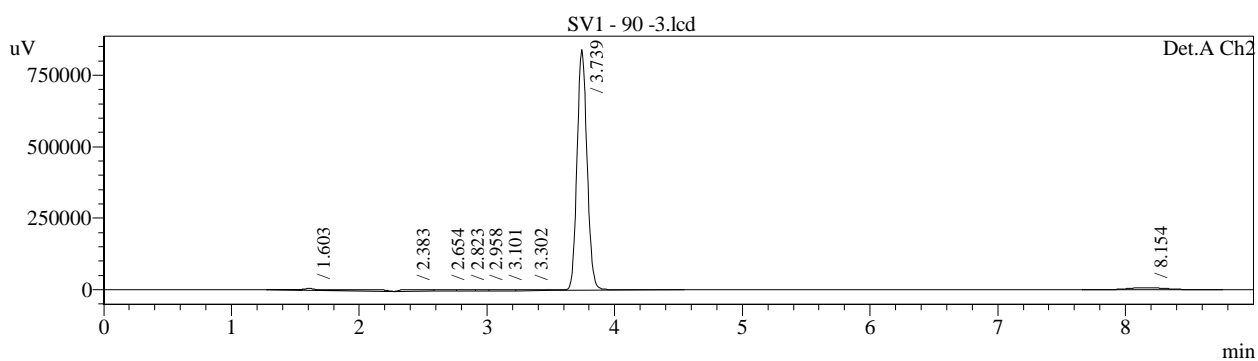
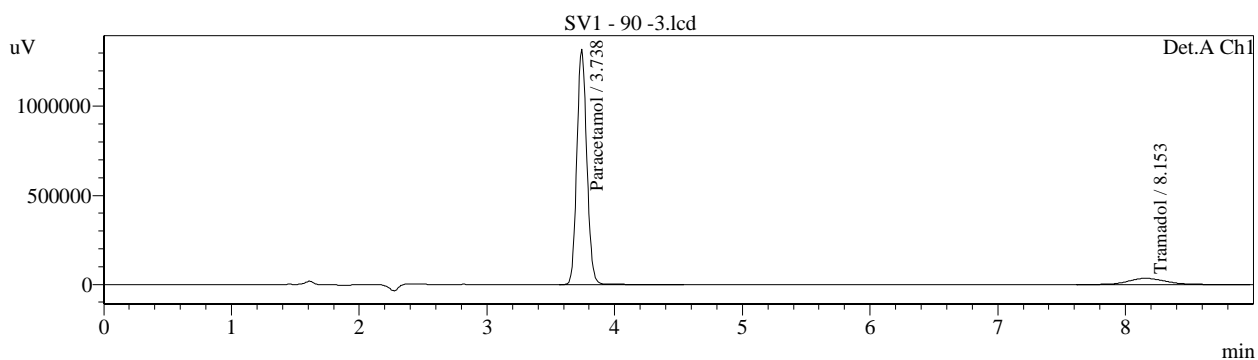
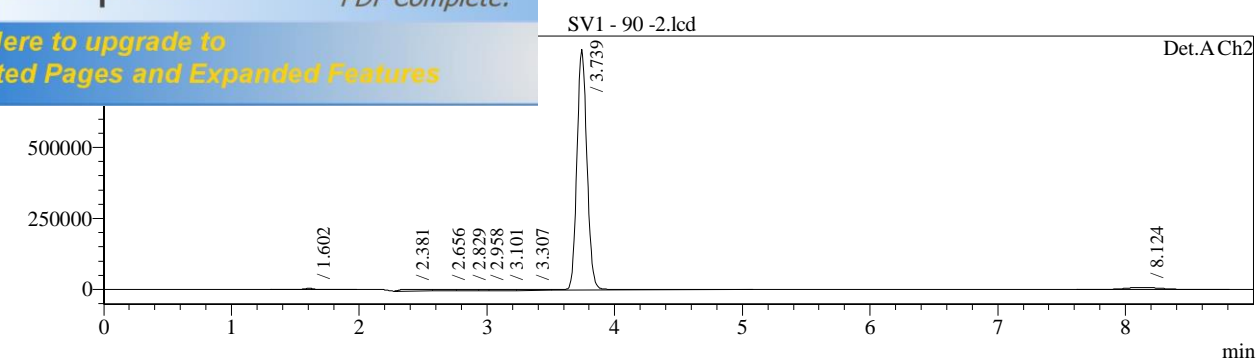


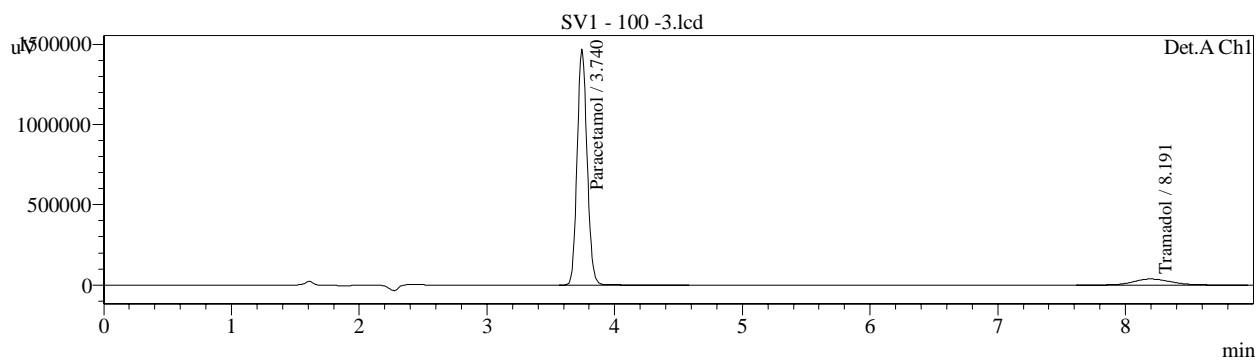
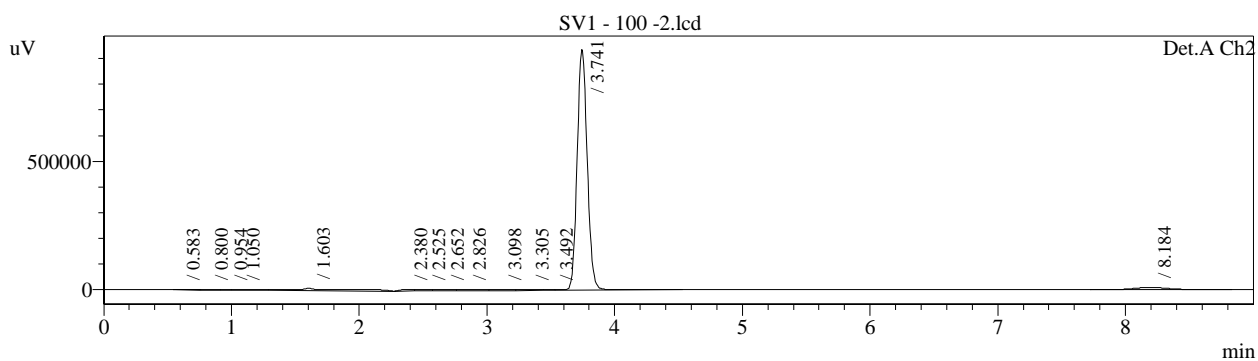
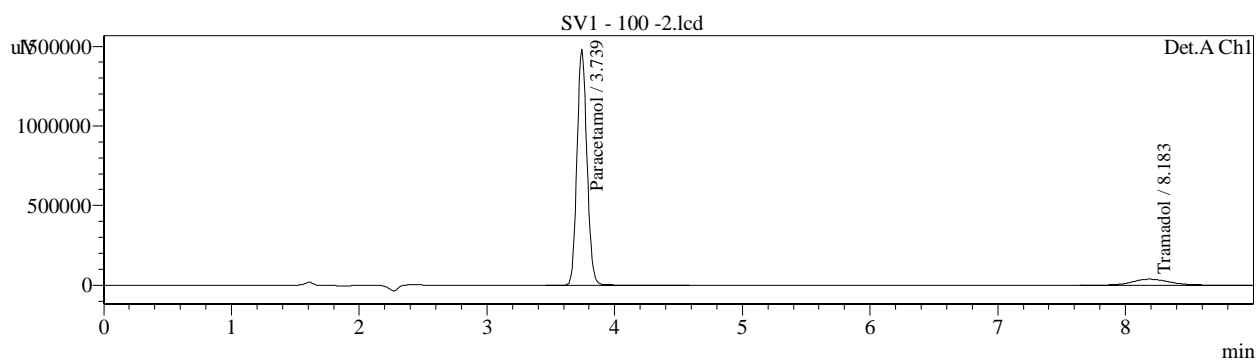
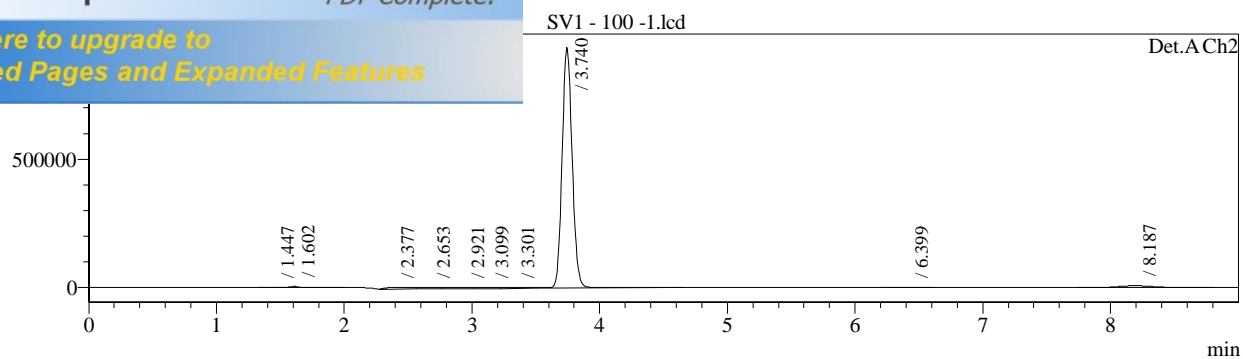


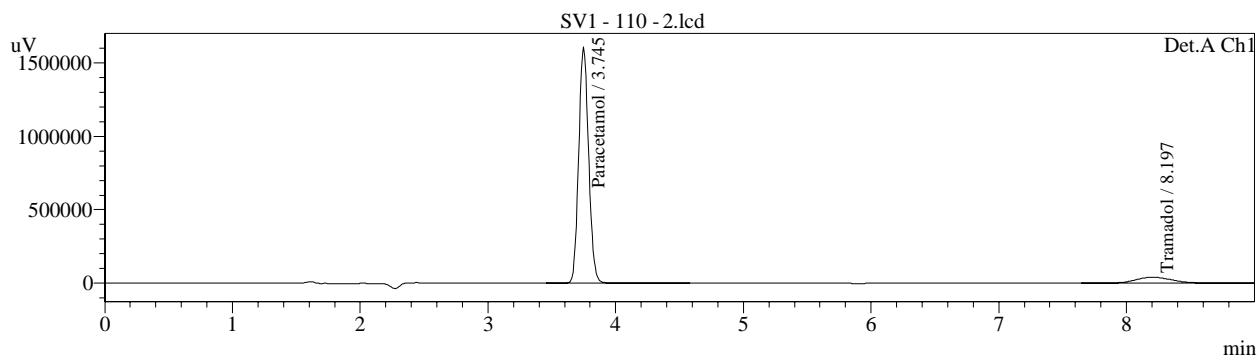
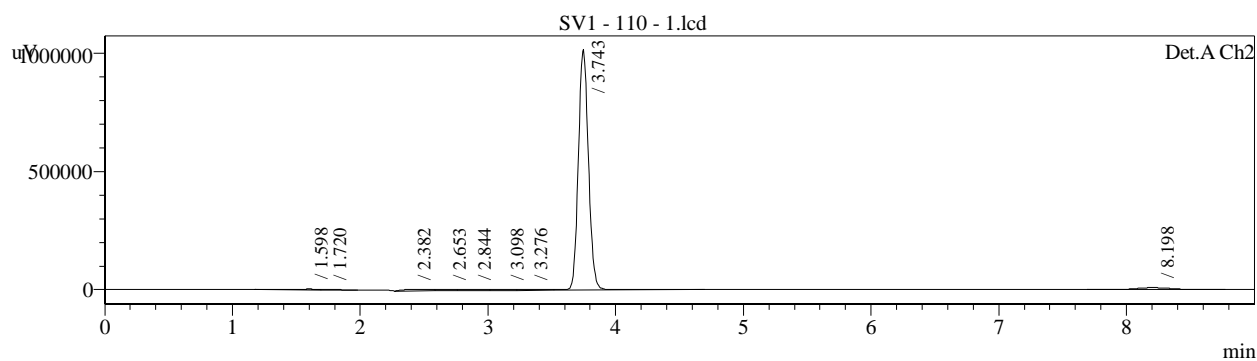
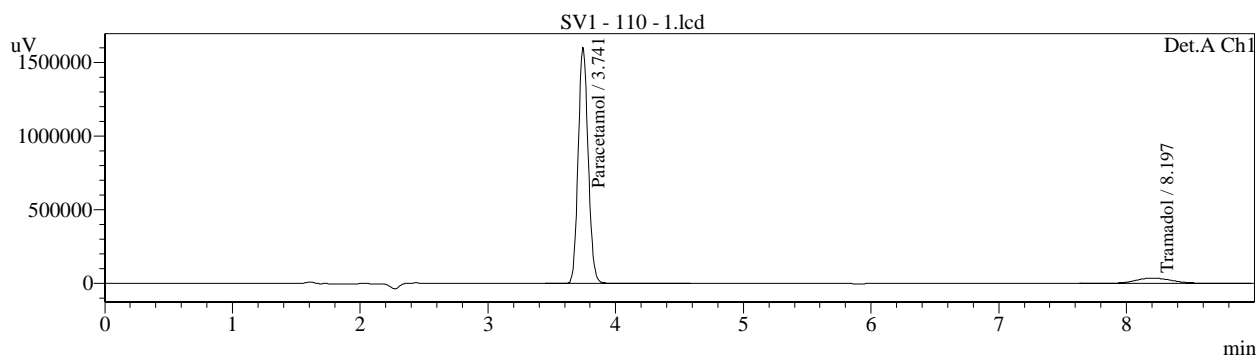
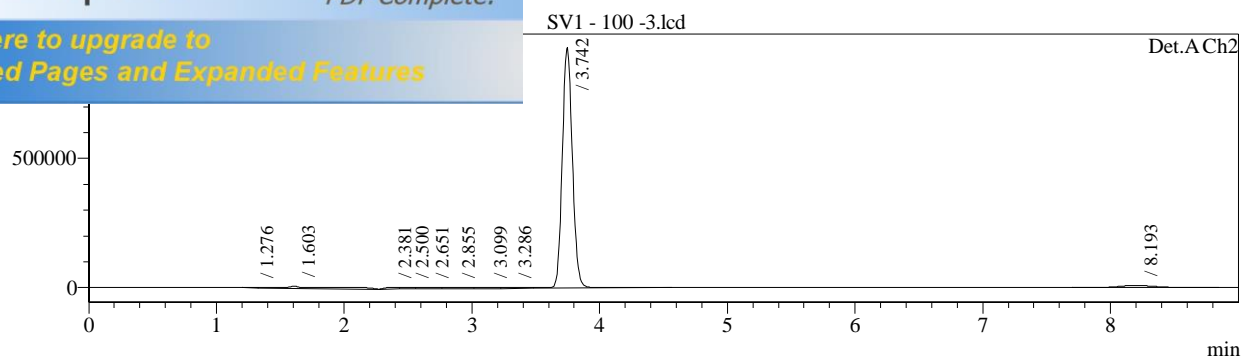


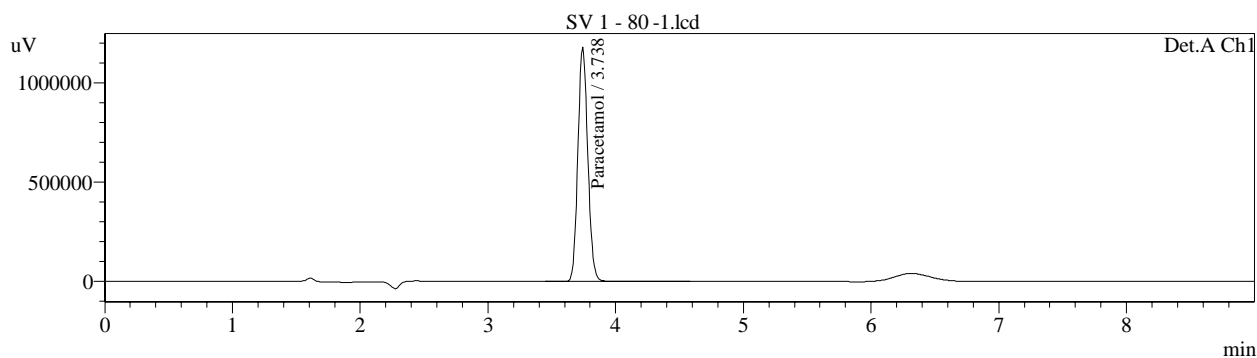
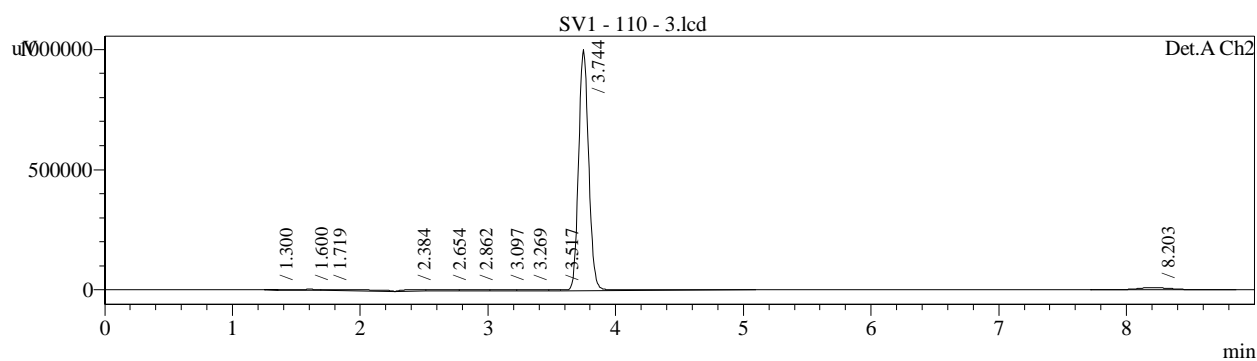
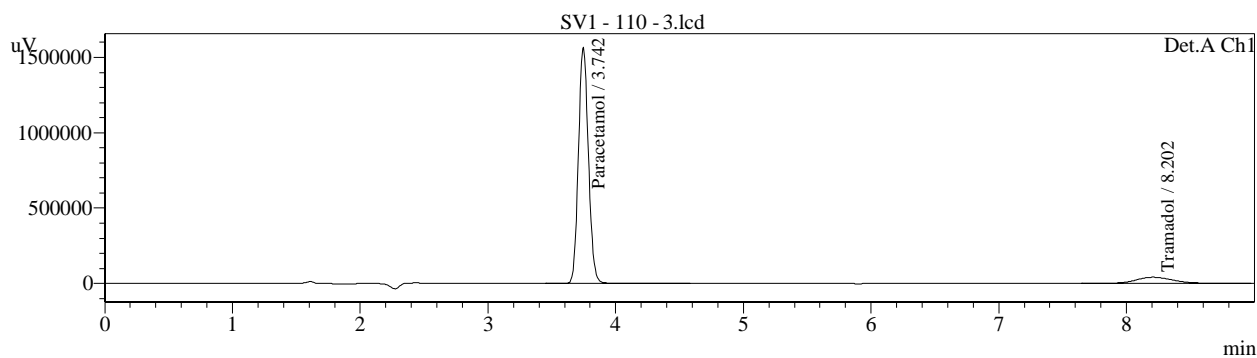
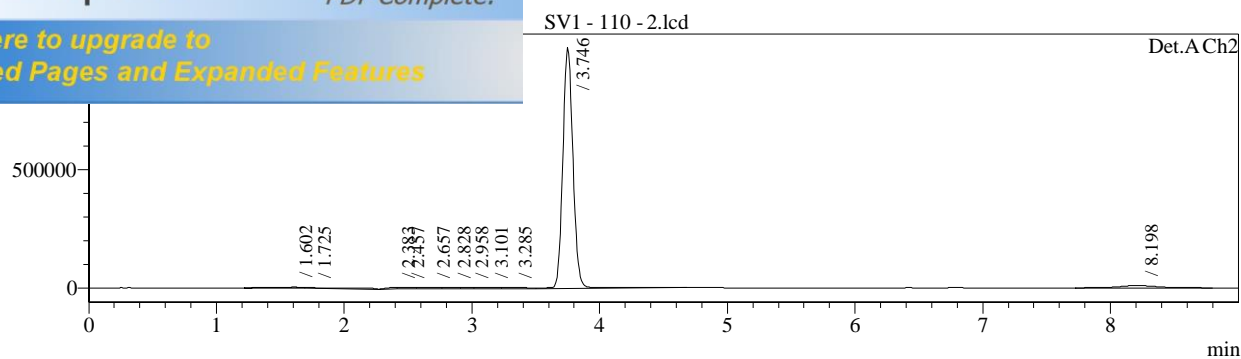


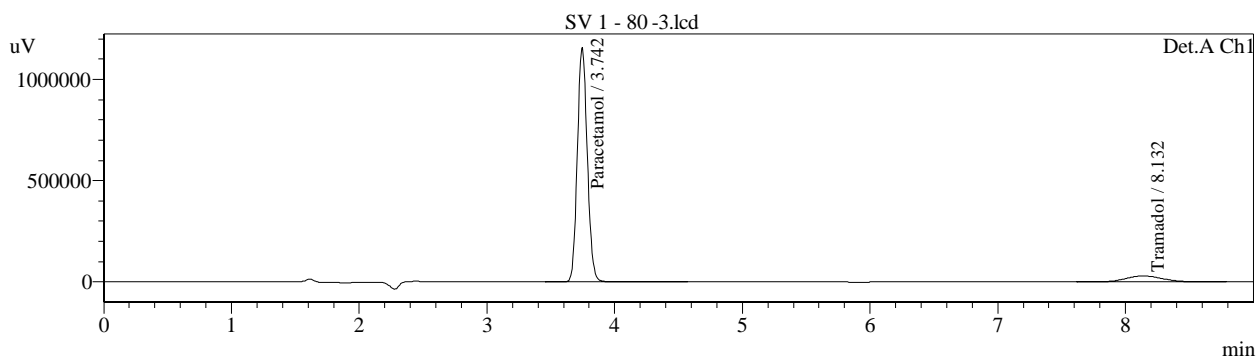
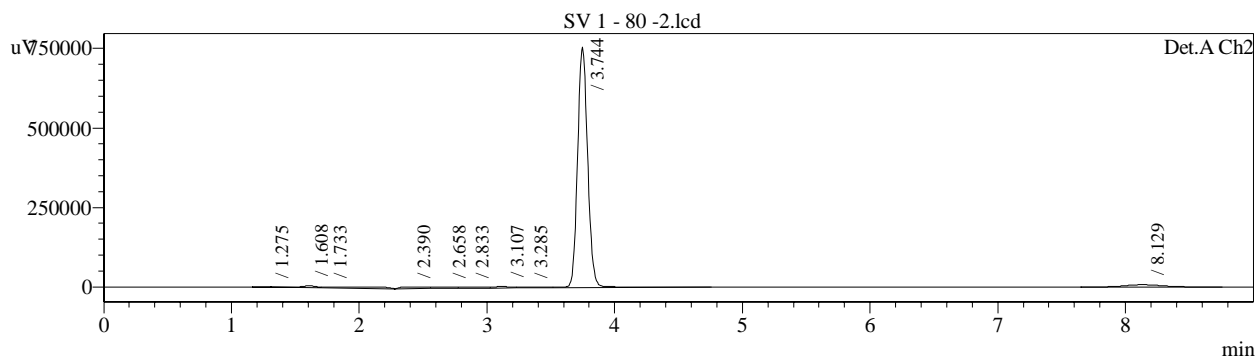
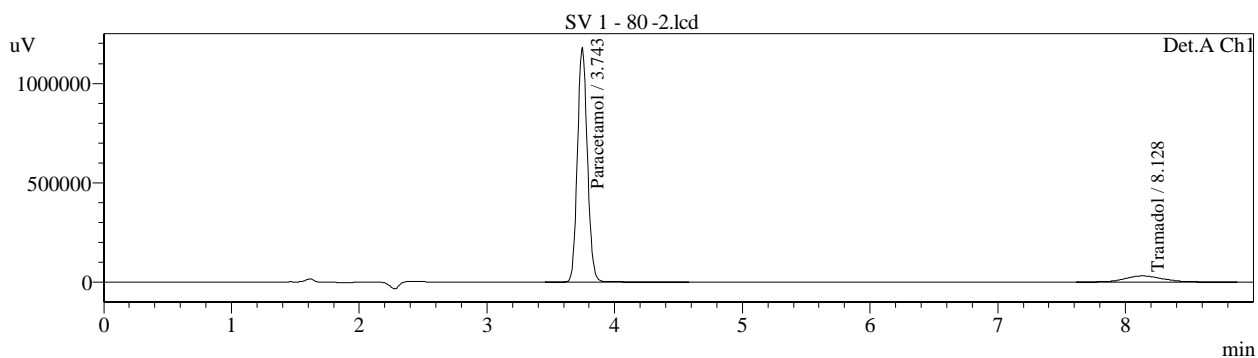
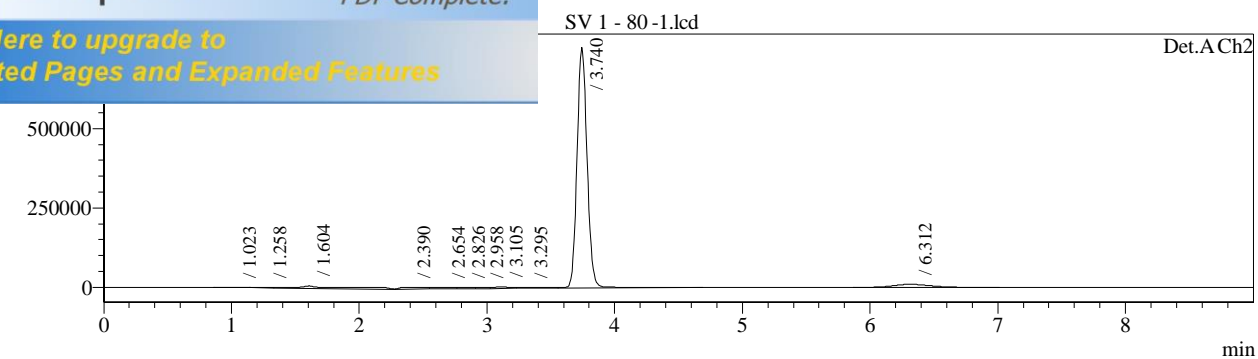


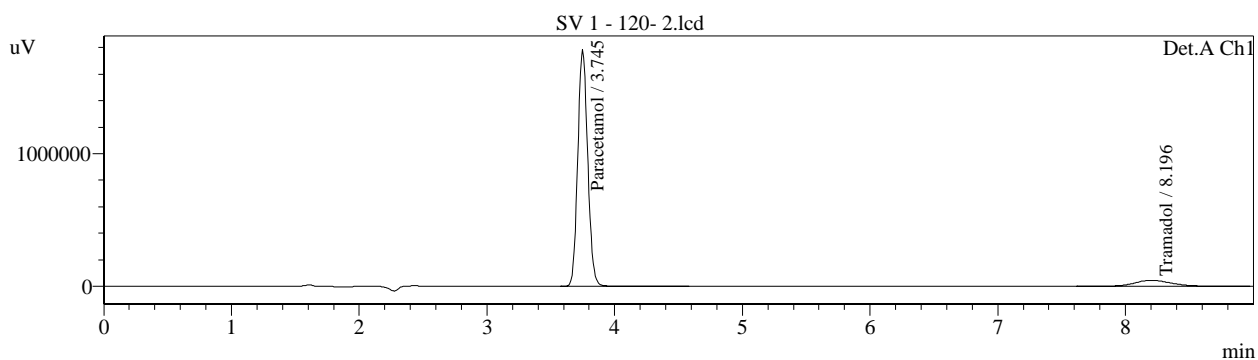
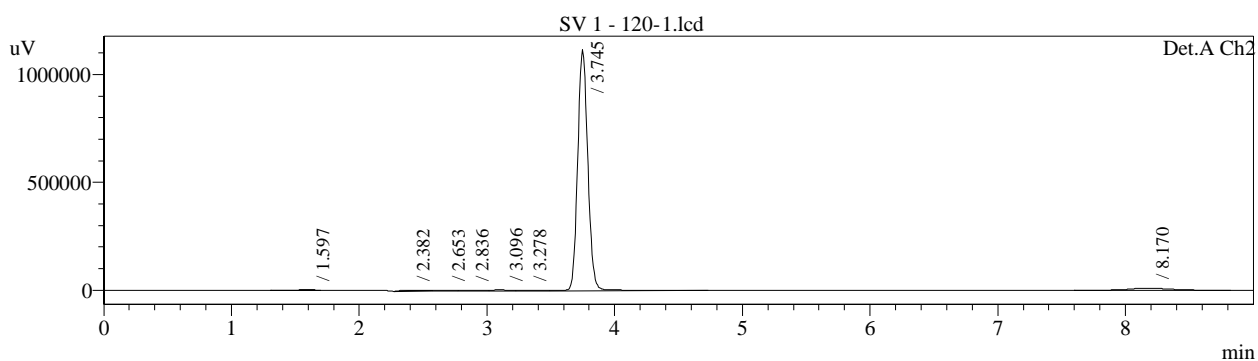
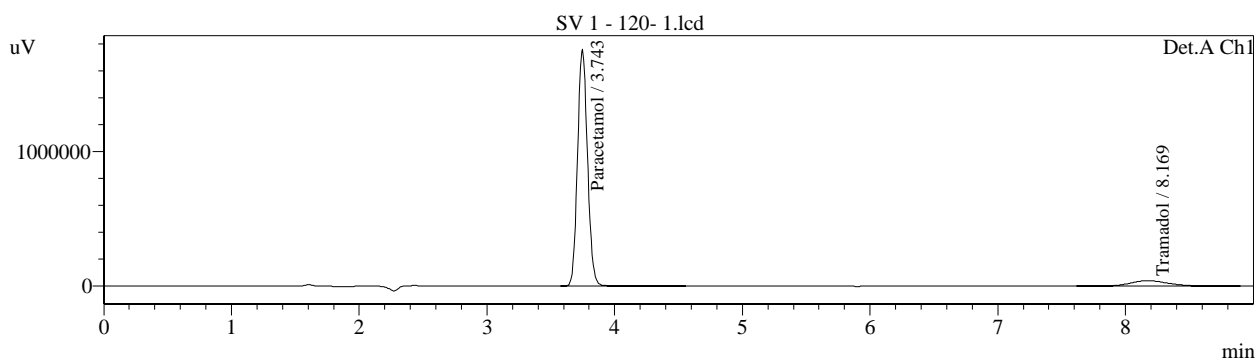
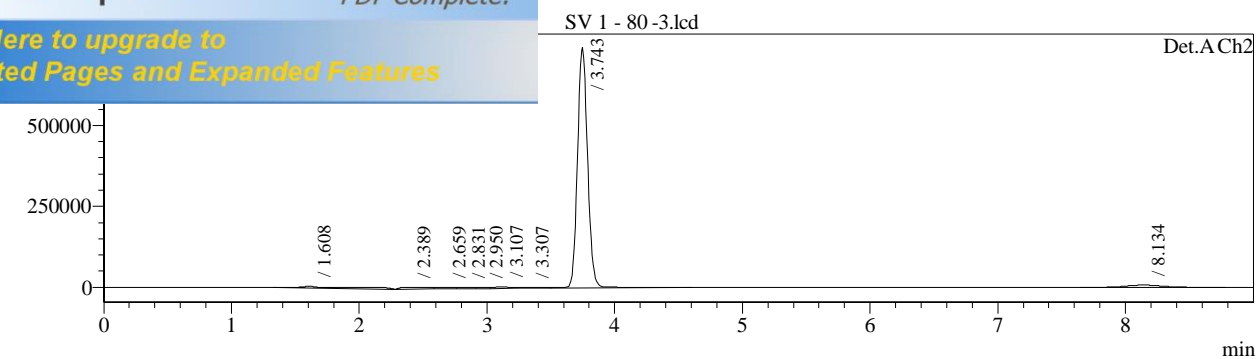


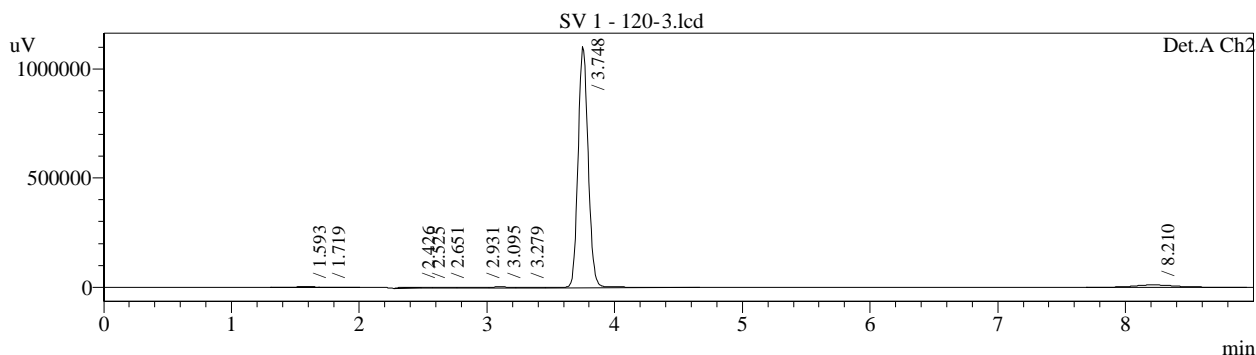
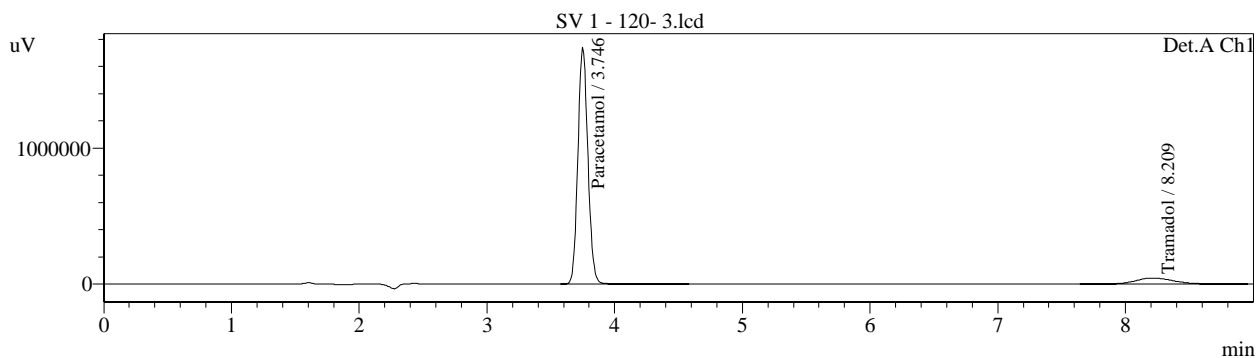
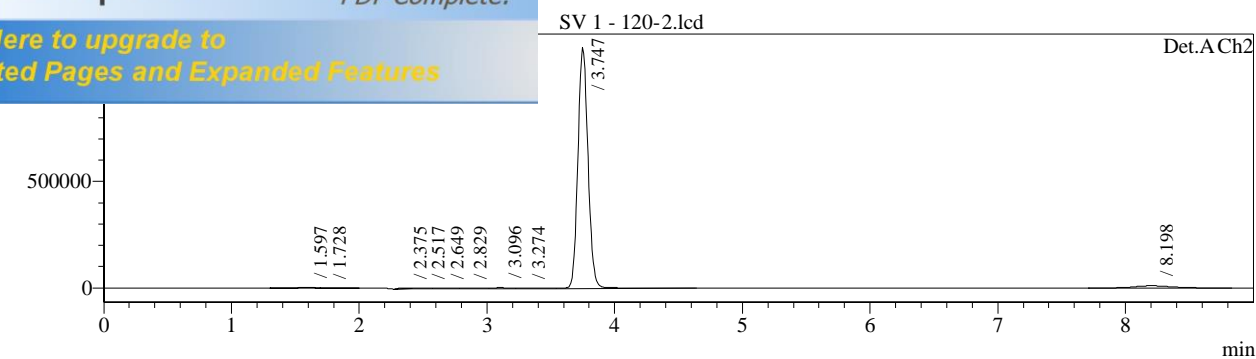












<< Detector A >>

Title	Sample Name	Sample ID	Paracetamol	Tramadol
SE1 - 80 -1.lcd	Paracetamol et t	SE 1	6264968	0
SE1 - 80 -2.lcd	Paracetamol et t	SE 1	6266885	593723
SE1 - 90 -1.lcd	Paracetamol et t	SE 1	7053649	580842
SE1 - 90 -2.lcd	Paracetamol et t	SE 1	7127194	676804
SE1 - 100 -1.lcd	Paracetamol et t	SE 1	7926063	678773
SE1 - 100 -2.lcd	Paracetamol et t	SE 1	7933217	743134
SE1 - 110 -1.lcd	Paracetamol et t	SE 1	8652999	753775
SE1 - 110 -2.lcd	Paracetamol et t	SE 1	8648760	817652
SE1 - 120-1.lcd	Paracetamol et t	SE 1	9470962	764221
SE1 - 120-2.lcd	Paracetamol et t	SE 1	9573738	873769
SV1 - 90 -1.lcd	Paracetamol et t	SV 1	6914763	591654
SV1 - 90 -2.lcd	Paracetamol et t	SV 1	7135934	662160
SV1 - 90 -3.lcd	Paracetamol et t	SV 1	7112050	679005
SV1 - 100 -1.lcd	Paracetamol et t	SV 1	7959711	677586
SV1 - 100 -2.lcd	Paracetamol et t	SV 1	7990256	753108
SV1 - 100 -3.lcd	Paracetamol et t	SV 1	7932599	748916
SV1 - 110 -1.lcd	Paracetamol et t	SV 1	8687698	742537
SV1 - 110 -2.lcd	Paracetamol et t	SV 1	8678386	827821
SV1 - 110 -3.lcd	Paracetamol et t	SV 1	8508665	825402
SV 1 - 80 -1.lcd	Paracetamol et t	SV 1	6362358	0
SV 1 - 80 -2.lcd	Paracetamol et t	SV 1	6376514	595382
SV 1 - 80 -3.lcd	Paracetamol et t	SV 1	6263739	593986
SV 1 - 120-1.lcd	Paracetamol et t	SV 1	9534264	801914
SV 1 - 120-2.lcd	Paracetamol et t	SV 1	9659708	894622
SV 1 - 120-3.lcd	Paracetamol et t	SV 1	9431342	889567
Average			7898657	728972
%RSD			14.690	13.708



PDF
Complete

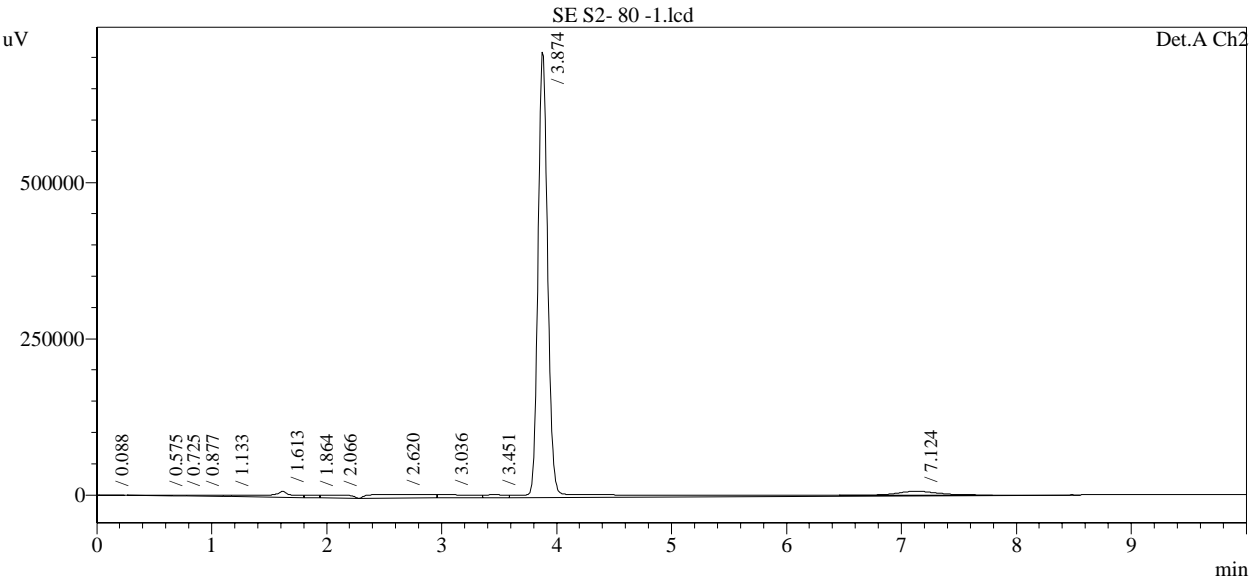
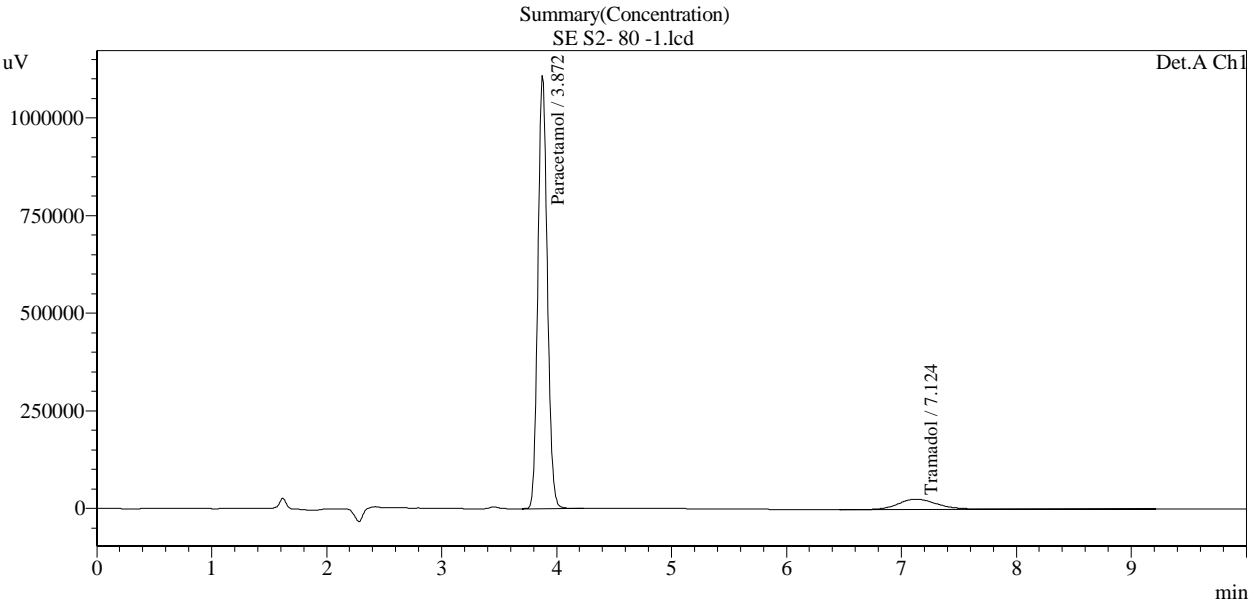
*Your complimentary
use period has ended.
Thank you for using
PDF Complete.*

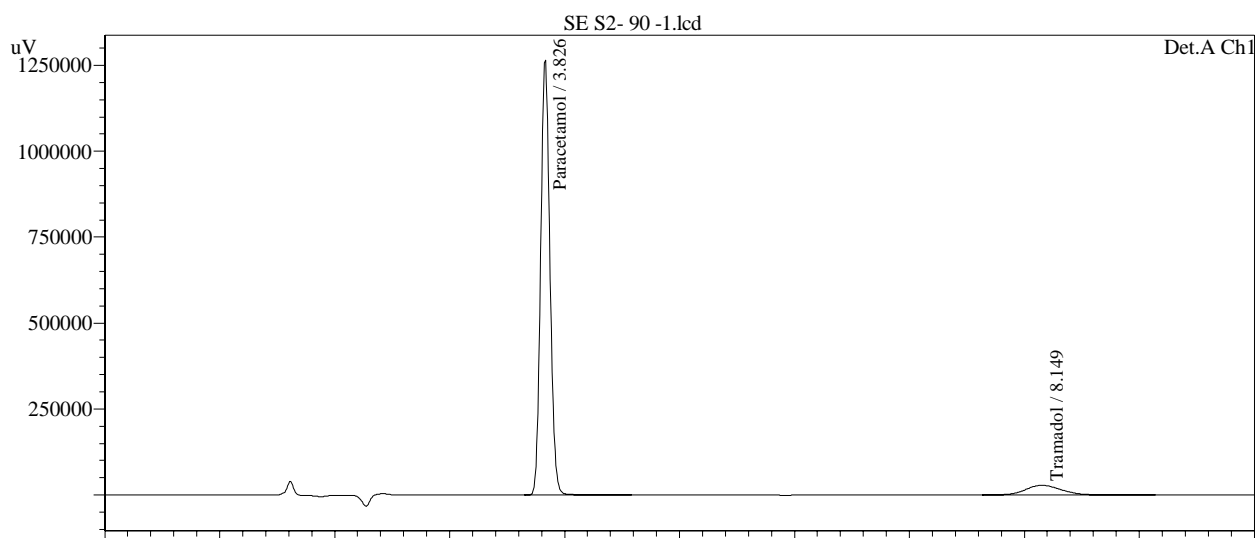
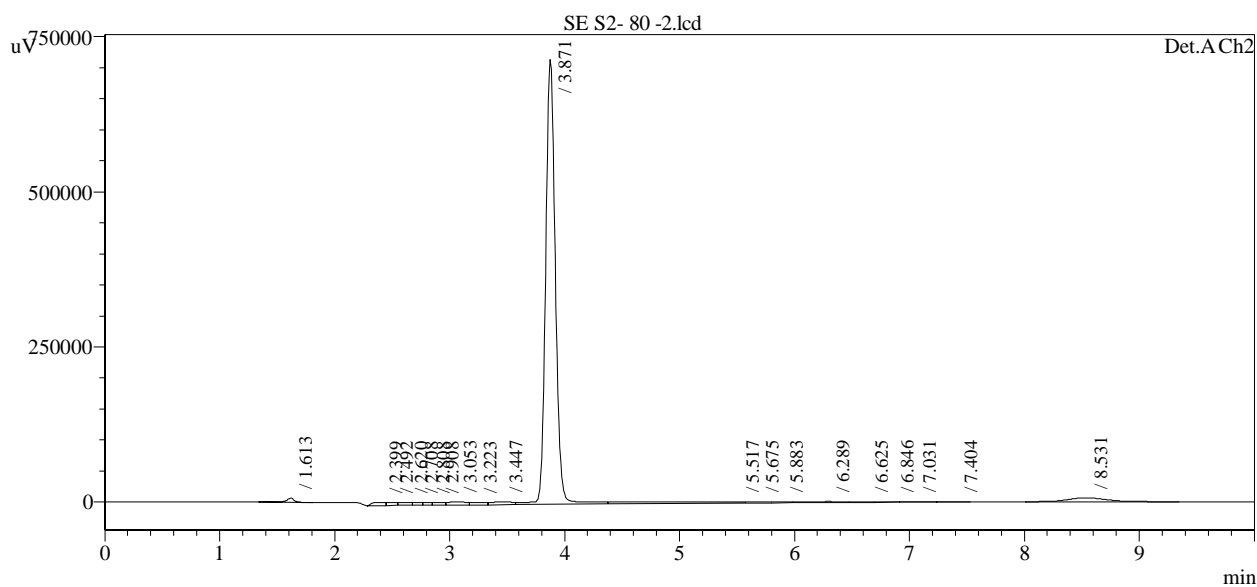
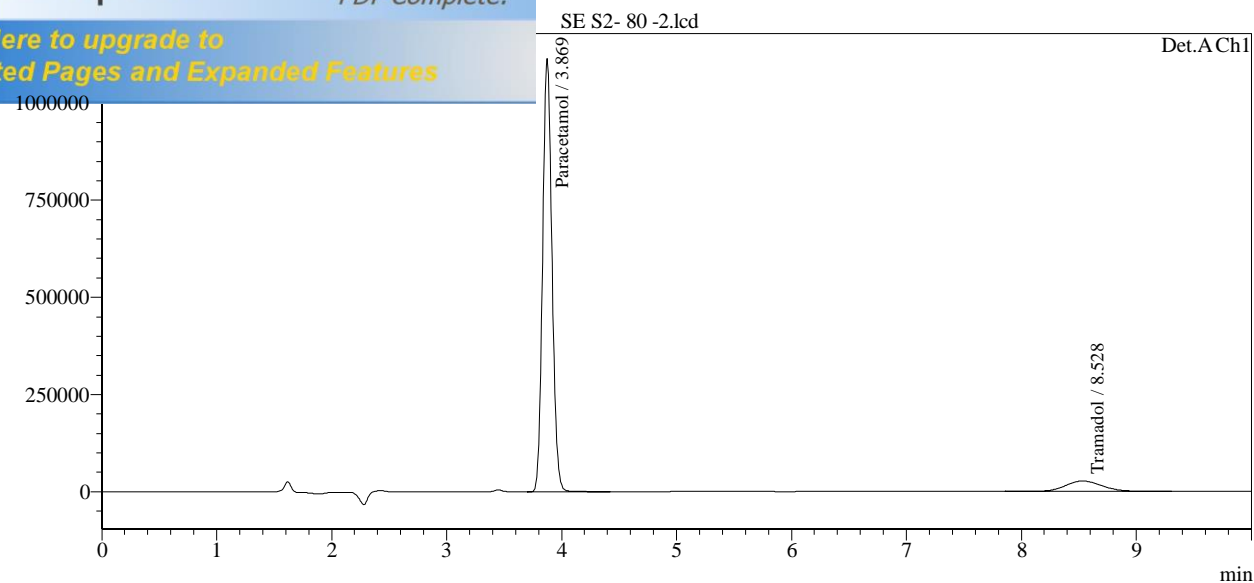
[Click Here to Upgrade to
Unlimited Pages and Expanded Features](#)

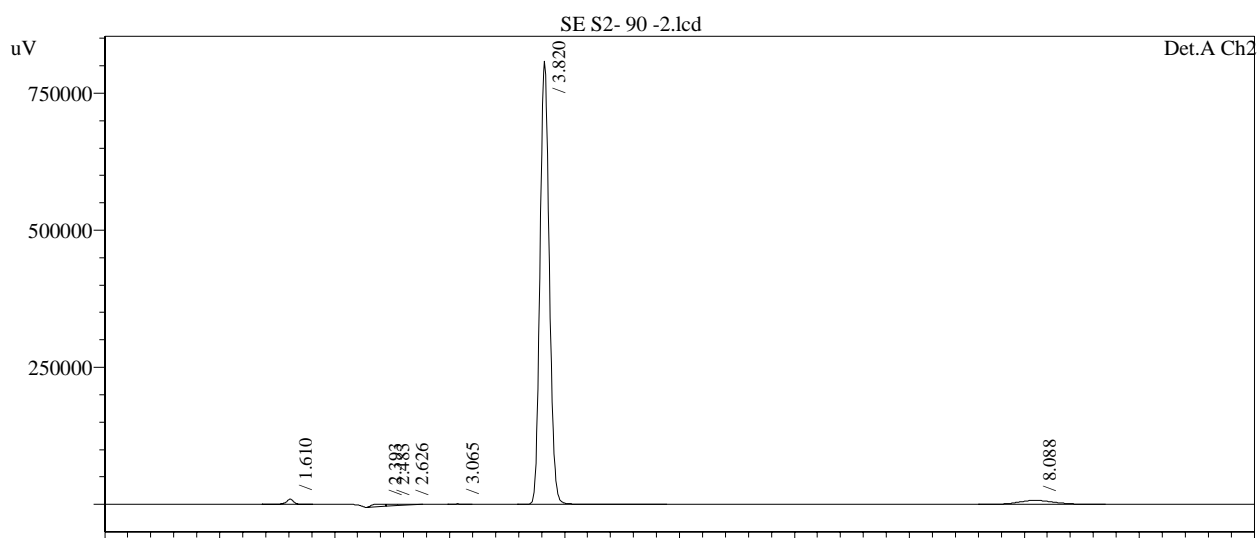
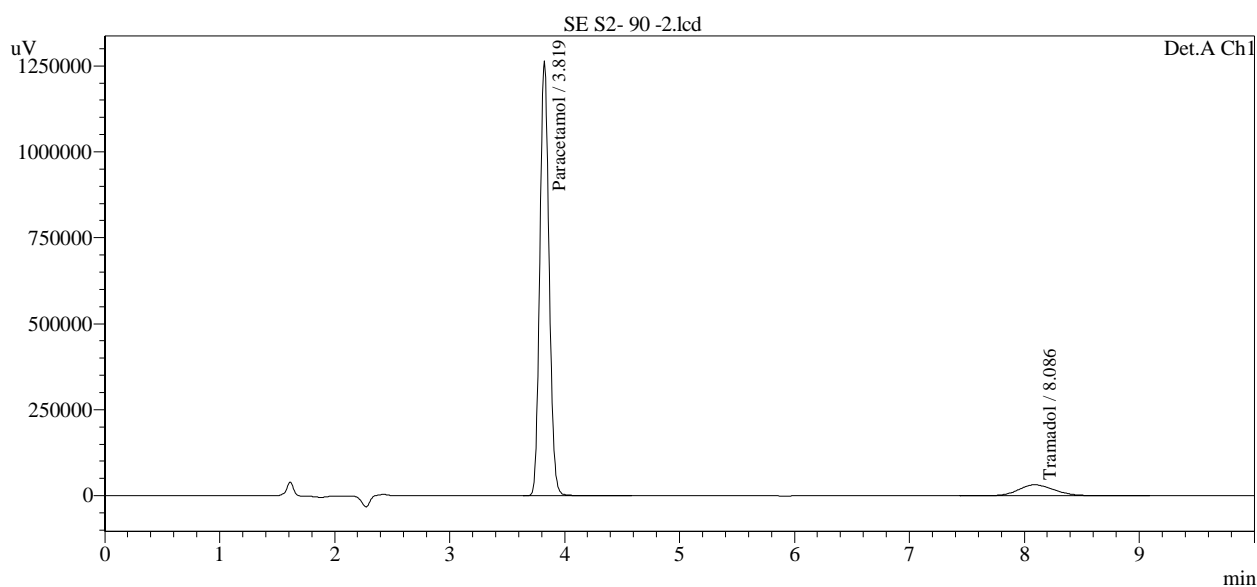
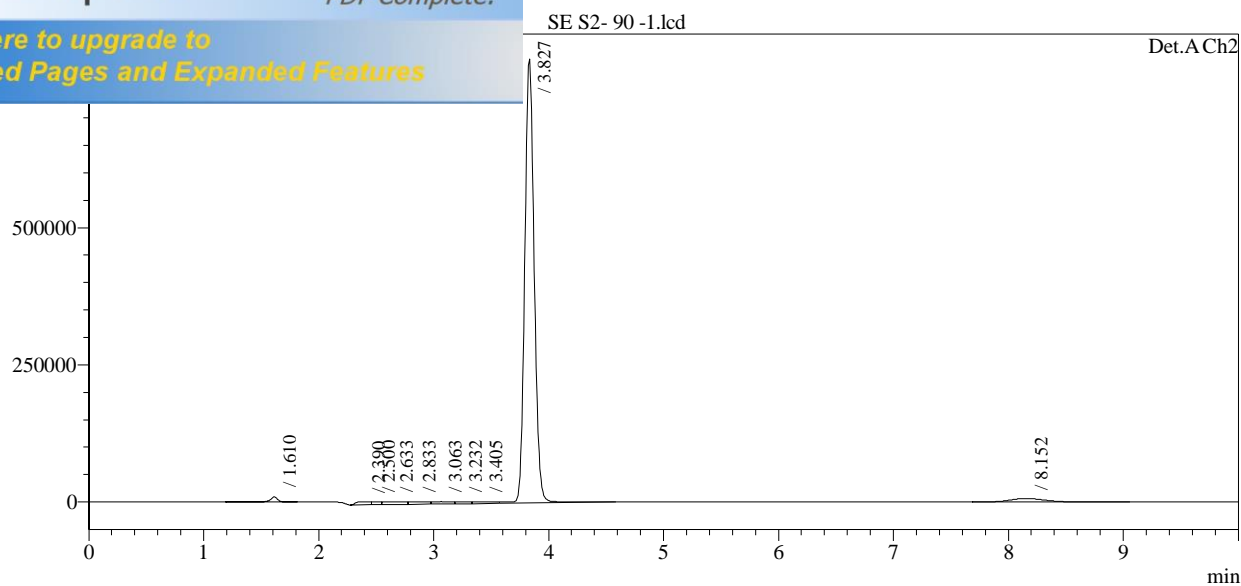
Title	Sample Name	Sample ID	Paracetamol	Tramadol
Maximum			9659708	894622
Minimum			6263739	580842
Standard Deviation			1160329	99926

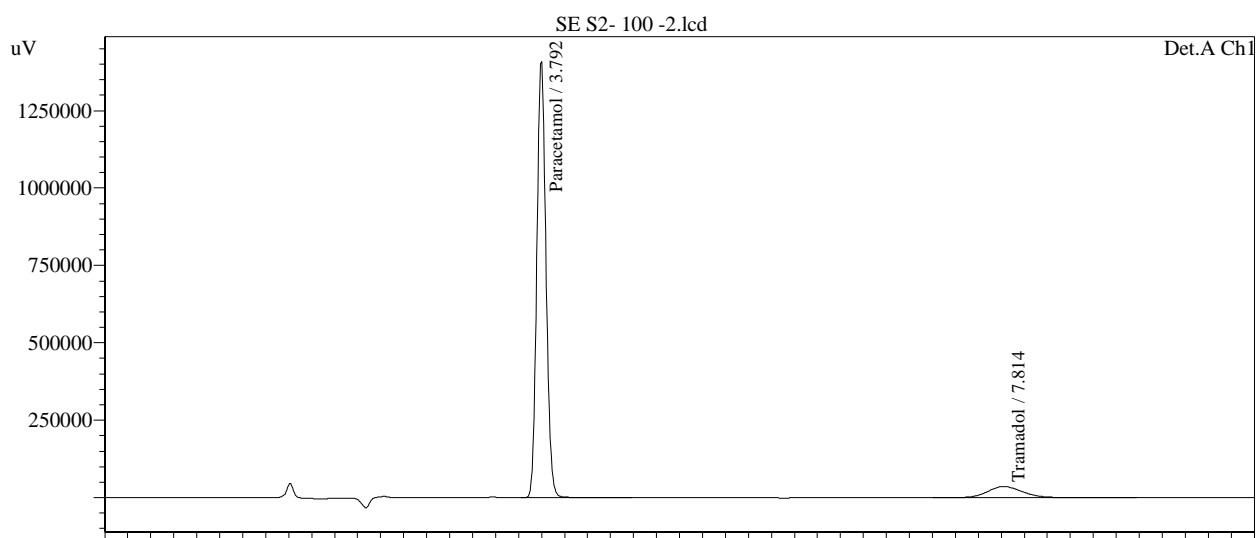
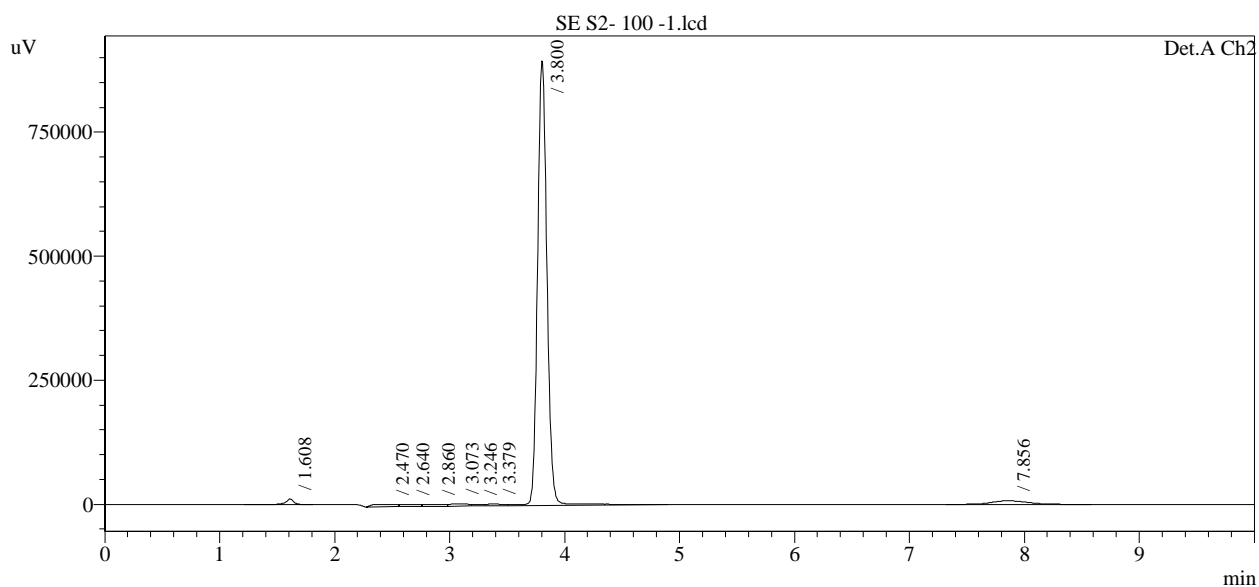
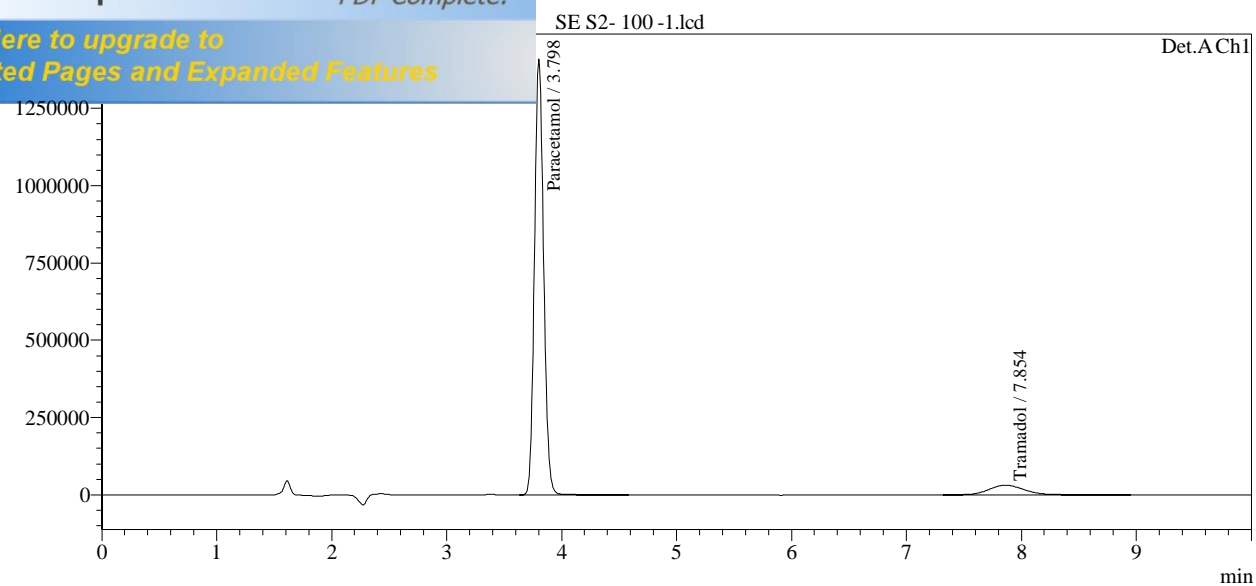
Sample Information

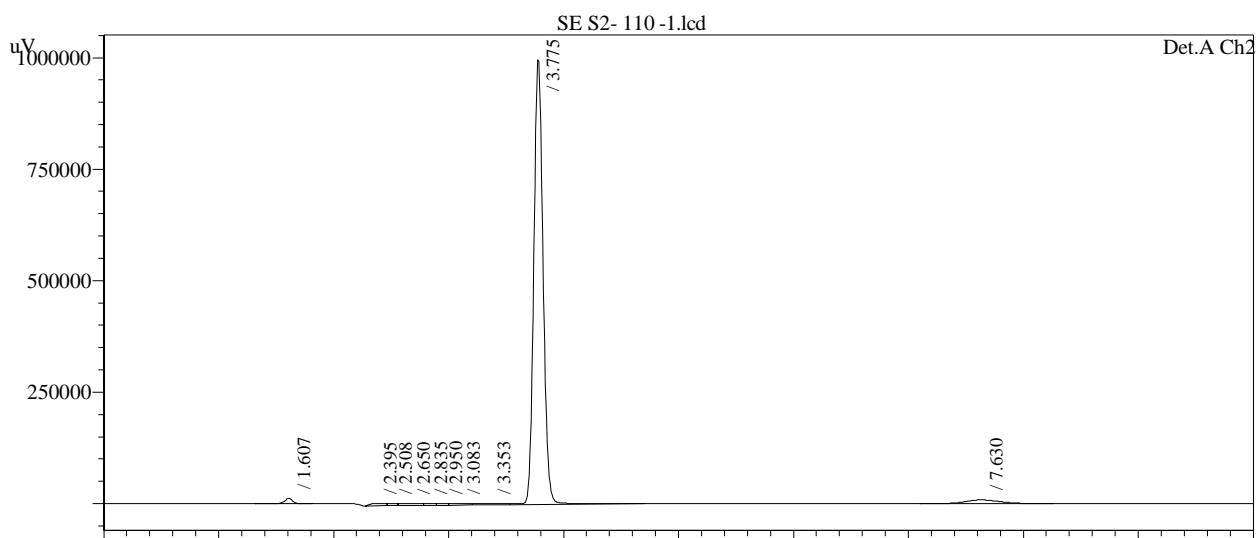
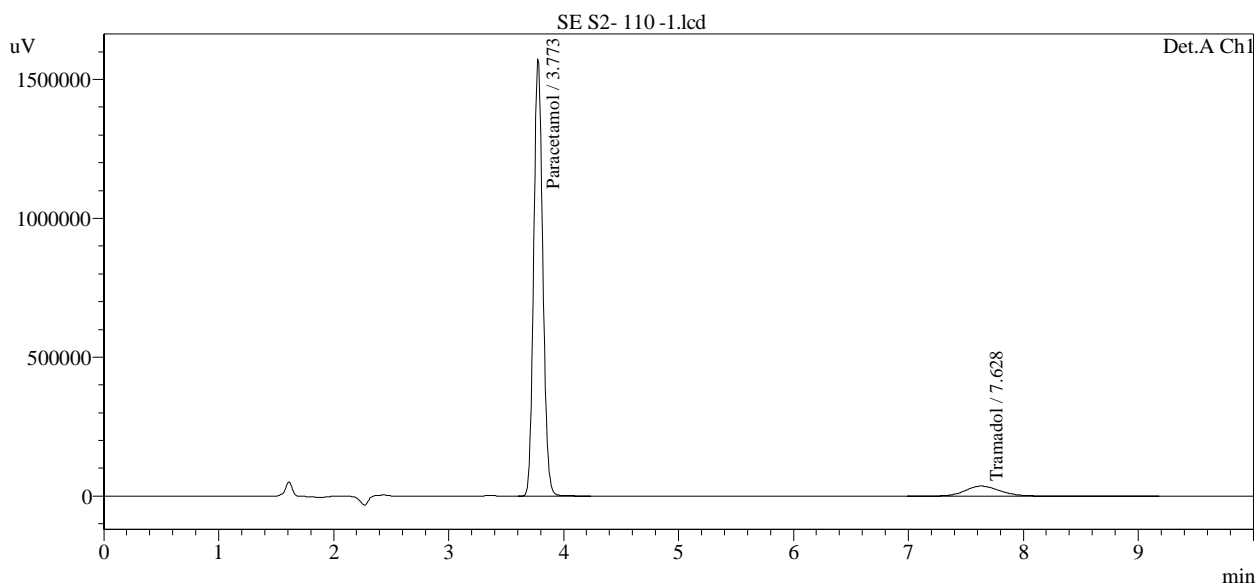
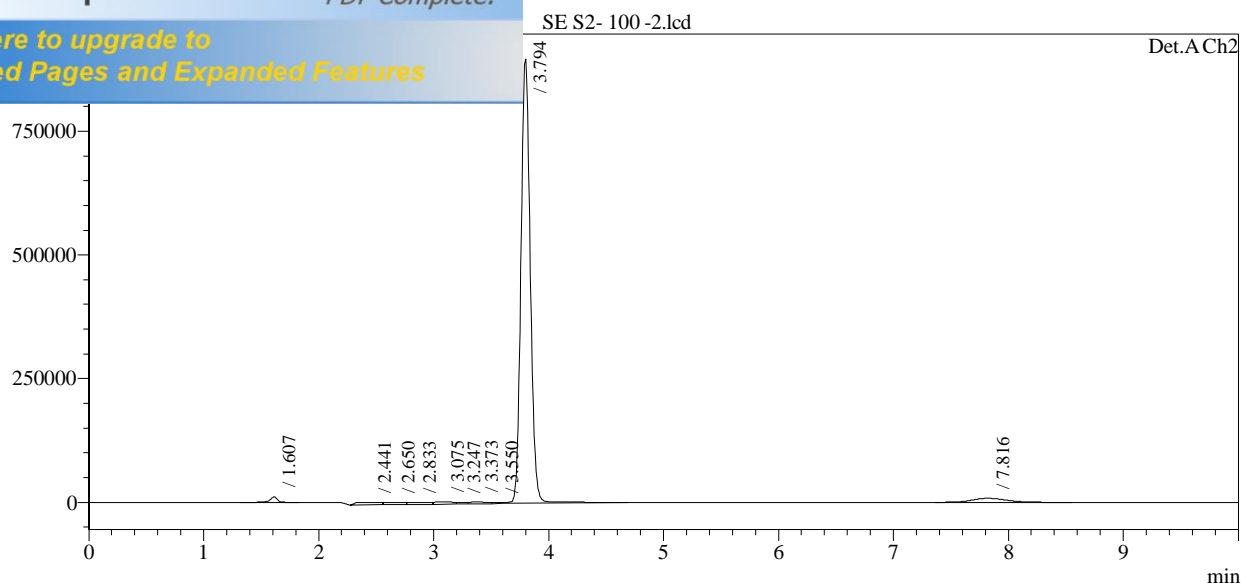
Acquired by : Admin
 Sample Name : Paracetamol et tramadol
 Sample ID : SE 3
 Tray# : 11
 Vail# : 2
 Injection Volume : 20 uL
 Data Filename : SE S2-80 -1.lcd
 Method Filename : Paracétamol et tramadol.lcm
 Batch Filename : Paracetamol tramadol serie 2 R.lcb
 Report Filename : Default.lcr
 Date Acquired : 10/05/2017 20:03:28
 Data Processed : 11/05/2017 12:48:28

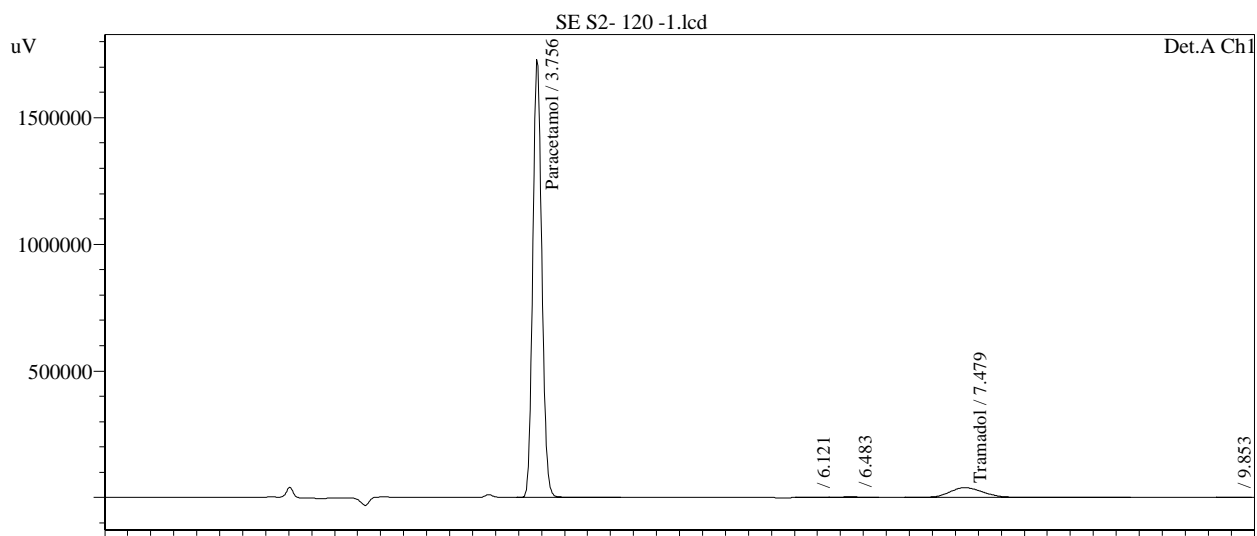
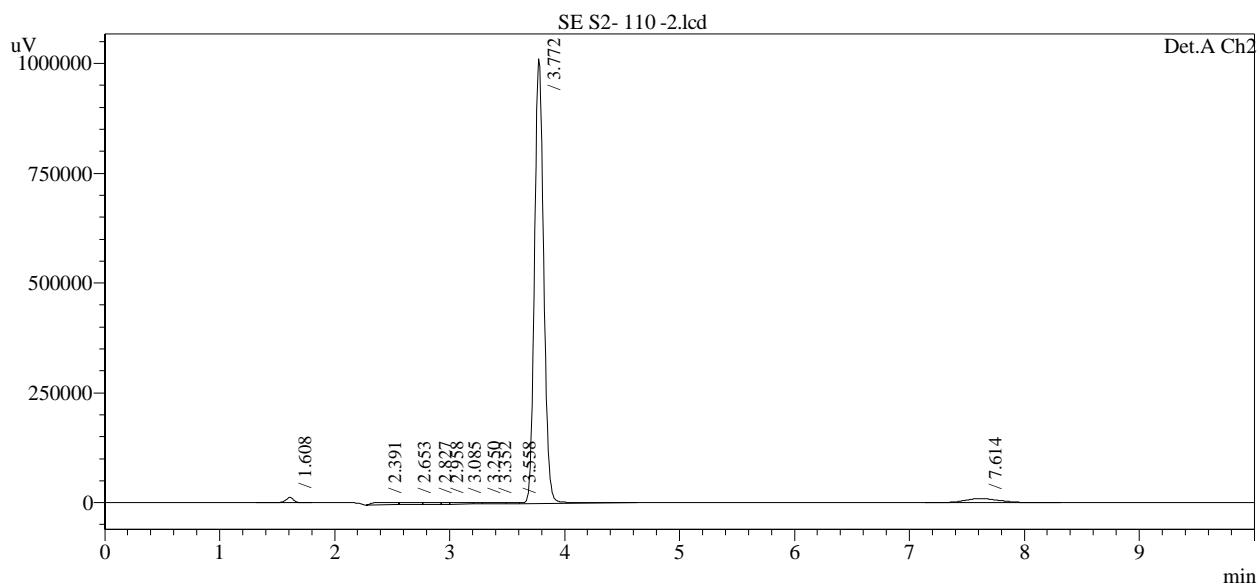
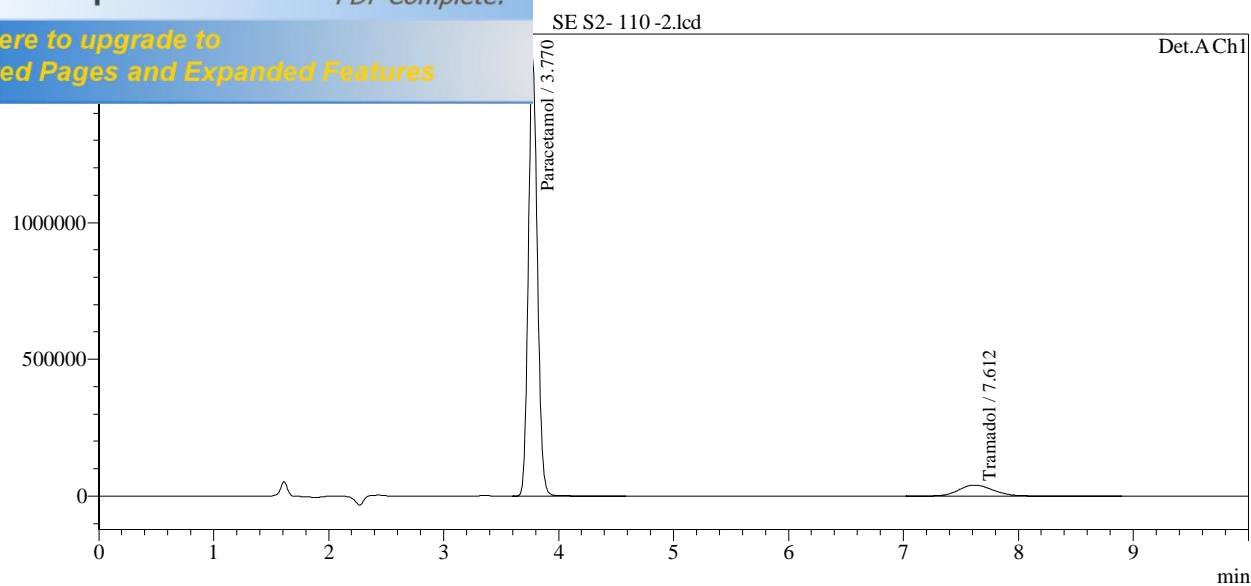


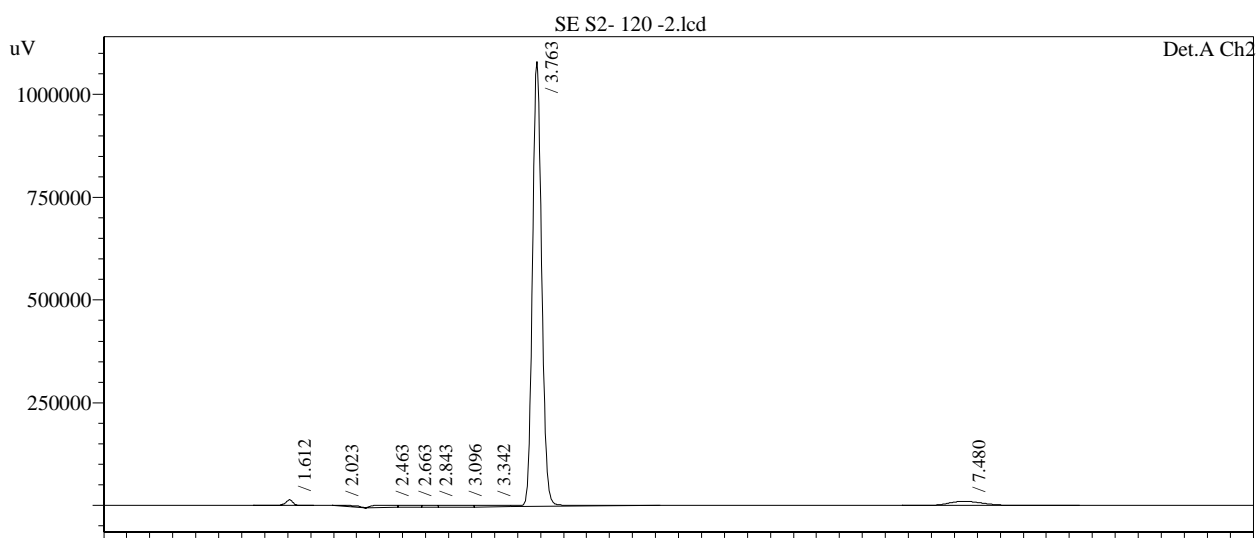
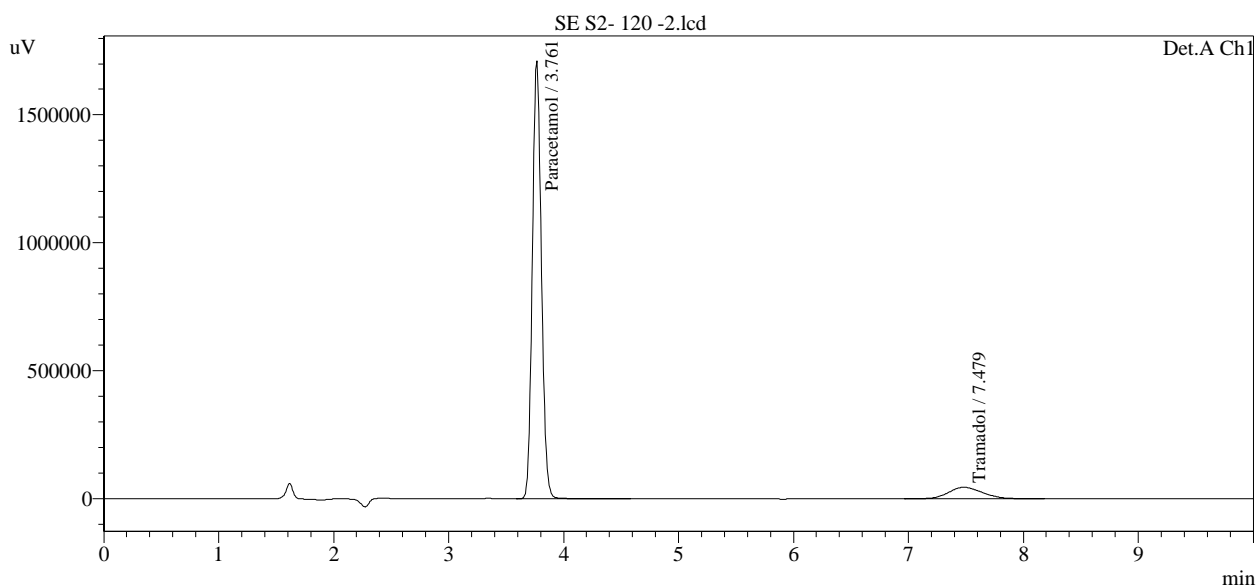
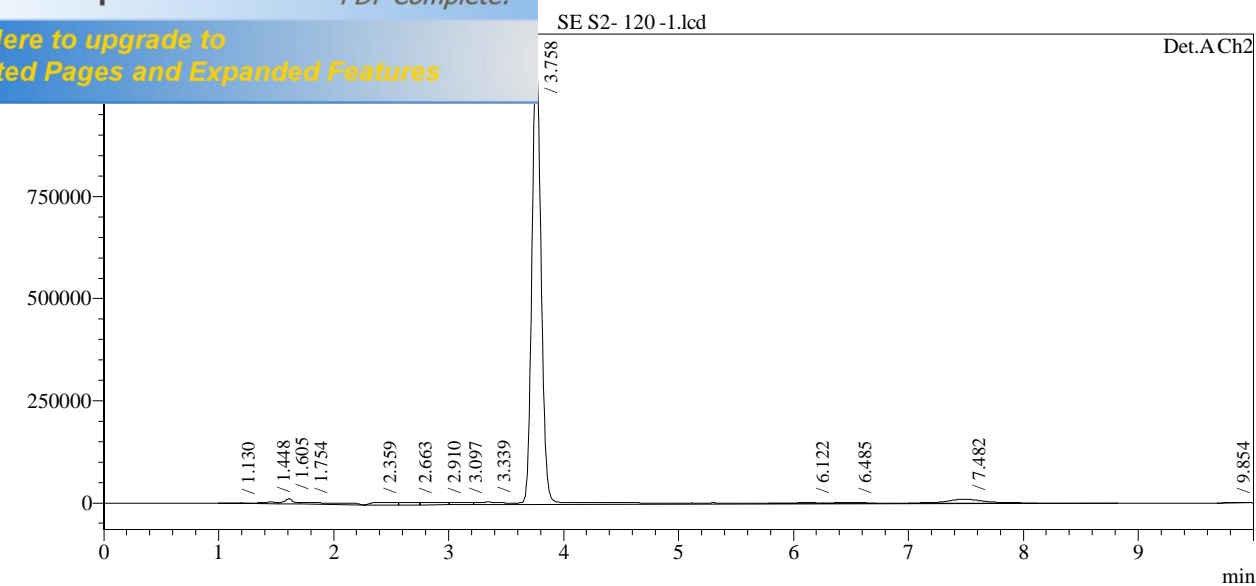


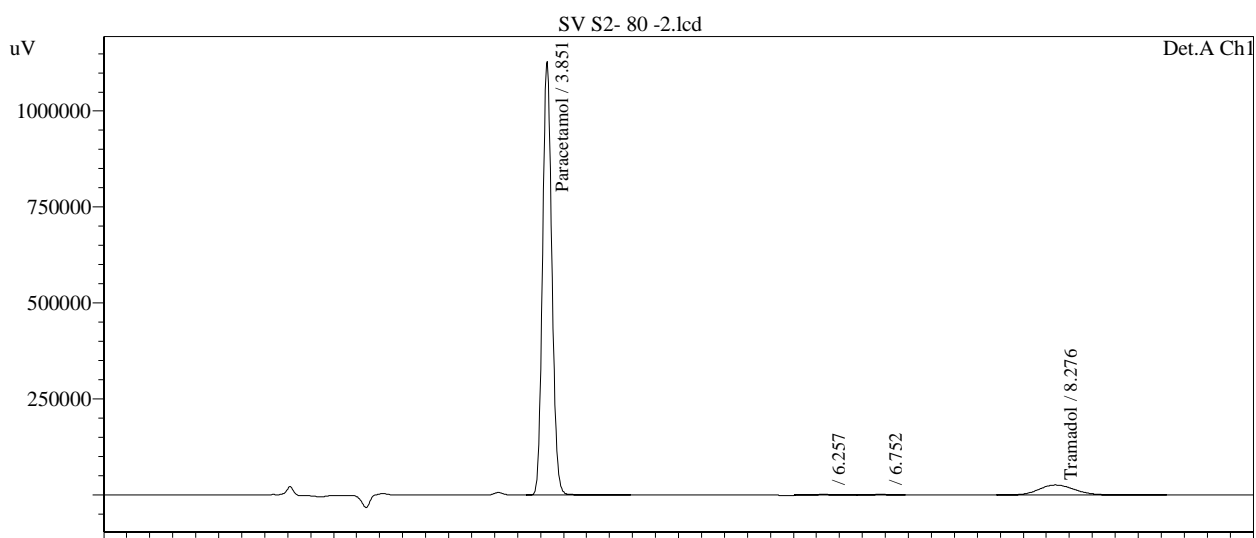
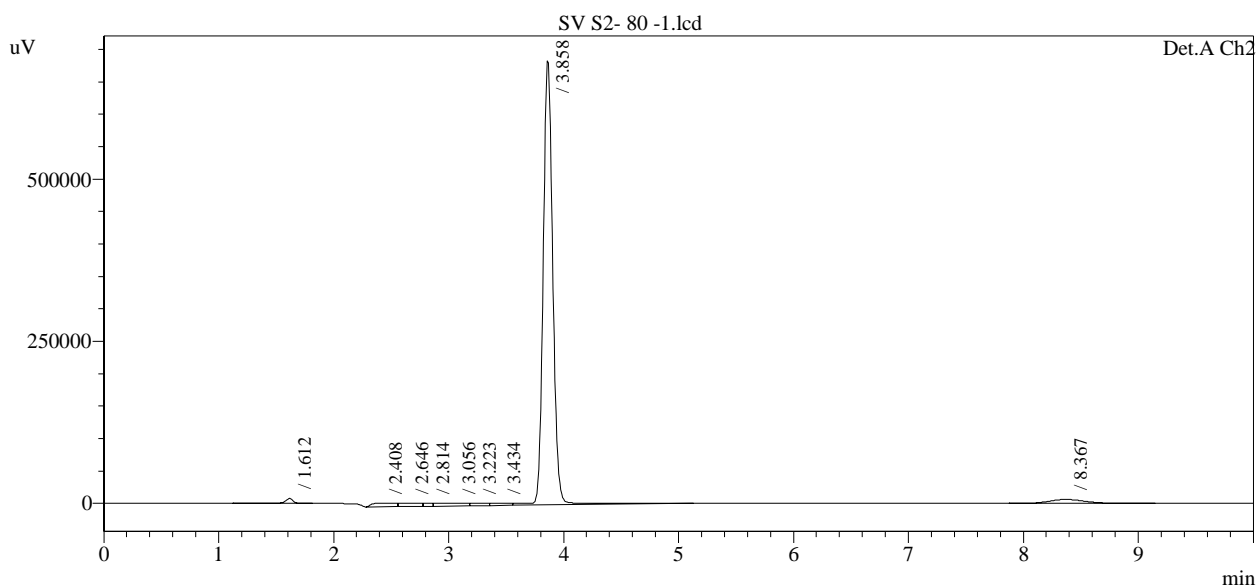
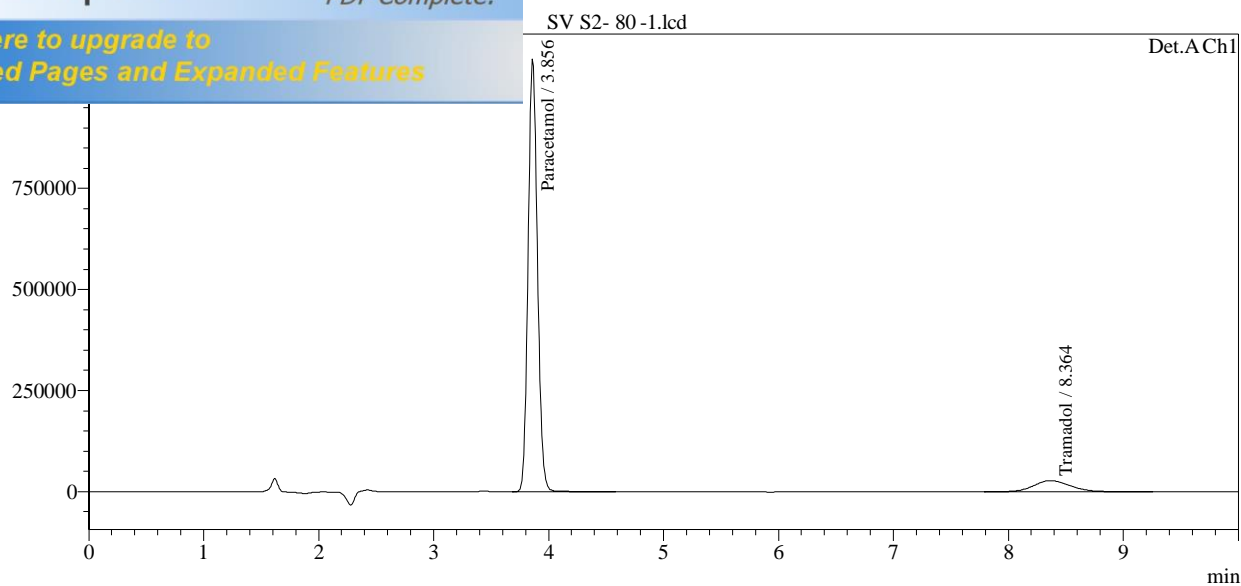


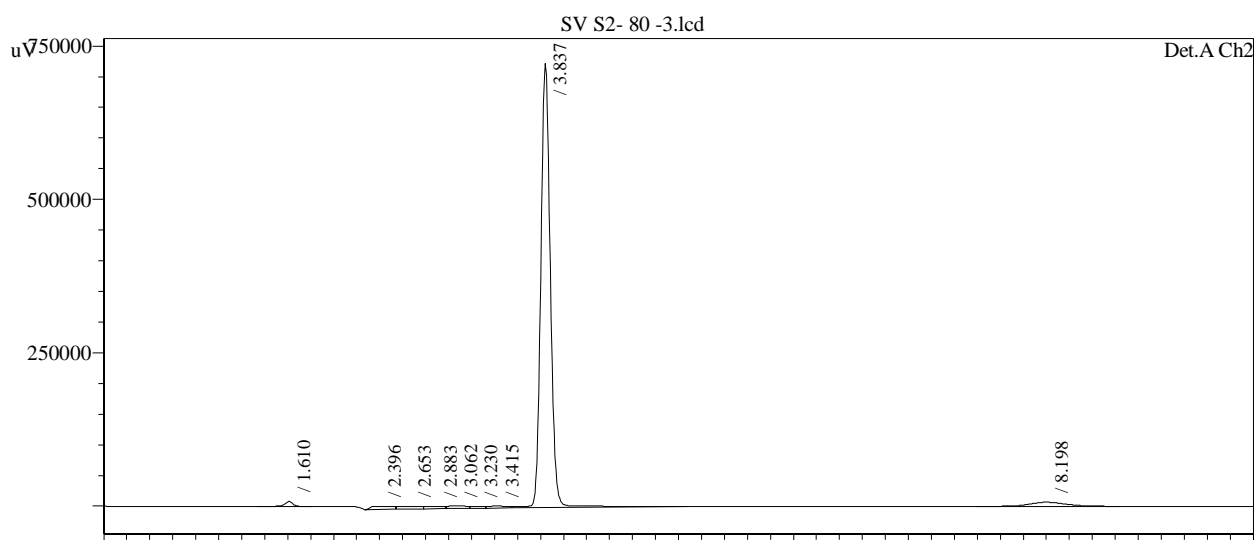
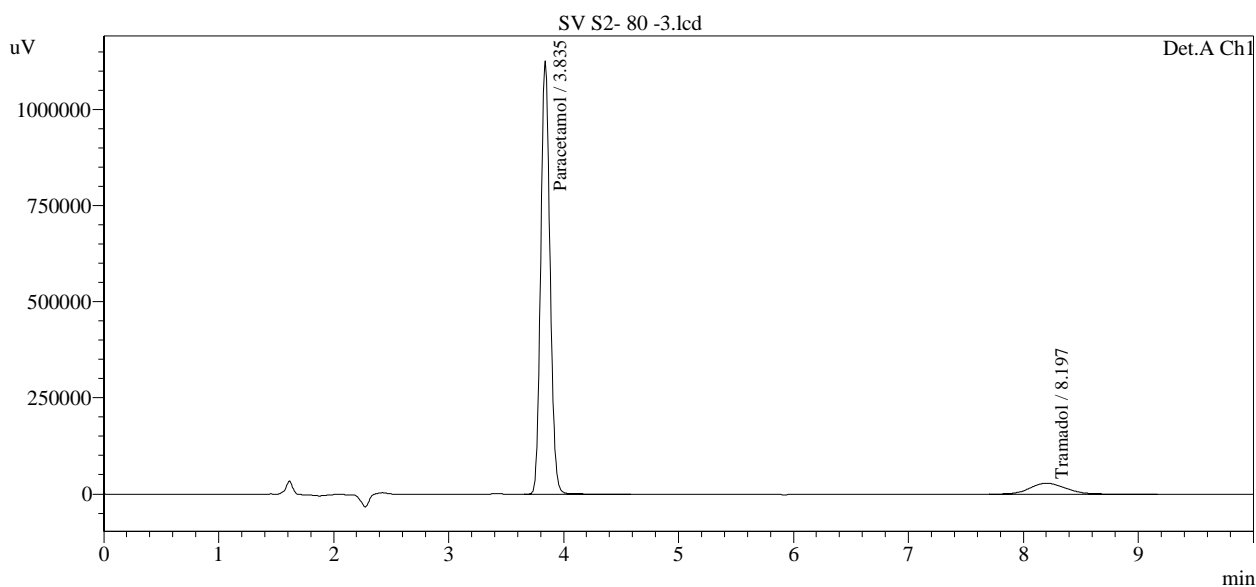
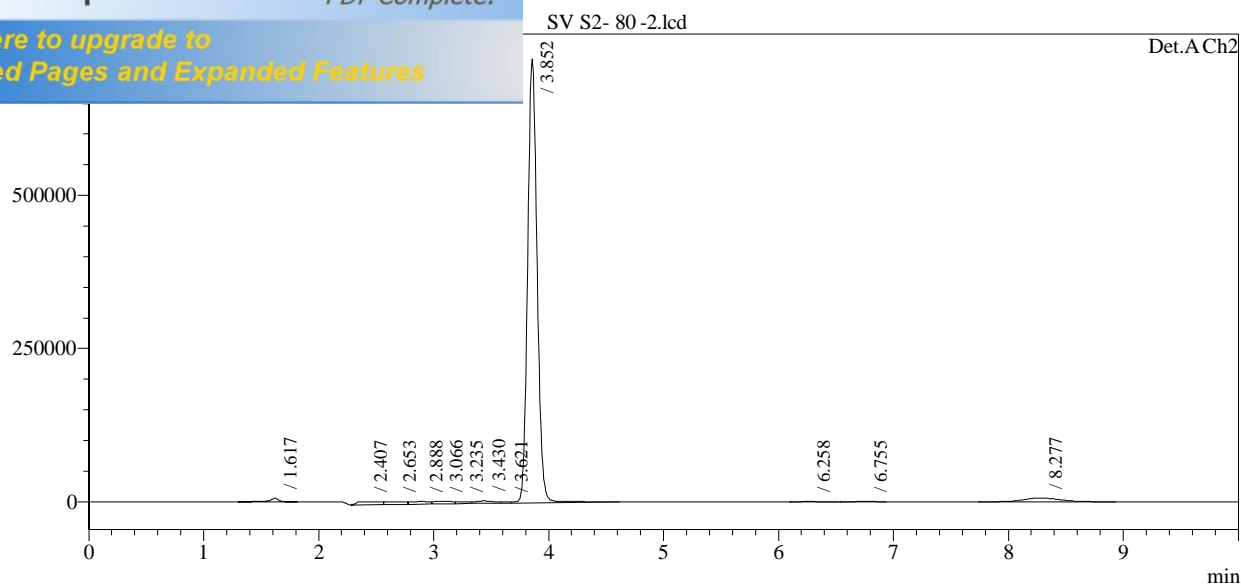


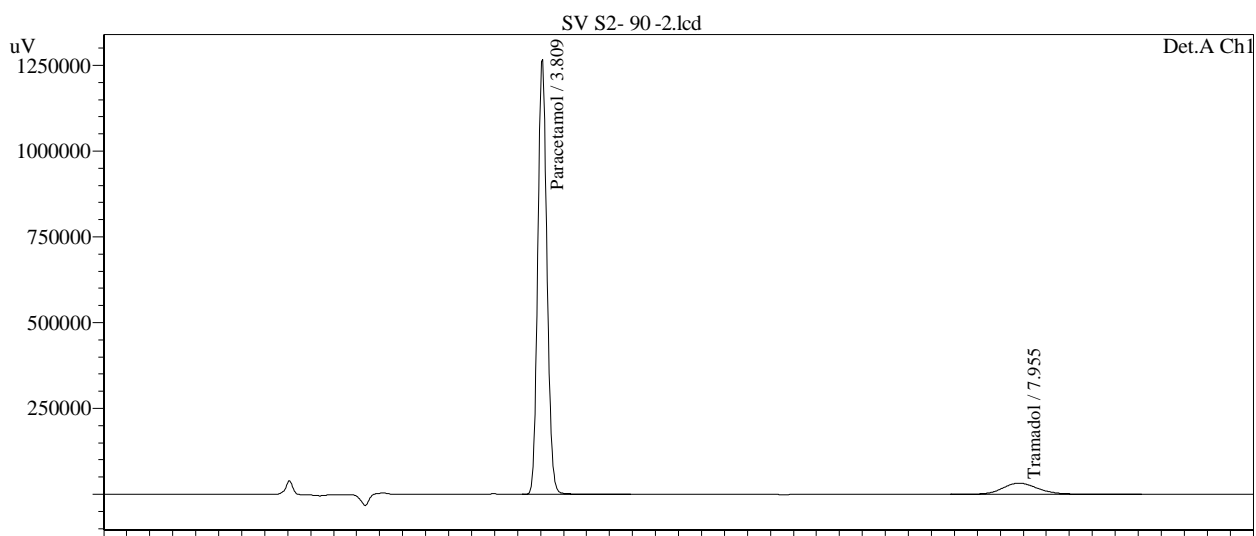
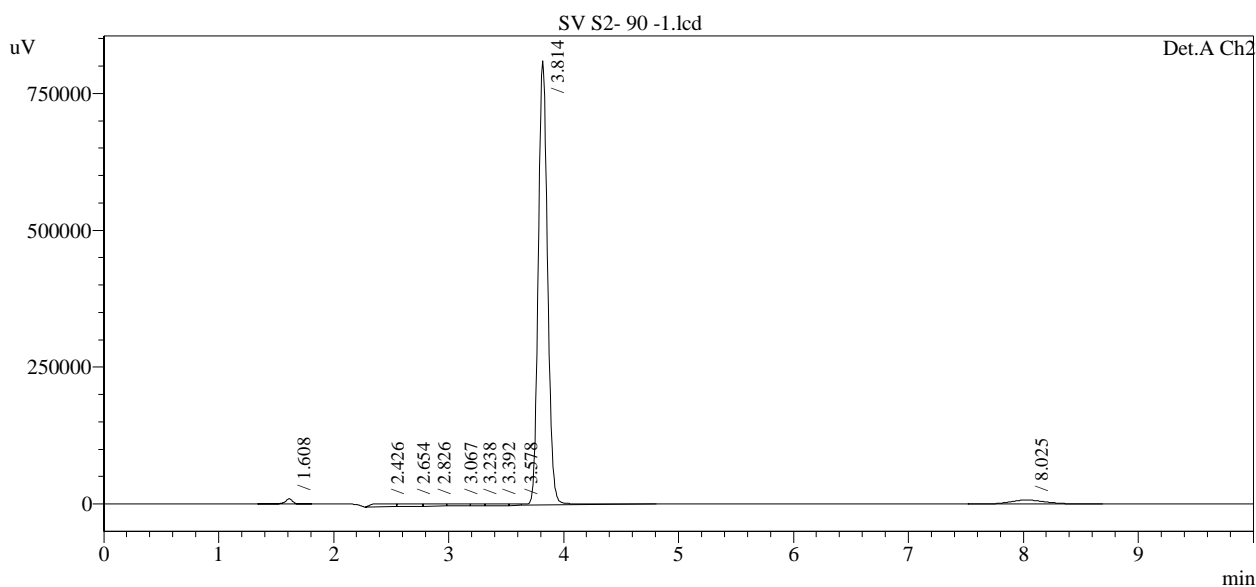
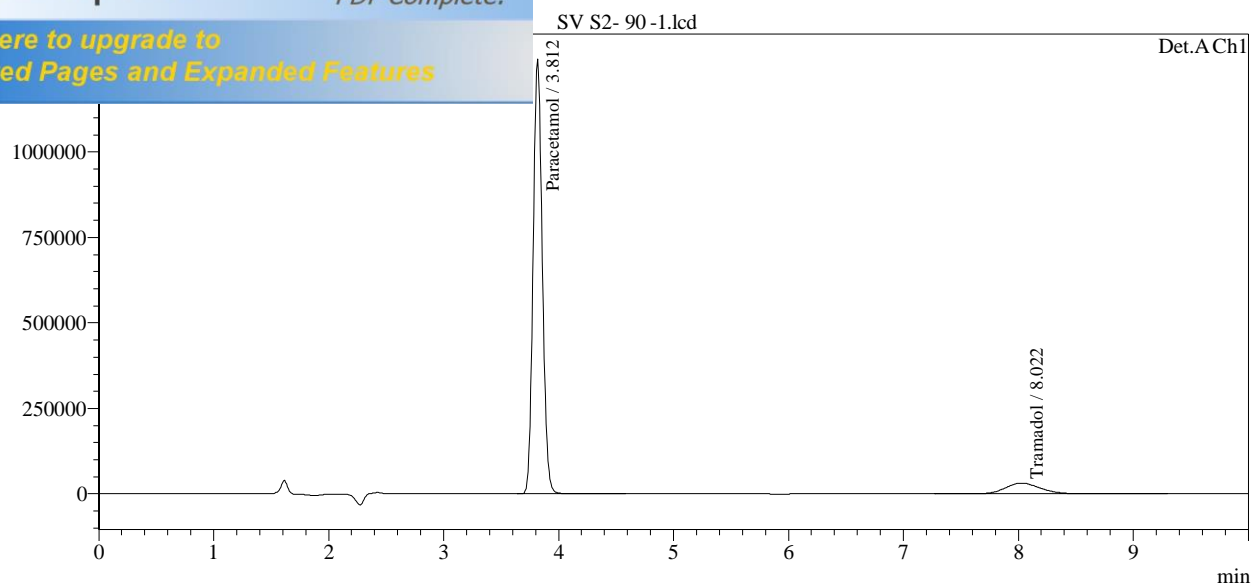


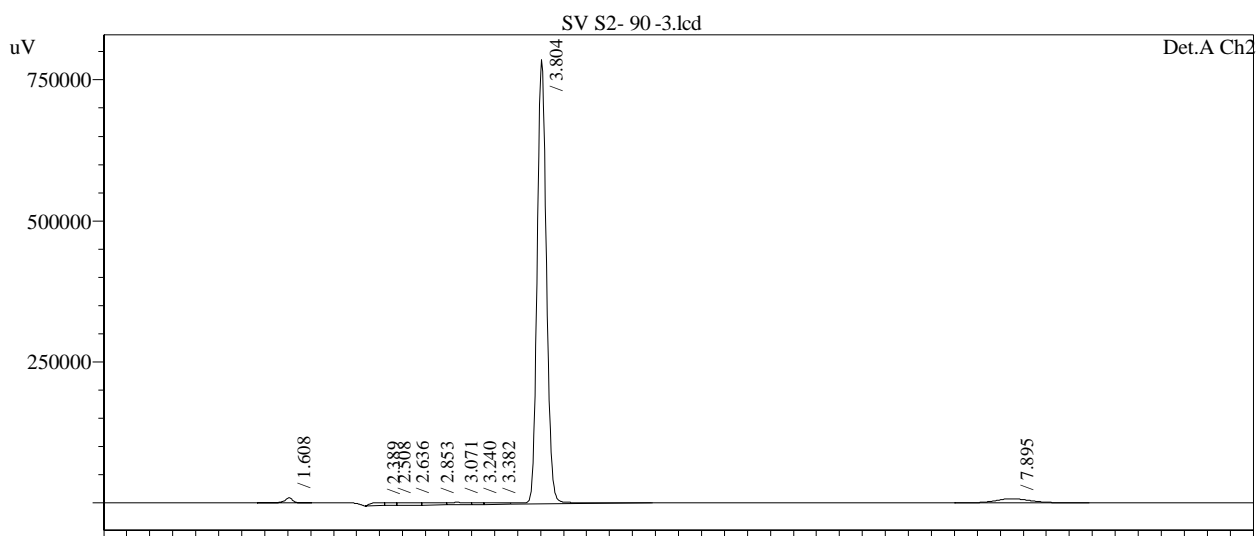
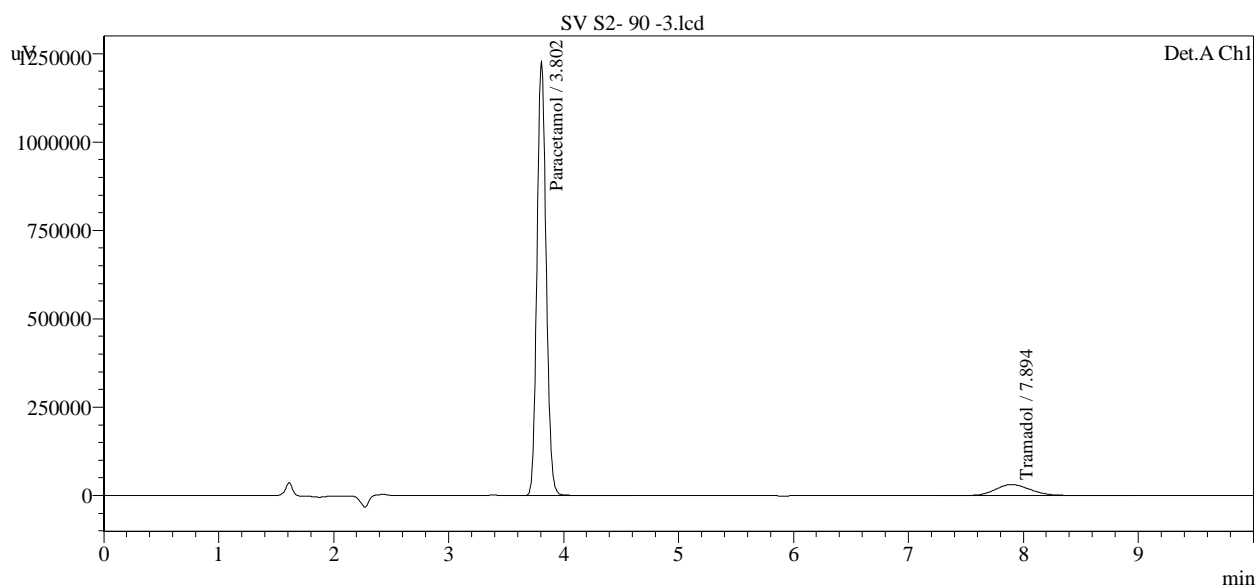
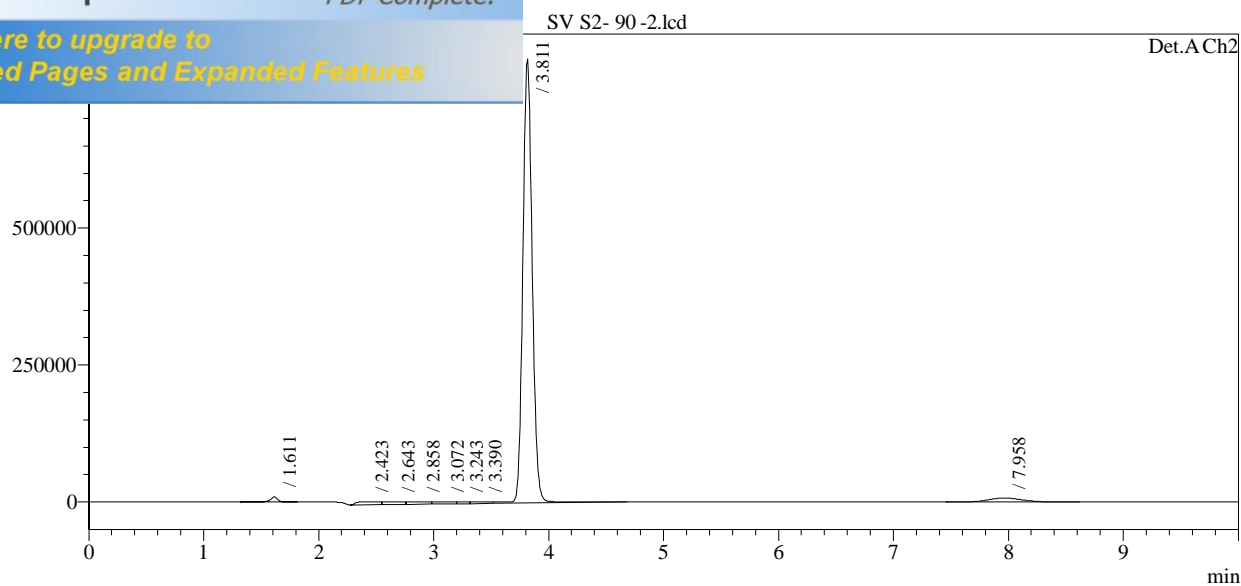


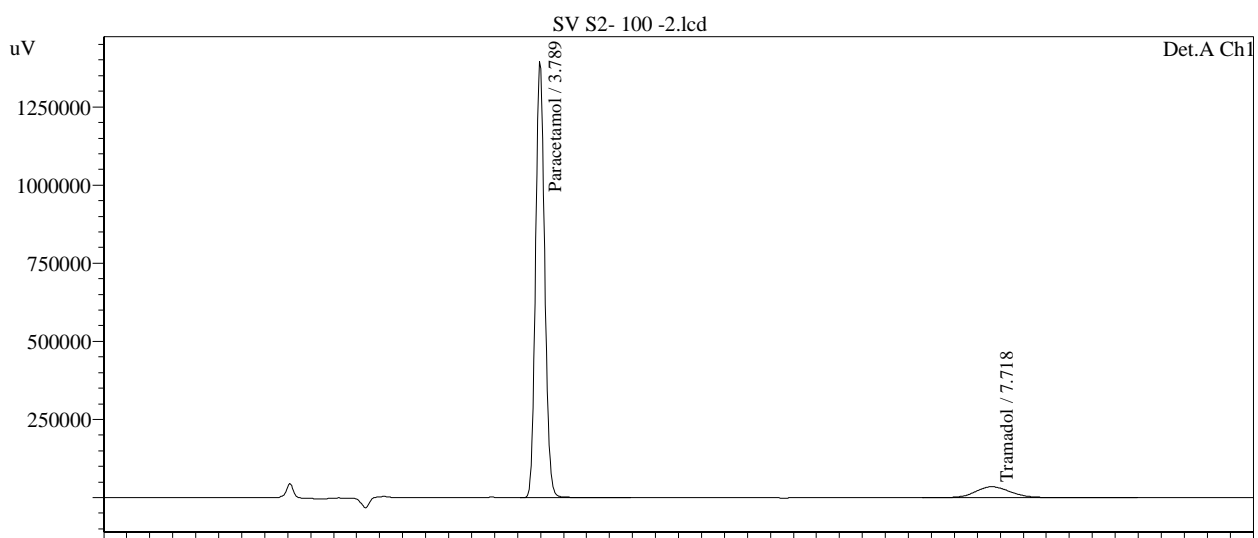
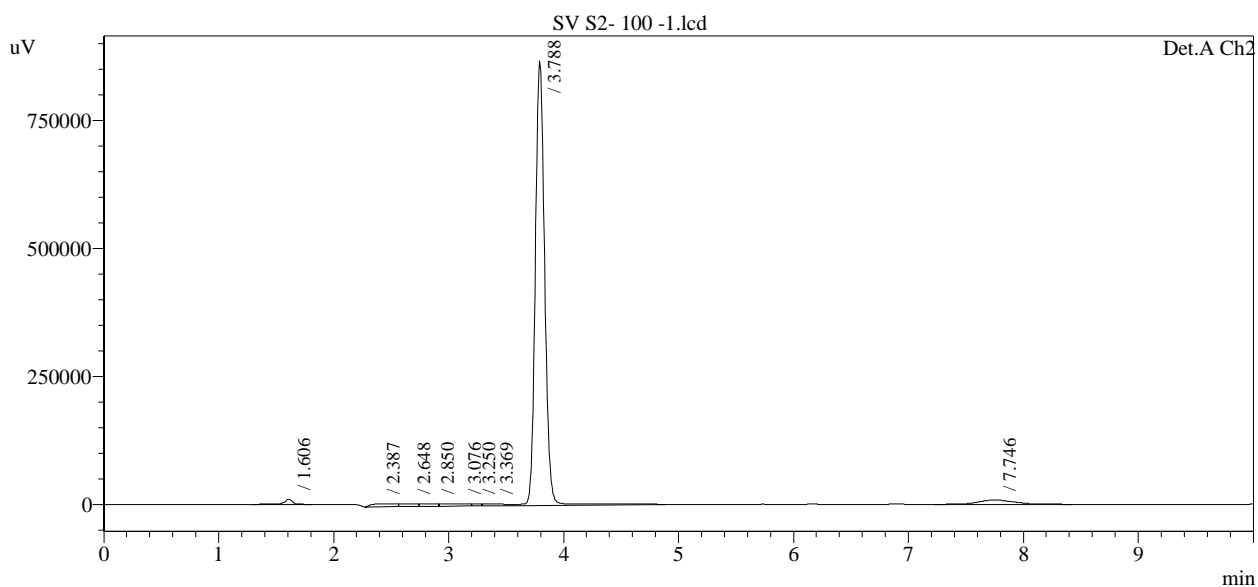
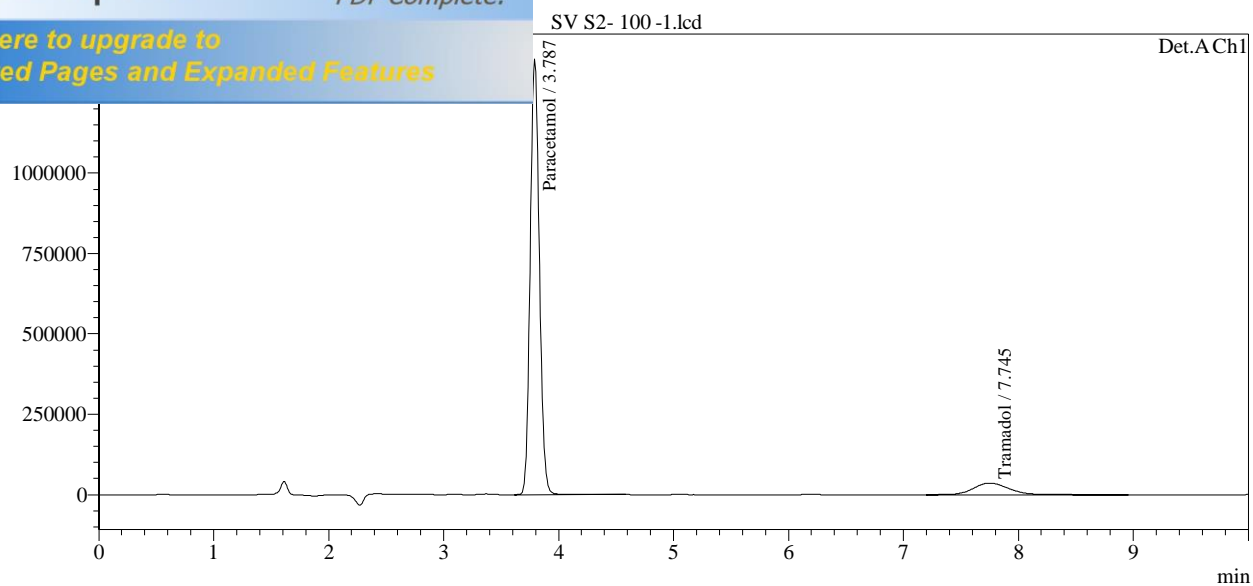


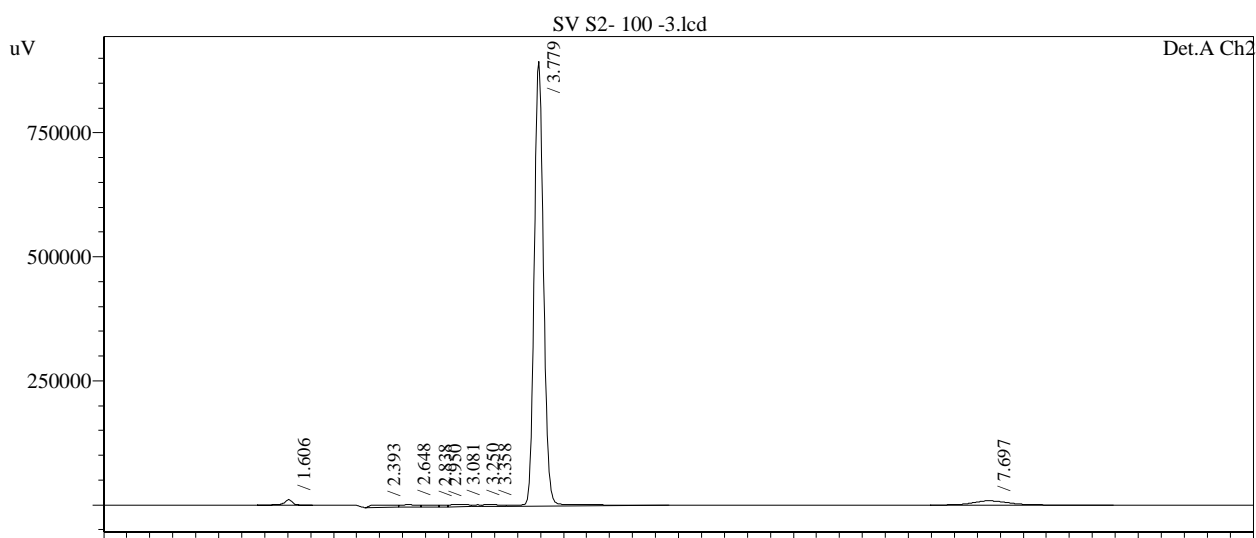
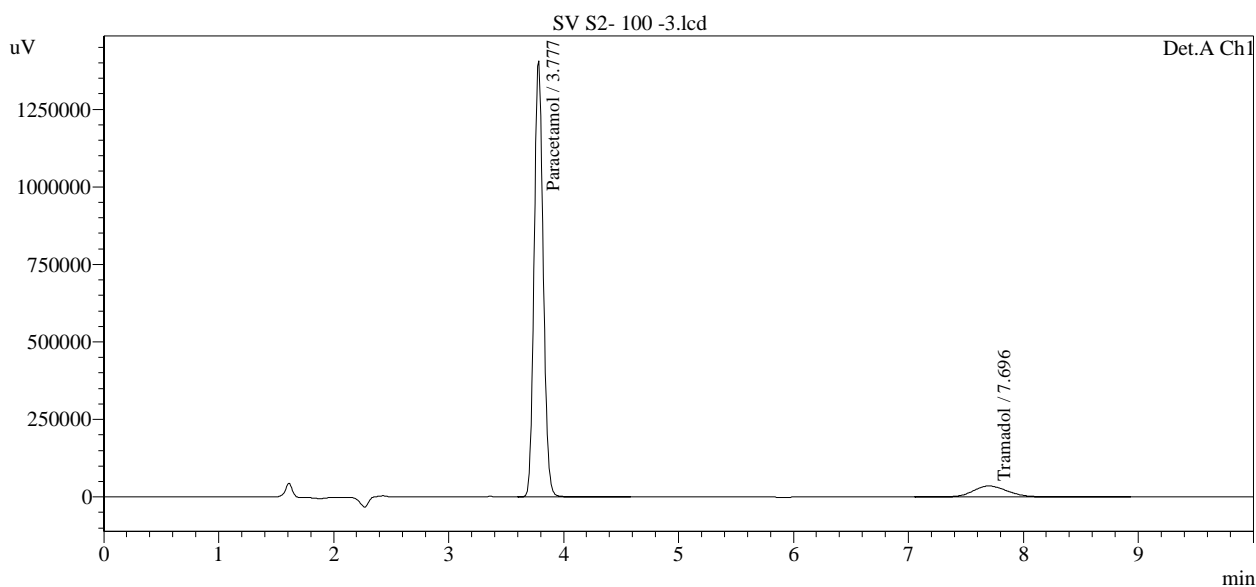
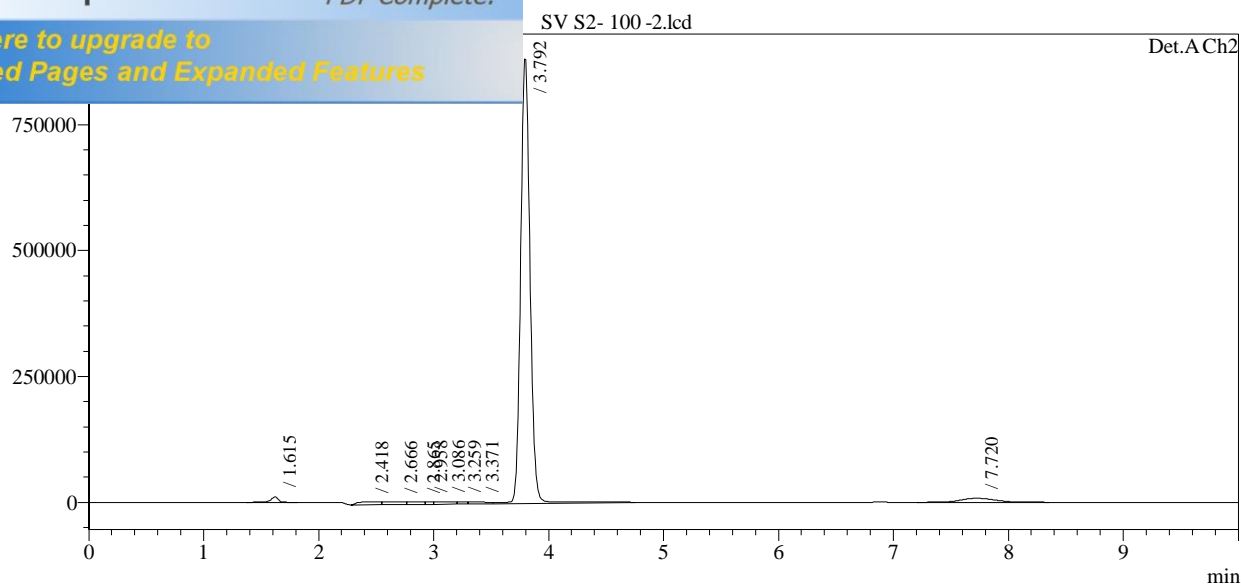


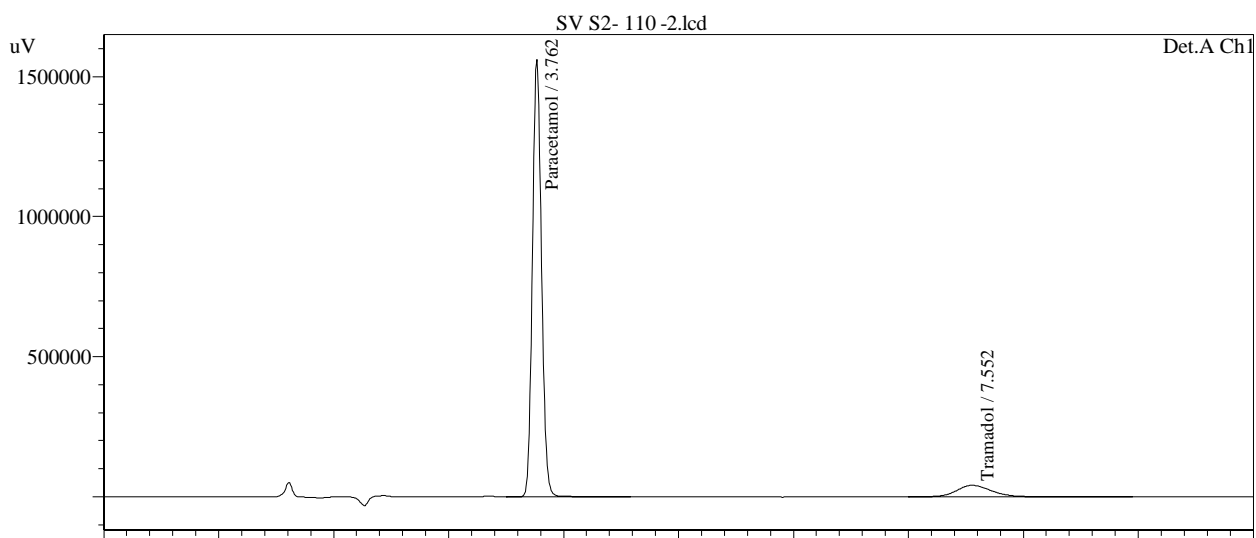
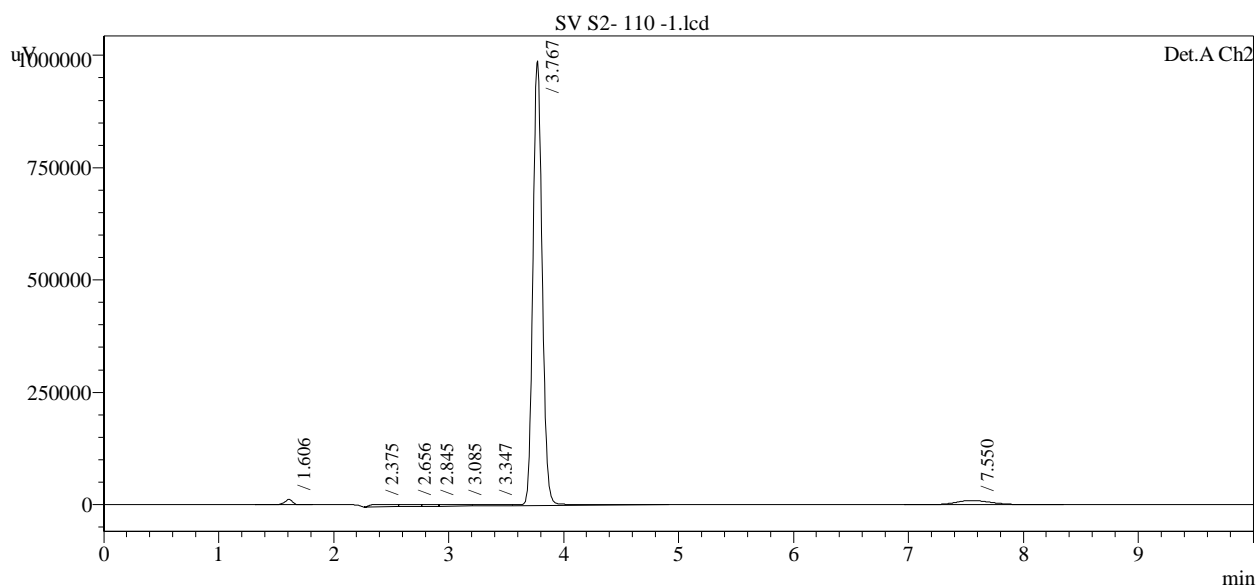
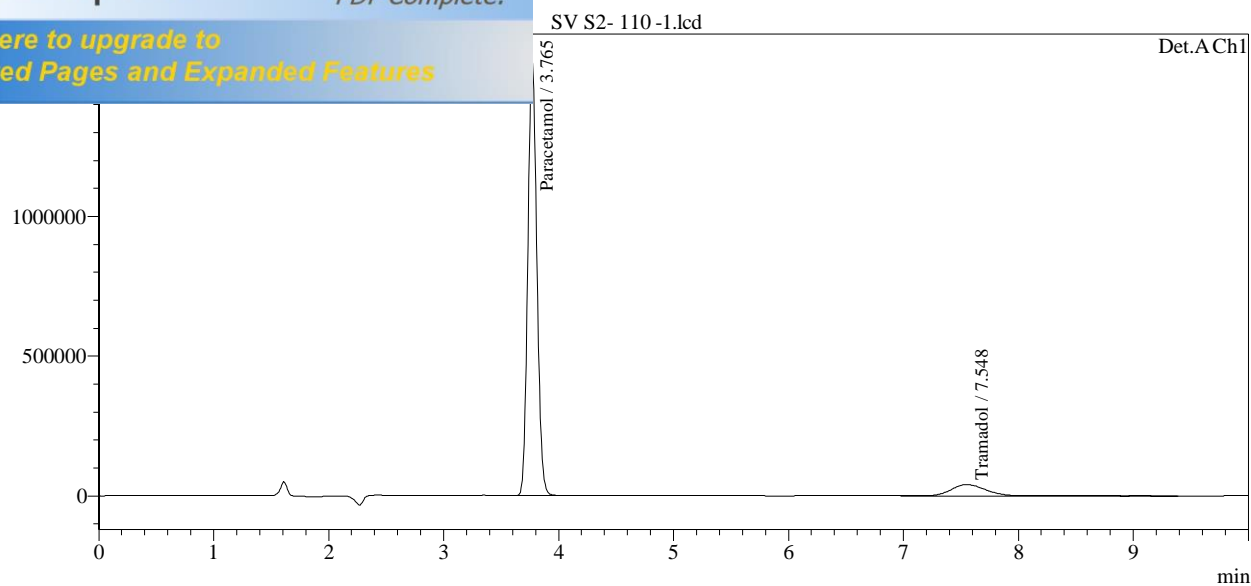


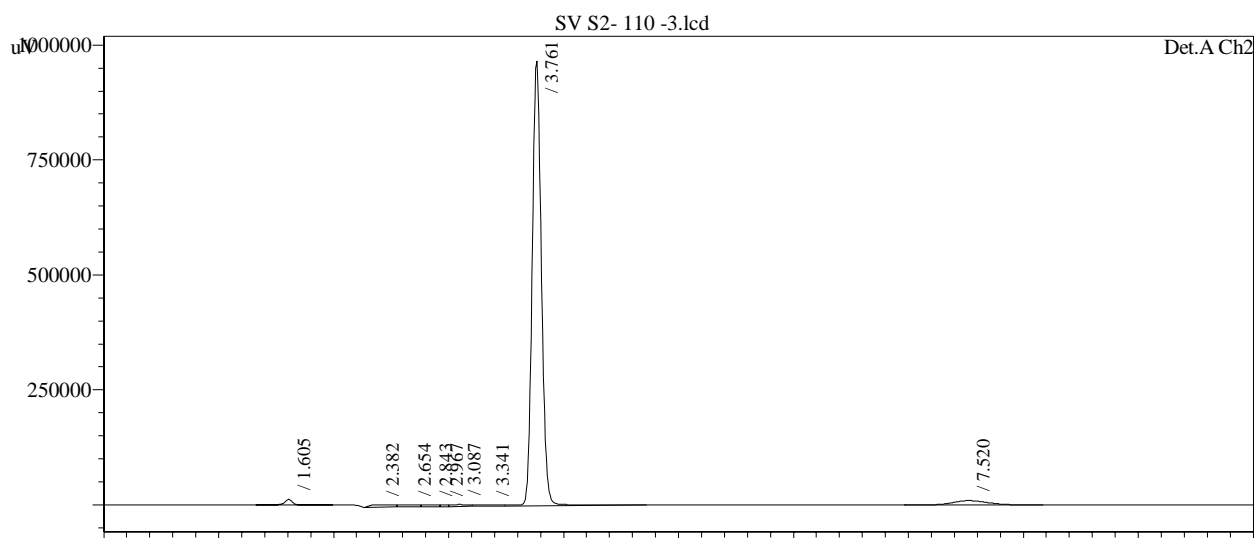
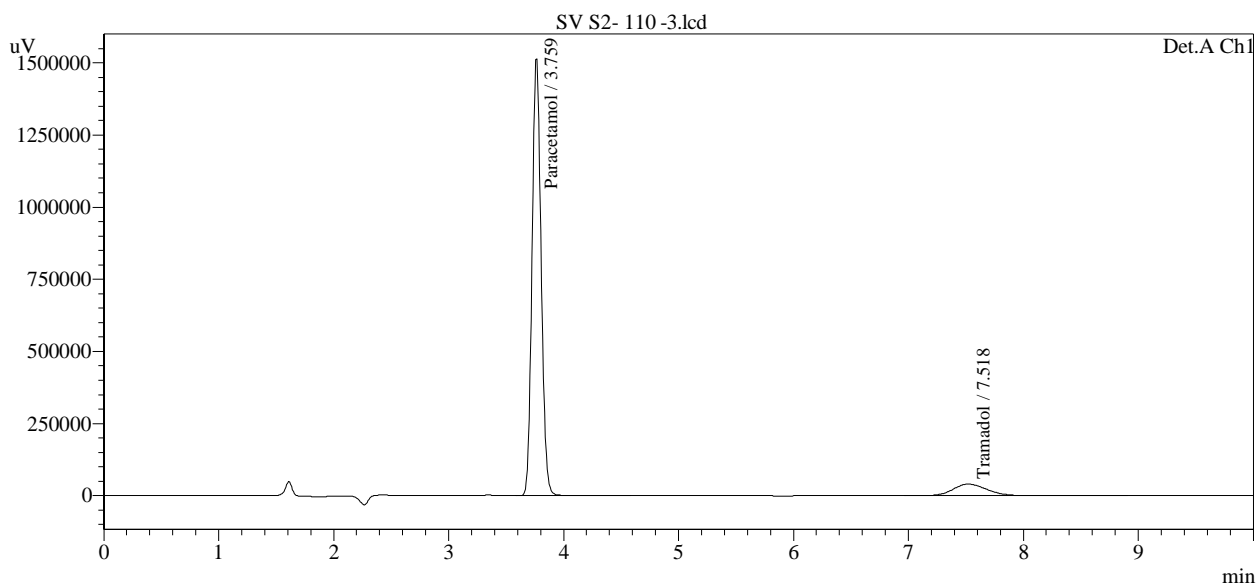
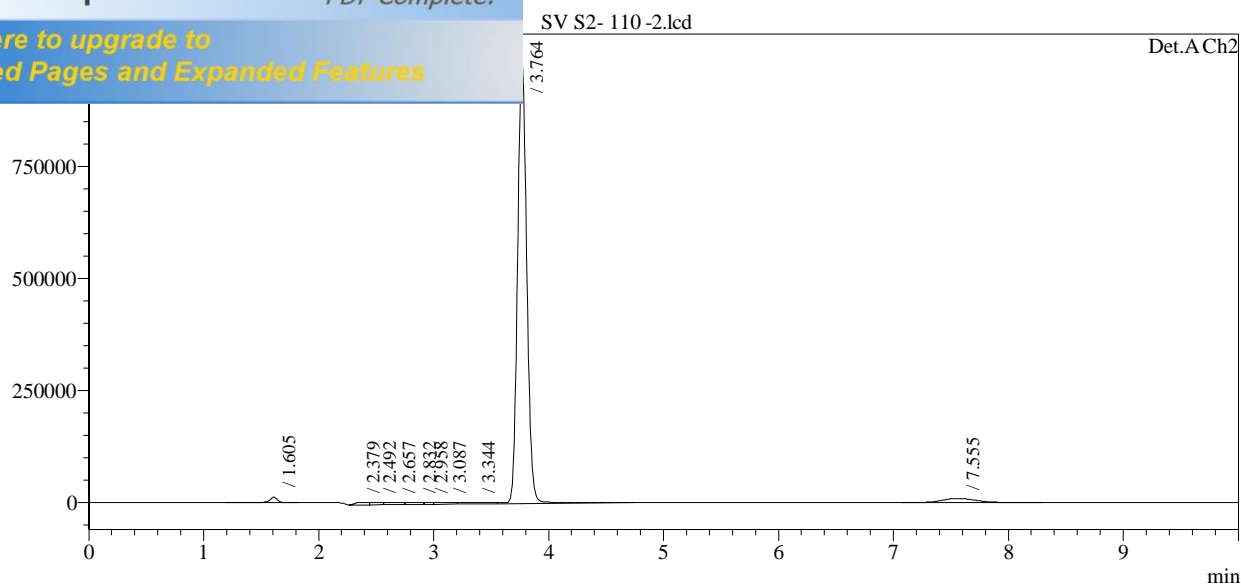


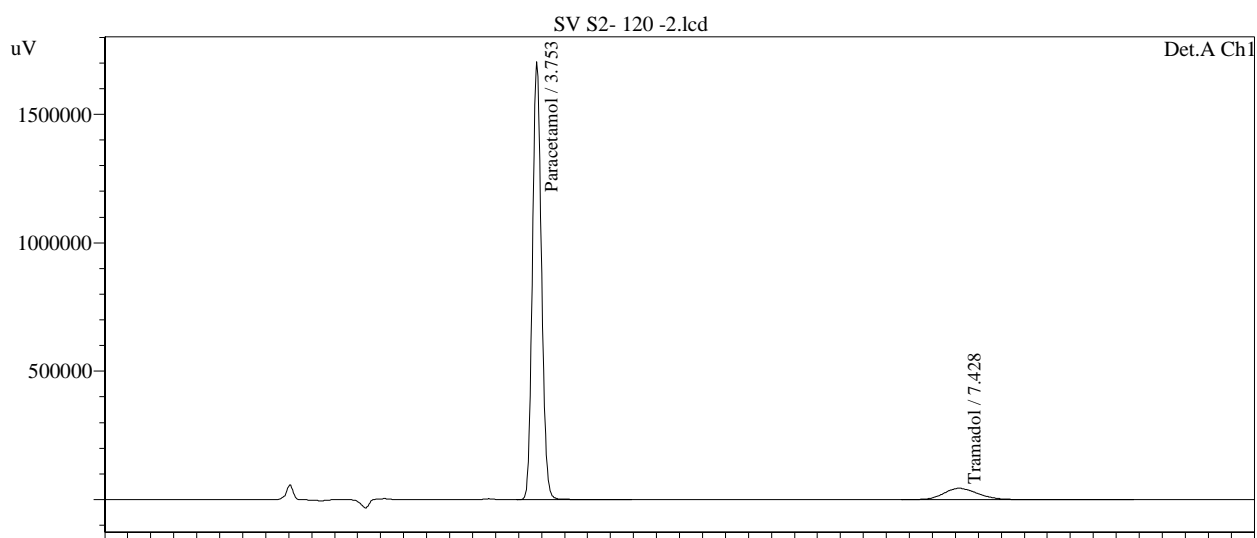
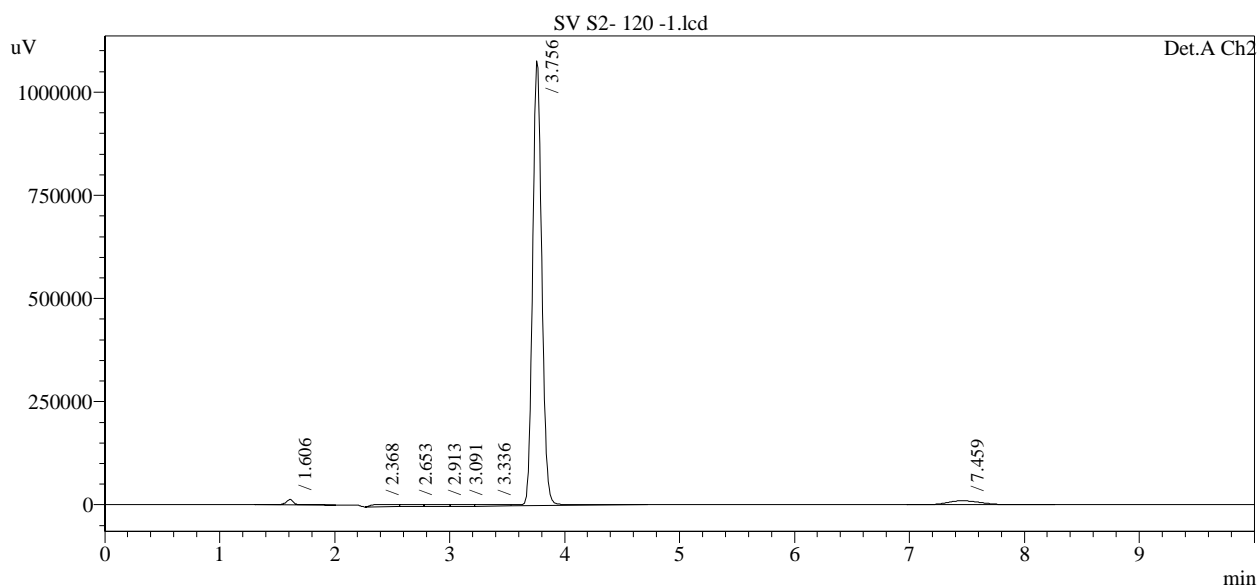
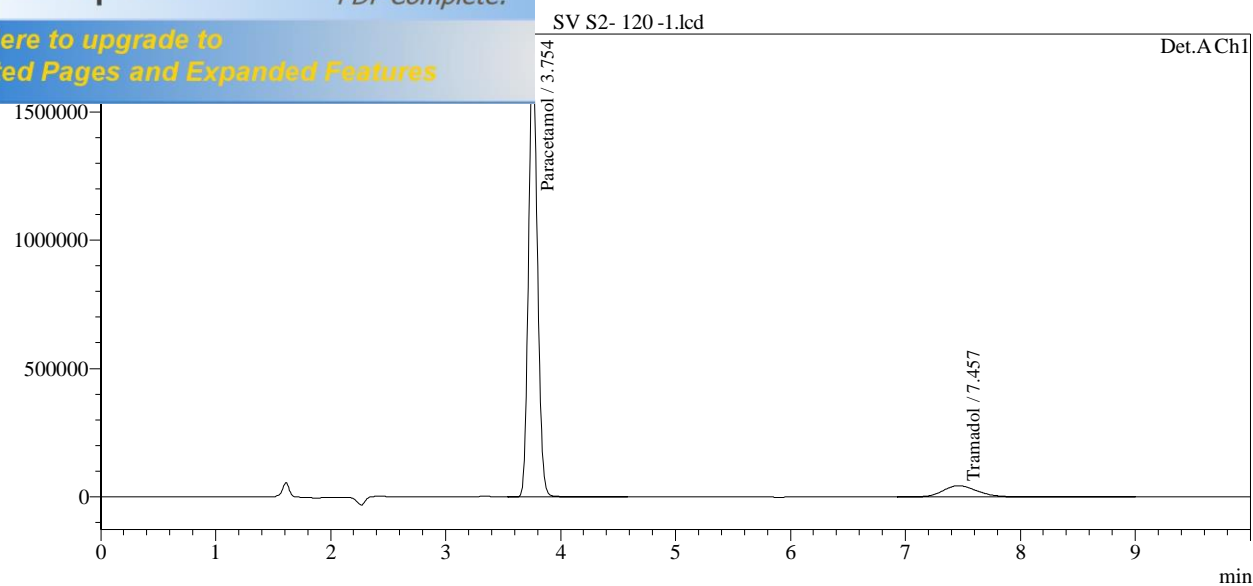


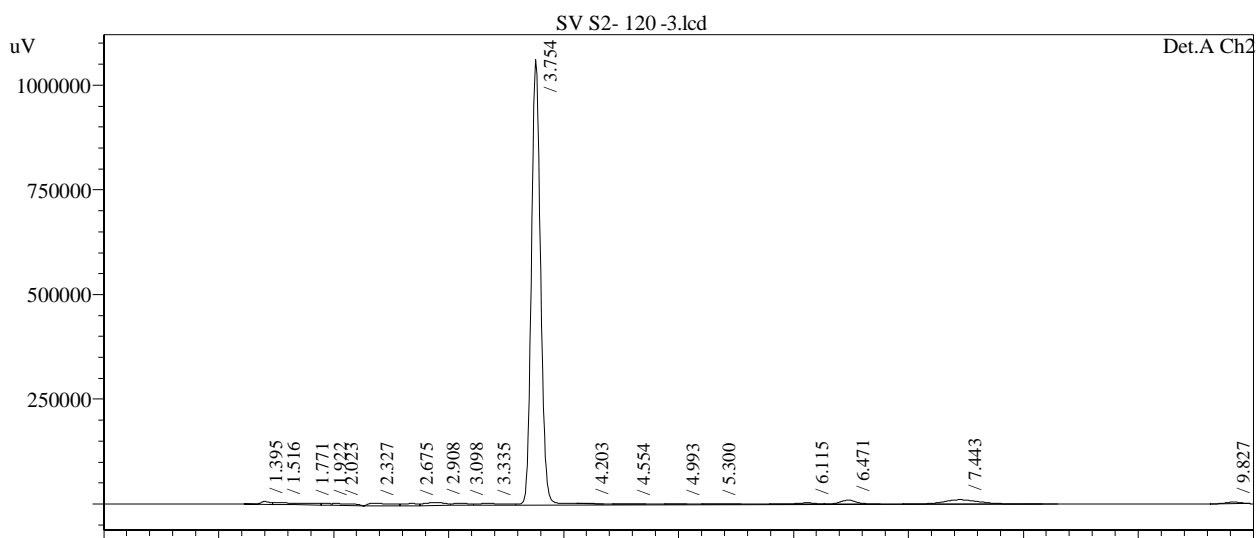
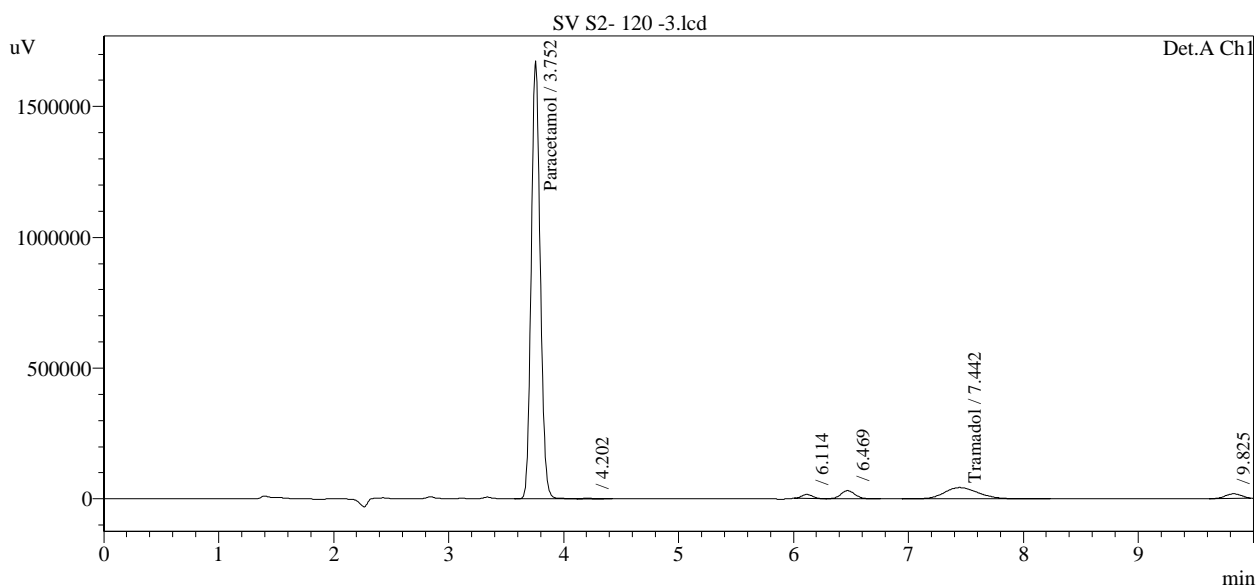
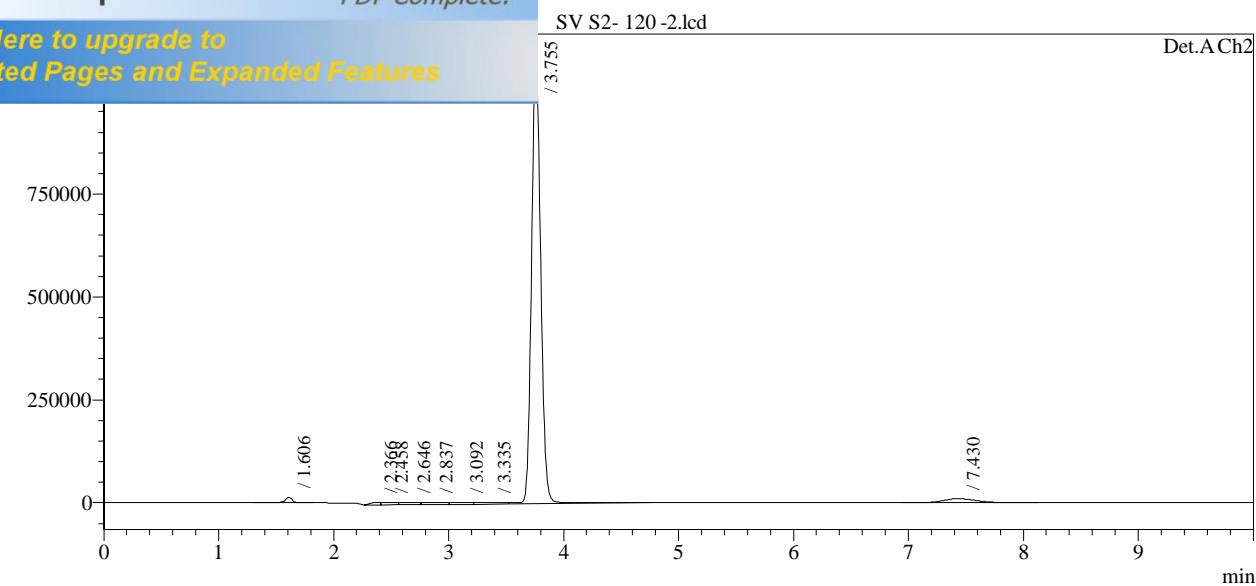


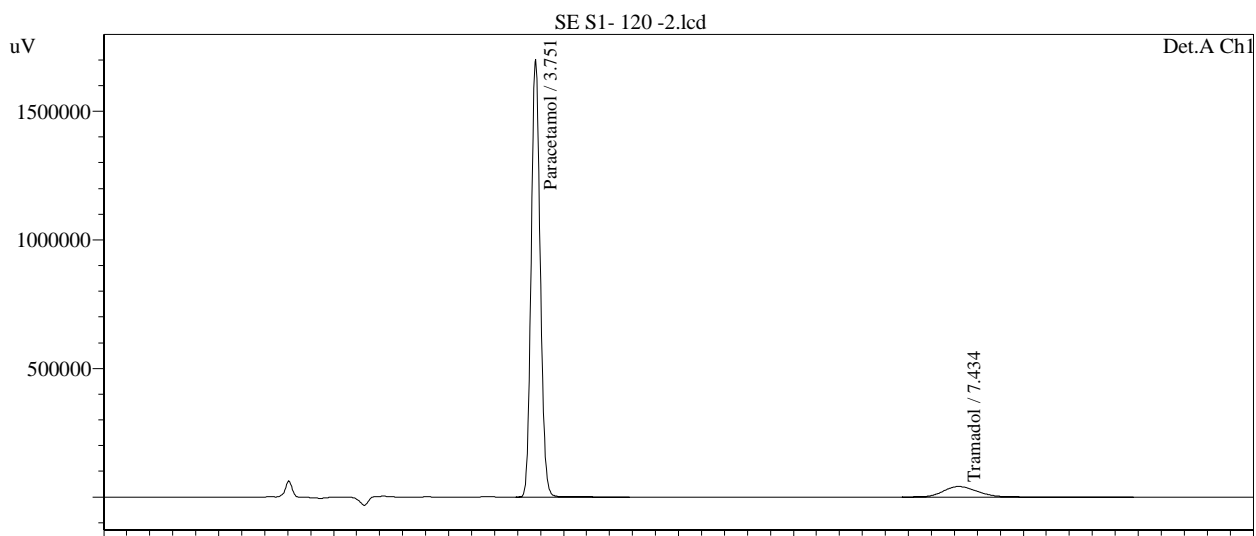
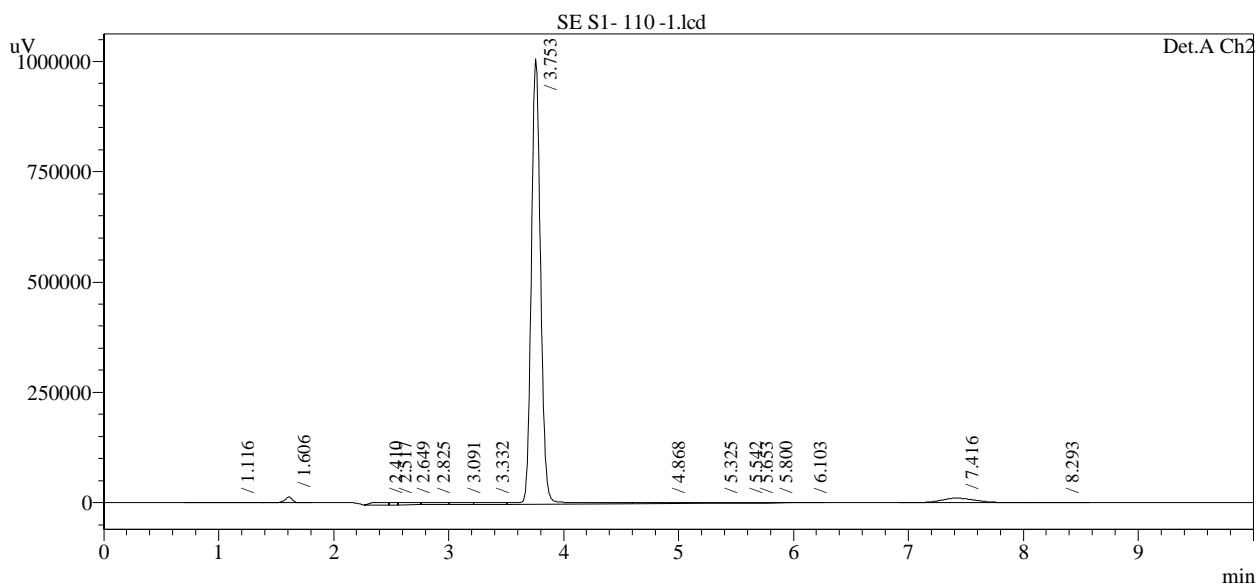
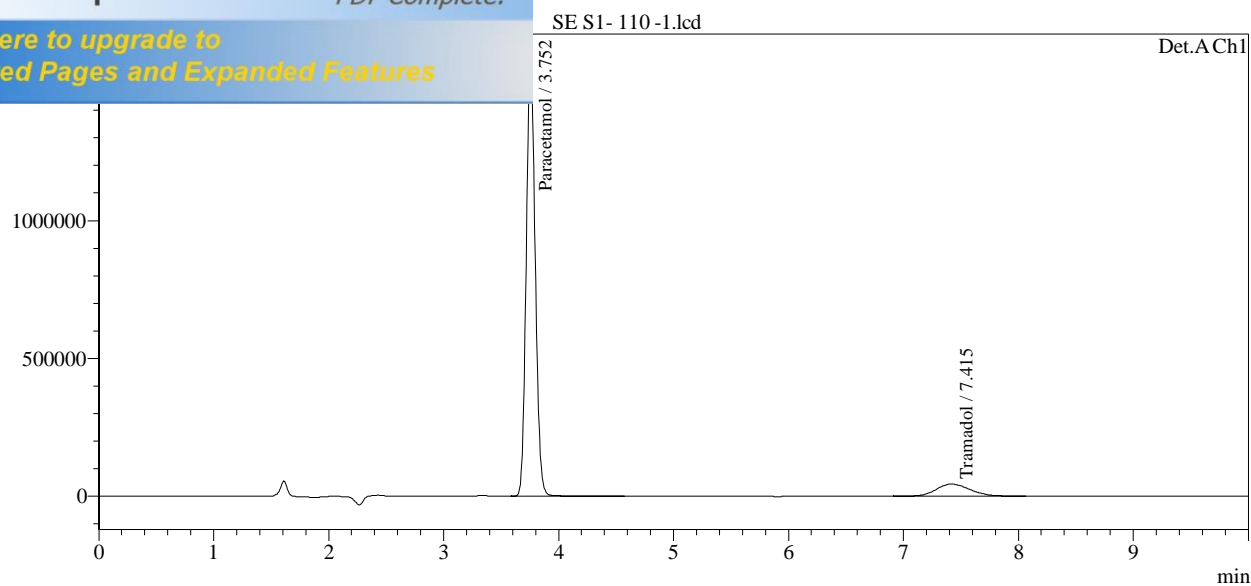


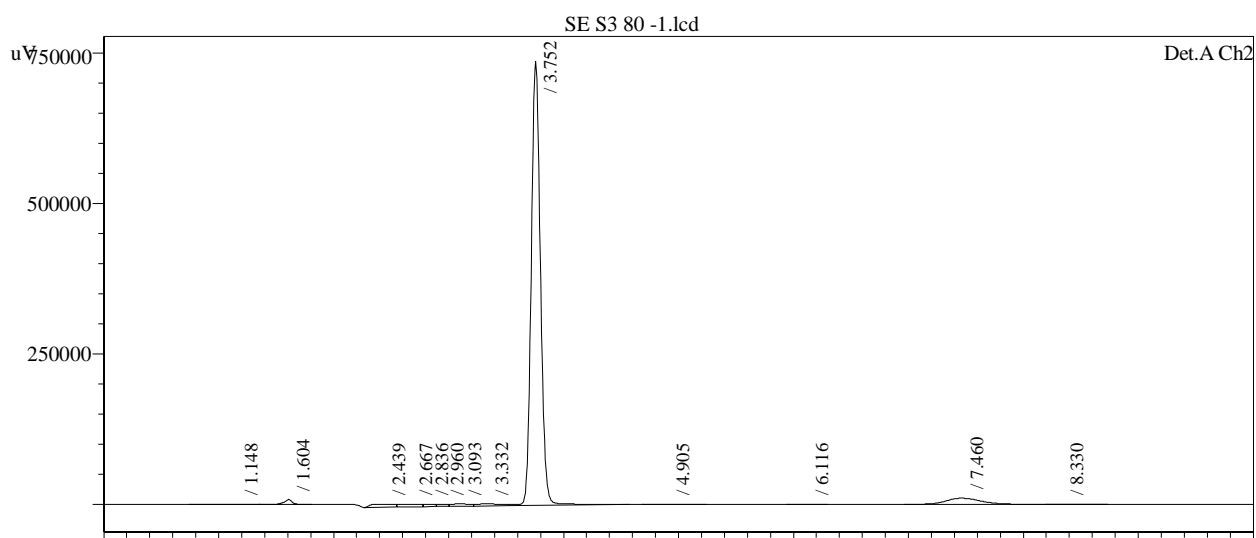
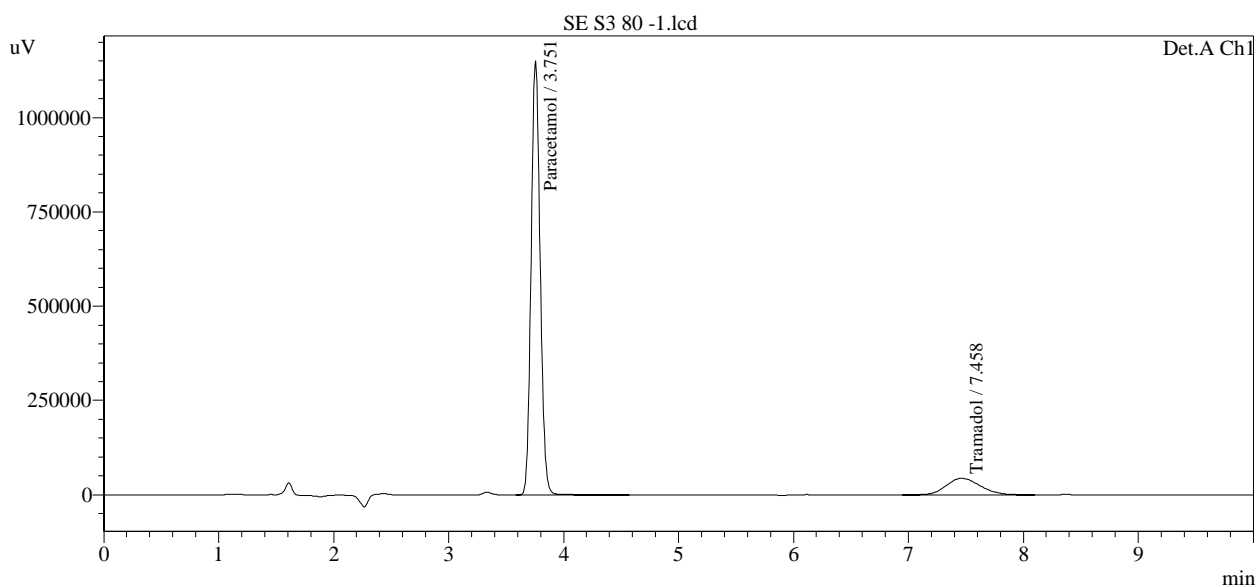
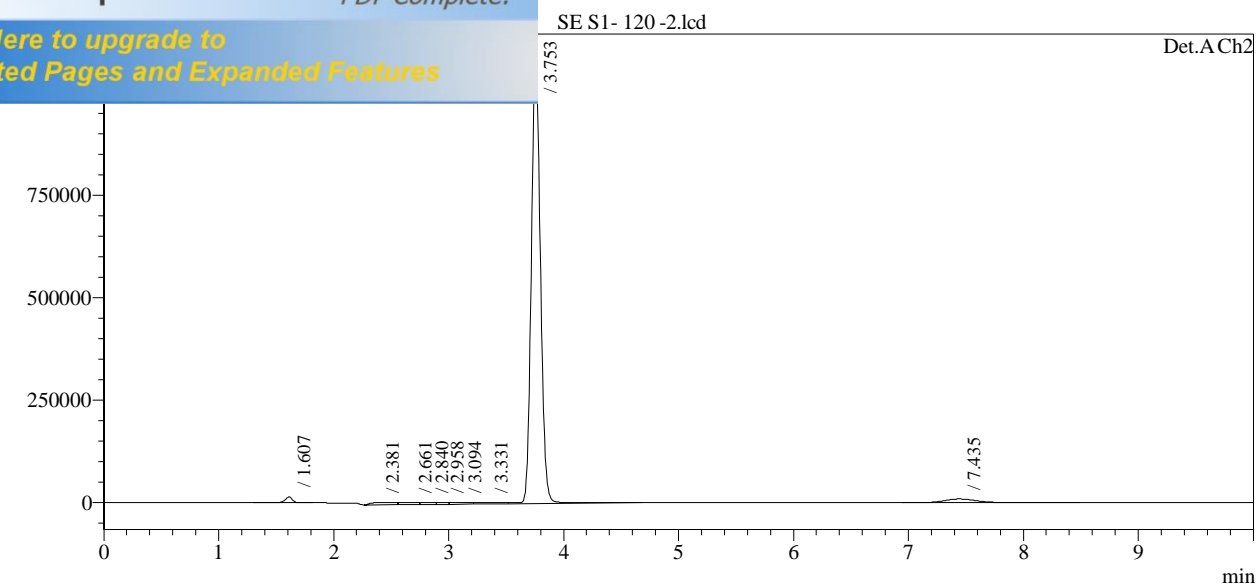


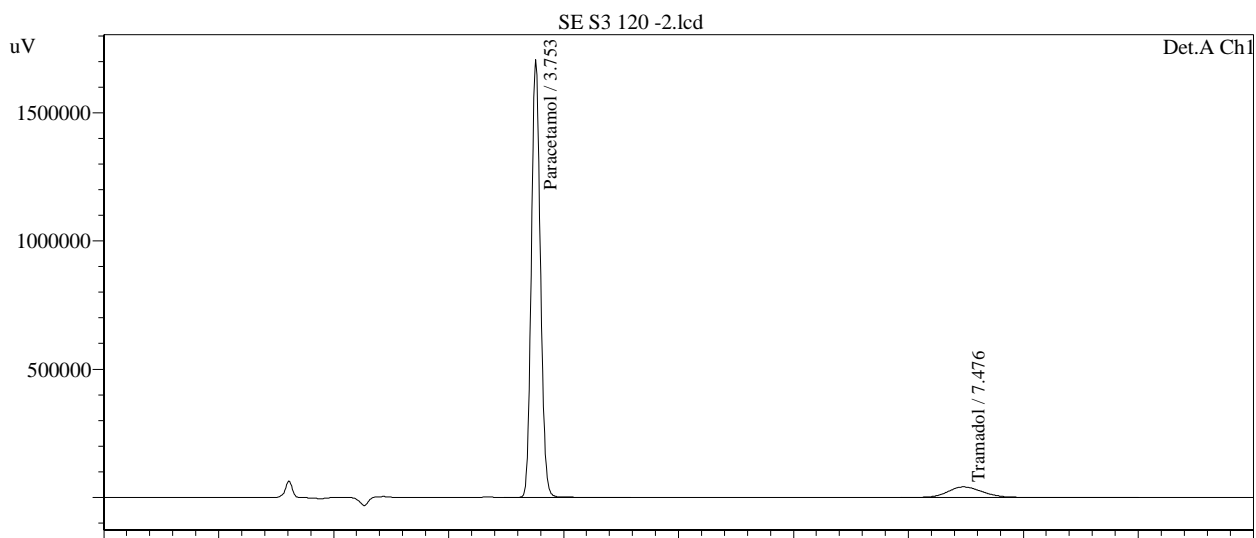
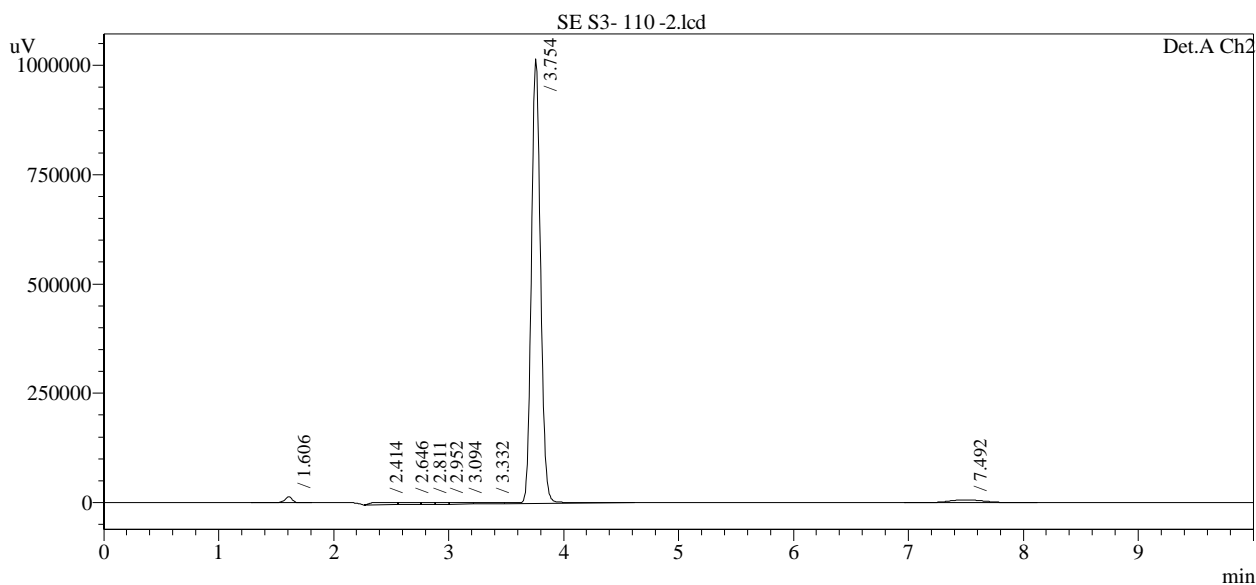
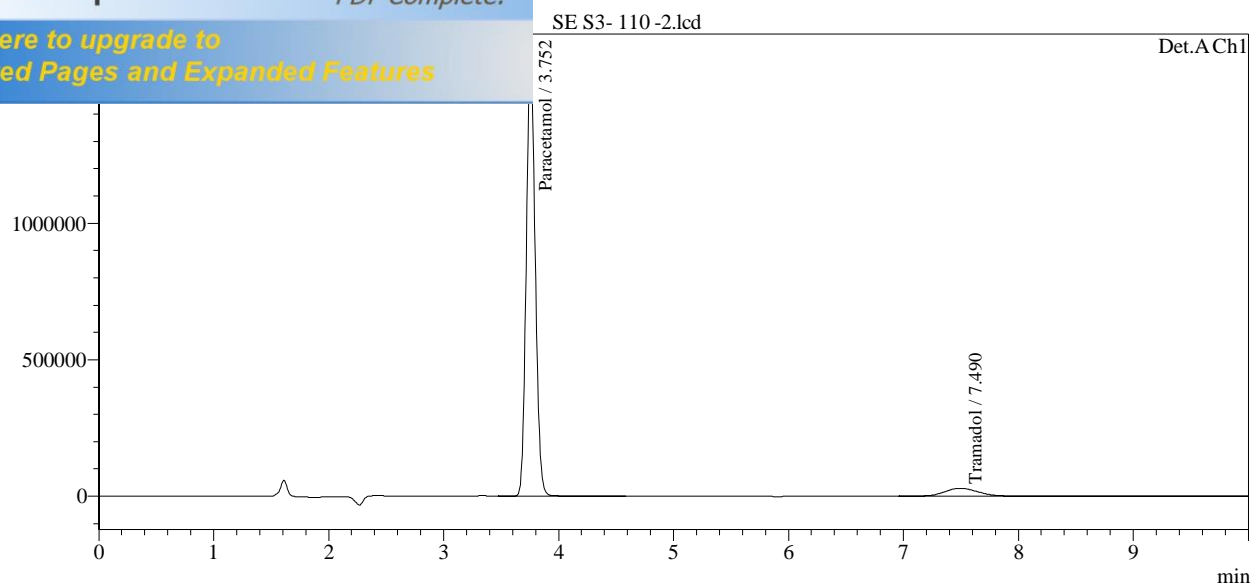


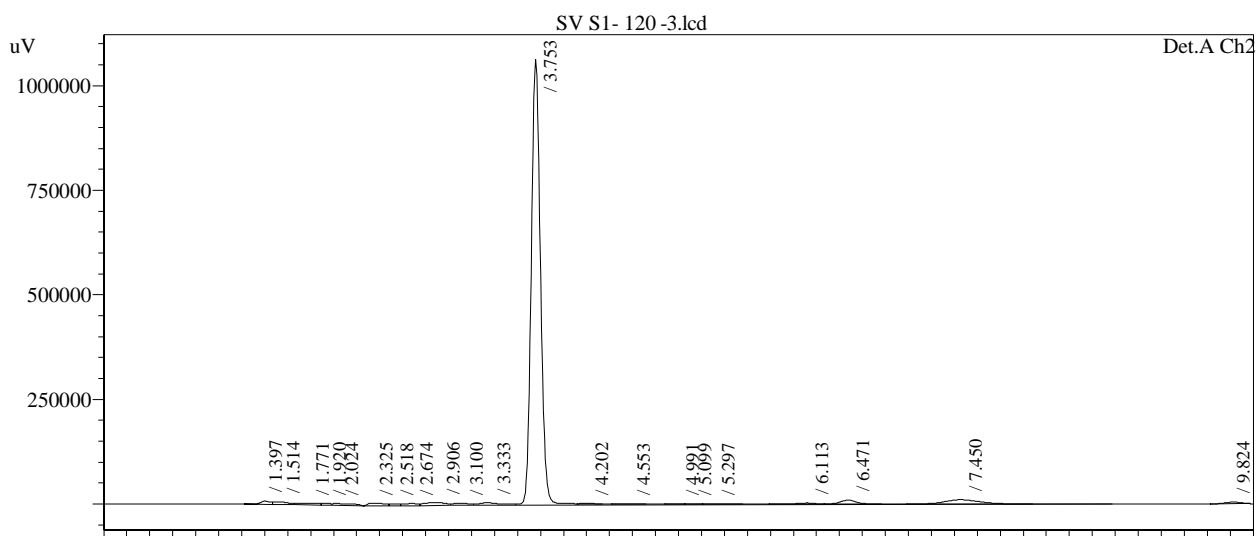
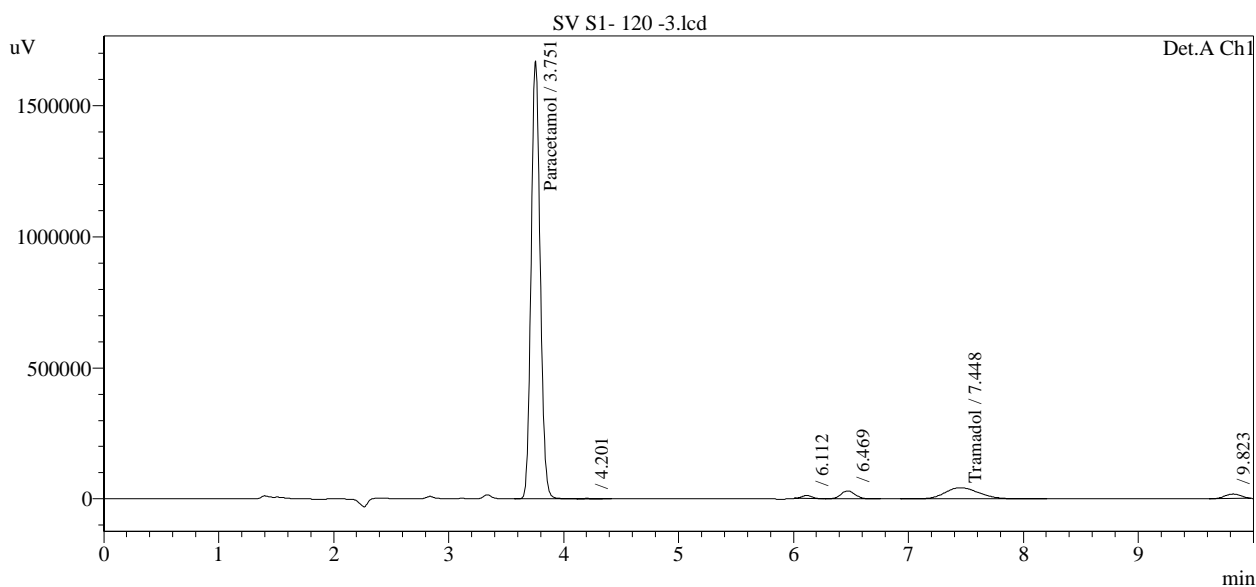
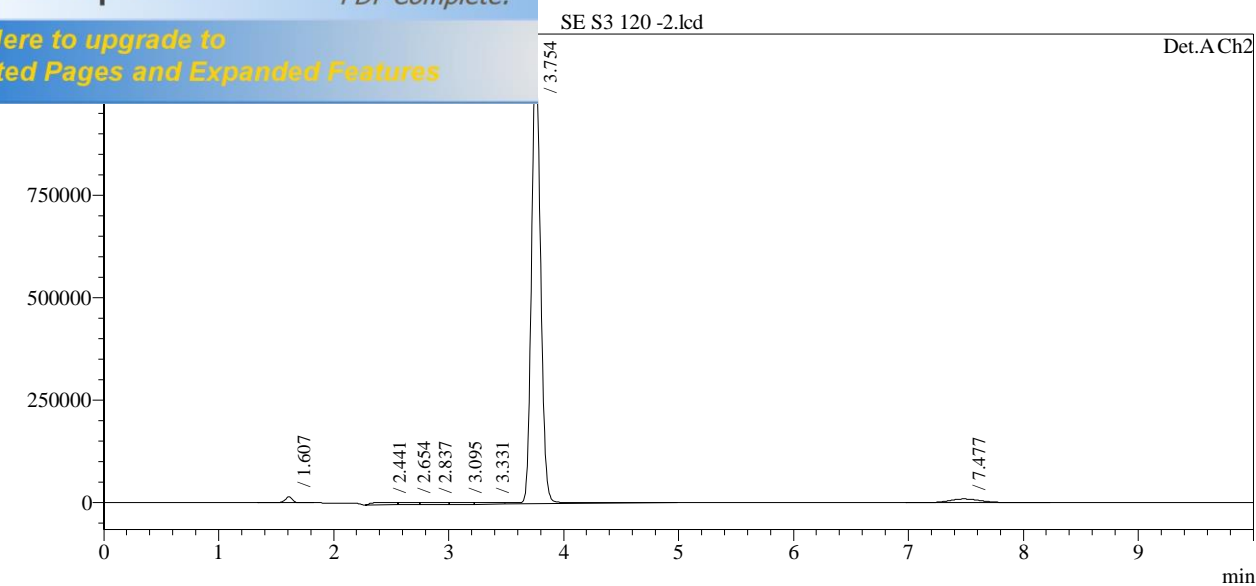










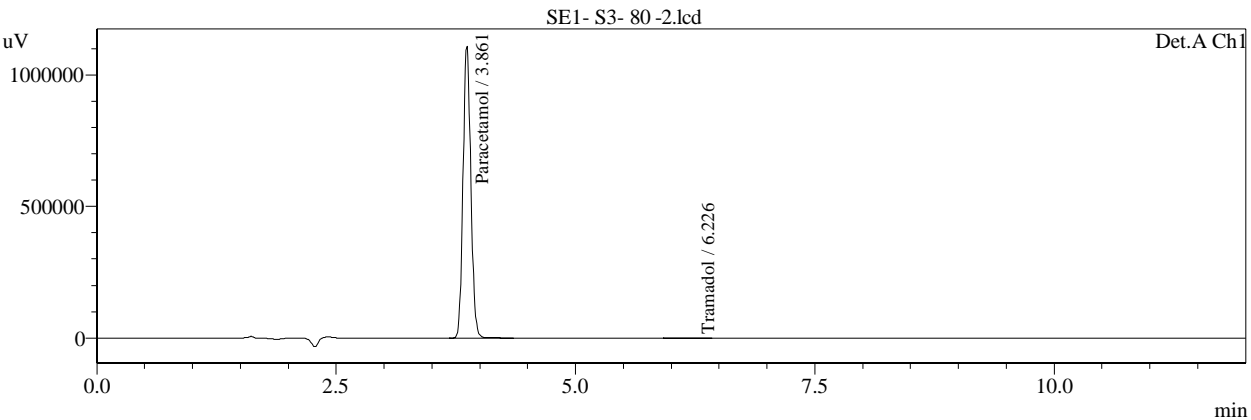
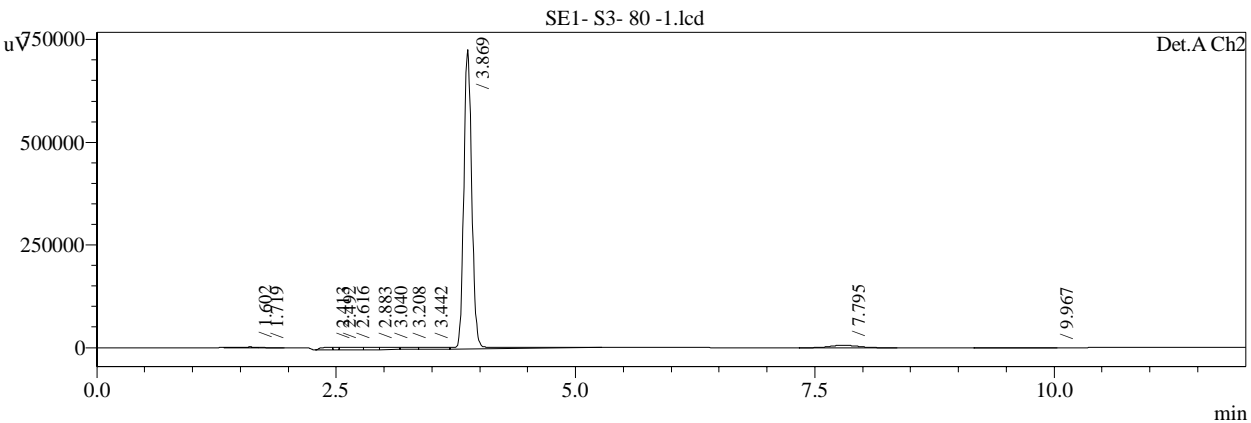
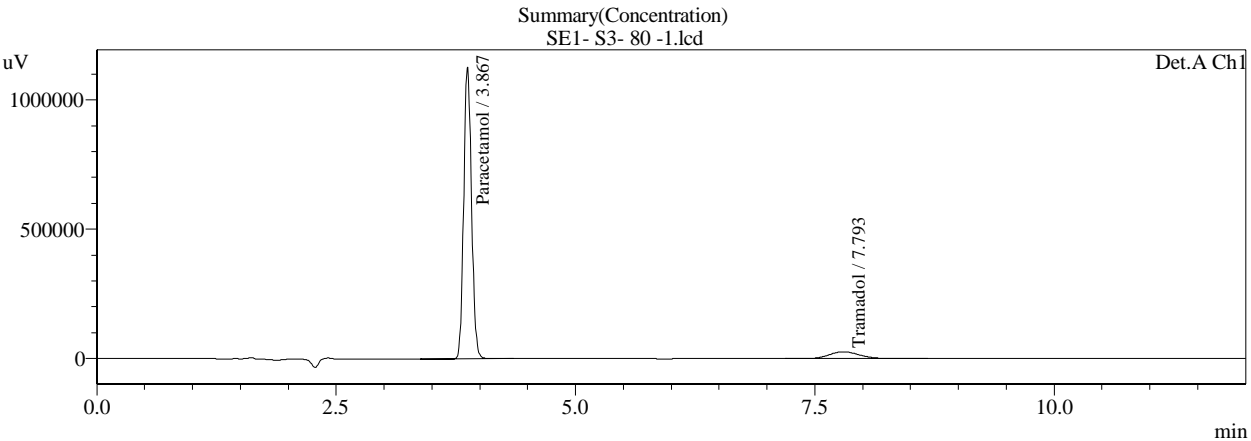


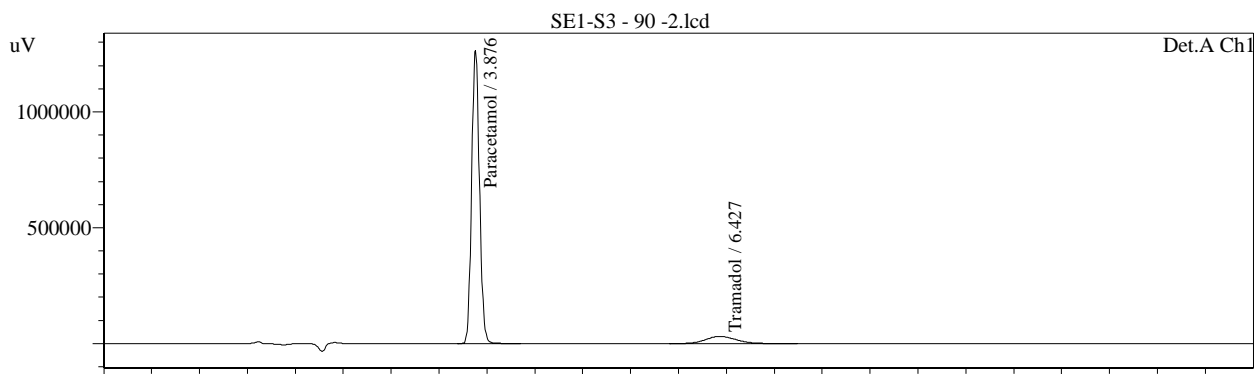
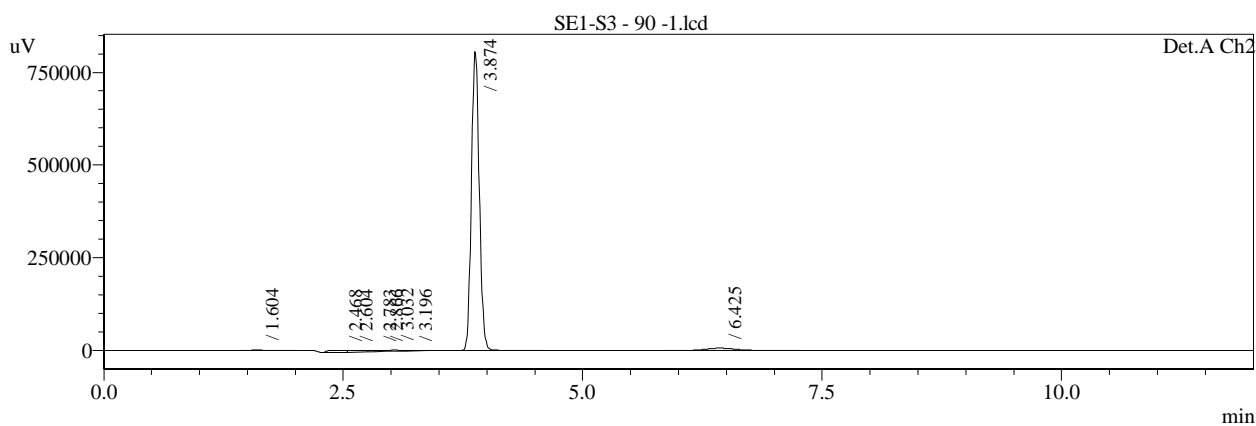
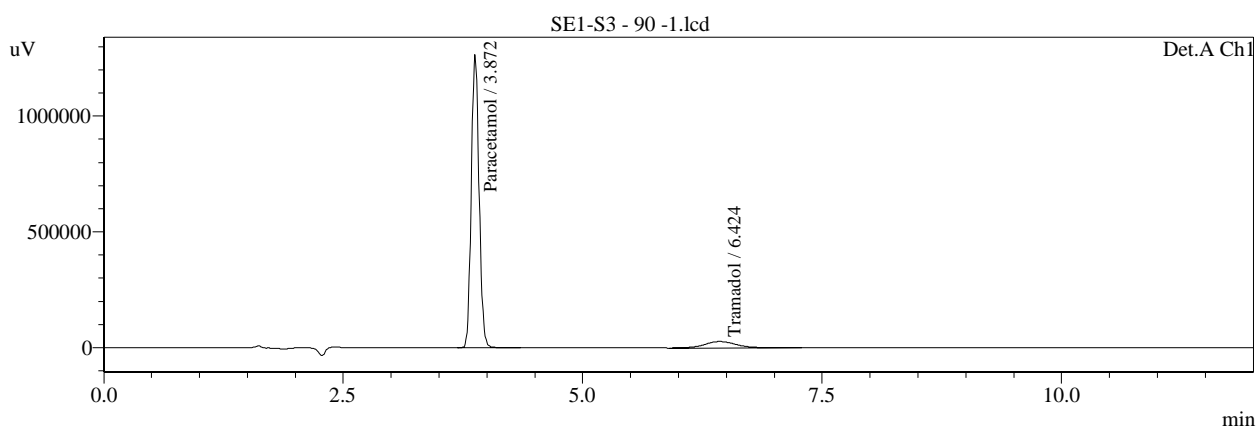
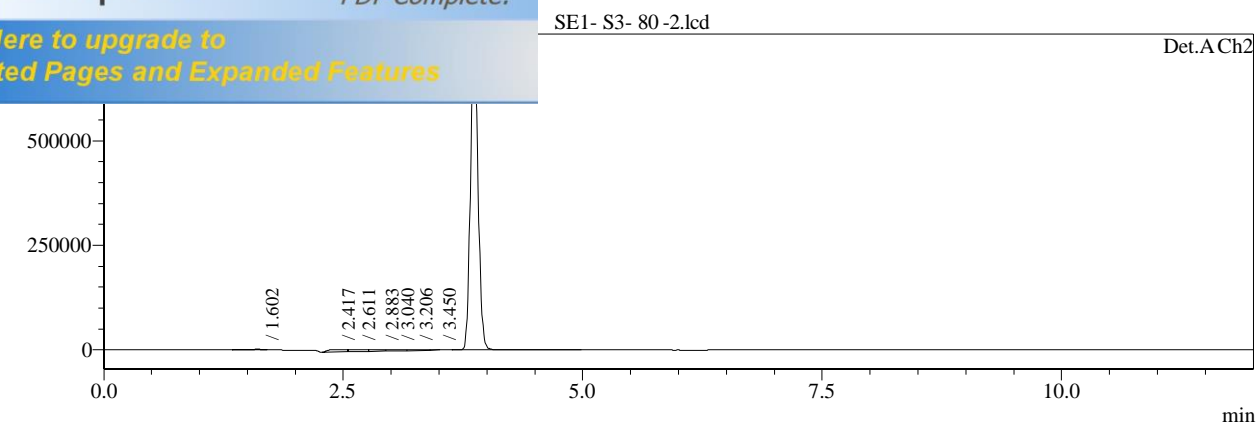
<< Detector A >>
Click Here to upgrade to
Unlimited Parallel Expanded Features

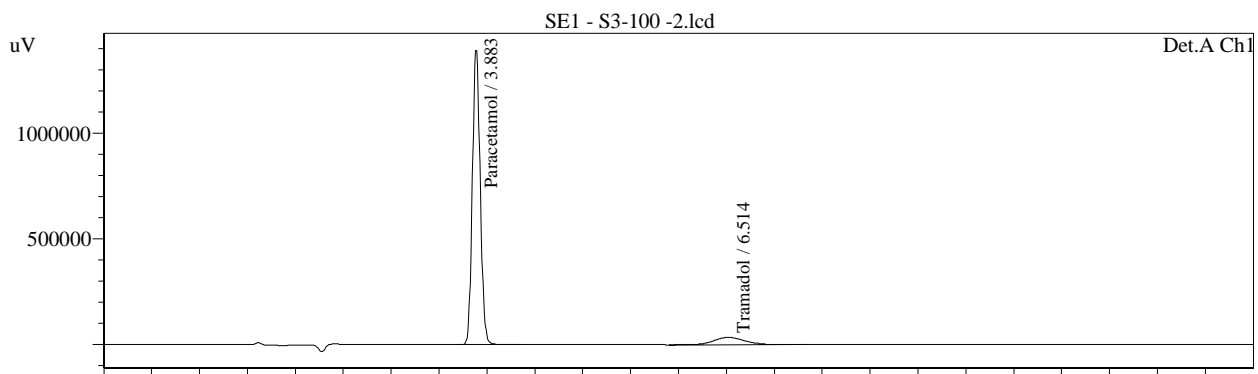
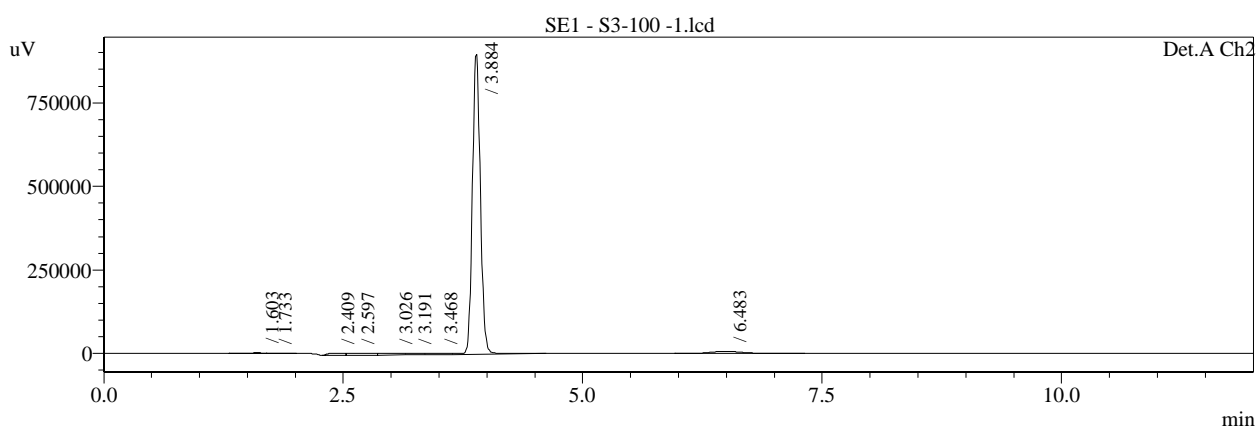
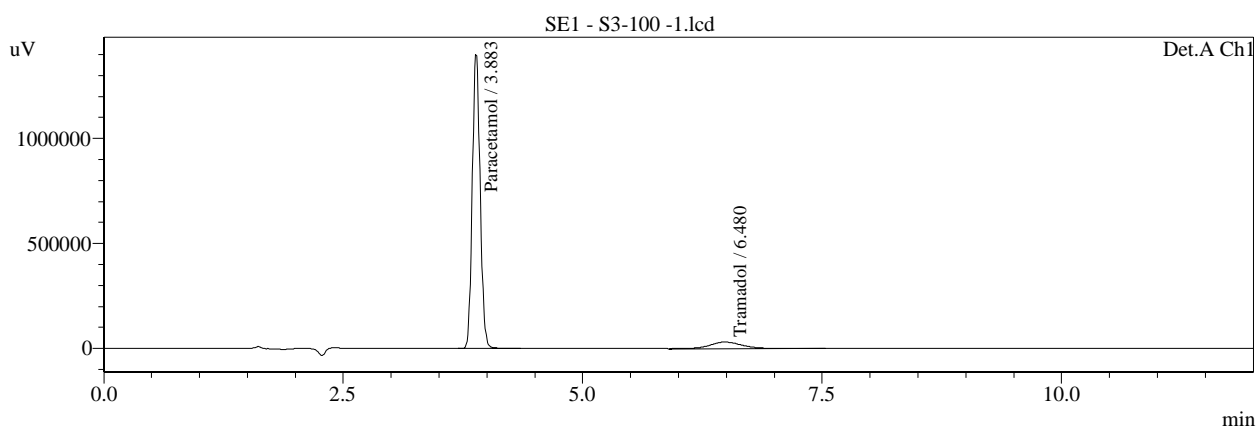
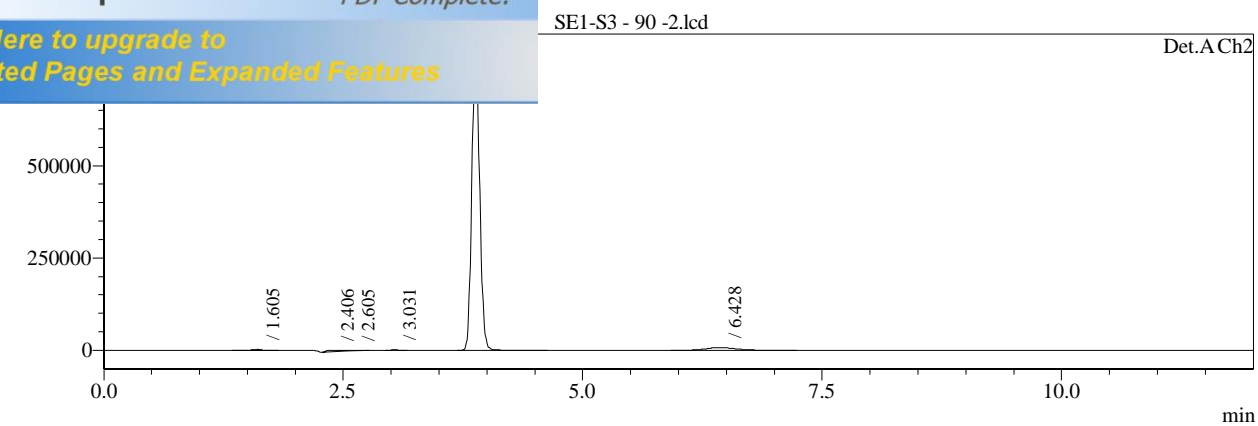
Title	Sample Name	Sample ID	Paracetamol	Tramadol
SE S2- 80 -1.lcd	Paracetamol et t	SE 3	6287365	667042
SE S2- 80 -2.lcd	Paracetamol et t	SE 2	6293801	592065
SE S2- 90 -1.lcd	Paracetamol et t	SE 2	7067598	598087
SE S2- 90 -2.lcd	Paracetamol et t	SE 2	7056331	674027
SE S2- 100 -1.lcd	Paracetamol et t	SE 2	7792313	653904
SE S2- 100 -2.lcd	Paracetamol et t	SE 2	7791836	751108
SE S2- 110 -1.lcd	Paracetamol et t	SE 2	8643625	751649
SE S2- 110 -2.lcd	Paracetamol et t	SE 2	8739834	841987
SE S2- 120 -1.lcd	Paracetamol et t	SE 2	9438035	797587
SE S2- 120 -2.lcd	Paracetamol et t	SE 2	9318641	922029
SV S2- 80 -1.lcd	Paracetamol et t	SE 2	6014539	592591
SV S2- 80 -2.lcd	Paracetamol et t	SE 2	6344040	568819
SV S2- 80 -3.lcd	Paracetamol et t	SE 2	6306360	616705
SV S2- 90 -1.lcd	Paracetamol et t	SE 2	7043848	684066
SV S2- 90 -2.lcd	Paracetamol et t	SE 2	7033730	685715
SV S2- 90 -3.lcd	Paracetamol et t	SE 2	6806114	662972
SV S2- 100 -1.lcd	Paracetamol et t	SE 2	7488848	752128
SV S2- 100 -2.lcd	Paracetamol et t	SE 2	7659600	731384
SV S2- 100 -3.lcd	Paracetamol et t	SE 2	7718554	745630
SV S2- 110 -1.lcd	Paracetamol et t	SE 2	8566219	849895
SV S2- 110 -2.lcd	Paracetamol et t	SE 2	8532723	841238
SV S2- 110 -3.lcd	Paracetamol et t	SE 2	8301738	835894
SV S2- 120 -1.lcd	Paracetamol et t	SE 2	9272109	900280
SV S2- 120 -2.lcd	Paracetamol et t	SE 2	9277338	904862
SV S2- 120 -3.lcd	Paracetamol et t	SE 2	9079828	888800
SE S1- 110 -1.lcd	Paracetamol et t	SE 1	8641117	907006
SE S1- 120 -2.lcd	Paracetamol et t	SE 1	9305828	843221
SE S3 80 -1.lcd	Paracetamol et t	SE 3	6273077	905941
SE S3- 110 -2.lcd	Paracetamol et t	SE 3	8721760	603035
SE S3 120 -2.lcd	Paracetamol et t	SE 3	9314362	847168
SV S1- 120 -3.lcd	Paracetamol et t	SE 1	9141451	889942
Average			7912018	758283
%RSD			14.459	15.222
Maximum			9438035	922029
Minimum			6014539	568819
Standard Deviation			1144006	115426

Sample Information

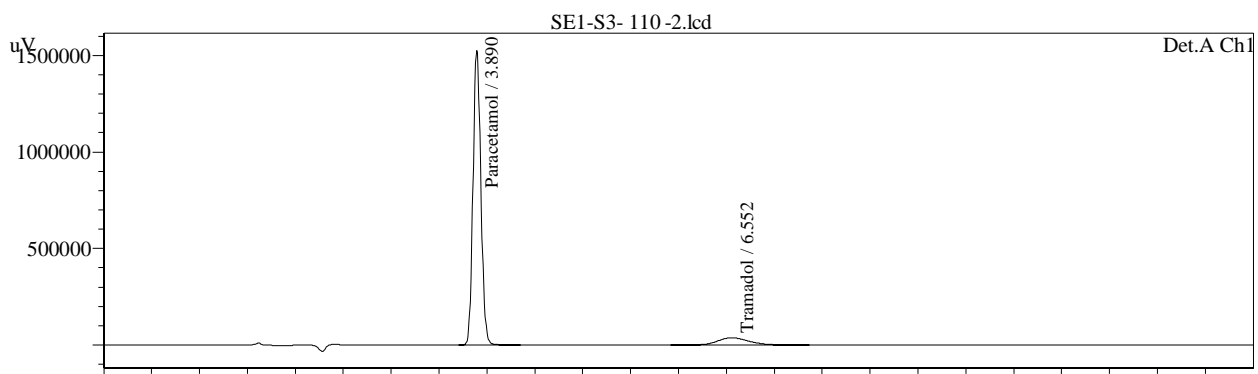
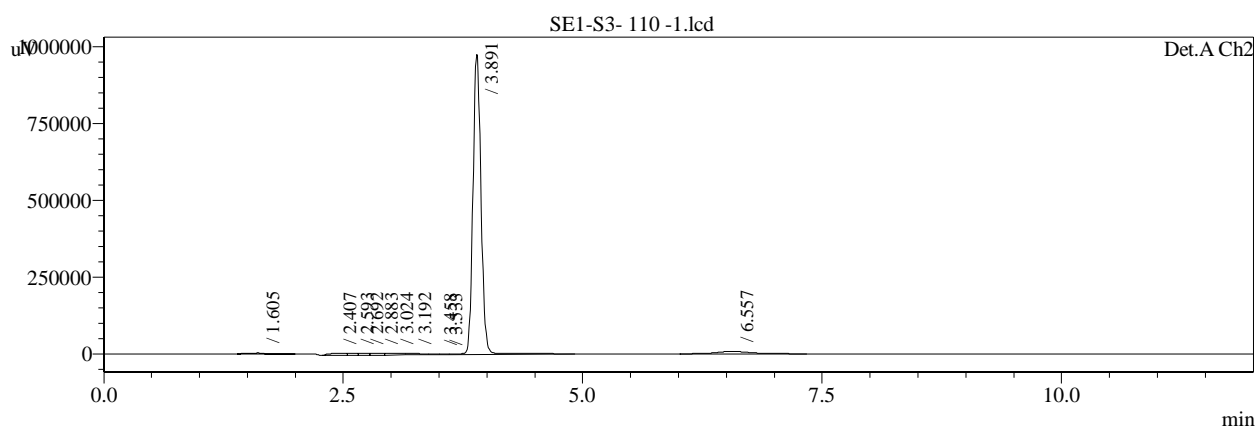
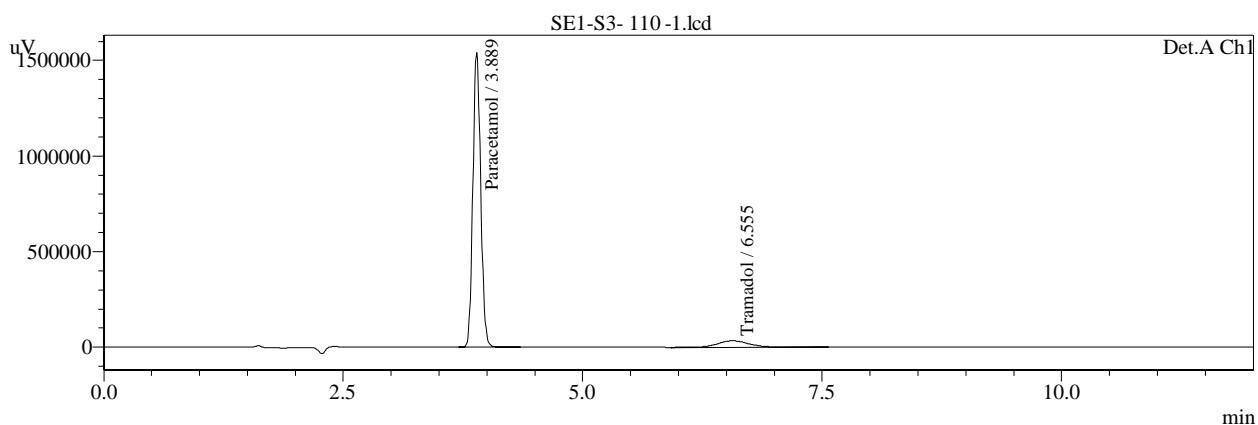
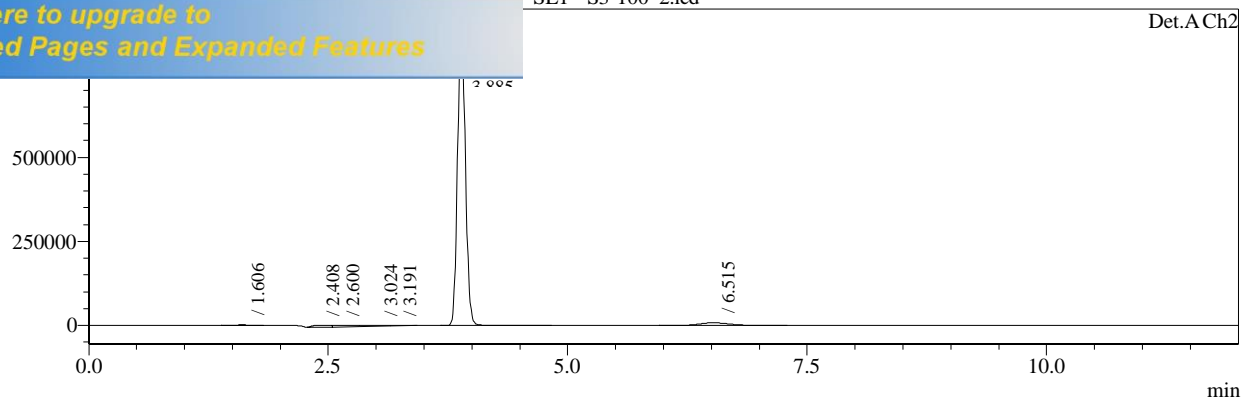
Acquired by : Admin
Sample Name : Paracetamol et tramadol
Sample ID : SE 3
Tray# : 11
Vail# : 76
Injection Volume : 20 uL
Data Filename : SE1- S3- 80 -1.lcd
Method Filename : Paracétamol et tramadol.lcm
Batch Filename : Paracetamol tramadol serie 3.lcb
Report Filename : Default.lcr
Date Acquired : 10/05/2017 07:22:13
Data Processed : 10/05/2017 13:05:14

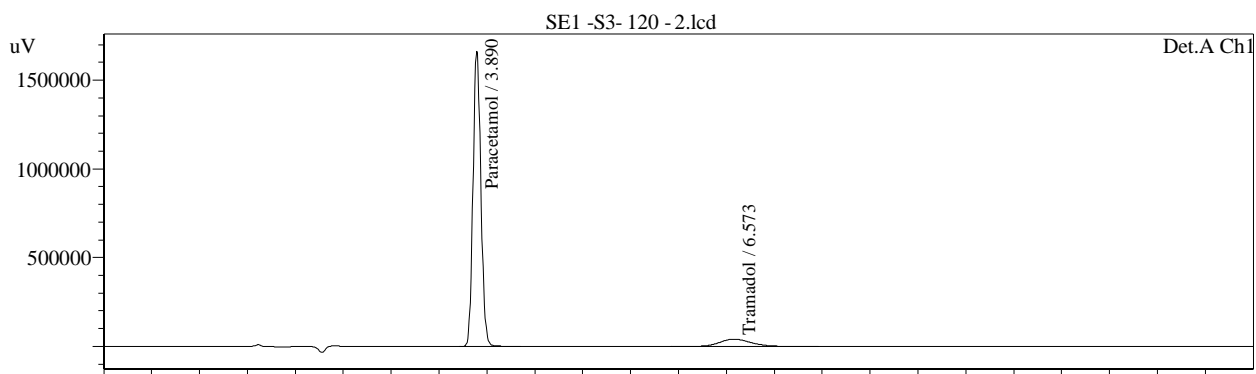
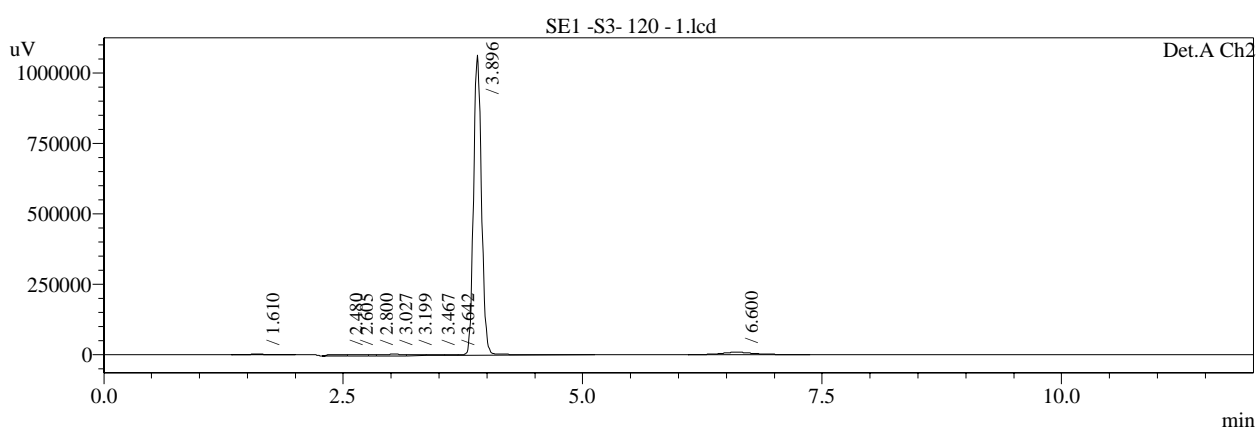
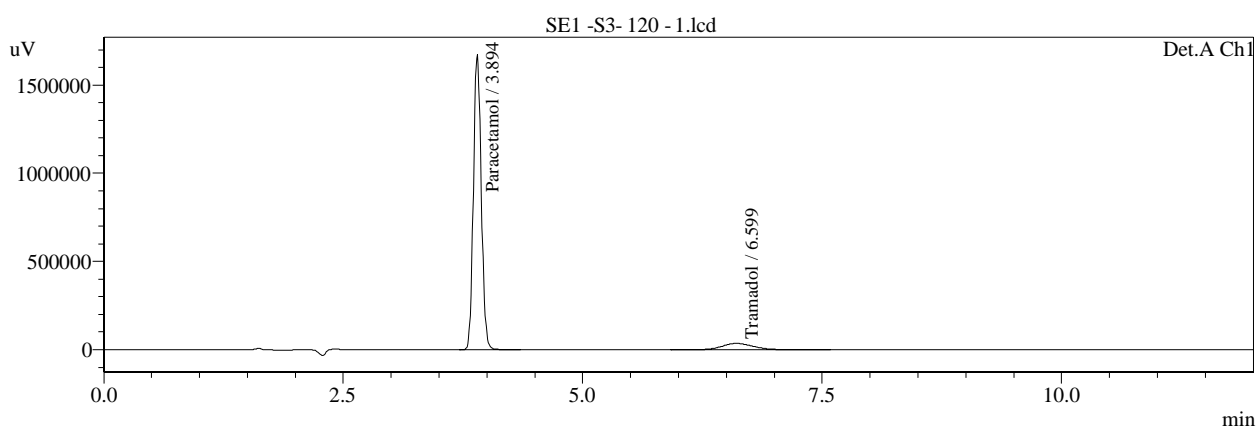
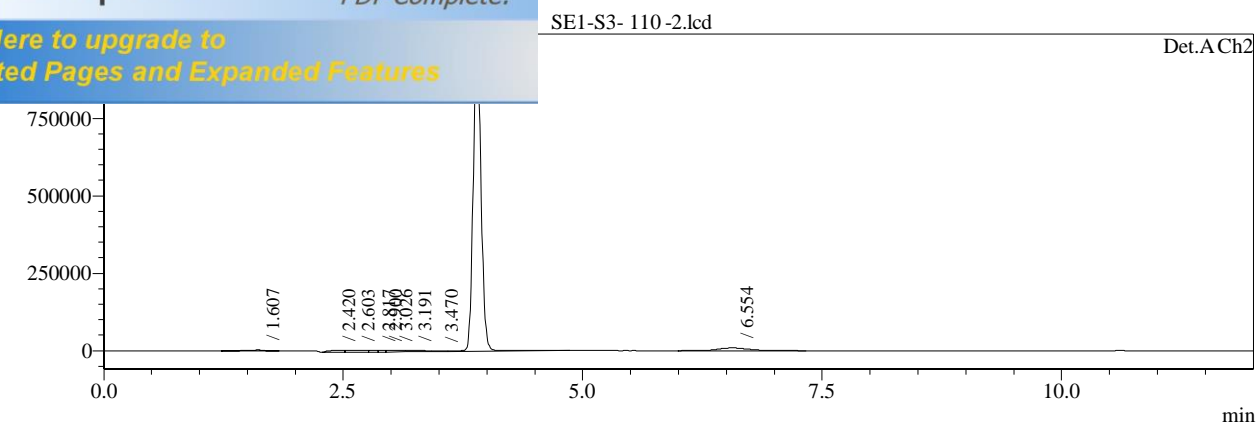




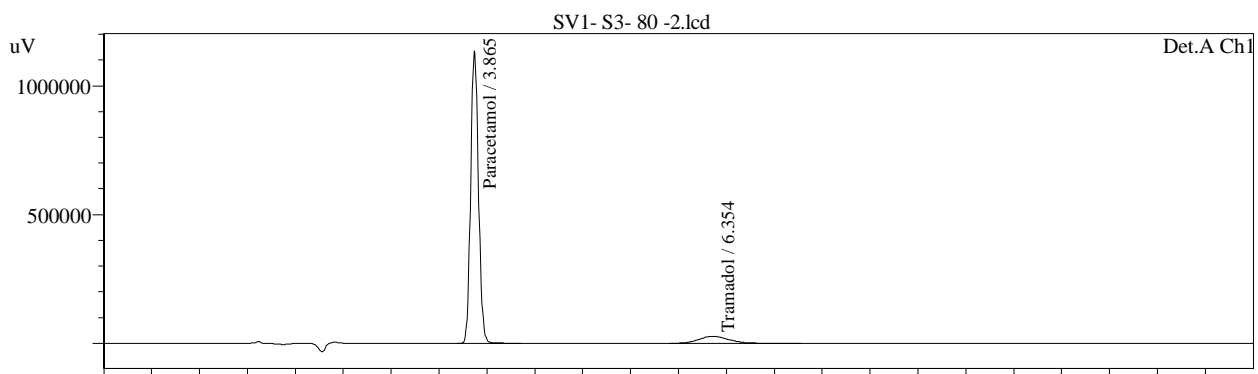
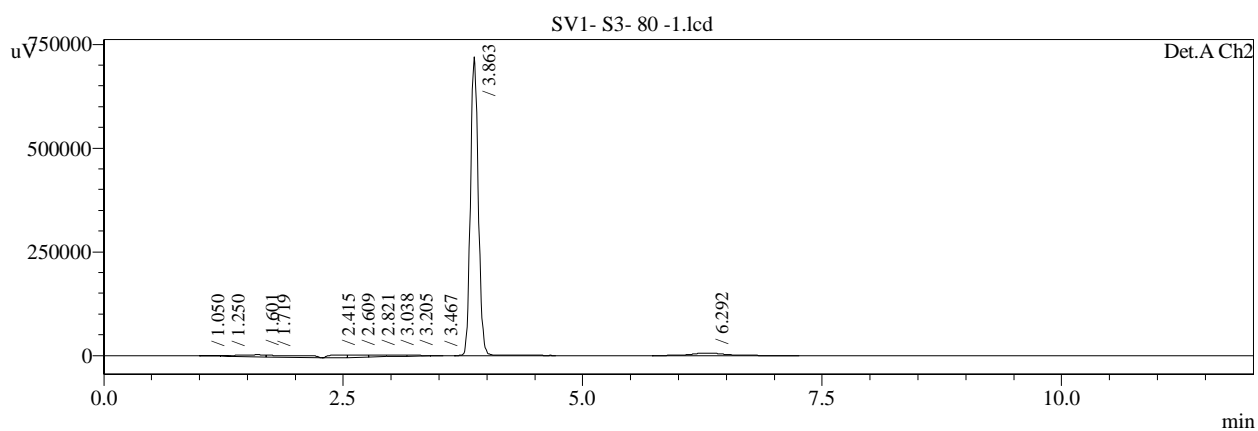
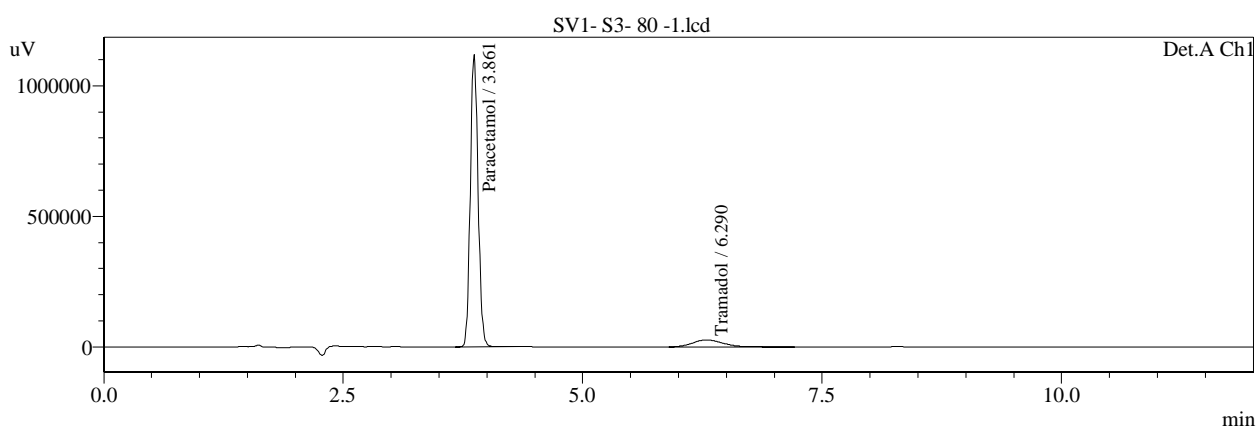
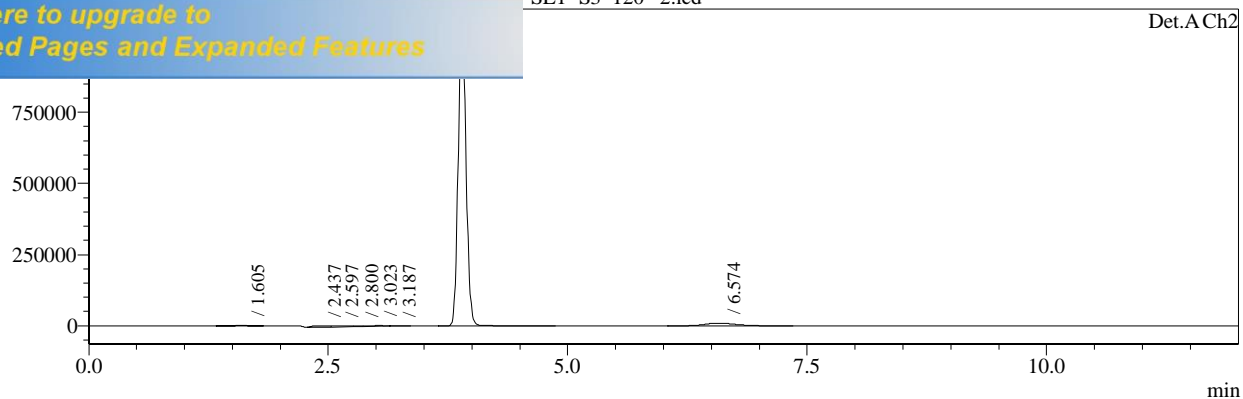


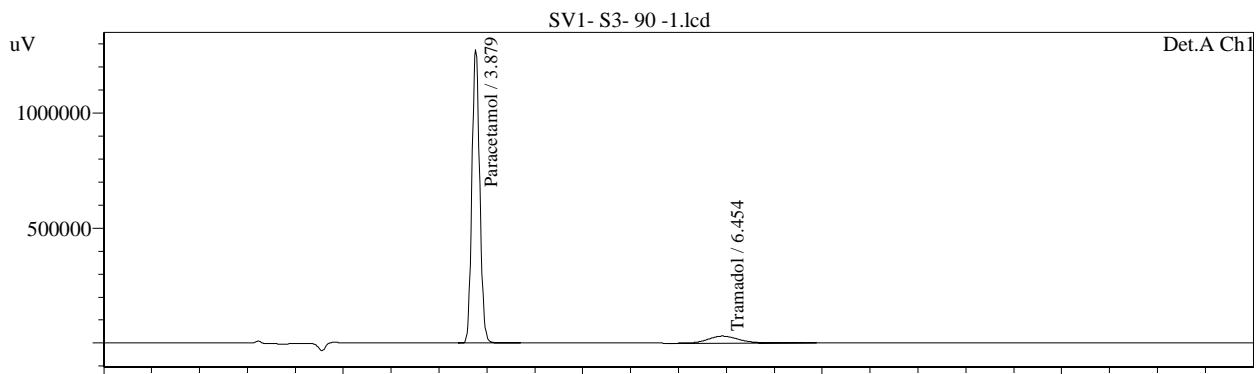
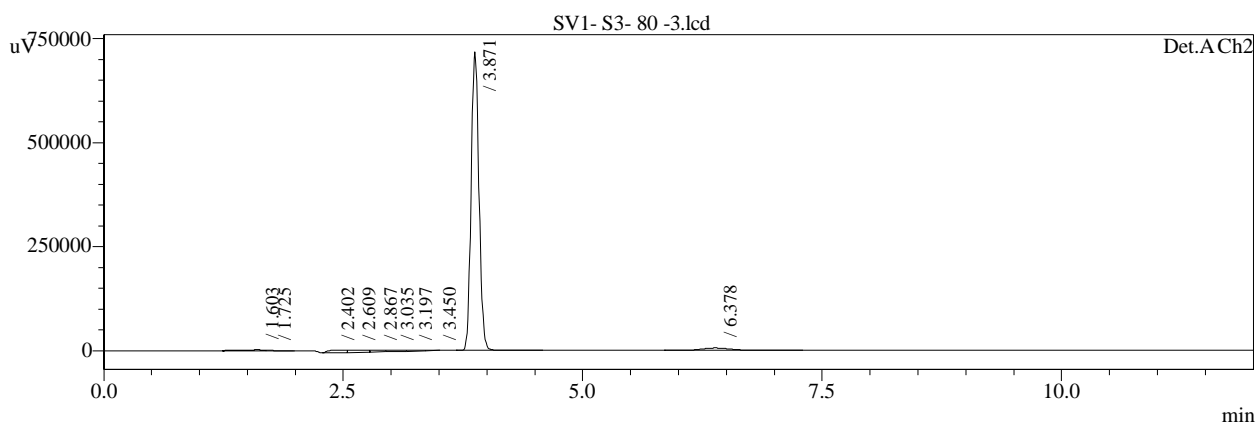
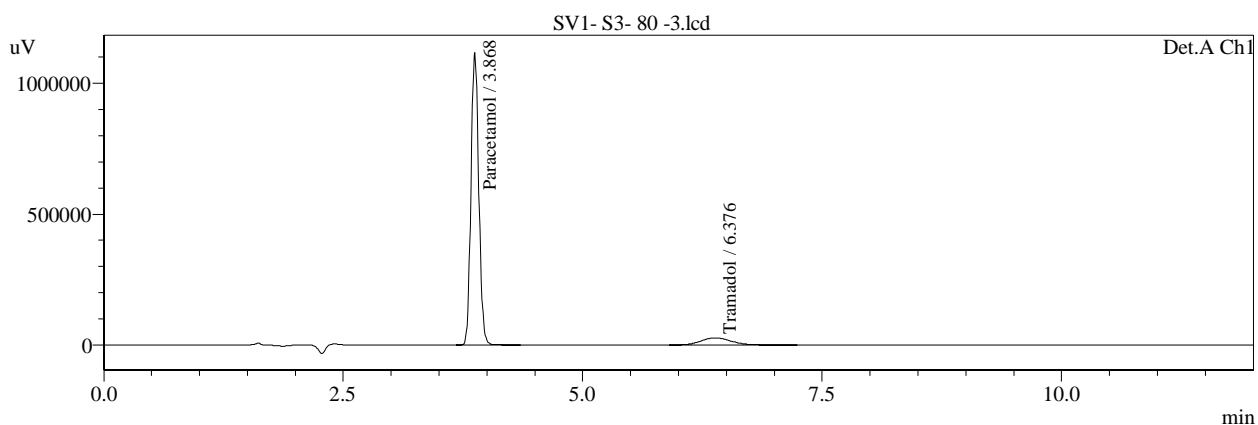
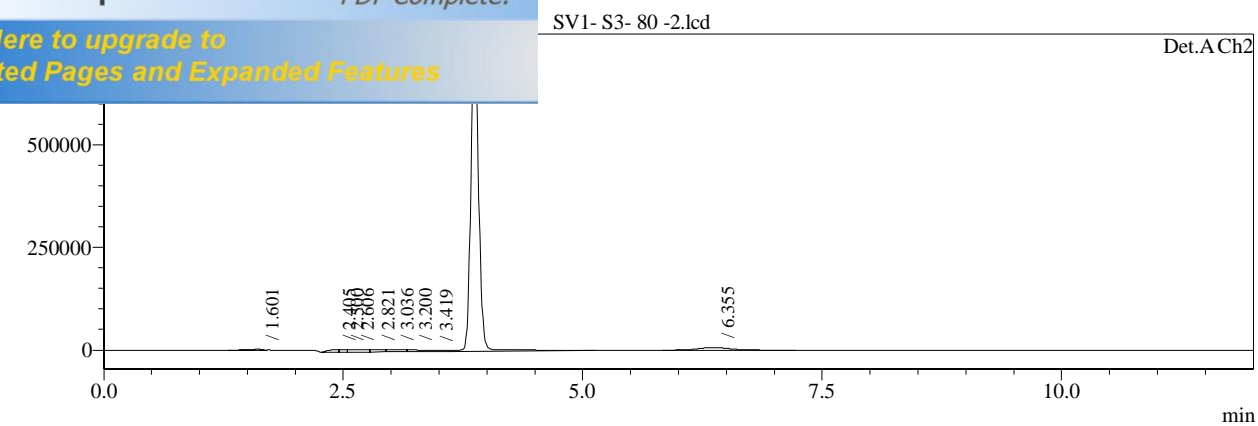
SE1 - S3-100 -2.lcd

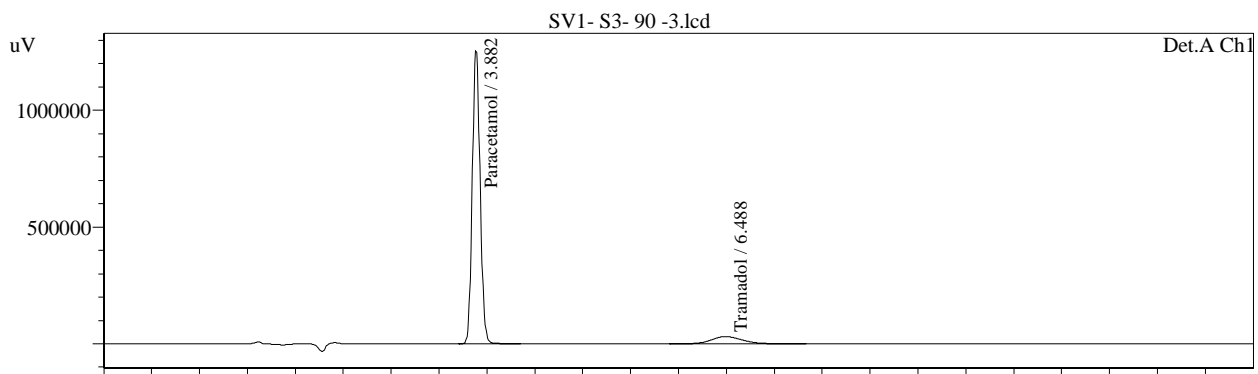
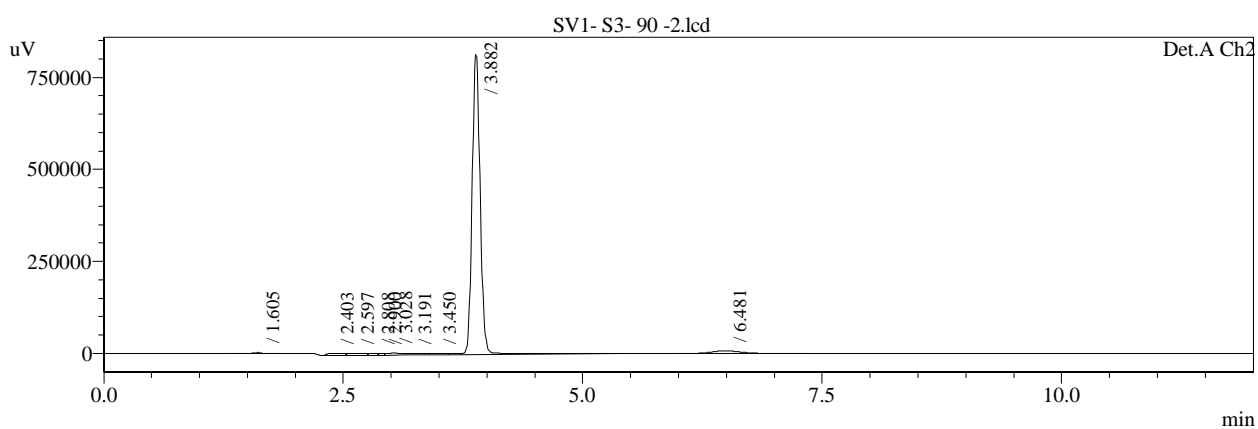
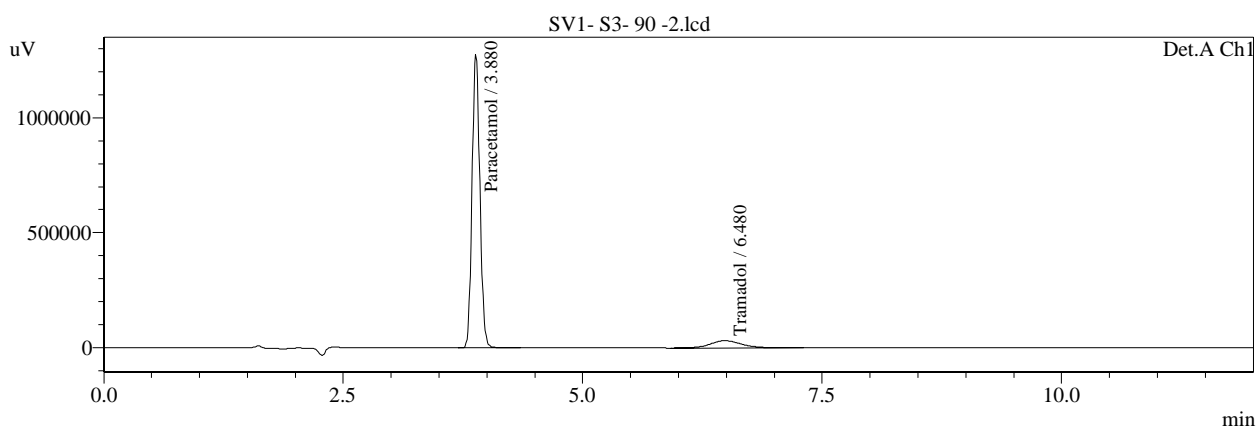
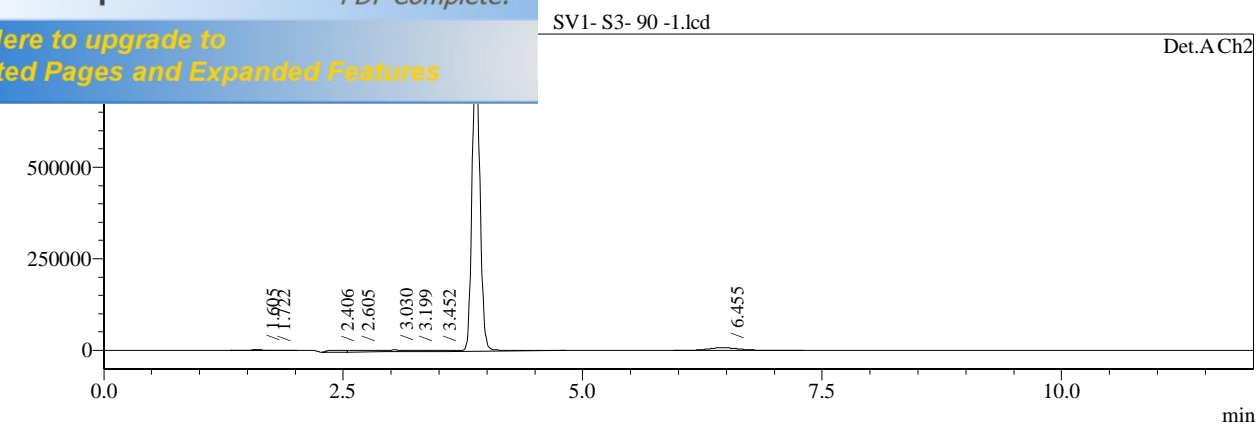


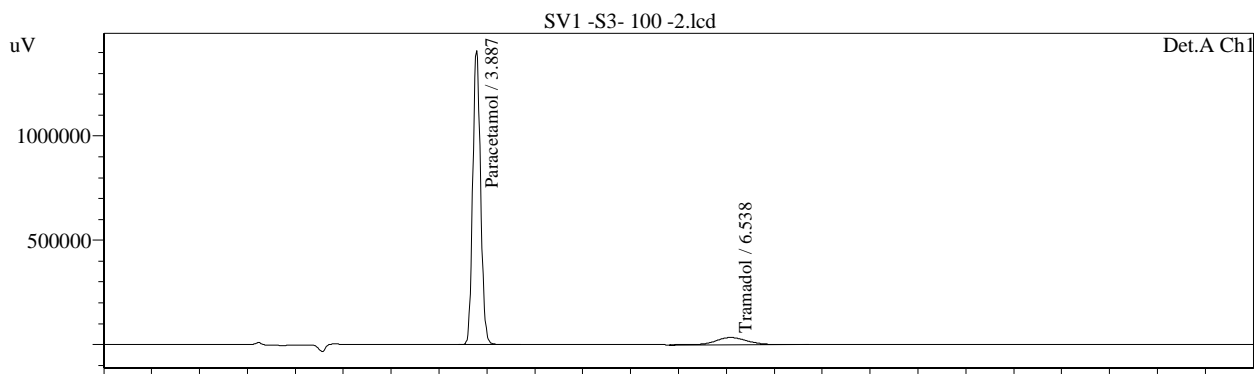
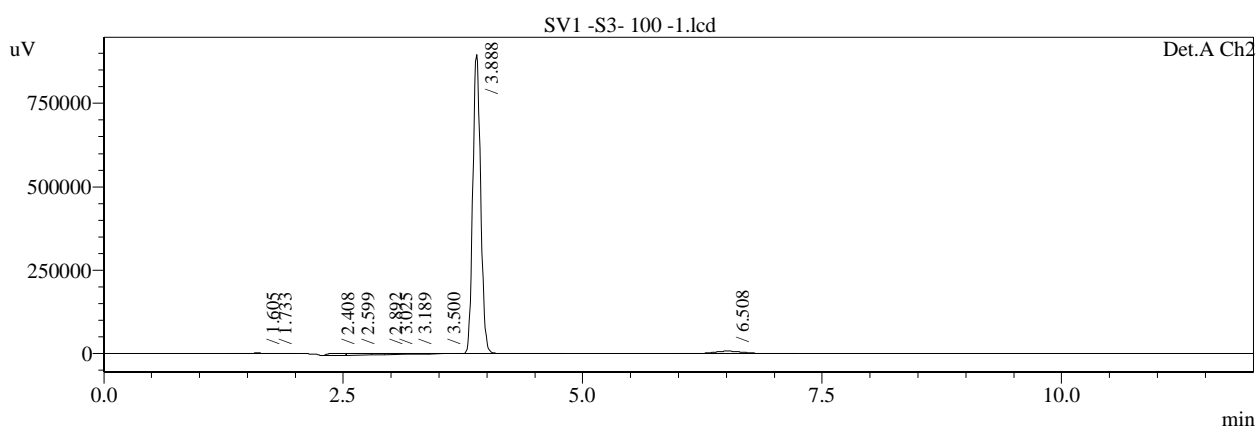
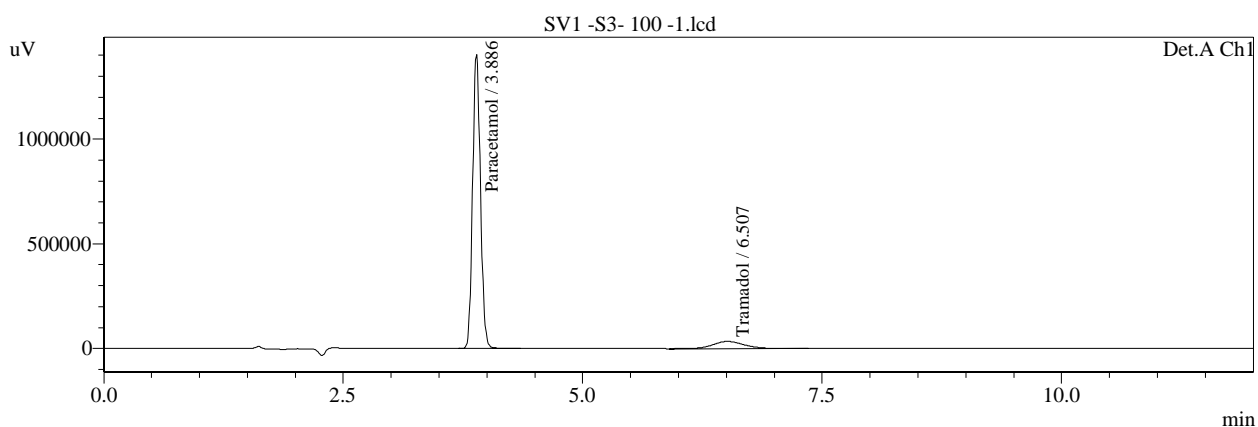
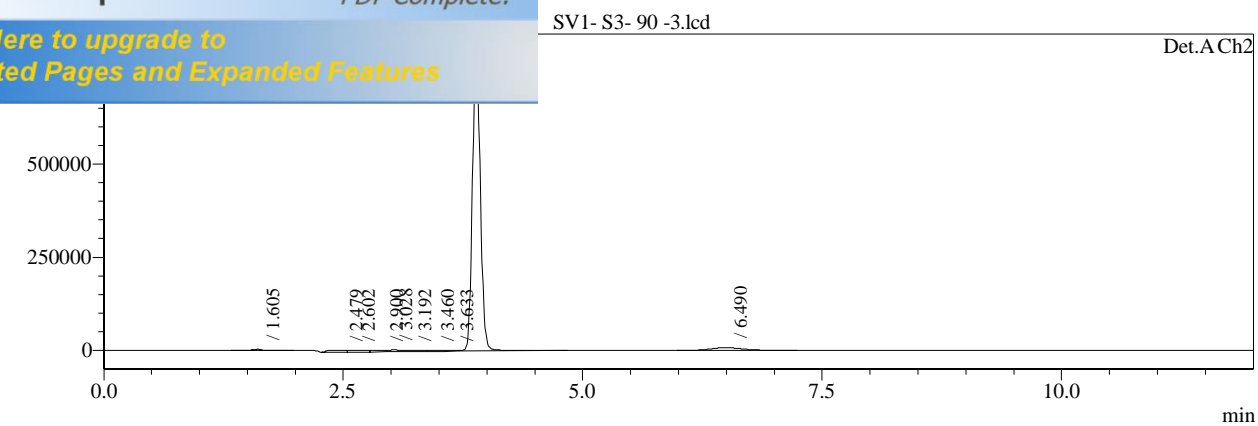


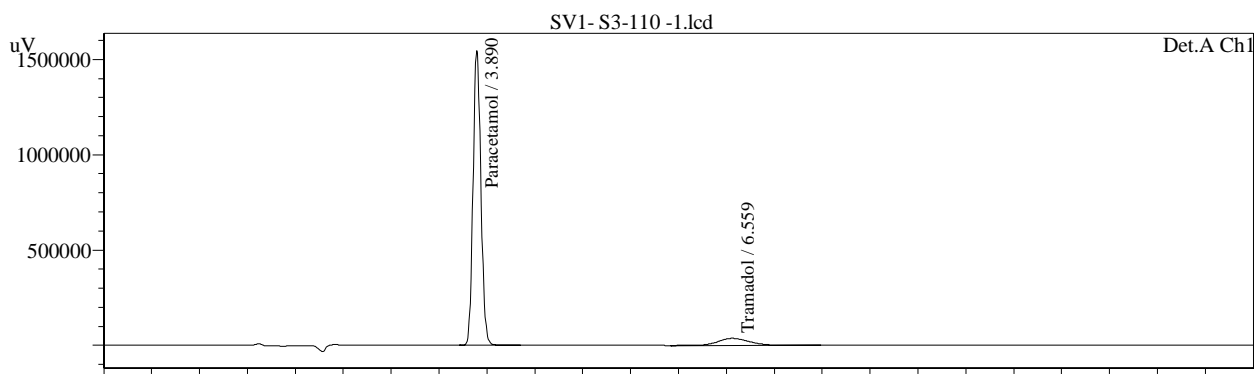
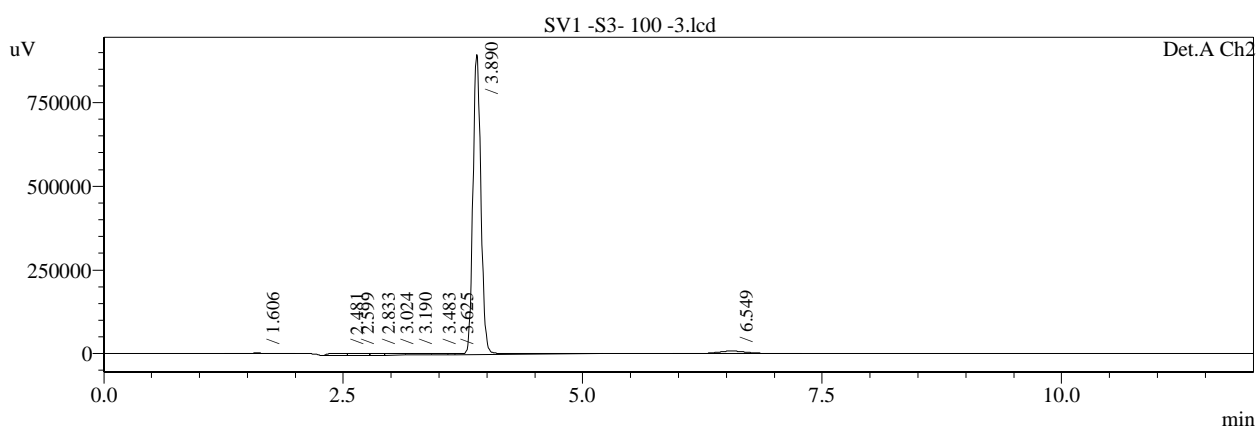
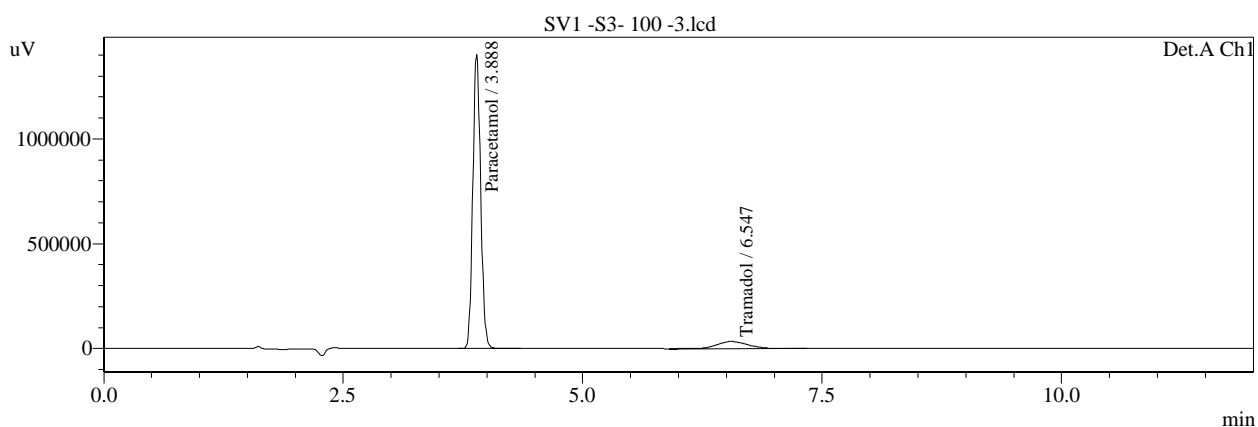
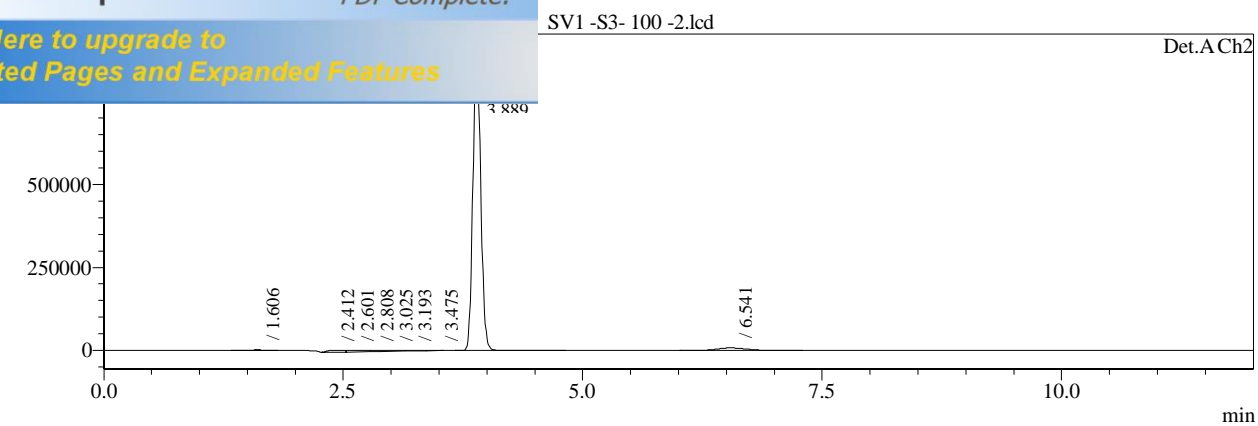
SE1 -S3- 120 -2.lcd

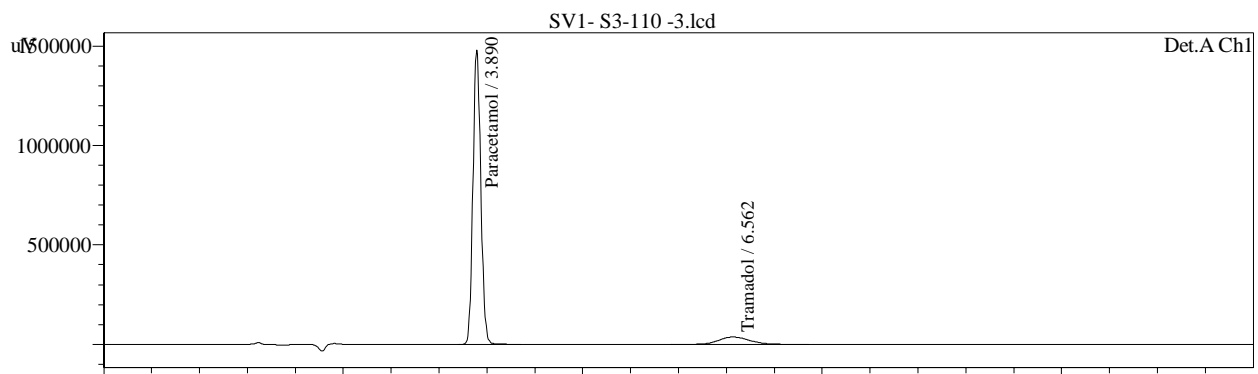
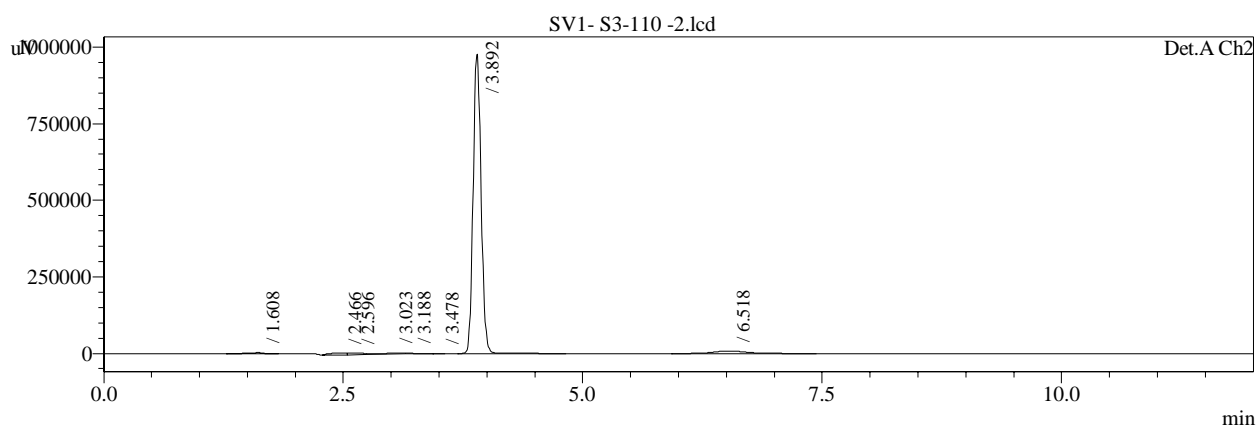
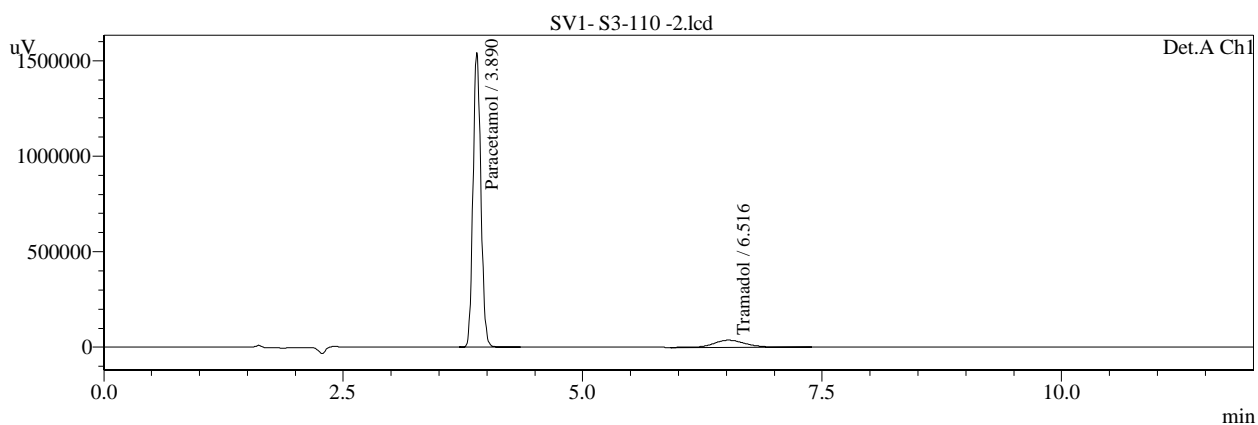
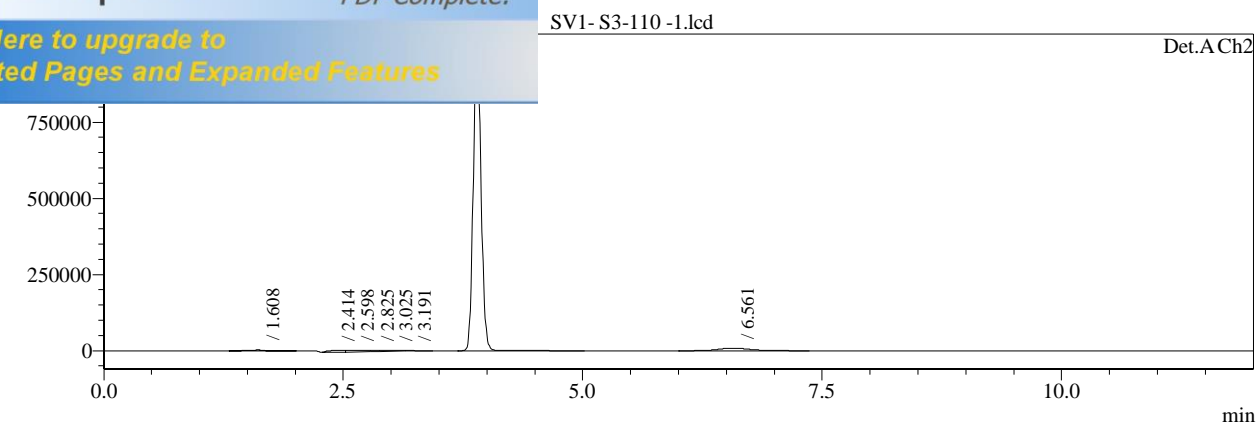


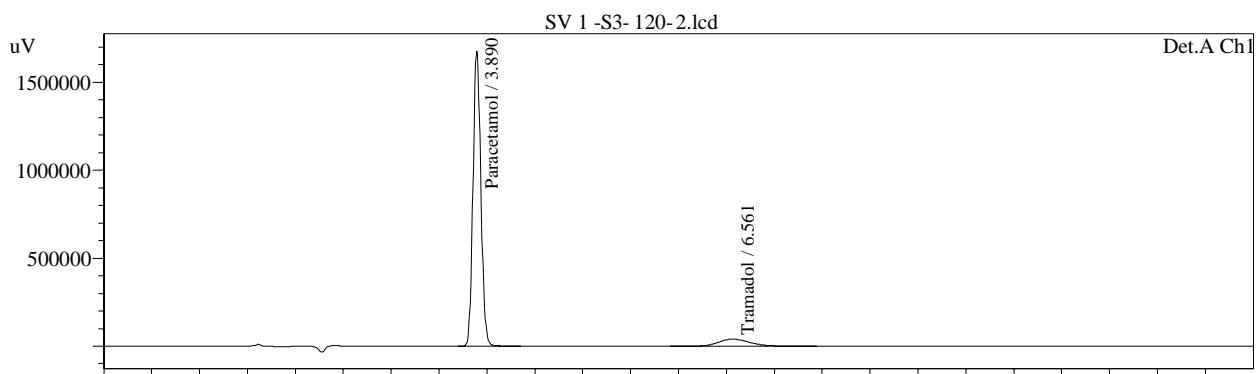
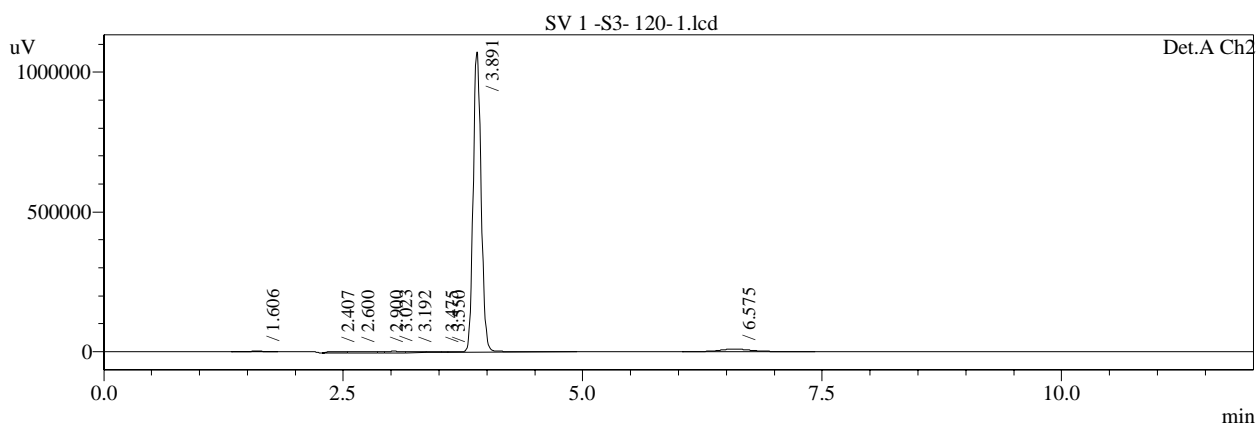
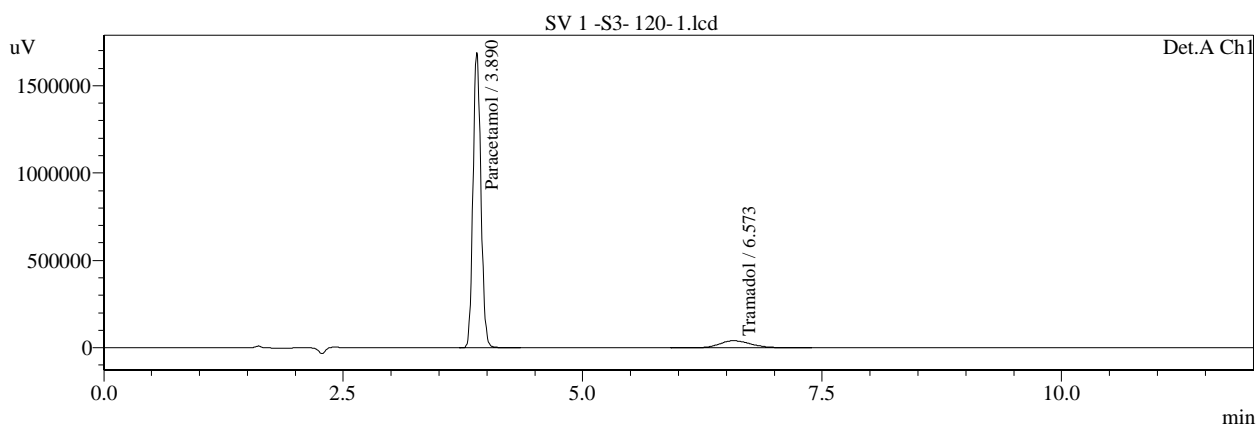
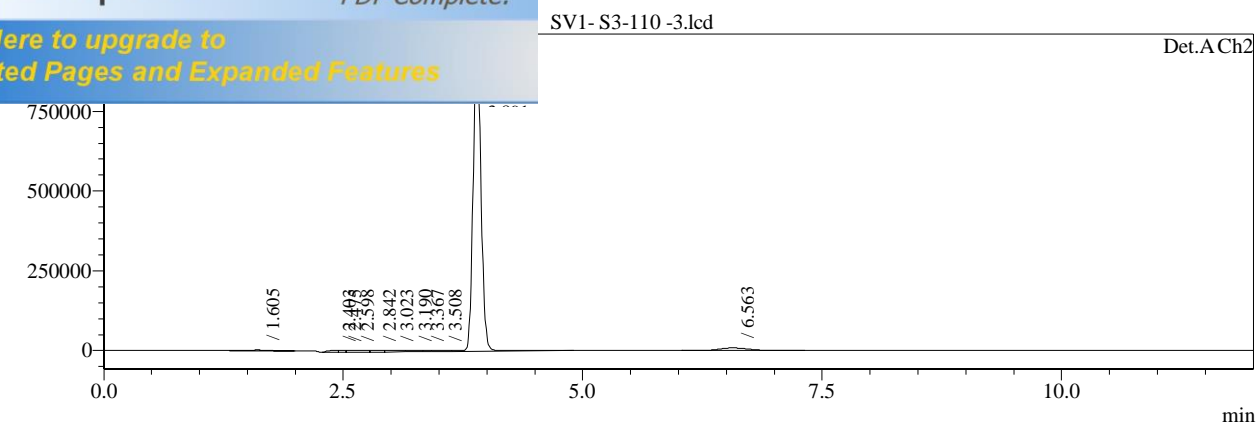


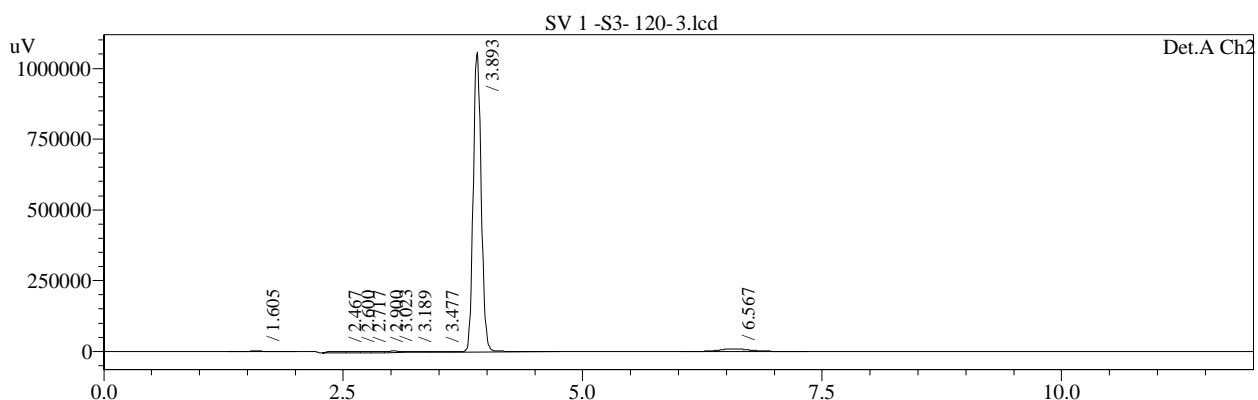
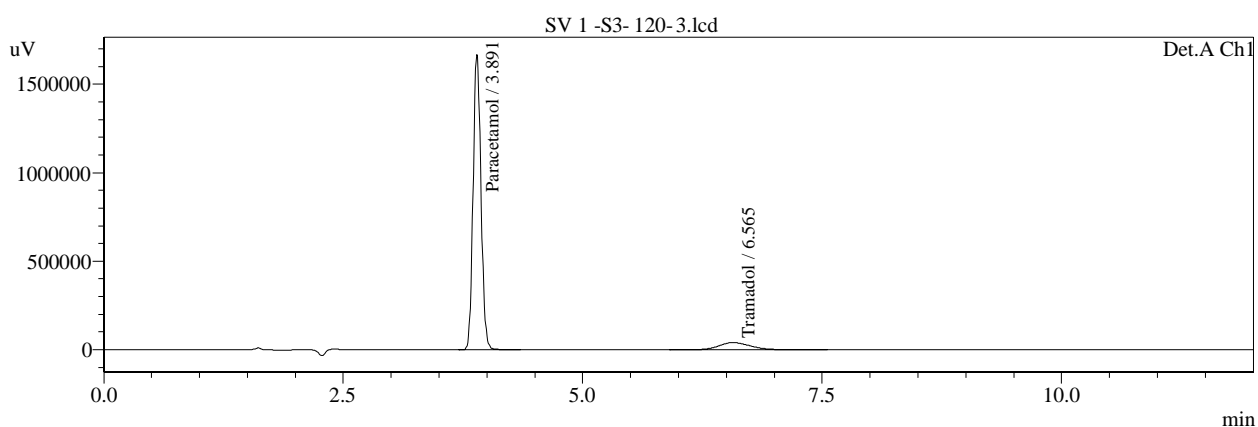
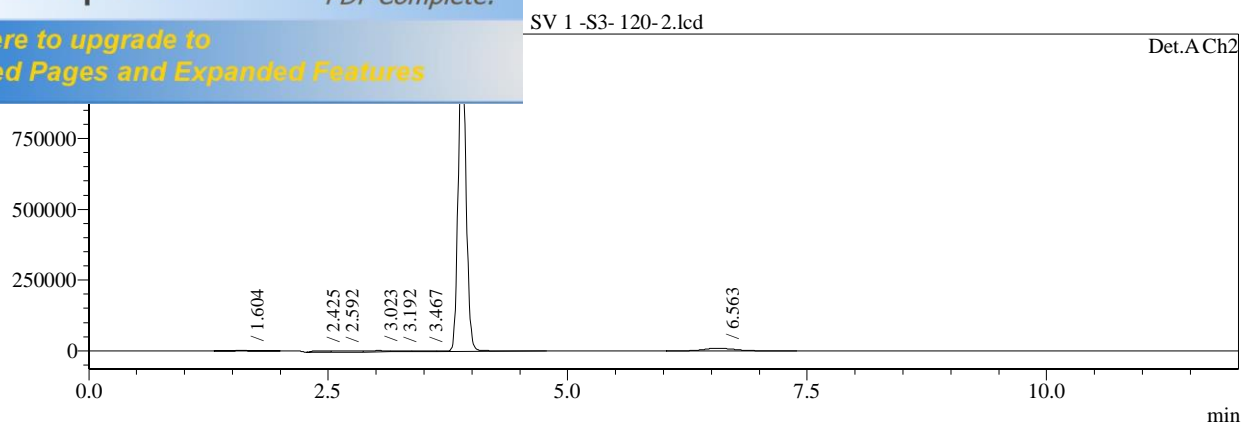












<< Detector A >>

Title	Sample Name	Sample ID	Paracetamol	Tramadol
SE1- S3- 80 -1.lcd	Paracetamol et t	SE 3	6401325	589352
SE1- S3- 80 -2.lcd	Paracetamol et t	SE 3	6249833	32448
SE1-S3 - 90 -1.lcd	Paracetamol et t	SE 3	7150629	644108
SE1-S3 - 90 -2.lcd	Paracetamol et t	SE 3	7181520	722940
SE1 - S3-100 -1.lcd	Paracetamol et t	SE 3	7979729	734766
SE1 - S3-100 -2.lcd	Paracetamol et t	SE 3	7938596	810583
SE1-S3- 110 -1.lcd	Paracetamol et t	SE 3	8748348	813402
SE1-S3- 110 -2.lcd	Paracetamol et t	SE 3	8686360	896237
SE1 -S3- 120 - 1.lcd	Paracetamol et t	SE 3	9529406	857313
SE1 -S3- 120 - 2.lcd	Paracetamol et t	SE 3	9499010	969234
SV1- S3- 80 -1.lcd	Paracetamol et t	SE 3	6311376	609419
SV1- S3- 80 -2.lcd	Paracetamol et t	SE 3	6422761	633873
SV1- S3- 80 -3.lcd	Paracetamol et t	SE 3	6322996	639174
SV1- S3- 90 -1.lcd	Paracetamol et t	SE 3	7218841	730629
SV1- S3- 90 -2.lcd	Paracetamol et t	SE 3	7214466	733897
SV1- S3- 90 -3.lcd	Paracetamol et t	SE 3	7131103	730881
SV1 -S3- 100 -1.lcd	Paracetamol et t	SE 3	7978512	801906
SV1 -S3- 100 -2.lcd	Paracetamol et t	SE 3	8013225	808657
SV1 -S3- 100 -3.lcd	Paracetamol et t	SE 3	7971688	807085



PDF

Complete

Your complimentary
use period has ended.
Thank you for using
PDF Complete.

Click Here to Upgrade to
Unlimited PDF to Word Expanded Features

Title	Sample Name	Sample ID	Paracetamol	Tramadol
SV1-S3-110-1.lcd	Paracetamol et t	SE 3	8815741	877404
SV1-S3-110-2.lcd	Paracetamol et t	SE 3	8780874	886241
SV1-S3-110-3.lcd	Paracetamol et t	SE 3	8408364	879713
SV 1 -S3- 120- 1.lcd	Paracetamol et t	SE 3	9665135	955167
SV 1 -S3- 120- 2.lcd	Paracetamol et t	SE 3	9552618	961972
SV 1 -S3- 120- 3.lcd	Paracetamol et t	SE 3	9522258	966905
Average			7947788	763732
%RSD			14.447	25.050
Maximum			9665135	969234
Minimum			6249833	32448
Standard Deviation			1148208	191314



ANNEXE III

LES MONOGRAPHIES

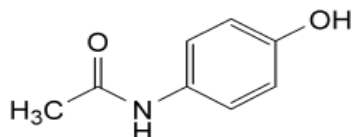


MONOGRAPHIE DU PARACETAMOL

ANNEXE III : MONOGRAPHIE DU PARACETAMOL

PARACÉTAMOL

Paracetamolum



C₈ H₉ NO₂

Mr 151,2

[103-90-2]

Definition

N-(4-Hydroxyphényl) acétamide.

Teneur : 99,0 pour cent à 101,0 pour cent (substance desséchée).

Caractères

- Aspect : poudre cristalline, blanche ou sensiblement blanche.
- Solubilité : assez soluble dans l'eau, facilement soluble dans l'alcool, très peu soluble dans le chlorure de méthylène.

Identification

Première identification : A, C.

Seconde identification : A, B, D, E.

A. Point de fusion (2.2.14) : 168 °C à 172 °C.

B. Dissolvez 0,1 g de paracétamol dans du méthanol R et complétez à 100,0 ml avec le même solvant. Prélevez 1,0 ml de solution, ajoutez 0,5 ml d'une solution d'acide chlorhydrique R à 10,3 g/l et complétez à 100,0 ml avec du méthanol R. Protégez la solution d'une lumière vive et mesurez immédiatement l'absorbance (2.2.25) au maximum à 249 nm. L'absorbance spécifique à ce maximum est de 860 à 980.

C. Spectrophotométrie d'absorption dans l'infrarouge (2.2.24).

-Préparation : pastilles.

-Comparaison : paracétamol SCR.

D. Chauffez à ébullition 0,1 g de paracétamol avec 1 ml d'acide chlorhydrique R pendant 3 min. Ajoutez 1 ml d'eau R et refroidissez dans un bain de glace. Il ne se forme aucun précipité. Ajoutez 0,05 ml d'une solution de dichromate de potassium R à 4,9 g/l. Il se développe une coloration violette qui ne vire pas au rouge.

E. Le paracétamol donne la réaction de l'acétyle (2.3.1). Effectuez le chauffage sur une flamme nue.

ANNEXE III : MONOGRAPHIE DU PARACETAMOL

Essai

Substances apparentées. Chromatographie liquide (2.2.29).

Préparez les solutions immédiatement avant l'emploi.

- Solution à examiner : dissolvez 0,200 g de paracétamol dans 2,5 ml de méthanol R contenant 4,6 g/l d'une solution d'hydroxyde de tétrabutylammonium R à 400 g/l et complétez à 10,0 ml avec un mélange à volumes égaux d'une solution de phosphate disodique R à 17,9 g/l et d'une solution de phosphate monosodique R à 7,8 g/l.
- Solution témoin (a) : prélevez 1,0 ml de solution à examiner et complétez à 50,0 ml avec la phase mobile. Prélevez 5,0 ml de cette solution et complétez à 100,0 ml avec la phase mobile.
- Solution témoin (b) : prélevez 1,0 ml de solution témoin (a) et complétez à 10,0 ml avec la phase mobile.
- Solution témoin (c) : dissolvez 5,0 mg de 4-aminophénol R, 5 mg de paracétamol SCR et 5,0 mg de chloroacétanilide R dans du méthanol R et complétez à 20,0 ml avec le même solvant. Prélevez 1,0 ml de solution et complétez à 250,0 ml avec la phase mobile.
- Solution témoin (d) : dissolvez 20,0 mg de 4-nitrophénol R dans du méthanol R et complétez à 50,0 ml avec le même solvant. Prélevez 1,0 ml de solution et complétez à 20,0 ml avec la phase mobile.

Colonne :

-Dimensions : $l = 0,25$ m, $\varnothing = 4,6$ mm,

-Phase stationnaire : gel de silice octylsilylé pour chromatographie R (5 μ m),

-Température : 35 °C.

-Phase mobile : mélangez 375 volumes d'une solution de phosphate disodique R à 17,9 g/l, 375 volumes d'une solution de phosphate monosodique R à 7,8 g/l et 250 volumes de méthanol R contenant 4,6 g/l d'une solution d'hydroxyde de tétrabutylammonium R à 400 g/l.

-Débit : 1,5 ml/min.

-Détection : spectrophotomètre à 245 nm.

-Injection : 20 μ l.

-Enregistrement : 12 fois le temps de rétention du paracétamol.

-Rétention relative par rapport au paracétamol (temps de rétention = environ 4 min) : impureté K = environ 0,8 ; impureté F = environ 3 ; impureté J = environ 7.

-Conformité du système : solution témoin (c) :

ANNEXE III : MONOGRAPHIE DU PARACETAMOL

Résolution : au minimum 4,0 entre les pics dus à l'impureté K et au paracétamol

-Rapport signal/bruit : au minimum 50 pour le pic dû à l'impureté J.

- Limites :

- Impureté J : au maximum 0,2 fois la surface du pic correspondant dans le chromatogramme obtenu avec la solution témoin (c) (10 ppm).
- Impureté K : au maximum la surface du pic correspondant dans le chromatogramme obtenu avec la solution témoin (c) (50 ppm).
- Impureté F : au maximum la moitié de la surface du pic correspondant dans le chromatogramme obtenu avec la solution témoin (d) (0,05 pour cent).
- Toute autre impureté : au maximum la moitié de la surface du pic principal du chromatogramme obtenu avec la solution témoin (a) (0,05 pour cent).
- Total des autres impuretés : au maximum la surface du pic principal du chromatogramme obtenu avec la solution témoin (a) (0,1 pour cent).
- Limite d'exclusion pour le calcul du total des autres impuretés : la surface du pic principal du chromatogramme obtenu avec la solution témoin (b) (0,01 pour cent).

Métaux lourds (2.4.8) : au maximum 20 ppm.

Dissolvez 1,0 g de paracétamol dans un mélange de 15 volumes d'eau R et de 85 volumes d'acétone R, puis complétez à 20 ml avec le même mélange de solvants. 12 ml de la solution satisfont à l'essai limite B. Préparez le témoin avec une solution à 1 ppm de plomb (Pb) obtenue par dilution de la solution à 100 ppm de plomb (Pb) R avec un mélange de 15 volumes d'eau R et de 85 volumes d'acétone R.

Perte à la dessiccation (2.2.32) : au maximum 0,5 pour cent, déterminé à l'étuve à 105 °C sur 1,000 g de paracétamol.

Cendres sulfuriques (2.4.14) : au maximum 0,1 pour cent, déterminé sur 1,0 g de paracétamol.

Dosage

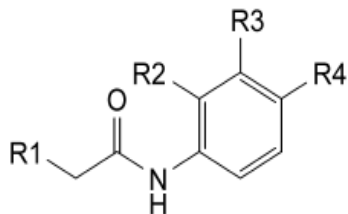
Dissolvez 0,300 g de paracétamol dans un mélange de 10 ml d'eau R et de 30 ml d'acide sulfurique dilué R. Chauffez à reflux pendant 1 h et, après refroidissement, complétez à 100,0 ml avec de l'eau R. A 20,0 ml de solution, ajoutez 40 ml d'eau R, 40 g de glace, 15 ml d'acide chlorhydrique dilué R et 0,1 ml de ferroïne R. Titrez par le sulfate de cérium 0,1M jusqu'à coloration jaune-vert. Effectuez un titrage à blanc. 1 ml de sulfate de cérium 0,1 M correspond à 7,56 mg de C₈ H₉ NO₂.

Conservation

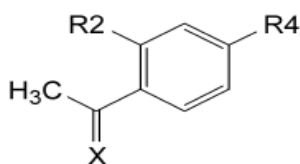
ANNEXE III : MONOGRAPHIE DU PARACETAMOL

A l'abri de la lumière.

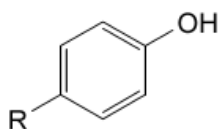
Impuretés



- A.** R1=R3=R4=H, R2=OH: *N*-(2-hydroxyphényl) acétamide,
B. R1 = CH3, R2 = R3 = H, R4 = OH : *N*-(4-hydroxyphényl) propanamide,
C. R1 = R2 = H, R3 = Cl, R4 = OH : *N*-(3-chloro-4- hydroxyphényl) acétamide,
D. R1 = R2 = R3 = R4 = H : *N*-phénylacétamide,
H. R1 = R2 = R3 = H, R4 = O-CO-CH3 : acétate de 4-(acétylamino)phényle,
J. R1 = R2 = R3 = H, R4 = Cl : *N*-(4-chlorophényl)acétamide (chloroacétanilide),



- E.** X = O, R2 = H, R4 = OH : 1-(4-hydroxyphényl) éthanone,
G. X = N-OH, R2 = H, R4 = OH : 1-(4-hydroxyphényl) éthanoneoxime,
I. X = O, R2 = OH, R4 = H : 1-(2-hydroxyphényl) éthanone,



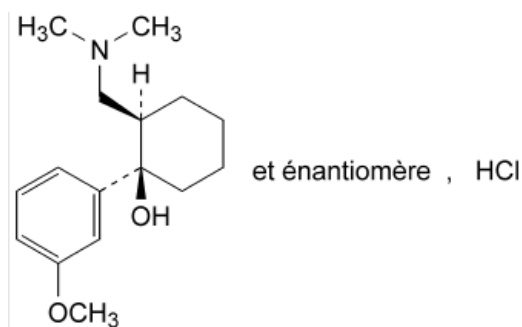
- F.** R = NO2 : 4-nitrophénol,
K. R = NH2 : 4-aminophénol



MONOGRAPHIE DU TRAMADOL

TRAMADOL (CHLORHYDRATE DE)

Tramadoli hydrochloridum



$C_{16}H_{26}ClNO_2$

Mr 299,8

[36282-47-0]

Définition

Chlorhydrate de (1*RS*, 2*RS*)-2-[(diméthylamino) méthyl]-1-(3-méthoxyphényl)cyclohexanol.

Teneur : 99,0 pour cent à 101,0 pour cent (substance anhydre).

Caractères

- Aspect : poudre cristalline blanche ou sensiblement blanche.
- Solubilité : facilement soluble dans l'eau et dans le méthanol, très peu soluble dans l'acétone.

Identification

- Première identification : B, D.
- Seconde identification : A, C, D.

A. Point de fusion (2.2.14) : 180 °C à 184 °C.

B. Spectrophotométrie d'absorption dans l'infrarouge (2.2.24).

Comparaison : chlorhydrate de tramadol SCR.

C. Examinez les chromatogrammes obtenus dans l'essai de l'impureté E.

Résultats : la tache principale du chromatogramme obtenu avec la solution à examiner (b) est semblable quant à sa position et ses dimensions à la tache principale du chromatogramme obtenu avec la solution témoin (a).

D. Le chlorhydrate de tramadol donne la réaction (a) des chlorures (2.3.1).

Essai

- ✓ **Solution S** : dissolvez 1,0 g de chlorhydrate de tramadol dans de l'eau R et complétez à 20 ml avec le même solvant.
- ✓ **Aspect de la solution** : la solution S est limpide (2.2.1) et incolore (2.2.2, Procédé II).

ANNEXE III : MONOGRAPHIE DU TRAMADOL

- ✓ **Acidité** : a 10 ml de solution S, ajoutez 0,2 ml de solution de rouge de méthyle R et 0,2 ml d'acide chlorhydrique 0,01 M. La solution est rouge. Le virage de l'indicateur au jaune ne nécessite pas plus de 0,4 ml d'hydroxyde de sodium 0,01 M.
 - ✓ **Angle de rotation optique** (2.2.7) : $-0,10^{\circ}$ à $+0,10^{\circ}$, déterminé avec la solution S.
 - ✓ **Impureté E** : Chromatographie sur couche mince (2.2.27).
 - Solution à examiner (a) : dissolvez 0,10 g de chlorhydrate de tramadol dans du méthanol R et complétez à 2 ml avec le même solvant.
 - Solution à examiner (b). : prélevez 1 ml de solution à examiner (a) et complétez à 10 ml avec du méthanol R.
 - Solution témoin (a) : dissolvez 25 mg de chlorhydrate de tramadol SCR dans du méthanol R et complétez à 5 ml avec le même solvant.
 - Solution témoin (b) : dissolvez 5 mg d'impureté E de tramadol SCR dans 5 ml de méthanol R. Prélevez 1 ml de solution et complétez à 10 ml avec du méthanol R.
 - Solution témoin (c) : dissolvez 5 mg d'impureté A de tramadol SCR dans 1 ml de solution témoin (a).
 - ✓ **Plaque** : plaque au gel de silice F₂₅₄ pour CCM R prélavée avec du méthanol R.
 - ✓ **Phase mobile** : ammoniacque concentrée R, 2-propanol R, toluène R (1:19:80 V/V/V).
- Dépôt : 10 µl.
- Développement : sur les 2/3 de la plaque. Saturez la plaque avec de l'ammoniacque concentrée R pendant 20 min. Introduisez de l'ammoniacque concentrée R dans l'un des réservoirs d'une cuve à double bac. Immédiatement avant le développement, introduisez la phase mobile dans l'autre réservoir. Placez la plaque dans la cuve en vous assurant que la couche de gel de silice soit orientée vers le milieu de la cuve.
- Séchage : à l'air.
- Détection : exposez la plaque aux vapeurs d'iode pendant 1 h ; examinez en lumière ultraviolette à 254 nm.
- Conformité du système : le chromatogramme obtenu avec la solution témoin (c) présente 2 taches nettement séparées.
- Limite : dans le chromatogramme obtenu avec la solution à examiner (a) : impureté E : s'il apparaît une tache due à l'impureté E, elle n'est pas plus grande ni plus intense que la tache du chromatogramme obtenu avec la solution témoin (b) (0,2 pour cent).
- Substances apparentées.** Chromatographie liquide (2.2.29).
- Solution à examiner : dissolvez 0,15 g de chlorhydrate de tramadol dans la phase mobile et complétez à 100 ml avec la phase mobile.

ANNEXE III : MONOGRAPHIE DU TRAMADOL

- Solution témoin (a) : prélevez 2,0ml de solution à examiner et complétez à 10,0 ml avec la phase mobile , prélevez 1,0 ml de cette solution et complétez à 100 ml avec la phase mobile.
- Solution témoin (b) : dissolvez 5 mg d'impureté A de tramadol SCR dans 4,0 ml de solution à examiner et complétez à 100 ml avec la phase mobile.

Colonne :

-Dimensions : $l = 0,25 \text{ m}$, $\varnothing = 4,0 \text{ mm}$,

-Phase stationnaire : gel de silice octylsilylé désactivé pour les bases postgreffé pour chromatographie R ($5 \mu\text{m}$).

-Phase mobile : 295 volumes d'acétonitrile R et 705 volumes d'un mélange de 0,2 ml d'acide trifluoracétique R et de 100 ml d'eau R.

-Débit : 1,0ml/min.

-Détection : spectrophotomètre à 270 nm.

-Injection : 20 μl .

-Enregistrement : 4 fois le temps de rétention du tramadol.

-Rétention relative par rapport au tramadol (temps de rétention = environ 5 min) : impureté A = environ 0,85.

-Conformité du système : solution témoin (b) :

Résolution : au minimum 2,0 entre les pics dus à l'impureté A et au tramadol.

- Limites :

- Impureté A : au maximum la surface du pic principal du chromatogramme obtenu avec la solution témoin (a) (0,2 pour cent)
- Toute autre impureté : au maximum 0,5 fois la surface du pic principal du chromatogramme obtenu avec la solution témoin (a) (0,1 pour cent)
- Total : au maximum 2 fois la surface du pic principal du chromatogramme obtenu avec la solution témoin (a) (0,4 pour cent)
- Limite d'exclusion : 0,1 fois la surface du pic principal du chromatogramme obtenu avec la solution témoin (a) (0,02 pour cent).

Métaux lourds (2.4.8) : au maximum 20 ppm.

Dissolvez 2,0 g de chlorhydrate de tramadol dans de l'eau R et complétez à 20 ml avec le même solvant. 12 ml de solution satisfont à l'essai limite A. Préparez le témoin avec la solution à 2 ppm de plomb (Pb) R.

Eau (2.5.12) : au maximum 0,5 pour cent, déterminé sur 1,000 g de chlorhydrate de tramadol.

ANNEXE III : MONOGRAPHIE DU TRAMADOL

Cendres sulfuriques (2.4.14) : au maximum 0,1 pour cent, déterminé sur 1,0 g de chlorhydrate de tramadol.

Dosage

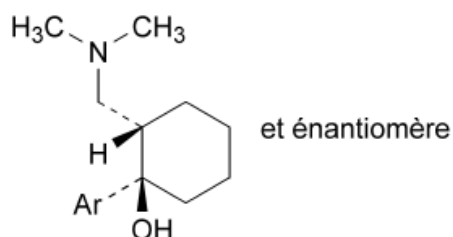
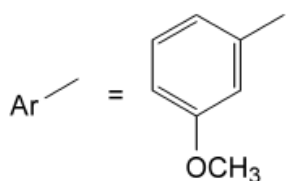
Dissolvez 0,180 g de chlorhydrate de tramadol dans 25 ml d'acide acétique anhydre R et ajoutez 10 ml d'anhydride acétique R. Titrez avec de l'acide perchlorique 0,1 M et déterminez le point de fin de titrage par potentiométrie (2.2.20).

1 ml d'acide perchlorique 0,1 M correspond à 29,98 mg de $C_{16}H_{26}ClNO_2$.

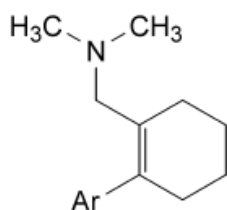
Conservation

A l'abri de la lumière.

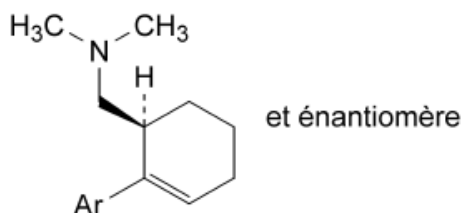
Impuretés



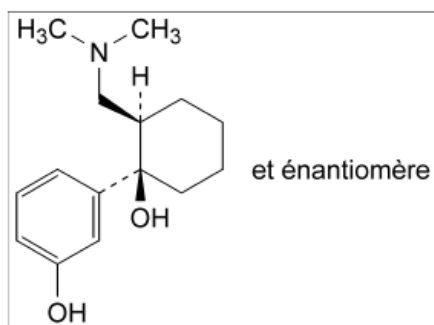
A. (1*RS*, 2*SR*)-2-[(diméthylamino) méthyl]-1-(3-méthoxyphényl) cyclohexanol



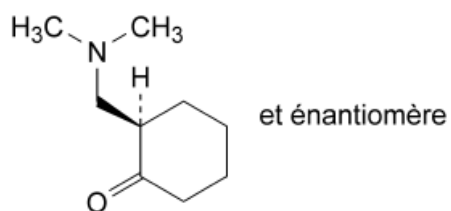
B. [2-(3-méthoxyphényl) cyclohex-1-ényl]-*N,N*diméthylméthanamine



C. (1*RS*)-[2-(3-méthoxyphényl) cyclohex-2-ényl]-*N,N*diméthylméthanamine



D. (1*RS*, 2*RS*)-2-[(diméthylamino) méthyl]-1-(3-hydroxyphényl) cyclohexanol



E. (2*RS*)-2-[(diméthylamino) méthyl] cyclohexanone



ANNEXE IV

TABLE DE STUDENT

ANNEXE IV : TABLE DE STUDENT

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 V

CALCULS DES INDICES POUR

LE TRI

DES MODELES D'ETALONNAGE

ANNEXE V : CALCULE DES INDICES POUR LE TRI DES MODELS D'ETALONNAGE

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 :

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

Où Cmax et Cmin 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 :

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

Où λ est la limite d'acceptation et Cmax, Cmin 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 :

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

ANNEXE V : CALCULE DES INDICES POUR LE TRI DES MODELS D'ETALONNAGE

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:

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

Résumé :

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

Le but du présent travail est de mettre au point et de valider une méthode de dosage simultanée du paracétamol et du tramadol dans des comprimés 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 la revue pharmaceutique STP Pharma Pratique.

Nous avons commencé dans un premier temps par une étude bibliographique concernant les deux principes actifs étudiés et l'approche adoptée au cours de la validation de la méthode d'analyse.

Dans la partie pratique et pour la mise au point de la technique, nous avons réalisé une série de tests afin d'optimiser les conditions analytiques, cette étape s'est concrétisée par l'élaboration d'un protocole de validation, objet de la suite du travail.

Aux prémices de la validation, nous avons pu démontrer la sélectivité de la méthode d'analyse en se basant sur le test de comparaison des pentes. Ensuite et après réalisation des expériences sur une gamme d'étalonnage et une gamme de validation, nous avons calculé les différents critères statistiques des différents modèles générés pour pouvoir construire les profils d'exactitude.

La technique développée s'est avérée spécifique, linéaire, sensible, exacte dans l'intervalle [260, 390] et [30, 45] µg/ml pour le paracétamol et le Tramadol respectivement avec un risque d'avoir au maximum de 10 % des futures mesures en dehors des limites d'acceptations fixées à [-5, +5] %. Cela démontre la validité de la méthode développée et son aptitude à être appliquée en routine pour le dosage simultané du paracétamol et du tramadol dans les comprimés dosés à 325mg de paracétamol et 37,5mg du tramadol.

Mots clés : Paracétamol, Tramadol, comprimés, validation analytique, profil d'exactitude, HPLC.

Abstract

Quality control of pharmaceuticals products is a regulatory requirement that all pharmaceuticals laboratories must meet with using their single laboratory validated analytical methods.

The aim of this work is to develop and validate a method for the simultaneous determination of paracetamol and tramadol in tablets using high performance liquid chromatography. The method was validated according to the approach of the total error proposed by a SFSTP commission using the accuracy profile as decision tool.

We started with a bibliographic study of the two studied components and the approach adopted during the validation of the analytical method.

In the practical part, we have carried out a serie of tests in order to optimize the analytical conditions and to develop the validation protocol.

After that, before the validation step, we have demonstrated the selectivity of the analytical method using student test for the comparison of the two-slope with and without the matrix. Then, a series calibration and validation standard were used to calculate the different statistical criteria for the different models tested and the accuracy profiles were built for each model.

The results demonstrated that the developed method was accurate with good selectivity and linearity in the range of [260, 390] and [30, 45] $\mu\text{g/ml}$ for le paracetamol and Tramadol, respectively with a risk of having a maximum of 10% of the futures measurements outside the acceptance limits settled at [-5, + 5] %. This confirms the validity of the developed method and its suitability for its routine application in the simultaneous determination of paracetamol and tramadol in the tablets of 325 mg of paracetamol and 37.5 mg of tramadol.

Key words: Paracétamol, Tramadol, tablets, analytical validation, accuracy profile, HPLC.