

الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية

République Algérienne démocratique et populaire

وزارة التعليم العالي والبحث العلمي

Ministère de l'enseignement supérieur et de la recherche scientifique

Université Mouloud MAMMERRI  
Faculté de Médecine  
Département de Pharmacie  
TIZI-OUZOU

جامعة مولود معمري  
كلية الطب  
فرع الصيدلة  
تيزي وزو

MÉMOIRE DE FIN D'ÉTUDES EN VUE DE L'OBTENTION D'UN  
DIPLÔME D'ÉTAT DE DOCTEUR EN PHARMACIE

Déposé le : 12 septembre 2021.

Thème :

**Optimisation et validation d'une méthode de dosage  
simultané du Paracétamol et de la Caféine dans des  
comprimés par HPLC-UV**

Réalisé par :

M<sup>elle</sup> DAHOUMANE Zineb

M<sup>elle</sup> YAKER Smina

M<sup>elle</sup> AMARA Maïssa

M<sup>elle</sup> OUKHELIFA Nouara

Encadrées par :

Dr. BEN SI SAID Hassan

Co-encadrées par :

Dr. AKROUM Adel

Membres du jury

Pr. MAMOU Marzouk

MCAHU-Faculté de médecine UMMTO

Président de jury

Dr. BEN SI SAID Hassan

MAHU-Faculté de médecine UMMTO

Promoteur

Dr. AKLI Karima

Assistante-CHU Tizi-Ouzou

Examinatrice

Dr. AKROUM Adel

Résident-Faculté de médecine UMMTO

Co-promoteur

Année universitaire : 2020/2021

# Remerciements

*Nous remercions au premier lieu « Dieu » le tout puissant qui nous a donné la force et la patience pour accomplir ce travail.*

*Nous tenons à exprimer nos remerciements les plus vifs à notre promoteur Dr. BEN SI SAID Hassan, maître-assistant en chimie analytique pour la qualité exceptionnelle de son encadrement de ce mémoire, sa riche collaboration, son aide précieuse, sa constante disponibilité, sa sympathie et son accueil chaleureux au niveau du laboratoire de chimie analytique, veuillez agréer l'expression de notre profonde admiration pour toutes vos qualités humaines et scientifiques, qui nous servent d'exemple.*

*Nos remerciements s'adressent également à notre co-promoteur Dr. AKROUM Adel, résident en chimie analytique, pour le partage de ses connaissances et de ses expériences dans ce domaine, pour son soutien, sa disponibilité, ses conseils et orientations tout au long de ce projet.*

*Au Pr. MAMOU Marzouk, maître de conférences en chimie analytique, pour nous avoir fait l'honneur de présider le jury d'évaluation de ce mémoire. Soyez assuré de notre sincère gratitude et notre profond respect.*

*Au Dr. AKLI Karima, assistante en chimie analytique, nous vous remercions d'avoir accepté d'examiner ce travail. Nous sommes infiniment sensibles à l'honneur que vous nous faites en acceptant de siéger parmi notre jury. Veuillez trouver ici, le témoignage de notre grande estime et de notre sincère reconnaissance.*

*A tous ceux qui nous ont accompagnées durant tout notre cursus universitaire, ainsi qu'à toute personne qui a contribué de près ou de loin au succès de ce modeste travail, vous avez toute notre gratitude*

# Dédicaces

*Je remercie tout d'abord le **bon Dieu** le tout puissant qui m'a donné le savoir, la volonté et le courage d'arriver là où je suis aujourd'hui, et qui m'a offert les meilleures personnes au monde pour qu'elles soient à mes côtés, auxquelles je dédie ce travail.*

***Autant d'expressions aussi éloquentes soient-elles ne sauraient exprimer la profonde gratitude, la reconnaissance, le respect et l'amour que j'éprouve pour mes parents.***

*À toi **mon Père** ; mon meilleur mentor et motivateur, ma source de sérénité et de réconfort. Je n'aurais jamais la force de poursuivre mes rêves et je ne serais jamais la personne courageuse et prospère que je suis aujourd'hui sans ton aide indéfectible, tes conseils aimants, et encouragements constants. Tu m'as inspiré à être forte, à faire face à toutes les situations, et m'as toujours tenu la main. Je ferai de mon mieux pour rester ta fierté et ne jamais te décevoir. Je suis tellement fière et chanceuse de t'avoir dans ma vie papa, je veux simplement te dire merci d'être le meilleur père du monde.*

*À toi **ma Mère** ; mon exemple de la bonté et de l'amour parfait et inconditionnel, tu m'as constamment procuré de la tendresse, de la douceur, et de l'affection. Tu as toujours su être l'oreille attentive, la bienveillance inépuisable et l'enthousiasme contagieux. Merci pour tes sincères prières qui m'ont accompagnée. Rien n'est plus précieux que ton sourire maman, tu es tout pour moi.*

*À **ma Sœur et mes Frères** ; merci pour vos encouragements incessants, pour votre humour contagieux, merci d'avoir été toujours là pour moi. Je vous souhaite le bonheur et la réussite dans tout ce que vous entreprenez.*

*À la mémoire de mes **grands-parents paternels** ; vous serez toujours présents dans mon cœur, puisse Dieu vous avoir en sa sainte miséricorde.*

*À mes **grands-parents maternels**. À tous mes **oncles et tantes**. À tous mes **cousins et cousines**.*

*À mes meilleurs **amis** d'enfance, du lycée et de la fac avec qui j'ai partagé des bons moments inoubliables. À toi particulièrement, ma très chère amie et sœur **Maissa**, que notre amitié restera intacte et durera pour toujours.*

*À l'ensemble des membres de notre quadrinôme : **Maissa, Nouara et Smina** ; je vous souhaite plein de succès et d'épanouissement dans vos vies.*

*Zineb* 

# Dédicaces

*Avec l'expression de ma reconnaissance je dédie ce modeste travail et cet évènement marquant de ma vie ; premièrement et avant tout à mes très chers parents ceux qui quels que soit les termes embrassés je n'arriverai jamais à leurs exprimer mon amour sincère ; ce travail est le fruit de tous les sacrifices qu'ils ont déployés pour mon éducation et ma formation.*

*A la mémoire de mon père qui est parti trop tôt ; cependant sa présence réside dans mon cœur et personne ne peut prendre sa place ni remplacer sa valeur ; c'est grâce à son amour et à l'image de son sourire que j'avance, il a toujours été pour moi un exemple de réussite, j'espère que, du monde le plus puissant qui est sien maintenant, il apprécie cet humble geste comme preuve de reconnaissance et d'amour, puisse dieu le tout puissant, l'avoir en sa sainte miséricorde.*

*A l'être le plus cher de ma vie, ma source d'amour et de tendresse, mon adorable maman, ta présence à mes côtés a toujours été ma source de force je me sens bénie de t'avoir dans ma vie, aucune dédicace ne saurait exprimer l'amour et l'estime que j'ai toujours eu pour toi.*

*Aux plus douces sœurs au monde : **Lyza et Malha.***

*A mes adorables frères : **Rayane et Rabah.***

*Une dédicace spéciale à mes adorables **Ouardia, Hassina et Rachid.***

*A mes deux famille maternelle et paternelle : **Haddadj et Amara** tous mes oncles mes tantes et mes grands- parents ; aucun langage ne saurait exprimer mon respect et ma considération pour votre soutien et encouragement, je vous dédie ce travail en reconnaissance de l'amour et que vous m'offrez quotidiennement.*

*Dédicace assez chaleureuse à mes chères cousins et cousines : **Tinhinane, Célia, Lydia, maya, zakia, Massi, Naim et Lylia.***

*A toutes mes amies : **Mira, Lydia, Sarah et Lynda.***

*A ma meilleure copine durant tout mon cursus universitaire ma chère amie et sœur **Zineb.***

*Sans oublier la triade avec qui j'ai mené ce travail du début jusqu'à la fin **Nouara, Zineb et Smina**, ça été un grand plaisir de travailler avec vous.*

*A tous mes enseignants du primaire jusqu'à la fin de mon cursus universitaire.*

*A tout ceux ou celles qui me sont chers et que j'ai oublié de citer.*

**Maïssa**

# Dédicaces

*Au nom de Dieu, le clément, le miséricordieux*

*C'est avec une profonde gratitude que je dédie ce modeste travail ;*

*À mes très chers **parents** ; nulle dédicace ne saurait traduire tout l'amour, le respect et l'estime que j'ai pour vous. Vous avez tant sacrifié pour que j'arrive là où je suis, vous m'avez donné la force d'aller de l'avant et offert tout le soutien dont j'avais besoin. Je prie Dieu, le tout puissant, vous accorder santé, bonheur et longue vie et faire en sorte que jamais je ne vous déçoive.*

*À mon précieux frère **Boussad** et à mon support dans la vie ; mes adorables sœurs **Lydia** et **Lysa**. Je vous souhaite un avenir radieux plein de réussite.*

*Particulièrement à **Aïssa**, à mon cher oncle **Belaïd** et à mes tantes **Malha** et **Ouiza**, que j'aime tant, que Dieu vous procure santé et longue vie inshallah.*

*À mes meilleures amies **Nouara** et **Kenza**, avec qui j'ai partagé des moments inoubliables durant ces six années d'études. Je vous souhaite tout le bonheur du monde.*

*À vous mes amies ; **Nouara**, **Maïssa**, **Zineb**, ensemble nous avons pu mener ce travail à terme.*

*À la mémoire de mon enseignant monsieur **FOUNAS Hamouche**, que Dieu ait pitié de son âme et l'accueille dans son vaste paradis, et à tous mes enseignants qui m'ont formé tout au long de mon cursus scolaire et universitaire.*

*Smína*

# Dédicaces

*Je tiens chaleureusement à dédier ce modeste travail à :*

*A mes très chers **parents**,*

*Autant de phrases aussi expressives soient-elles ne sauraient montrer ma profonde affection et mon immense gratitude que j'éprouve pour vous, vous n'avez cessé de me soutenir et m'encourager durant toutes les années de mes études, je vous dois ce que je suis aujourd'hui, puisse Dieu le tout puissant vous donner santé, bonheur et longue vie.*

*A mon frère **Rachid** et ma sœur **Thanina**, pour leur soutien moral et leurs encouragements permanents, je vous souhaite un avenir radieux, rayonnant de bonheur et de fraternité.*

*A ma très chère grand-mère **Horia**,*

*Tes précieux conseils m'ont toujours guidé vers le pas de la réussite, que ce modeste travail soit l'exaucement de tes vœux tant allégués, j'implore Dieu qu'il t'apporte santé et longue vie.*

*A mes oncles **Nourredine, Amar, Madjid, Karim, El Ghani**, et tantes **Rosa, Nadira et Djamila**, pour leurs encouragements et leur indéfectible soutien.*

*A mes braves amis qui m'ont soutenu de près ou de loin pendant tout mon parcours : **Smina, Lamia, Sara, Ali, Aghilas, Massinissa et Hakim**, je tiens à vous témoigner ma reconnaissance et ma profonde admiration.*

*Au trinôme **Smina, Maissa et Zineb**, ce fut un plaisir d'avoir mené ce travail avec vous, puisse Dieu le tout puissant vous procurer une longue et heureuse vie.*

*A tous ceux qui me sont chers.*

*A tous ceux qui luttent pour une cause juste.*

*A tous ceux qui luttent pour le bien et la paix.*

***Nouara***

## TABLE DES MATIÈRES

Table des matières.....	i
Liste des abréviations.....	vi
Listes des figures .....	viii
Liste des tableaux.....	ix
Introduction .....	1
Objectifs .....	3
Partie bibliographique.....	4
CHAPITRE I : PARACÉTAMOL-CAFÉINE.....	4
1 PARACÉTAMOL.....	4
1.1 Origine.....	4
1.1.1 Bref aperçu sur l’histoire du paracétamol .....	4
1.1.2 Synthèse du paracétamol.....	4
1.2 Dénomination et formule chimique.....	5
1.3 Propriétés physico-chimiques.....	6
1.4 Stabilité et conditions de dégradation.....	6
1.5 Propriétés pharmacologiques.....	7
1.5.1 Pharmacocinétique .....	7
1.5.1.1 Absorption .....	7
1.5.1.2 Distribution.....	7
1.5.1.3 Métabolisme .....	7
1.5.1.4 Elimination .....	7
1.5.2 Pharmacodynamie .....	8
1.6 Mécanisme d’action.....	8
1.7 Indications thérapeutiques .....	10
1.8 Effets indésirables.....	10
1.9 Contre-indications .....	11
1.10 Interactions médicamenteuses .....	11
1.11 Toxicité.....	12
2 CAFÉINE.....	13
2.1 Origine.....	13
2.1.1 Historique .....	13
2.1.2 Synthèse .....	13
2.1.2.1 Synthèse à partir de l’uracile .....	13

2.1.2.2	Synthèse à partir de la théobromine .....	14
2.2	Structure et dénomination.....	15
2.3	Propriétés physico-chimiques.....	15
2.4	Propriétés pharmacologiques.....	16
2.4.1	Pharmacocinétique .....	16
2.4.1.1	Absorption .....	16
2.4.1.2	Distribution.....	16
2.4.1.3	Métabolisme .....	16
2.4.1.4	Élimination .....	17
2.4.2	Pharmacodynamie .....	17
2.5	Mécanisme d'action.....	18
2.6	Intérêts et utilisations thérapeutiques .....	20
2.7	Effets indésirables.....	22
2.7.1	Métabolisme osseux et homéostasie calcique .....	22
2.7.2	Système cardiovasculaire .....	22
2.7.3	Système digestif .....	22
2.7.4	Sommeil et anxiété .....	22
2.7.5	Fertilité .....	22
2.8	Précautions d'emploi .....	22
2.9	Interactions médicamenteuses .....	23
2.10	Toxicité.....	23
3	ASSOCIATION PARACÉTAMOL-CAFÉINE.....	25
3.1	Associations fixes de médicaments .....	25
3.1.1	Avantages .....	25
3.1.2	Inconvénients .....	25
3.2	La caféine en tant qu'adjuvant analgésique.....	25
3.2.1	Intérêt de l'association .....	26
3.3	Spécialité pharmaceutique renfermant du paracétamol et de la caféine.....	26
3.4	Méthodes de dosage simultané du paracétamol et de la caféine .....	26
	CHAPITRE II : VALIDATION ANALYTIQUE.....	28
1	Place de la validation des méthodes d'analyse dans l'assurance qualité .....	28
2	Définition .....	28
3	Objectifs de la validation analytique.....	28
4	Procédures analytiques à valider.....	29
5	Aspect réglementaire et normatif.....	29
5.1	Documents ISO.....	29
5.2	Documents ICH .....	29

5.3	Documents de la FDA .....	29
5.4	Documents des commissions SFSTP .....	29
6	Cycle de vie d'une méthode.....	30
7	Critères de validation .....	31
8	Choix des critères de la validation .....	37
9	Validation d'une procédure analytique quantitative par le profil d'exactitude .....	37
10	Étapes de validation d'une méthode analytique en utilisant le profil d'exactitude.....	38
11	Protocole en phase de validation .....	39
12	Etude statistique de la validation analytique .....	41
12.1	Spécificité .....	41
12.2	Fonction de réponse.....	42
12.3	Alignement des observations.....	43
12.4	Prédiction inverse .....	44
12.5	Calcul de la justesse et de la fidélité.....	45
12.5.1	Modèle.....	45
12.5.2	Justesse .....	46
12.5.3	Fidélité.....	47
12.5.3.1	Calcul de la répétabilité et de la fidélité intermédiaire .....	47
12.6	Exactitude .....	48
12.7	Erreur totale et profil d'erreur totale.....	48
12.8	Calcul de l'intervalle de tolérance .....	49
12.9	Profil d'exactitude .....	50
12.9.1	Calcul .....	50
12.9.2	Choix de la fonction de réponse.....	50
12.10	Linéarité .....	51
12.11	Limite de quantification .....	51
	Partie pratique .....	52
	CHAPITRE I : MATÉRIELS ET MÉTHODES.....	52
1	MATÉRIELS .....	52
1.1	Verreries et autres .....	52
1.2	Appareillage.....	53
1.3	Matières premières .....	54
1.4	Réactifs .....	54
2	MÉTHODES.....	55
2.1	Optimisation de la méthode .....	55
2.2	Choix du protocole de validation.....	56
2.3	Choix des paramètres de validation.....	56

2.3.1	Niveaux de concentration.....	56
2.3.2	Limites d'acceptabilité ( $\lambda$ ) .....	56
2.3.3	Probabilité de confiance ( $\beta$ ) et risque d'erreur accepté ( $\alpha$ ) .....	57
2.3.4	Conditions expérimentales .....	57
2.3.4.1	Choix de la dilution .....	57
2.3.4.2	Choix du diluant .....	57
2.3.4.3	Préparation des solutions .....	57
2.3.4.4	Conditions chromatographiques .....	59
2.3.4.5	Préparation de la feuille de calcul.....	60
CHAPITRE II : RÉSULTATS ET DISCUSSION.....		60
1	RÉSULTATS.....	61
1.1	Chromatogrammes obtenus du dosage simultané des deux principes actifs .....	61
1.2	Temps de rétention obtenus .....	62
1.3	Calcul de la résolution .....	62
1.4	Informations concernant les données brutes.....	63
1.5	Spécificité et effet matrice .....	63
1.5.1	Comparaison des chromatogrammes .....	63
1.5.2	Confirmation de la spécificité sur les deux gammes d'étalonnage et de validation.....	66
1.6	Fonction de réponse.....	71
1.7	Profils d'exactitude obtenus .....	86
1.8	Choix de la fonction de réponse .....	89
1.9	Alignement des observations.....	89
1.10	Prédictions inverses .....	92
1.11	Justesse .....	93
1.12	Fidélité.....	94
1.13	Exactitude .....	95
1.14	Erreur totale et profil d'erreur totale.....	98
1.15	Intervalle de tolérance .....	99
1.16	Profil d'exactitude .....	100
1.17	Linéarité.....	102
1.18	Limites de quantification .....	105
2	DISCUSSION .....	106
2.1	Résolution.....	106
2.2	Spécificité et effet matrice.....	106
2.2.1	Comparaison des chromatogrammes .....	106
2.3	Choix de la fonction de réponse .....	107

2.4	Justesse .....	108
2.5	Fidélité.....	108
2.6	Erreur totale .....	109
2.7	Profil d'exactitude .....	109
2.8	Limites de quantification et intervalle de dosage .....	109
2.9	Linéarité.....	110
2.10	Comparaison avec d'autres études .....	110
2.11	Commentaire sur le profil d'exactitude .....	111
Conclusion .....		114
Références bibliographiques		
ANNEXES		
RÉSUMÉ		

## Liste des abréviations

**AA** : Acide Arachidonique.

**A1, A2a, A2b, A3** : Récepteurs de l'adénosine.

**AF** : Association Fixe.

**AMM** : Autorisation de Mise sur le Marché.

**AMP<sub>c</sub>** : Adénosine Monophosphate Cyclique.

**APAP** : Paracétamol.

**AVK** : Antivitamines K.

**CEI** : Commission Électronique Internationale.

**COX 3** : Cyclooxygénase de type 3.

**CV** : Coefficient de Variation.

**D2** : Récepteurs Dopaminergiques du type 2.

**DCI** : Dénomination Commune Internationale.

**DHPR** : Récepteur de la Dihydropyridine.

**Dyn A** : Dynorphine A.

**EMA** : Agence Européenne des Médicaments.

**FAAH** : Enzyme amidohydrolase des acides gras.

**FDA** : Food and Drug Administration.

**HPLC** : Chromatographie Liquide à Haute Performance.

**HTA** : Hypertension artérielle.

**ICH** : Conseil International d'Harmonisation des Exigences Techniques pour l'Enregistrement des Médicaments à Usage Humain.

**ISO** : Organisation Internatinal de Normalisation.

**IT** : Intervalle de Tolérance.

**IUPAC** : Union Internationale de Chimie Pure et Appliquée.

**LLOC** : Limite Inférieure de Quantification.

**LQ** : Limite de Quantification.

**NAPQI** : N-acétyl-para-benzoquinone imine.

**PAP** : Para-AminoPhénol.

**PG** : Prostaglandines.

**PGH<sub>2</sub>S** : Enzyme prostaglandine H<sub>2</sub> synthétase.

**PLA 2** : Phospholipase A<sub>2</sub>.

**PLM** : Phospholipases membranaires.

**Récepteurs CB1** : Récepteurs Cannabinoïdes de type 1.

**Récepteurs TRPV1** : Récepteurs Vanilloïdes de type 1.

**RyRs** : Récepteurs de la Ryanodine.

**SE** : Standard d'Étalonnage.

**SFSTP** : Société Française des Sciences et Techniques Pharmaceutiques.

**Site COX** : Site de la Cyclooxygénase.

**Site POX** : Site de la Peroxydase.

**SNC** : Système Nerveux Central.

**SR** : Réticulum Sarcoplasmique.

**SV** : Standard de Validation.

**ULOC** : Limite Supérieure de Quantification.

**UV** : Ultra-Violet.

## Liste des figures

<b>Figure 1</b> : Schéma d'acylation du PAP avec de l'acide acétique .....	4
<b>Figure 2</b> : Schéma d'acylation du PAP avec de l'anhydride acétique .....	5
<b>Figure 3</b> : Structure chimique du paracétamol .....	5
<b>Figure 4</b> : Schéma général représentatif du mécanisme d'action du paracétamol .....	9
<b>Figure 5</b> : Schéma réactionnel de la synthèse de la caféine à partir de l'uracile.....	14
<b>Figure 6</b> : Schéma réactionnel de la synthèse de la caféine à partir de la théobromine.....	14
<b>Figure 7</b> : Structure chimique de la caféine .....	15
<b>Figure 8</b> : Principales voies et enzymes impliquées dans la dégradation de la caféine .....	17
<b>Figure 9</b> : Le cycle du $\text{Ca}^{2+}$ lors du couplage excitation-contraction dans un muscle strié ....	18
<b>Figure 10</b> : Schéma représentant les différents mécanismes d'action de la caféine .....	19
<b>Figure 11</b> : Schéma récapitulatif des intérêts et utilisations thérapeutiques de la caféine .....	21
<b>Figure 12</b> : Cycle de vie d'une méthode d'analyse .....	31
<b>Figure 13</b> : Profil d'exactitude établi avec cinq niveaux de concentration .....	38
<b>Figure 14</b> : Logigramme de sélection d'un protocole de validation .....	40
<b>Figure 15</b> : Chromatogramme du standard d'étalonnage des deux principes actifs, niveau 100%.....	61
<b>Figure 16</b> : Chromatogramme du standard de validation des deux principes actifs, niveau 100%.....	61
<b>Figure 17</b> : Détermination des largeurs des pics à la base et des temps de rétention à partir du chromatogramme du standard de validation (niveau 100%).....	62
<b>Figure 18</b> : Chromatogramme du diluant non chargé de principe actif. ....	63
<b>Figure 19</b> : Chromatogramme du diluant avec placebo non chargé de principe actif.....	64
<b>Figure 20</b> : Chromatogramme du standard d'étalonnage du paracétamol, niveau 100%. ....	64
<b>Figure 21</b> : Chromatogramme du standard de validation du paracétamol, niveau 100%. ....	64
<b>Figure 22</b> : Chromatogramme du standard d'étalonnage de la caféine, niveau 100%.....	65
<b>Figure 23</b> : Chromatogramme du standard de validation de la caféine, niveau 100%.....	65
<b>Figure 24</b> : Courbe d'étalonnage du Paracétamol obtenue avec la fonction $y = bx + a$ (série 1) .....	72
<b>Figure 25</b> : Courbe d'étalonnage du Paracétamol obtenue avec la fonction $y = bx + a$ (série 2) .....	72
<b>Figure 26</b> : Courbe d'étalonnage du Paracétamol obtenue avec la fonction $y = bx + a$ (série 3) .....	73
<b>Figure 27</b> : Courbe d'étalonnage de la Caféine obtenue avec la fonction $y = bx + a$ (série 1)74	74
<b>Figure 28</b> : Courbe d'étalonnage de la Caféine obtenue avec la fonction $y = bx + a$ (série 2)74	74
<b>Figure 29</b> : Courbe d'étalonnage de la Caféine obtenue avec la fonction $y = bx + a$ (série 3)75	75
<b>Figure 30</b> : Courbe d'étalonnage du Paracétamol obtenue avec la fonction $y = bx$ (Série 1). .....	76
<b>Figure 31</b> : Courbe d'étalonnage du Paracétamol obtenue avec la fonction $y = bx$ (Série 2). 76	76
<b>Figure 32</b> : Courbe d'étalonnage du Paracétamol obtenue avec la fonction $y = bx$ (Série 3). 76	76
<b>Figure 33</b> : Courbe d'étalonnage de la caféine obtenue avec la fonction $y = bx$ (Série 1). ....	77
<b>Figure 34</b> : Courbe d'étalonnage de la caféine obtenue avec la fonction $y = bx$ (Série 2). ....	77
<b>Figure 35</b> : Courbe d'étalonnage de la caféine obtenue avec la fonction $y = bx$ (Série 3). ....	78

<b>Figure 36</b> : Courbe d'étalonnage du Paracétamol obtenue avec la fonction $\ln y = f(\ln x)$ (Série 1).....	79
<b>Figure 37</b> : Courbe d'étalonnage du Paracétamol obtenue avec la fonction $\ln y = f(\ln x)$ (Série 2).....	79
<b>Figure 38</b> : Courbe d'étalonnage du Paracétamol obtenue avec la fonction $\ln y = f(\ln x)$ (Série 3).....	80
<b>Figure 39</b> : Courbe d'étalonnage de la Caféine obtenue avec la fonction $\ln y = f(\ln x)$ (Série 1). .....	81
<b>Figure 40</b> : Courbe d'étalonnage de la Caféine obtenue avec la fonction $\ln y = f(\ln x)$ (Série 2). .....	81
<b>Figure 41</b> : Courbe d'étalonnage de la Caféine obtenue avec la fonction $\ln y = f(\ln x)$ (Série 3). .....	82
<b>Figure 42</b> : Courbe d'étalonnage du Paracétamol obtenue avec la fonction $\sqrt{y} = f(\sqrt{x})$ (série 1).....	83
<b>Figure 43</b> : Courbe d'étalonnage du Paracétamol obtenue avec la fonction $\sqrt{y} = f(\sqrt{x})$ (série 2).....	83
<b>Figure 44</b> : Courbe d'étalonnage du Paracétamol obtenue avec la fonction $\sqrt{y} = f(\sqrt{x})$ (série 3).....	84
<b>Figure 45</b> : Courbe d'étalonnage de la Caféine obtenue avec la fonction $\sqrt{y} = f(\sqrt{x})$ (série 1). .....	85
<b>Figure 46</b> : Courbe d'étalonnage de la Caféine obtenue avec la fonction $\sqrt{y} = f(\sqrt{x})$ (série 2). .....	85
<b>Figure 47</b> : Courbe d'étalonnage de la Caféine obtenue avec la fonction $\sqrt{y} = f(\sqrt{x})$ (série 3). .....	86
<b>Figure 48</b> : Profil d'erreur totale du Paracétamol.....	98
<b>Figure 49</b> : Profil d'erreur totale de la Caféine. ....	99
<b>Figure 50</b> : Profil d'exactitude du Paracétamol ( $\beta = 95\%$ et $\lambda = 5\%$ ). ....	101
<b>Figure 51</b> : Profil d'exactitude de la Caféine ( $\beta = 95\%$ et $\lambda = 5\%$ ). ....	102
<b>Figure 52</b> : Droite de linéarité entre la concentration prédite en fonction de la concentration introduite du Paracétamol.....	103
<b>Figure 53</b> : Droite de linéarité entre la concentration prédite en fonction de la concentration introduite de la Caféine. ....	104

## Liste des tableaux

<b>Tableau I</b> : Propriétés physico-chimiques du paracétamol .....	6
<b>Tableau II</b> : Désignation des abréviations citées dans le schéma. ....	10
<b>Tableau III</b> : Interactions médicamenteuses .....	11
<b>Tableau IV</b> : Propriétés physico-chimiques de la caféine. ....	15
<b>Tableau V</b> : Les principaux effets résultant de la fixation de la caféine sur les récepteurs A1 et A2a. ....	20
<b>Tableau VI</b> : Définitions des critères de la validation analytique.....	32
<b>Tableau VII</b> : Critères de la validation en fonction du type d'analyse.....	37
<b>Tableau IX</b> : Choix du nombre de standards d'étalonnage et de validation en fonction du protocole choisi. ....	41
<b>Tableau X</b> : Exemples de fonctions de réponses. ....	42
<b>Tableau XI</b> : Règles d'alignement pour différentes fonctions de réponses .....	44
<b>Tableau XII</b> : Calcul des prédictions inverses pour différentes fonctions de réponses.....	44
<b>Tableau XIII</b> : Calcul des prédictions inverses pour la droite ayant subi une transformation logarithmique ou racine carrée.....	45
<b>Tableau XIV</b> : Verreries et autres matériels utilisés dans ce présent travail. ....	52
<b>Tableau XV</b> : Appareillage utilisé dans ce présent travail.....	53
<b>Tableau XVI</b> : Matières premières utilisées dans ce présent travail.....	54
<b>Tableau XVII</b> : Réactifs utilisés dans ce présent travail.....	54
<b>Tableau XVIII</b> : Les volumes à prélever et les fioles à utiliser pour chaque niveau de concentration. ....	58
<b>Tableau XIX</b> : Volumes prélevés et fioles utilisées pour les standards de validation.....	58
<b>Tableau XX</b> : Conditions chromatographiques de la méthode de dosage. ....	59
<b>Tableau XXI</b> : Temps de rétention et largeur du pic à la base des deux PA. ....	63
<b>Tableau XXII</b> : Résultats de la superposition des chromatogrammes.....	66
<b>Tableau XXIII</b> : Résultats obtenus de l'étude de la spécificité et de l'effet matrice : standards d'étalonnage (PA seul) du Paracétamol. ....	67
<b>Tableau XXIV</b> : Résultats obtenus de l'étude de la spécificité et de l'effet matrice : standards de validation (FR) du Paracétamol.....	68
<b>Tableau XXV</b> : Comparaison des deux pentes et des deux ordonnées à l'origine du PA seul et de la FR du Paracétamol.....	69
<b>Tableau XXVI</b> : Résultats obtenus de l'étude de la spécificité et de l'effet matrice : standards d'étalonnage (PA seul) de la Caféine. ....	69
<b>Tableau XXVII</b> : Résultats obtenus de l'étude de la spécificité et de l'effet matrice : standards de validation (FR) de la Caféine. ....	70
<b>Tableau XXVIII</b> : Comparaison des deux pentes et des deux ordonnées à l'origine du PA seul et de la FR de la Caféine.....	70
<b>Tableau XXIX</b> : Paramètres d'étalonnage obtenus pour le Paracétamol avec la fonction $y = bx + a$ (PA seul) .....	71
<b>Tableau XXX</b> : Paramètres d'étalonnage obtenus pour la Caféine avec la fonction $y = bx + a$ (PA seul).....	73

<b>Tableau XXXI</b> : Paramètres d'étalonnage obtenus pour le Paracétamol avec la fonction $y = bx$ (PA seul) .....	75
<b>Tableau XXXII</b> : Paramètres d'étalonnage obtenus pour la caféine avec la fonction $y = bx$ (PA seul).....	77
<b>Tableau XXXIII</b> : Paramètres d'étalonnage obtenus pour le Paracétamol avec la fonction $\ln y = f(\ln x)$ (PA seul). .....	78
<b>Tableau XXXIV</b> : Paramètres d'étalonnage obtenus pour la Caféine avec la fonction $\ln y = f(\ln x)$ (PA seul). .....	80
<b>Tableau XXXV</b> : Résultats du Paracétamol obtenus avec la fonction $\sqrt{y} = f(\sqrt{x})$ (PA seul)..	82
<b>Tableau XXXVI</b> : Résultats de la caféine obtenus avec la fonction $\sqrt{y} = f(\sqrt{x})$ (PA seul)....	84
<b>Tableau XXXVII</b> : Profils d'exactitude obtenus pour le Paracétamol. ....	86
<b>Tableau XXXVIII</b> : Profils d'exactitude obtenus pour la Caféine.....	88
<b>Tableau XXXIX</b> : Tableau d'alignement des réponses observées avec les trois séries de validation pour le Paracétamol.....	90
<b>Tableau XL</b> : Tableau d'alignement des réponses observées avec les trois séries de validation pour la Caféine. ....	91
<b>Tableau XLI</b> : Concentrations calculées par prédiction inverse pour le Paracétamol.....	92
<b>Tableau XLII</b> : Concentrations calculées par prédiction inverse pour la Caféine. ....	92
<b>Tableau XLIII</b> : Justesse calculée pour chaque niveau de concentration des standards de validation pour le Paracétamol.....	93
<b>Tableau XLIV</b> : Justesse calculée pour chaque niveau de concentration des standards de validation pour la Caféine. ....	93
<b>Tableau XLV</b> : Fidélité calculée pour chaque niveau de concentration des standards de validation pour le Paracétamol.....	94
<b>Tableau XLVI</b> : Fidélité calculée pour chaque niveau de concentration des standards de validation pour la Caféine. ....	94
<b>Tableau XLVII</b> : Résultats du calcul de l'exactitude relative pour le Paracétamol. ....	96
<b>Tableau XLVIII</b> : Résultats du calcul de l'exactitude relative pour la Caféine.....	97
<b>Tableau XLIX</b> : Calcul de l'erreur totale pour chaque niveau de concentration des standards de validation du Paracétamol. ....	98
<b>Tableau L</b> : Calcul de l'erreur totale pour chaque niveau de concentration des standards de validation de la Caféine.....	99
<b>Tableau LI</b> : Limites de tolérance du Paracétamol.....	100
<b>Tableau LII</b> : Limites de tolérance de la Caféine.....	100
<b>Tableau LIII</b> : Évaluation statistique de la linéarité du Paracétamol. ....	103
<b>Tableau LIV</b> : Évaluation statistique de la linéarité de la Caféine.....	104
<b>Tableau LV</b> : Signification des résultats des deux pentes et des deux ordonnées à l'origine entre elles pour le Paracétamol.....	106
<b>Tableau LVI</b> : Signification des résultats des deux pentes et des deux ordonnées à l'origine entre elles pour la caféine.....	107

## Introduction

Les substances actives contenues dans les produits pharmaceutiques, conférant à ces derniers des caractéristiques biologiques et thérapeutiques, sont soumises à des contraintes réglementaires strictes, dans le but d'assurer la sécurité du consommateur et mettre à disposition des médicaments de qualité. A cet égard, les laboratoires pharmaceutiques et les industriels du médicament procèdent au contrôle de la qualité de leurs principes actifs afin de rester en adéquation avec les évolutions réglementaires. Parmi les analyses effectuées lors de ces contrôles de qualité visant à répondre aux exigences réglementaires, le dosage des principes actifs s'avère nécessaire.

En effet, chaque nouvelle méthode mise au point, ou encore optimisée, doit faire l'objet d'une validation complète conformément aux guides et aux textes réglementaires en vigueur, avant sa mise en routine.

La validation est basée sur une analyse statistique d'un certain nombre de critères, permettant de conclure à l'aptitude ou non d'une procédure analytique à donner des résultats fiables, la validation analytique est donc une étape essentielle donnant des garanties que les mesures qui seront effectuées en routine, avec cette méthode, ne s'écartent que très peu des résultats attendus.

Il existe plusieurs documents de référence qui décrivent ce concept de validation, selon la démarche classique, la performance d'une méthode analytique est démontrée en examinant séparément deux critères statistiques à savoir le biais (justesse) et la précision (fidélité), cependant des problèmes d'interprétation ont été souvent rencontrés, suite à la complexité des tests statistiques appliqués et au manque de données concernant le plan expérimental à suivre.

Afin de palier cet inconvénient, d'améliorer et de faire évoluer la validation, de nouvelles tendances sont apparues notamment l'harmonisation des démarches publiée par la Société Française des Sciences et Techniques Pharmaceutiques (SFSTP) dans la revue STP Pharma Pratique en janvier 2006, qui repose sur l'utilisation du profil d'exactitude comme outil de décision, selon un concept basé sur l'erreur totale (erreur systématique + erreur aléatoire), cette approche se base sur un ensemble de mesures expérimentales formulées en tests statistiques prouvant ainsi mathématiquement la fiabilité et l'exactitude de la méthode.

C'est dans ce cadre que s'inscrit notre travail, qui vise à optimiser et à valider une méthode analytique pour le dosage simultané de deux principes actifs dans des comprimés : le paracétamol ; un antalgique et antipyrétique du palier I, et la caféine ; une méthylxanthine stimulante du système nerveux central et des centres respiratoires, par Chromatographie Liquide à Haute Performance (HPLC).

Ces deux molécules sont disponibles sous forme d'une association à doses fixes indiquée dans la prise en charge de la fièvre et des douleurs d'intensité légère à modérée.

L'existence de telles associations, a poussé les industriels à développer des méthodes de dosage simultané de deux principes actifs afin de bénéficier de la réduction du temps et du coût de l'analyse.

Ce présent travail a été réalisé au niveau du laboratoire de chimie analytique du département de Pharmacie à la faculté de Médecine de l'Université Mouloud MAMMERRI de TIZI OUZOU (UMMTO).

Le présent mémoire est réparti en deux parties :

- ❖ La première consiste en une synthèse bibliographique, dans laquelle nous allons traiter des généralités concernant les principes actifs seuls « paracétamol » et « caféine » ainsi que leur association. Un chapitre de plus est dédié à la validation analytique.
- ❖ La deuxième est consacrée à notre travail pratique, dans lequel nous allons décrire tout le matériel utilisé ainsi que les conditions et protocoles expérimentaux appliqués, nous allons exposer nos résultats, les discuter, pour terminer ensuite par une conclusion quant à la validité de la méthode analytique objet de l'étude.

## Objectifs

L'objectif de notre étude est d'optimiser et de valider une méthode analytique de dosage simultané du paracétamol à 500 mg et de la caféine à 65 mg dans des comprimés à doses fixes par Chromatographie Liquide à Haute Performance (HPLC) en vue de son application en routine, tout en utilisant le profil d'exactitude comme outil de décision ; une approche harmonisée qui a été décrite dans un guide de validation élaboré par une commission de la Société Française des Sciences Techniques et Pharmaceutiques (SFSTP) publié dans le revue STP Pharma Pratique en janvier 2006.

---

## **Partie bibliographique**

---



## CHAPITRE I : PARACÉTAMOL-CAFÉINE

### 1 PARACÉTAMOL

#### 1.1 Origine

##### 1.1.1 Bref aperçu sur l'histoire du paracétamol

Il fut un temps, l'écorce de *Cinchona* était très utilisée pour ses vertus antipyrétiques, et vu qu'elle devenait rare et chère, il fallait la substituer, c'est ainsi que le paracétamol a connu le jour. En effet, il a été synthétisé pour la première fois en 1878 par Harmon Northrop Morse sous l'appellation d'acétylaminophénol. [1]

Le paracétamol a été redécouvert de nouveau et a rapidement gagné une extraordinaire popularité [2], il a été commercialisé pour la première fois, en 1953, sur le marché britannique sous l'appellation Panadol par les laboratoires Sterling-Winthrop Co [3], et 10 ans après il a pu intégrer la Pharmacopée britannique [4]. En 1955, la FDA (Food and Drug Administration) a accordé aux laboratoires Mac Neil l'AMM sur le marché américain, quant au marché français, la commercialisation a pu débuter en 1967 [3], et c'est ainsi que le paracétamol a rempli petit à petit les comptoirs des officines et depuis 2011 il est devenu le médicament le plus consommé au monde. [5]

##### 1.1.2 Synthèse du paracétamol

La première synthèse du paracétamol fut par Morse, en réduisant du para-nitrophénol en para-aminophénol en présence d'étain dans de l'acide acétique glacial, le produit formé a été acylé par l'acide acétique afin d'obtenir du paracétamol.

Vignolo a pu raccourcir cette synthèse en utilisant le para-aminophénol comme produit de départ, une seule étape d'acylation était donc nécessaire (figure 1). [6]

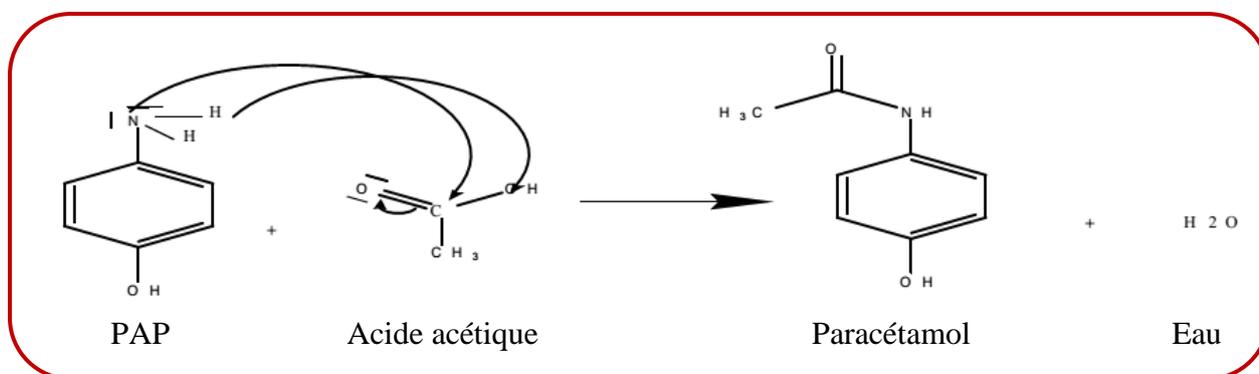


Figure 1 : Schéma d'acylation du PAP avec de l'acide acétique. [6]



Plus tard, Friedlander apporta une modification à ce procédé, en faisant interagir le PAP avec de l'anhydride acétique au lieu de l'acide acétique, ce qui a permis d'avoir un meilleur rendement (figure 2). [6]

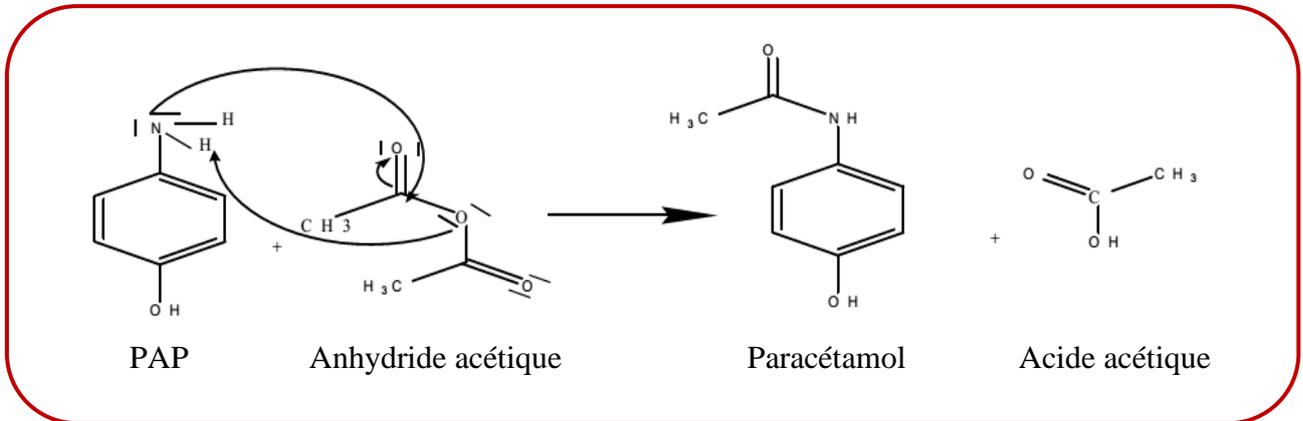


Figure 2 : Schéma d'acylation du PAP avec de l'anhydride acétique. [6]

## 1.2 Dénomination et formule chimique

La molécule de paracétamol (figure 3) est constituée d'un cycle benzénique substitué par deux groupements ; hydroxyle et amide en position para. Il ne comporte pas de carbone asymétrique ni de stéréo-isomères. [1]

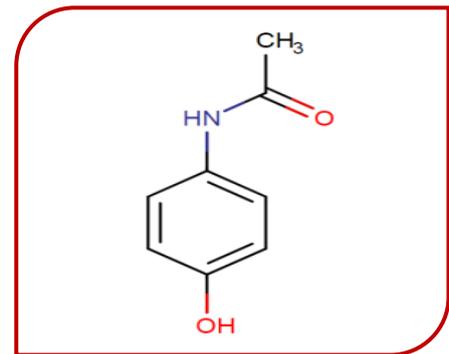


Figure 3 : Structure chimique du paracétamol. [7]

Le paracétamol, également appelé l'acétaminophène, est néanmoins désigné par plusieurs autres dénominations telles que :

- N-acétyl-paraminophénol ;
- N-(4-hydroxyphényl) acétamide : nom IUPAC ;
- Acétamidophénol ;
- Hydroxy-4-acétanilide. [1, 8-10]



### 1.3 Propriétés physico-chimiques

Les propriétés physico-chimiques du paracétamol sont résumées dans le tableau suivant :

**Tableau I :** Propriétés physico-chimiques du paracétamol. [1, 8, 11]

<b>DCI</b>	Paracétamol.
<b>Formule brute</b>	$C_8H_9NO_2$ .
<b>Masse molaire</b>	151,2 g/mol.
<b>Point de fusion</b>	Entre 168 et 172°C.
<b>PKa</b>	9,5.
<b>Aspect</b>	Une poudre cristalline blanche ou sensiblement blanche, inodore et de saveur amère.
<b>Solubilité</b>	Assez soluble dans l'eau, facilement soluble dans l'alcool, très peu soluble dans le chlorure de méthylène, l'éther et le chloroforme.
<b>Densité</b>	1.263 g/cm <sup>3</sup> .
<b>Absorption dans l'ultra-violet (l'UV)</b>	Un maximum d'absorption à 240 nm (dans l'éthanol).

### 1.4 Stabilité et conditions de dégradation

- Le paracétamol est un acide faible (via sa fonction phénol), en le plaçant en un milieu humide, en particulier dans une solution aqueuse, il est susceptible de subir une dégradation formant du para-aminophénol ou également appelé PAP (un produit de dégradation primaire) suite à une hydrolyse, ce dernier émet à son tour des produits de dégradation secondaire notamment les quinones-imines ; [12]
- Le pH de la solution est le facteur le plus important qui influence la stabilité de l'acétaminophène en solution aqueuse, d'après un article publié par *Koshy et Lach* [13], en précisant que cette dégradation est minimale à un pH voisin de 6, avec une demi-vie de 21,8 années à 25°C ;
- Lors de la dégradation du paracétamol, accentuée par l'augmentation de la température ou en présence de lumière, deux composés cytotoxiques se forment : le 4-aminophénol et la quinone imine. [1]
- Sa conservation se fait à l'abri de l'air afin d'éviter tout contact avec l'humidité [1], d'ailleurs il reste stable pendant 5 ans dans les conditions normales de stockage (entre 15 et 25°C et à l'abri de la lumière). [14]



## 1.5 Propriétés pharmacologiques

### 1.5.1 Pharmacocinétique

#### 1.5.1.1 Absorption

Le paracétamol administré par voie orale, est absorbé au niveau du tractus gastro intestinal par diffusion passive, sa biodisponibilité absolue est de 70% à 90%. La  $C_{max}$  du paracétamol est atteinte en 15 à 120 minutes, cette fourchette de variation dépend essentiellement de la forme galénique et de la vidange gastrique. Le paracétamol est également absorbé au niveau du rectum avec une vitesse d'absorption presque similaire à celle de la voie orale, présentant des avantages chez les enfants et les comateux. [9, 11, 15-19]

#### 1.5.1.2 Distribution

Le volume de distribution du paracétamol est approximativement 1kg /L, il présente une faible liaison aux protéines plasmatiques. Étant lipophile, le paracétamol se distribue rapidement et uniformément dans la plupart des tissus et des liquides (sang, salive, liquide céphalo-rachidien et liquide interstitiel), il franchit également la barrière placentaire et passe faiblement dans le lait maternel. [9, 11, 15-19]

#### 1.5.1.3 Métabolisme

Il subit un métabolisme essentiellement hépatique qui dépend de la dose administrée :

- À dose thérapeutique : plus de 85% du paracétamol administré sera gluco et sulfoconjugué donnant naissance à des métabolites inactifs sécrétés dans les urines, et une fraction minimale de 5 à 8% sera métabolisée en N-acétyl-para-benzoquinone-imine via le cytochrome P450, c'est un métabolite qui est hautement toxique et éliminé dans les urines après conjugaison au glutathion et transformation en mercaptate et en cystéine ;
- À dose toxique : les voies de la glucuronidation et de la sulfatation se trouvent saturées et y aura donc une déviation de la voie métabolique vers celle du Cyt P450 donnant lieu un dérivé toxique (NAPQI) cumulable dans le foie. [9, 11, 15-19]

#### 1.5.1.4 Elimination

Le paracétamol est éliminé par voie rénale :

- 90% sous forme de métabolites glucuronoconjugués ou sulfoconjugués, excrétés rapidement au niveau tubulaire ;



- 5 à 10% sous forme inchangée filtrée au niveau glomérulaire. [9, 11, 15-19]

### **1.5.2 Pharmacodynamie**

Le paracétamol appartient à la classe pharmacologique des antalgiques du palier I, doté d'un effet rapide ; l'analgésie obtenue est comparable à celle de l'aspirine. Il exerce principalement deux actions :

- Antalgique : qui repose sur l'insensibilisation des chémorécepteurs aux médiateurs de la douleur et surtout sur l'inhibition des prostaglandines ;
- Antipyrétique : mal élucidée, elle reposerait sur une action au niveau hypothalamique et une inhibition des prostaglandines.

Cependant le paracétamol ne présente que peu d'activité anti inflammatoire ; avec une faible activité anti-oxydante. [16-18]

### **1.6 Mécanisme d'action**

Bien que plus d'un siècle après sa synthèse, le mécanisme d'action du paracétamol demeure mal précisé et fait encore l'objet de débats. De nombreuses études ont été menées à cet égard, et, comme l'illustre le schéma ci-dessous (figure 4), plusieurs hypothèses ont été émises :

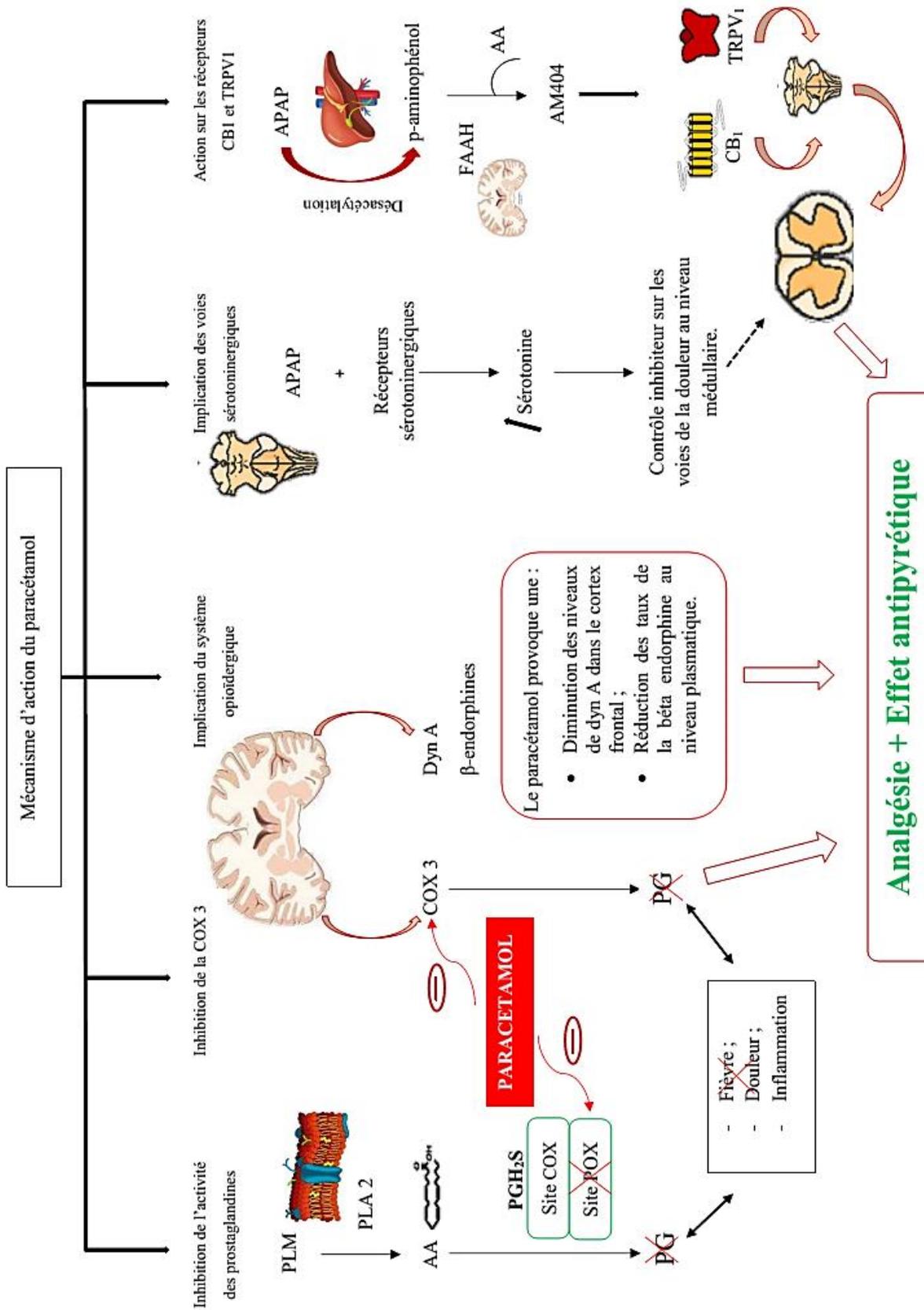


Figure 4 : Schéma général représentatif du mécanisme d'action du paracétamol. [20-26]



Le tableau ci-dessous résume la désignation des abréviations citées dans le schéma représenté dans la figure (4).

**Tableau II :** Désignation des abréviations citées dans le schéma.

Abréviations	Significations
PLM	Phospholipases membranaires.
PLA 2	Phospholipase A 2.
AA	Acide arachidonique.
PGH <sub>2</sub> S	Enzyme prostaglandine H2 synthétase dont il existe deux types : 1 et 2 appelées communément COX 1 et COX 2.
Site COX	Site de la Cyclooxygénase.
Site POX	Site de la Peroxydase.
PG	Prostaglandines.
COX 3	Cyclooxygénase de type 3 ; nouvelle variante de la COX 1.
Dyn A	Dynorphine A.
APAP	Paracétamol.
Récepteurs CB <sub>1</sub>	Récepteurs Cannabinoïdes de type 1.
Récepteurs TRPV <sub>1</sub>	Récepteurs Vanilloïdes de type 1.
FAAH	Enzyme amidohydrolase des acides gras ; elle assure la conjugaison du para-aminophénol à l'acide arachidonique au niveau cérébral.

### 1.7 Propriétés thérapeutiques

Le paracétamol représente l'antalgique de référence dans la prise en charge des douleurs aiguës ou chroniques d'intensité légère à modérée, telles que :

- Les céphalées, migraines, douleurs musculaires, entorses, maux de dos (lombalgies), dysménorrhées, douleurs dentaires ;
- Les douleurs chroniques cancéreuses, et non cancéreuses par excès de nociception ;
- Les douleurs associées aux interventions chirurgicales mineures.

C'est aussi l'antipyrétique utilisé en première intention chez l'enfant, il est également indiqué dans le traitement symptomatique de l'arthrose. [2, 17, 27]

### 1.8 Effets indésirables

Bien que le paracétamol soit l'antalgique le mieux toléré, il présente comme tout autre médicament un certain nombre d'effets indésirables :

- Asthme ;
- Réactions d'hypersensibilité rarement observées type choc anaphylactique et œdème de Quincke ;
- Erythème, urticaire, rash cutané, et de très rare atteintes cutanées graves ont été rapportées (syndrome de Stevens-Johnson et la nécrolyse épidermique) ;



- Thrombopénies, leucopénies et neutropénies (exceptionnelles) ;
- Agranulocytose et anémie hémolytique, observées chez les patients souffrant d'un déficit en glucose-6-phosphate-déshydrogénase ;
- Atteinte hépatique cytolytique ;
- Rhabdomyolyse ;
- Saignements gastro-intestinaux supérieurs, nausées, vomissements et douleurs épigastriques qui sont rencontrés beaucoup plus en cas de prise chronique ;
- Augmentation du risque de maladies cardiovasculaires comme l'infarctus du myocarde et l'accident vasculaire cérébral. [17, 27-32]

### 1.9 Contre-indications

- Hypersensibilité au paracétamol ;
- Insuffisance hépatique sévère responsable de la diminution des capacités de neutralisation du NAPQI par le glutathion.

NB : les prises de paracétamol nécessitent un espacement d'au moins huit heures en cas d'insuffisance rénale avec une clairance de la créatinine inférieure à 10 ml/min. [27]

### 1.10 Interactions médicamenteuses

Parmi les interactions médicamenteuses du paracétamol celles résumées dans le tableau (III) :

**Tableau III** : Interactions médicamenteuses. [27, 32-35]

Médicaments	Conséquences de l'interaction	Mécanisme d'interaction
Anticoagulants oraux (Warfarine et autres AVK)	Potentialisation de l'effet anticoagulant et du risque hémorragique si prise de paracétamol aux doses maximales (4 g/j) pendant au moins 4 jours.	Le métabolite du paracétamol (NAPQI) exerce un effet oxydatif sur plusieurs étapes du cycle de la vitamine k, d'autre part la warfarine inhibe la vitamine k époxyde réductase. La combinaison de ces effets entraîne une déplétion profonde en facteurs de coagulation vit k dépendant activés.
Flucloxacilline	Risque d'acidose métabolique en cas d'utilisation concomitante de longue durée des deux molécules.	Le NAPQI et la flucloxacilline interfèrent avec le cycle gamma-glutamyl entraînant une accumulation de 5-oxoproline (acide pyroglutamique) d'où une acidose métabolique grave à trou anionique élevé.
Les résines chélatrices telles que la cholestyramine et le charbon activé	Réduction de l'absorption du paracétamol et de son efficacité.	Complexation intraluminale.
Inducteurs du CytP450 tels que les antiépileptiques et la rifampicine	Potentialisation de la toxicité hépatique du paracétamol.	L'induction du métabolisme peut entraîner une production de métabolite hépatotoxique du paracétamol en quantité dépassant les capacités de réduction par le glutathion.



### 1.11 Toxicité

Aux doses thérapeutiques (inférieures à 125 mg/kg en une seule prise pour un adulte sain), le paracétamol présente un bon profil de sécurité. En cas de surdosage, en plus de la toxicité hépatique qui a été déjà bien documentée et moins couramment l'atteinte rénale, une toxicité cardiaque a également été signalée. [2, 36]

Au niveau des microsomes hépatiques, un faible pourcentage du paracétamol est métabolisé par le CytP450 en un intermédiaire réactif ; le N-acétyl-para-benzoquinone imine (NAPQI). À doses toxiques (supérieures à 150 mg/kg) les capacités de réduction par le glutathion sont dépassées. Une nécrose hépatocytaire survient donc suite à la liaison du NAPQI aux groupements sulfhydryles (-SH) des protéines mitochondriales des hépatocytes. [2, 37]



## 2 CAFÉINE

La caféine est une substance psychoactive, largement consommée dans le monde sous forme de café, de thé, de chocolat ou de boissons énergisantes. En plus d'être un constituant naturel de plus de 60 espèces de plantes, elle est retrouvée dans divers produits pharmaceutiques en combinaison avec des médicaments utilisés comme analgésiques, diurétiques, anti-rhumes, produits de contrôle du poids, stimulants bronchiques et cardiaques, ainsi que dans les médicaments pour le traitement de l'acné et d'autres maladies de la peau. [38]

### 2.1 Origine

#### 2.1.1 Historique

La caféine fut initialement isolée à partir du café en 1819, et nommée kaffeine par le chimiste allemand Friedlieb Ferdinand Runge. Plusieurs travaux et découvertes ont été réalisés par la suite, et ce n'est qu'à la fin du 19<sup>ème</sup> siècle que sa structure chimique a été élucidée par Herman Fisher qui est d'ailleurs le premier à réaliser sa synthèse, et est récompensé en partie pour ce travail par le prix Nobel de chimie en 1902. [39, 40]

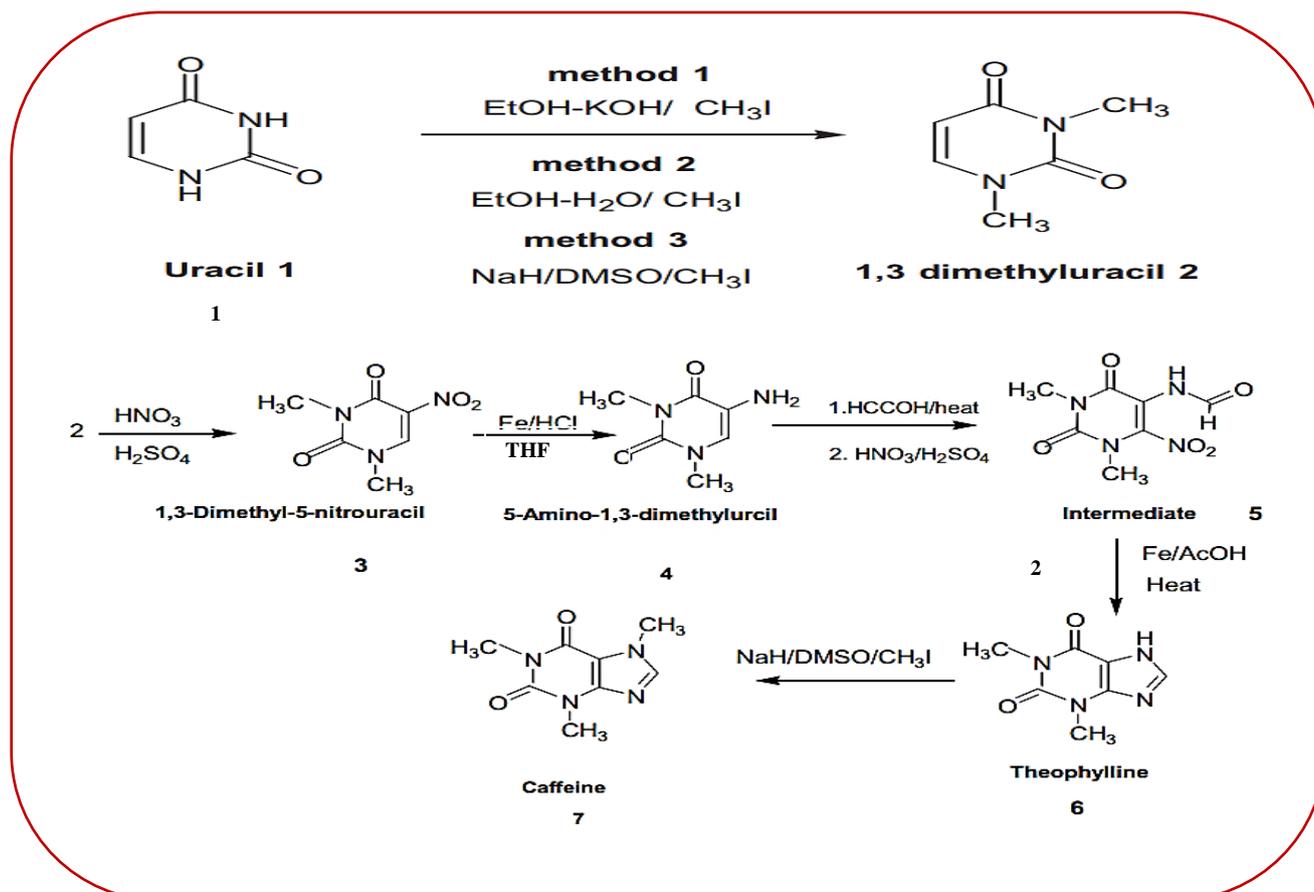
#### 2.1.2 Synthèse

Recueillie comme résidu de la décaféination du café et récupérée à partir des déchets de feuilles de thé, raisons pour lesquelles il n'existe que peu de méthodes de synthèse décrites dans la littérature.

Toutefois, deux voies de synthèse ont été récemment décrites :

##### 2.1.2.1 Synthèse à partir de l'uracile

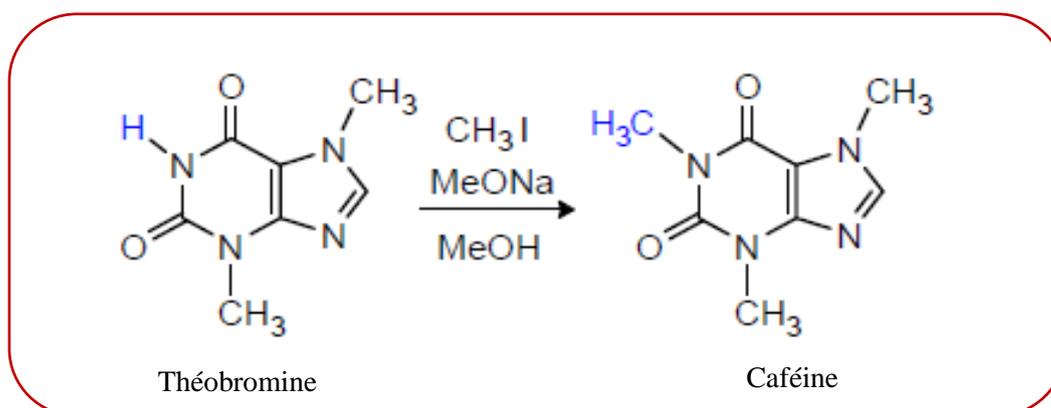
Elle se déroule en six étapes : L'uracile est dans un premier temps converti en 3-diméthyluracile, suivi d'une nitration, réduction et cyclisation pour donner la théophylline et enfin méthylation de théophylline en caféine. [41]



**Figure 5** : Schéma réactionnel de la synthèse de la caféine à partir de l'uracile. [41]

### 2.1.2.2 Synthèse à partir de la théobromine

Dans cette méthode la caféine est obtenue par N-alkylation de la théobromine à l'aide d'iodure de méthyle dans une solution méthanolique de méthylate de sodium [42], selon la réaction suivante :



**Figure 6** : Schéma réactionnel de la synthèse de la caféine à partir de la théobromine. [42]



## 2.2 Structure et dénomination

La caféine est un pseudo-alcaloïde, d'origine végétale, appartenant à la famille des méthylxanthines. Il s'agit d'une molécule organique, hétérocyclique, plane, qui dérive des bases puriques plus exactement des xanthines dont trois atomes d'azote sont substitués par des radicaux méthyles. [40, 43]

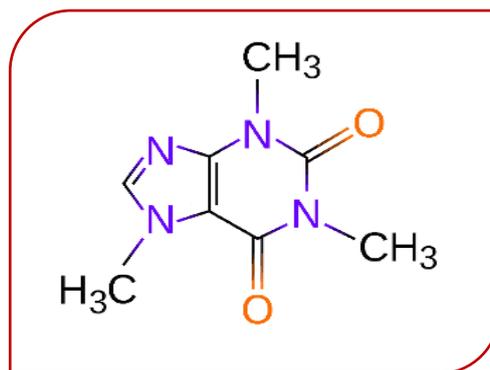


Figure 7 : Structure chimique de la caféine. [44]

La caféine est connue sous plusieurs autres dénominations, telles que :

- Théine ;
- Guaranine ;
- Méthylthéobromine ;
- 7-méthylthéophylline ;
- 1,3,7-triméthylxanthine (nom chimique) ;
- 3,7-dihydro-1,3,7-triméthyl-1H-purine-2,6-dione (nom selon l'IUPAC). [8, 40, 45]

## 2.3 Propriétés physico-chimiques

Les propriétés physico-chimiques de la caféine sont résumées dans le tableau ci-dessous :

Tableau IV : Propriétés physico-chimiques de la caféine. [8, 46]

<b>Formule brute</b>	C <sub>8</sub> H <sub>10</sub> N <sub>4</sub> O <sub>2</sub>
<b>Masse molaire</b>	194,2 g/mol
<b>Point de fusion</b>	Entre 234°C et 239°C
<b>PKa</b>	10,9
<b>Aspect</b>	Poudre cristalline, blanche ou sensiblement blanche, ou cristaux soyeux, blancs ou sensiblement blancs.
<b>Solubilité</b>	Assez soluble dans l'eau, facilement soluble dans l'eau bouillante, peu soluble dans l'éthanol à 96 pour cent. La caféine se dissout dans les solutions concentrées de benzoates ou de salicylates alcalins. Elle se sublime facilement.
<b>Absorption dans l'ultra-violet (l'UV)</b>	Un maximum d'absorption à 275 nm



## 2.4 Propriétés pharmacologiques

### 2.4.1 Pharmacocinétique

#### 2.4.1.1 Absorption

Chez l'homme, la caféine est rapidement absorbée par le tractus gastro-intestinal, un taux de 99% de la dose administrée est absorbé au bout de 45 minutes, et la concentration maximale au niveau du plasma est atteinte entre 15 et 120 minutes. Elle est également absorbée par voie rectale et intramusculaire mais d'une façon plus lente. [47]

#### 2.4.1.2 Distribution

La caféine diffuse rapidement dans le milieu extravasculaire, et en raison de sa lipophilie elle traverse toutes les membranes biologiques y compris la barrière hémato-encéphalique et la barrière foeto-placentaire, elle est même retrouvée dans le lait maternel. Son volume de distribution est de 0,7 Kg/L. Elle possède une faible liaison aux protéines plasmatiques (entre 10% et 30%). [47, 48]

#### 2.4.1.3 Métabolisme

La caféine est métabolisée par le foie, via des systèmes enzymatiques microsomaux. La contribution des autres organes n'a toujours pas encore été démontrée. Trois étapes importantes ont lieu : une déméthylation, une oxydation et une acétylation. La déméthylation est la voie métabolique la plus importante, elle représente plus de 95% de toutes les biotransformations de la caféine. [47, 49]

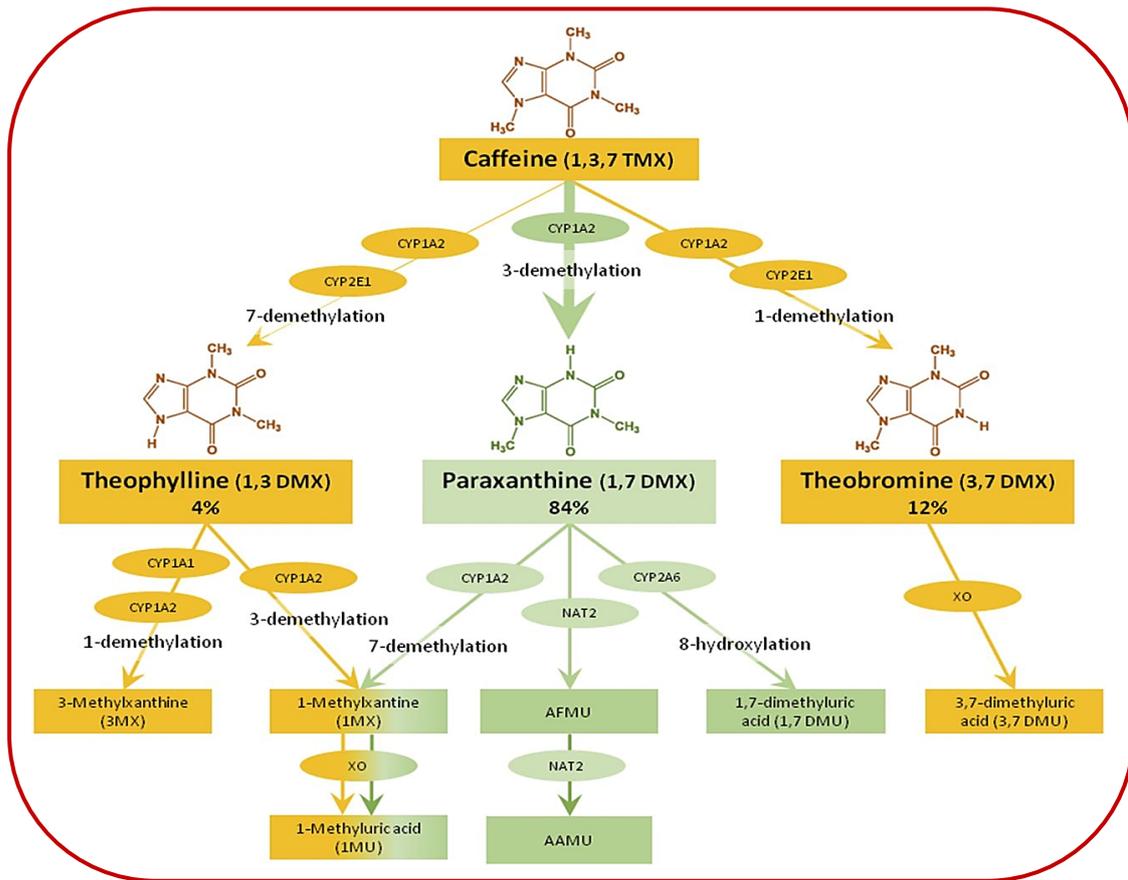


Figure 8 : Principales voies et enzymes impliquées dans la dégradation de la caféine. [50]

#### 2.4.1.4 Élimination

L'élimination de la caféine se fait par voie rénale sous forme de diméthylxanthines, monométhylxanthines et de dérivés méthylés de l'acide urique.

Seulement 3% (voire moins) de la caféine qui est éliminée sous forme inchangée au niveau urinaire, en raison de sa forte métabolisation au niveau du foie mais également de son importante réabsorption tubulaire rénale (98%).

Sa demi-vie est directement liée à la dose administrée, en effet, pour des doses inférieures à 10 mg/kg le  $T_{1/2}$  varie entre 2,5 et 4,5 h chez l'homme. [47, 51]

#### 2.4.2 Pharmacodynamie

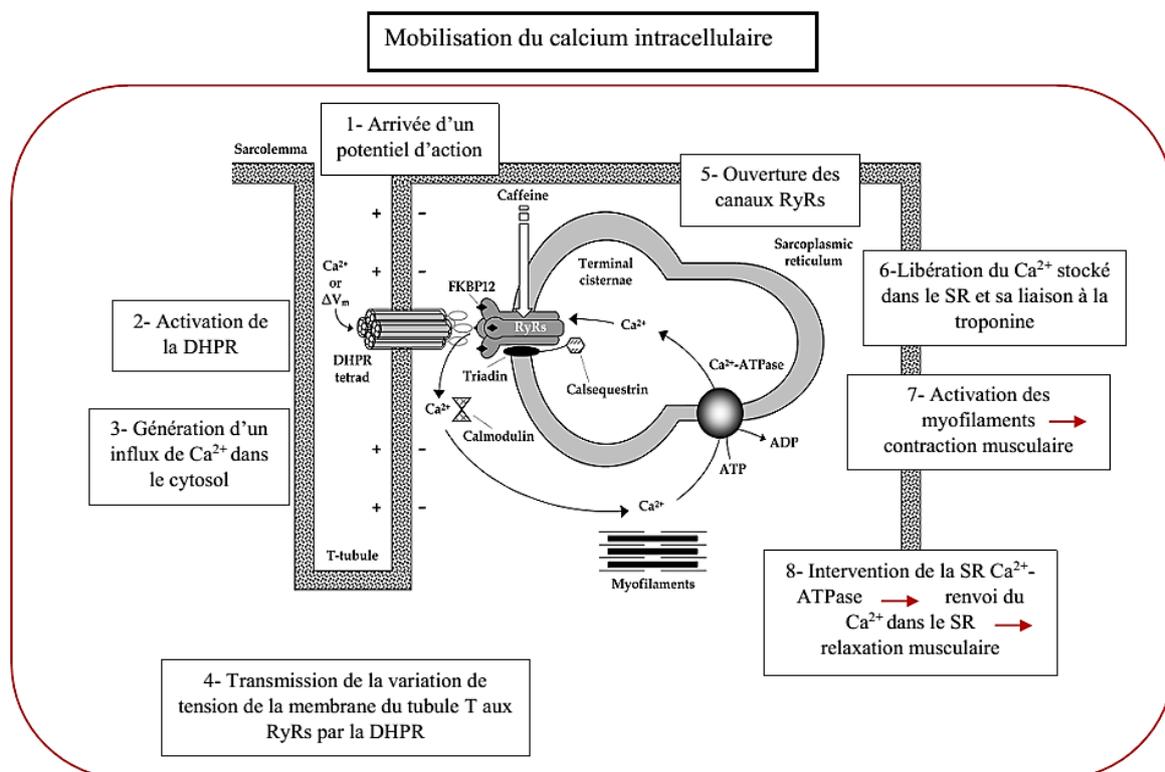
La caféine est un psychostimulant qui exerce plusieurs effets, les plus importants sont : une stimulation du système nerveux, du cœur et des muscles squelettiques, une inhibition des muscles lisses, une vasodilatation coronarienne, un faible effet diurétique y compris des changements métaboliques pouvant engendrer une dysglycémie et une hypokaliémie. [52]

## 2.5 Mécanisme d'action

Plusieurs hypothèses ont été formulées concernant les mécanismes d'action de la caféine, les trois principaux qui ont été décrits sont, selon l'ordre chronologique de leur découverte :

- ◆ Mobilisation du calcium intracellulaire ;
- ◆ Inhibition des phosphodiesterases ;
- ◆ Antagonisme au niveau des récepteurs de l'adénosine.

Un quatrième mécanisme a été suggéré, préconisant que la caféine agit sur le système nerveux central en se liant aux récepteurs des benzodiazépines. [53]



**Figure 9** : Le cycle du Ca<sup>2+</sup> lors du couplage excitation-contraction dans un muscle strié. [49]

La caféine interfère avec le couplage excitation-contraction, elle a la capacité de provoquer une vidange complète, rapide et réversible des réserves de calcium du réticulum sarcoplasmique (SR). Elle induit la libération du Ca<sup>2+</sup> en activant les canaux RyRs via la fusion des vésicules en bicouche lipidique planaire, faisant augmenter la fréquence et la durée d'ouverture des canaux, mais également le taux d'efflux unidirectionnel du Ca<sup>2+</sup> à partir du SR. [49]

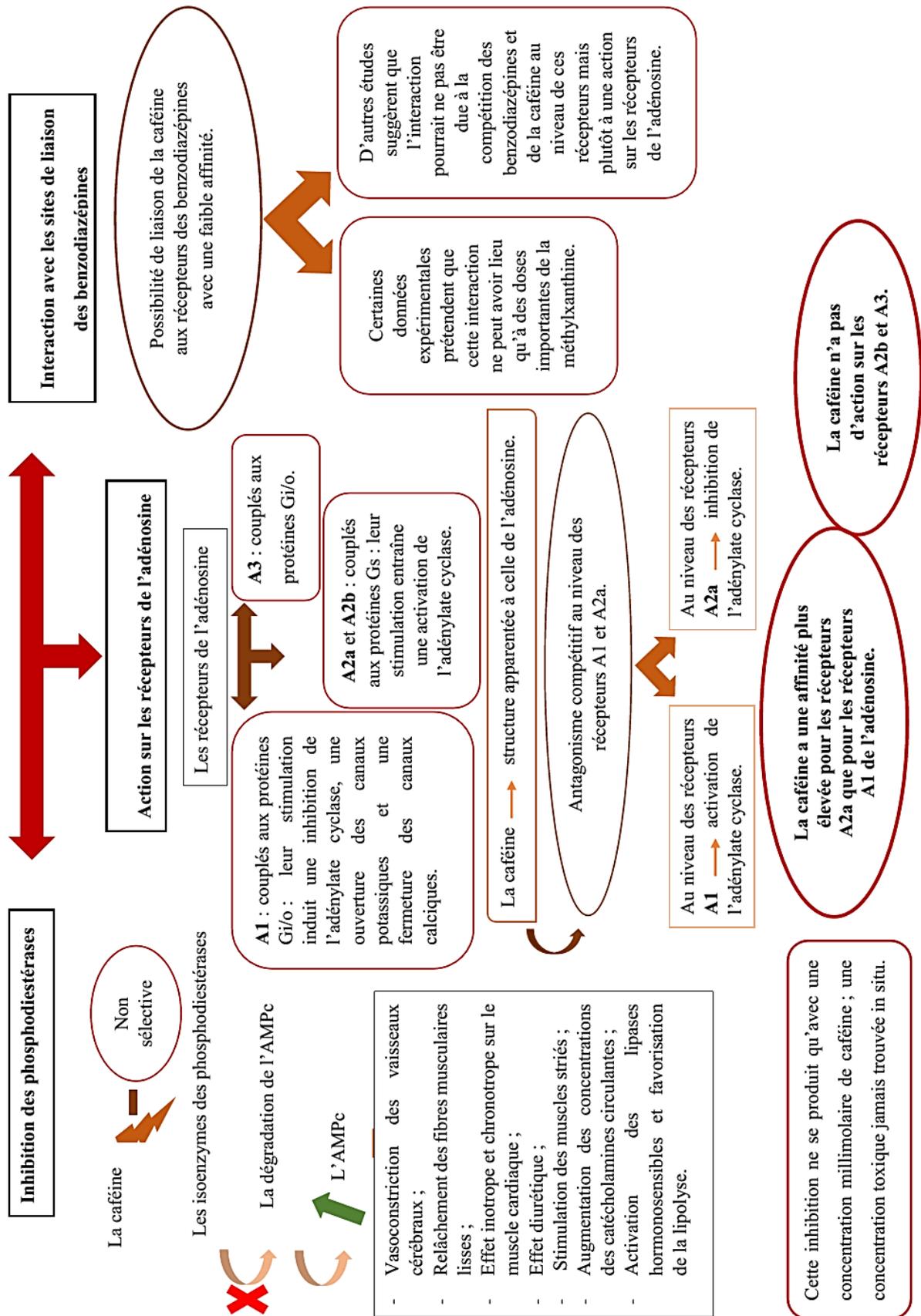


Figure 10 : Schéma représentant les différents mécanismes d'action de la caféine. [53-57]



Le tableau ci-dessous résume Les principaux effets résultant de la fixation de la caféine sur les récepteurs A1 et A2a.

**Tableau V** : Les principaux effets résultant de la fixation de la caféine sur les récepteurs A1 et A2a. [55]

Récepteurs	Organes	Antagonisme par la caféine
<b>A1</b>	SNC	Psychostimulant : diminution de la somnolence Augmentation de l'attention
	Cœur	Inotrope (+) Chronotrope (+)
	Vaisseaux Artère afférente rénale	Vasodilatation
	Système respiratoire	Bronchodilatation
<b>A2a</b>	SNC	(+) centre bulbaire respiratoire (+) transmission dopaminergique (D2) (+) dépendance
	Système vasculaire Artère coronaire	Vasoconstriction Effet antimigraineux
	Système digestif	(+) sécrétions : relaxation du sphincter œsophagien inférieur

D2 : récepteurs dopaminergiques du type 2 / (+) : stimulation

## 2.6 Intérêts et utilisations thérapeutiques

Les intérêts ainsi que certaines utilisations thérapeutiques de la caféine sont résumés dans le schéma suivant (figure 11) :

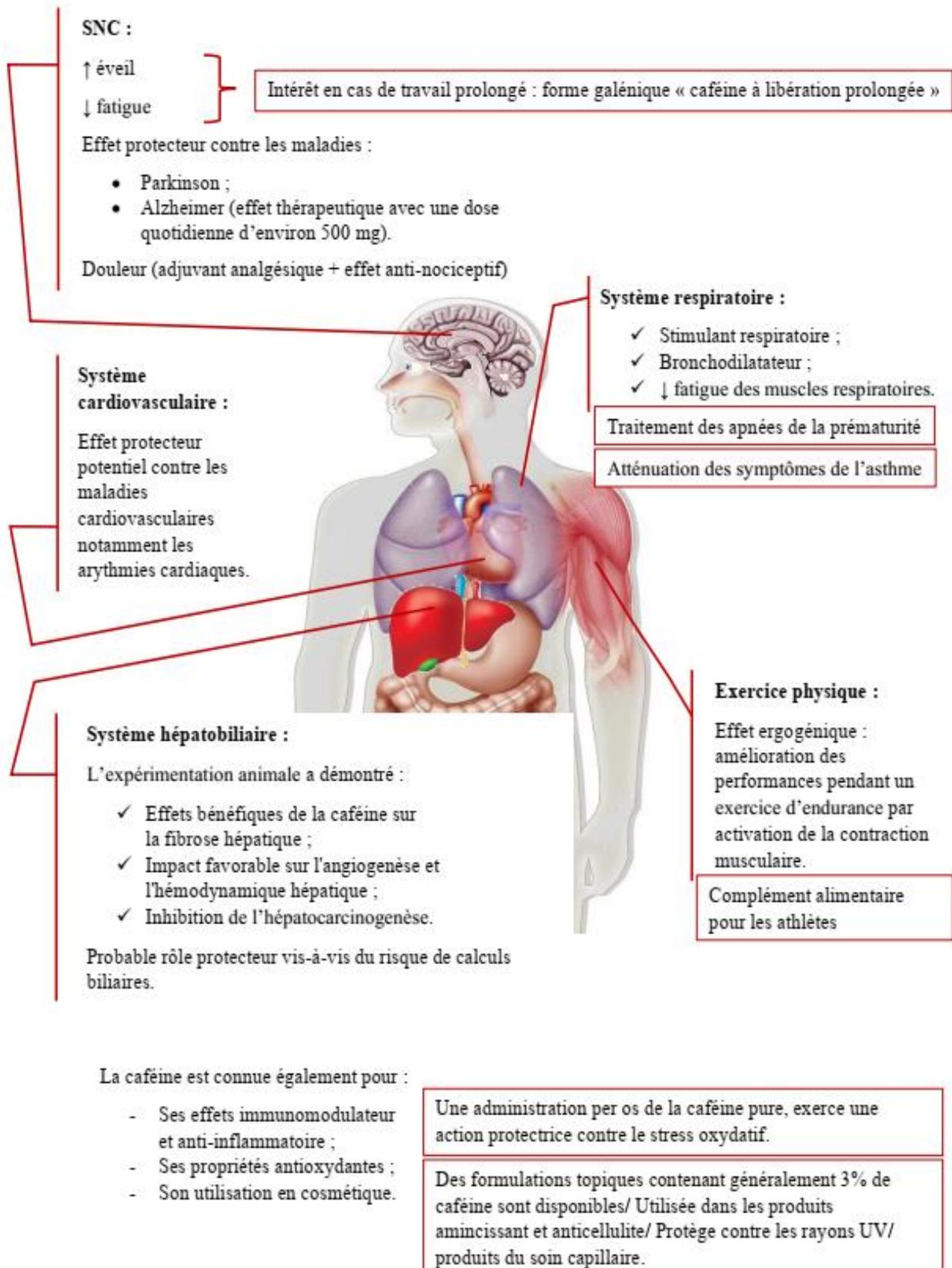


Figure 11 : Schéma récapitulatif des intérêts et utilisations thérapeutiques de la caféine. [58-77]



## **2.7 Effets indésirables**

### **2.7.1 Métabolisme osseux et homéostasie calcique**

Des études suggèrent que la caféine affecte négativement l'équilibre calcique et le métabolisme osseux (risque des fractures osseuses et d'ostéoporose), d'une manière dépendante de sa consommation et de l'apport en calcium, notamment chez les femmes. [78]

### **2.7.2 Système cardiovasculaire**

La caféine est responsable d'une augmentation du rythme cardiaque qui peut être à l'origine de palpitations. [79] La consommation de la caféine isolée augmente la pression artérielle systolique et diastolique à court terme, cependant une tolérance au moins partielle se développe avec la consommation habituelle. [60]

### **2.7.3 Système digestif**

La caféine favorise le reflux gastro-œsophagien en induisant le relâchement du sphincter inférieur de l'œsophage. [59]

### **2.7.4 Sommeil et anxiété**

Consommée tardivement dans la journée, la caféine réduit la qualité du sommeil. de plus elle peut induire de l'anxiété notamment pour des doses supérieures à 400 mg par jour, et chez les personnes souffrant de troubles anxieux ou bipolaires. [60]

### **2.7.5 Fertilité**

La consommation de la caféine peut être impliquée dans la réduction de la fécondité chez les femmes fertiles, elle peut retarder la conception voire même provoquer une interruption de la grossesse. [78]

## **2.8 Précautions d'emploi**

La consommation de la caféine est déconseillée chez les patients souffrant de troubles cardiaques, anxieux, rénaux, d'hypertension artérielle, d'insomnie, d'ulcères gastriques et duodénaux ou encore d'ostéoporose. Des doses élevées doivent être évitées chez les diabétiques. L'utilisation de la caféine ne doit être envisagée au cours de la grossesse que si nécessaire. [27, 80]



## 2.9 Interactions médicamenteuses

Observées beaucoup plus chez l'adulte, en particulier avec :

- Les inhibiteurs enzymatiques : ils diminuent le catabolisme hépatique de la caféine d'où une augmentation de ses taux plasmatiques, et parmi lesquels on cite :
  - Les antibiotiques : ciprofloxacine, norfloxacine et l'énoxacine (avec ce dernier, des concentrations pouvant entraîner des excitations et hallucinations ont été observées) ;
  - La mexilétiline ;
  - La cimétidine ;
  - Le stiripentol (risque de surdosage en caféine).
- Les inducteurs enzymatiques comme le tériflunomide, qui suite à des prises répétées, induit une diminution des concentrations plasmatiques de la caféine ;
- Le dipyridamol : son effet vasodilatateur est réduit par la caféine lorsqu'il est administré par voie injectable ;
- Les bêta 2 mimétiques : potentialisation de l'effet inotrope positif ;
- Les psychostimulants : potentialisation de l'effet neurotoxique. [27]

## 2.10 Toxicité

La toxicité ainsi que la gravité des effets indésirables liés à l'ingestion de la caféine dépendent de la dose.

### ➤ Intoxication chronique

La consommation excessive et régulière de la caféine peut entraîner un syndrome d'intoxication chronique appelé « caféinisme » qui peut se manifester par les symptômes suivants :

- Symptomatologie liée à une intoxication modérée : l'agitation, la nervosité, l'excitation, l'insomnie, maux de tête, palpitation, hyperventilation, rougissement du visage l'augmentation de la miction, des troubles gastro-intestinaux, des contractions musculaires, un flot de pensée et de paroles décousues, l'irritabilité, l'arythmie, la tachycardie.  
Des nausées, des vomissements et un œdème cérébral ont également été signalés.
- Symptomatologie grave :(ingestion de 1 à 2g de caféine) : elle se résume à des arythmies et à des convulsions. [81-84]

### ➤ Intoxication aiguë

Par dysrythmie ventriculaire et dans certains cas peut aboutir à la mort, elle est rare et implique généralement un surdosage délibéré ou accidentel avec l'ingestion de quantités importantes de caféine allant de 5 à 10g. [81, 82, 84]



➤ **Toxicité chez la femme enceinte**

La prise de la caféine à des doses supérieures à 300mg par jour au cours de la grossesse peut interférer avec le développement fœtal ; un retard de croissance intra-utérin et une diminution du poids de naissance ont été observés. [78]

➤ **Dose létale**

Fixée à une concentration sanguine de 80mg/L chez le sujet adulte, des concentrations plus faibles peuvent être associées à la létalité si le sujet en question présente une pathologie sous-jacente (exemple de cardiomyopathie dilatée, létalité à 49mg/L). [78]



### 3 ASSOCIATION PARACÉTAMOL-CAFÉINE

#### 3.1 Associations fixes de médicaments

Appelées également associations à ratio fixe, elles sont définies par la présence dans une seule et même présentation galénique d'au moins deux principes pharmacologiques actifs à des dosages respectifs imposés. Leur utilisation, dans un but curatif (HTA, glaucome...) mais également préventif (vaccins et contraceptifs oraux), est de plus en plus fréquente. [85]

##### 3.1.1 Avantages

Elles permettent de :

- Simplifier le schéma thérapeutique et assurer une meilleure efficacité ;
- Favoriser une bonne observance du traitement en réduisant le nombre de prises ;
- Diminuer certains risques d'erreurs posologiques ;
- Réduire le coût du traitement ;
- Inhiber la résistance microbienne. [85]

##### 3.1.2 Inconvénients

- Absence de flexibilité : les AF ne permettent pas de procéder à des ajustements posologiques, et ne sont pas adaptées aux évolutions de l'état du patient ;
- Leur dénomination commerciale ne traduit pas toujours les noms de leurs constituants et peut être ainsi à l'origine de confusions, d'erreurs de prescription ou de surdosage ;
- L'oubli de leur contenu, au fil du temps, favorise des interactions dangereuses avec d'autres médicaments pris par le patient. [85]

#### 3.2 La caféine en tant qu'adjuvant analgésique

La caféine étant probablement ajoutée au début, dans le but de compenser les effets sédatifs potentiels des analgésiques, elle est actuellement considérée comme un analgésique adjuvant.

Des études cliniques publiées dans les années soixante et soixante-dix ont signalé que des analgésiques en association avec la caféine provoquaient des effets similaires à ceux des analgésiques seuls, cependant dans les années quatre-vingt, une analyse de plusieurs études a permis de conclure que l'association avec la caféine (65mg) induit une potentialisation de l'effet des analgésiques (paracétamol, aspirine).

Une étude a examiné seize combinaisons de doses de caféine avec le paracétamol (100-10, -18, -32, -56 ; 178-10, -18, -32, -56 ; 316-10, -18, -32, -56 ; 562-10, -18, -32, -56 mg/kg).



Une vaste littérature préclinique rapporte une action anti-nociceptive intrinsèque de la caféine associée généralement à des doses de 25 à 100 mg/kg. [62]

### **3.2.1 Intérêt de l'association**

Aux doses recommandées, la caféine agit comme un adjuvant analgésique ; elle améliore l'efficacité du paracétamol, assure un début d'action plus précoce et réduit la dose de médicament nécessaire pour produire le même effet analgésique par rapport à une dose plus élevée d'acétaminophène seul. [86]

Des études (19 études, dont 7238 participants qui utilisaient le paracétamol ou l'ibuprofène, avec 100 mg jusqu'à 130 mg de caféine) s'intéressant à plusieurs états douloureux (à savoir les douleurs dentaires postopératoires, les douleurs du postpartum et les céphalées), ont été faites. Ces dernières ont démontré que l'ajout de la caféine, dont la dose équivaut à une grosse tasse de café (supérieure ou égale à 100mg), comparée à une dose standard d'analgésiques (notamment le paracétamol), permet d'augmenter de 5% à 10% le nombre de personnes ressentant un réel soulagement de la douleur. [87]

En outre, d'autres études ont prouvé que l'association de la caféine avec l'acétaminophène n'augmente pas l'hépatotoxicité induite par ce dernier, bien au contraire, la caféine présente un effet protecteur sur la bioénergétique mitochondriale. [88]

### **3.3 Spécialité pharmaceutique renfermant du paracétamol et de la caféine**

Le paracétamol est commercialisé en combinaison fixe avec la caféine, sous différentes formes galéniques et différents dosages.

Ce type d'association est utilisé comme analgésique et antipyrétique léger à modéré, il est prescrit notamment en cas de maux de tête, y compris la migraine, de douleurs dentaires, de dysménorrhée, de myalgie, d'état fébrile, d'arthrose mais aussi comme thérapie d'appoint pour traiter les états inflammatoires telle que la polyarthrite rhumatoïde. [89]

### **3.4 Méthodes de dosage simultané du paracétamol et de la caféine**

Il en existe plusieurs, parmi lesquelles on cite :

- La chromatographie Liquide Haute Performance couplée à un détecteur UV (Dinc, Yurtsever et Onur en 2004, Tsvetkova et al. en 2012) ;



- Les méthodes spectrophotométriques UV (Alpdogan, Karabina et Sungur en 2002, Vichare et al. en 2010) ;
- Les méthodes électrochimiques (Jeevagan et John en 2012, Saciloto, Cervini, et Cavalheiro en 2013...). [90]



---

## CHAPITRE II : VALIDATION ANALYTIQUE

### 1 Place de la validation des méthodes d'analyse dans l'assurance qualité

L'assurance qualité est, selon la norme ISO 8402 « l'ensemble des activités préétablies et systématiques mises en œuvre dans le cadre du système qualité, et démontrées en tant que besoin, pour donner la confiance appropriée en ce qu'une entité satisfera aux exigences pour la qualité. » [91]

La qualité : c'est l'ensemble des caractéristiques d'une entité qui lui confèrent l'aptitude à satisfaire des besoins exprimés et implicites. (ISO 9000-1) [92]

A partir de ces deux définitions, on peut déduire qu'il existe une relation étroite entre la validation et la qualité. En effet, la validation des procédés de fabrication et des méthodes d'analyse constitue un outil qui permet de concevoir, construire et atteindre la qualité requise, garantissant ainsi que la méthode ne procure pas de résultats inattendus et que le produit est d'une sûreté et d'une efficacité satisfaisante. [93]

### 2 Définition

La validation d'une procédure analytique est définie :

- Selon la clause 5.4.5.1 de la norme ISO 17025, 2005 : « La validation est la confirmation par examen et apport de preuves objectives du fait que les exigences particulières en vue d'une utilisation prévue déterminée sont remplies. » [94]
- Selon l'ICH Q2(R1) : la validation d'une procédure analytique : « L'objectif de la validation des méthodes d'analyse est de démontrer qu'elles conviennent aux usages auxquels on les destine. » [95]
- Selon la FDA : « Valider une méthode consiste à démontrer, avec un degré de confiance élevé et sous une forme documentée, que la méthode permet d'obtenir un résultat analytique qui atteint les spécifications à l'avance. » [96]

### 3 Objectifs de la validation analytique

En industrie pharmaceutique le passage de la phase de développement à celle de routine ne peut pas avoir lieu sans avoir recours à la validation analytique.

Cette dernière a pour objectifs de démontrer que chaque mesure réalisée ultérieurement en routine sera suffisamment proche de la valeur vraie ou dans les limites acceptables, tout en réalisant un ensemble d'opérations afin de prouver que le protocole est suffisamment exact et fiable pour avoir confiance dans les résultats fournis et ceci pour un usage déterminé. [97, 98]



#### 4 Procédures analytiques à valider

Les méthodes analytiques devant être validées par un laboratoire, comme indiqué dans la clause 5.4.5.2 de la norme ISO/CEI 17025, sont :

- Les méthodes non normalisées ;
- Les méthodes conçues/développées par le laboratoire ;
- Les méthodes normalisées employées en dehors de leur domaine d'application prévu ;
- Les amplifications et les modifications des méthodes normalisées. [99]

#### 5 Aspect réglementaire et normatif

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

##### 5.1 Documents ISO

- **ISO/CEI 17025** : « Exigences générales concernant la compétence des laboratoires d'étalonnage et d'essais ». [100]
- **ISO 5725** : « Exactitude (justesse et fidélité) des résultats et méthodes de mesure », propose le profil d'exactitude comme outil de décision. [101]

##### 5.2 Documents ICH

**ICHQ2** : « Analytical validation » :

- **ICH Q2A** : Text on Validation of Analytical Procedures « Definitions and Terminology » (Mars 1995). [102]
- **ICH Q2B** : Validation of Analytical Procedures : « Methodology » (Novembre 1996). [103]
- **ICH Q2(R1)** : Validation of Analytical Procedures : « Text and Methodology » (Novembre 2005). [95]
- **ICH Q2(R2) / ICH Q14** : Analytical Procedure Development and Revision of Q2 (R1) Analytical Validation (Novembre 2018). [104]

##### 5.3 Documents de la FDA

- « Guidance for Industry : Bioanalytical Method Validation » (Mai 2001). [105]
- « Analytical Procedures and Methods Validation for Drugs and Biologics : Guidance for Industry » (Juillet 2015) : elle complète la ligne directrice Q2(R1). [106]
- « Guidelines for the Validation of Chemical Methods in Food, Feed, Cosmetics, and Veterinary Products 3rd Edition » (Octobre 2019). [107]

##### 5.4 Documents des commissions SFSTP

Ce sont des publications qui ne constituent pas une exigence réglementaire :



- « Guide de validation analytique – Rapport d’une commission SFSTP » : il est scindé en deux parties :
  - I. Méthodologie, paru dans STP Pharma Pratiques, en 1992. [108]
  - II. Exemples d’application, paru dans STP Pharma Pratiques, en 1992. [109]
- « Méthodes chromatographiques de dosage dans les milieux biologiques : stratégie de validation. Rapport d’une commission SFSTP » paru dans STP Pharma Pratiques, en 1997. [110]
- « Méthodes chromatographiques de dosage dans les milieux biologiques : exemple d’application de la stratégie de validation. Rapport d’une commission SFSTP » paru dans STP Pharma Pratiques, en 1998. [111]
- « Validation des procédures analytiques quantitatives : Harmonisation des démarches » : en plusieurs parties :
  - Partie I. Généralités, paru dans STP Pharma Pratiques, en 2003.
  - Partie II. Statistiques, paru dans STP Pharma Pratiques, en 2006.
  - Partie III. Exemples d’application, paru dans STP Pharma Pratiques, en 2006. [112]
- « Analyse des performances d’une méthode analytique : Évaluation des risques lors d’une utilisation en routine », paru dans STP Pharma Pratiques en 2012. [113]

## 6 Cycle de vie d’une méthode

Une méthode analytique est, contrairement à ce que l’on pense, un processus évolutif non pas figé. En effet, elle naît, évolue puis vieillit et disparaît suite à son remplacement par d’autres méthodes. Ceci peut être résumé par ce que l’on appelle « cycle de vie d’une méthode », qui comme l’illustre la figure ci-dessous, se décompose en six principales phases généralement successives.

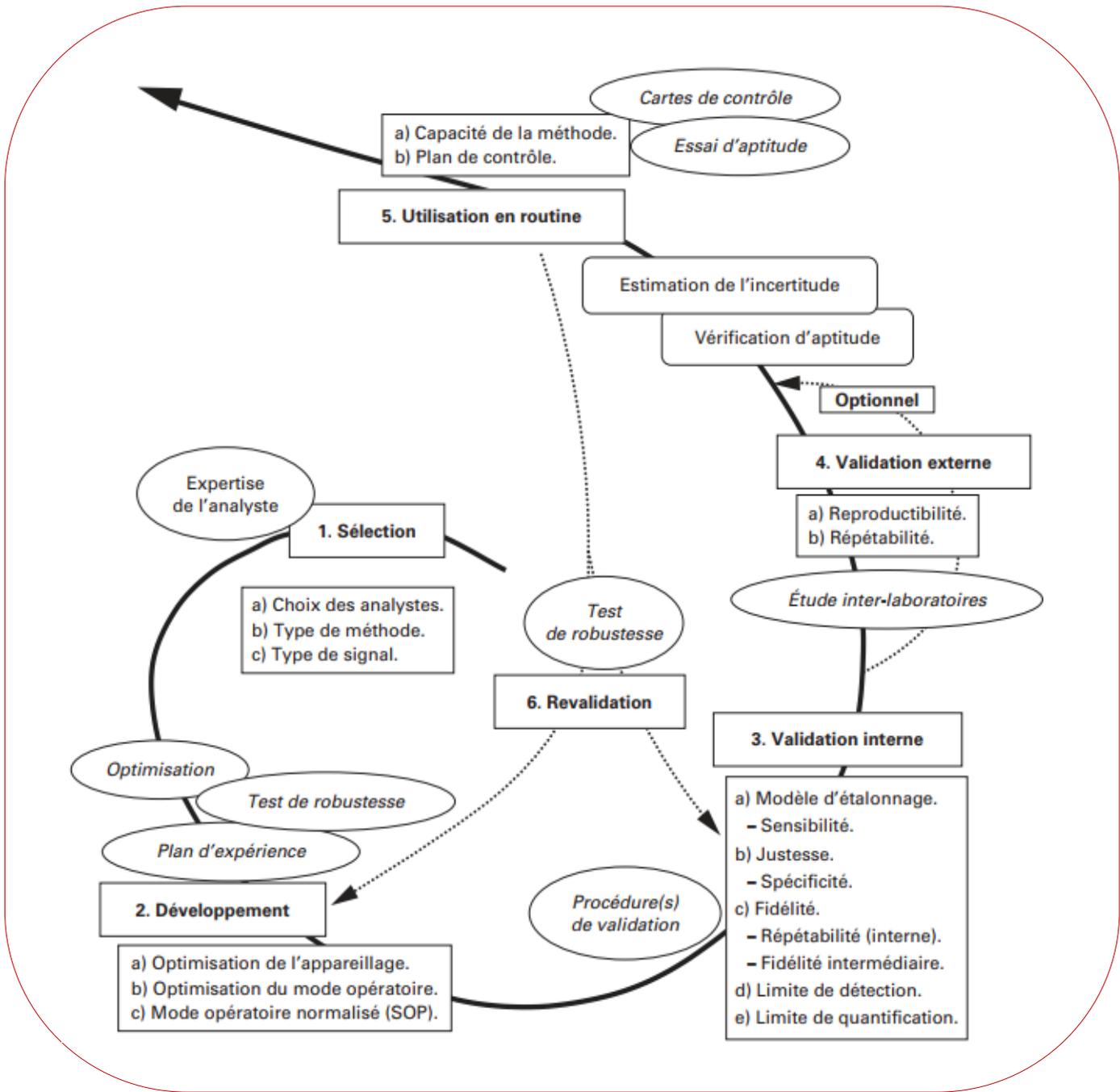


Figure 12 : Cycle de vie d'une méthode d'analyse. [114]

## 7 Critères de validation

Les principaux critères de validation utilisés dans les laboratoires d'analyse sont ceux cités dans le tableau (VI) en indiquant, s'il y a une différence d'une référence à une autre, plusieurs définitions :

Tableau VI : Définitions des critères de la validation analytique.

Critères	Références	Définitions
<b>Spécificité-sélectivité</b>	<b>SFSTP</b>	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.  NB : pour les techniques chromatographiques, on parle plutôt de sélectivité (notion relative) que de spécificité (notion absolue), le degré de sélectivité de la procédure d'analyse dépend de la qualité de séparation chromatographique et de la sélectivité du mode de détection. [112]
	<b>ICH</b>	La spécificité est la capacité d'évaluer sans équivoque l'analyte en présence de composants dont on peut s'attendre à ce qu'ils soient présents. Il s'agit généralement d'impuretés, d'agents de dégradation, de la matrice, etc. [95]
	<b>EURACHEM</b>	La sélectivité d'une méthode désigne la mesure dans laquelle la méthode peut être utilisée pour déterminer des analytes particuliers dans des mélanges ou des matrices sans interférences d'autres composants ayant des caractéristiques similaires. [115]
<b>Linéarité</b>	<b>SFSTP</b>	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. Rappelons que l'exigence de linéarité s'applique aux résultats [concentration calculée = f (concentration introduite)], pas aux réponses [signal = f (concentration introduite)]. » [112]
	<b>ICH</b>	La linéarité d'une procédure analytique est sa capacité (dans un intervalle donné) à fournir des résultats directement proportionnels à la concentration (quantité) de l'analyte dans l'échantillon. [95]
<b>Fonction de réponse</b>	<b>SFSTP</b>	La fonction de réponse d'une procédure d'analyse traduit, à l'intérieur de l'intervalle de dosage, la relation existante entre la réponse (signal) et la concentration (quantité) en substance à examiner dans l'échantillon. La fonction de réponse monotone la plus simple qui exprime cette relation est appelée « courbe d'étalonnage ». [112]
	<b>EMA</b>	La fonction de réponse est une fonction qui décrit de manière adéquate la relation entre la réponse de l'instrument (par exemple, la surface ou le rapport de hauteur du pic) et la concentration (quantité) de l'analyte



		dans l'échantillon. La fonction de réponse est définie dans une plage donnée. [116]		
<b>Justesse (biais)</b>	<b>SFSTP</b>	<p>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).</p> <p>NB : La mesure de la justesse est généralement exprimée en termes de recouvrement et de biais absolu ou relatif (erreur systématique). Signalons encore que la justesse a été également appelée « exactitude » ou « exactitude de la moyenne ». Cet usage n'est toutefois pas recommandé. [112]</p>		
	<b>EURACHEM</b>	Le biais est la différence entre la moyenne des résultats de mesure et une valeur de référence. [115]		
<b>Fidélité (précision)</b>	<b>SFSTP</b>	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. Elle fournit une indication sur les erreurs liées au hasard. Elle peut être évaluée à trois niveaux : la répétabilité, la fidélité intermédiaire (intra laboratoire) et la reproductibilité (inter laboratoire). [112]		
		La 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. [112]	La 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. [112]	La 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. [112]
		<b>ICH</b>	La précision d'une procédure analytique exprime l'étroitesse de l'accord (degré de dispersion) entre une série de mesures obtenues à partir de prélèvements multiples du	

		même échantillon homogène dans les conditions prescrites. [95]		
		La répétabilité exprime la précision dans les mêmes conditions de fonctionnement sur un court intervalle de temps. La répétabilité est également appelée précision intra-essai. [95]	La précision intermédiaire exprime les variations au sein des laboratoires : jours différents, analystes différents, équipements différents, etc. [95]	La reproductibilité exprime la précision entre laboratoires (études collaboratives, généralement appliquées à la normalisation de la méthodologie). [95]
	<b>EURACHEM</b>	La précision est une mesure de l'écart entre des résultats de mesure mutuellement indépendants obtenus dans des conditions spécifiées. Elle est une composante de l'incertitude de mesure. [115]		
		La répétabilité est un type de précision censé représenter la plus petite variation des résultats. Il s'agit d'une mesure de la variabilité des résultats lorsque les mesures sont effectuées sur le même matériau par un seul analyste utilisant la même méthode et les mêmes conditions. [115]	La précision intermédiaire donne une estimation de la variation des résultats lorsque des mesures sur le même matériau sont effectuées dans un seul laboratoire en utilisant la même méthode sur une longue période, et donc dans des conditions plus variables que les conditions de répétabilité. [115]	La reproductibilité, qui devrait représenter la plus grande variation des résultats, est une mesure de la variabilité des résultats lorsque les mesures sont effectuées dans différents laboratoires. [115]
	<b>EMA</b>	La fidélité (précision) de la méthode d'analyse décrit la proximité des mesures individuelles répétées de l'analyte. Elle est exprimée par le coefficient de variation (CV). [116]		
<b>Exactitude</b>	<b>SFSTP</b>	L'exactitude exprime l'écart entre le résultat d'essai et la valeur de référence acceptée, aussi appelée « valeur conventionnellement vraie ». L'écart ainsi observé est la résultante de la somme des erreurs systématique et aléatoire, en d'autres termes l'erreur totale liée au résultat. Par conséquent, l'exactitude		



		est l'expression de la somme de la justesse et de la fidélité. [112]
	<b>ICH</b>	L'exactitude d'une méthode d'analyse exprime l'étroitesse de l'accord entre la valeur qui est acceptée soit comme une valeur vraie conventionnelle, soit comme une valeur de référence acceptée, et la valeur trouvée. On parle parfois de justesse. [95]
	<b>EMA</b>	L'exactitude d'une procédure analytique exprime la proximité de la valeur déterminée par rapport à la valeur acceptée soit comme valeur réelle conventionnelle, soit comme valeur de référence acceptée. [116]
<b>Limite de détection</b>	<b>SFSTP</b>	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. [112]
	<b>ICH</b>	La limite de détection d'une procédure analytique individuelle est la plus petite quantité d'analyte dans un échantillon qui peut être détectée mais pas nécessairement quantifiée comme une valeur exacte. [95]
	<b>EURACHEM</b>	C'est la concentration la plus faible de l'analyte qui peut être détectée par la méthode à un niveau de confiance spécifié. [115]
<b>Limite de quantification (LQ)</b>	<b>SFSTP</b>	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. [112]
	<b>ICH</b>	La limite de quantification d'une procédure analytique individuelle est la plus petite quantité d'analyte dans un échantillon qui peut être déterminée quantitativement avec une précision et une exactitude appropriée. La limite de quantification est un paramètre des essais quantitatifs pour les faibles niveaux de composés dans les matrices d'échantillons, et est utilisée en particulier pour la détermination des impuretés et/ou des produits de dégradation. [95]
	<b>EURACHEM</b>	La limite de quantification (LQ) est la concentration la plus faible de l'analyte qui peut être déterminée avec un niveau acceptable d'incertitude et peut donc être fixée arbitrairement comme l'extrémité inférieure requise de la gamme de travail de la méthode. [115]
	<b>EMA</b>	La limite inférieure de quantification (LLOC) d'une procédure analytique individuelle est la plus petite quantité d'analyte dans un



		échantillon qui peut être déterminée quantitativement avec une précision et une exactitude prédéfinie. [116]	d'analyte dans un échantillon qui peut être déterminée quantitativement avec une précision et une exactitude prédéfinie. [116]
<b>Intervalle de dosage</b>	<b>SFSTP</b>	L'intervalle de dosage d'une procédure d'analyse est la région entre les niveaux supérieur et inférieur (ces valeurs incluses) pour laquelle il a été démontré que la procédure est appropriée quant à son exactitude (justesse + fidélité) et sa linéarité, en utilisant la méthode décrite. [112]	
	<b>ICH</b>	L'intervalle de mesure d'une procédure analytique c'est l'intervalle entre la concentration (quantité) supérieure et inférieure de l'analyte dans l'échantillon (y compris ces concentrations) pour lequel il a été démontré que la procédure analytique présente un niveau approprié de précision, d'exactitude et de linéarité. [95]	
<b>Sensibilité</b>	<b>SFSTP</b>	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. Il convient d'éviter de définir, par extension, la sensibilité d'une méthode comme sa capacité à détecter de faibles concentrations. [112]	
<b>Robustesse</b>	<b>SFSTP</b>	La robustesse d'une procédure d'analyse est sa capacité à rendre des résultats exacts en présence de faibles changements de conditions expérimentales susceptibles de se produire dans l'utilisation de cette procédure. [108]	
	<b>ICH</b>	La robustesse d'une méthode d'analyse est une mesure de sa capacité à ne pas être affectée par des variations faibles mais délibérées des paramètres de la méthode et fournit une indication de sa fiabilité dans des conditions normales d'utilisation. [95]	
	<b>EURACHEM</b>	La robustesse (parfois appelée aussi solidité) donne une indication de la fiabilité d'une méthode lors d'une utilisation normale. Une étude de robustesse évalue la capacité d'une méthode à ne pas être affectée par de petites variations des paramètres de la méthode. Elle consiste à introduire délibérément de petits changements dans la méthode et à en examiner les conséquences. Un grand nombre de facteurs peuvent être pris en compte, mais comme la plupart d'entre eux auront un effet négligeable, il sera normalement possible d'en faire varier plusieurs à la fois, en particulier si des outils de conception expérimentale sont utilisés. [115]	



## 8 Choix des critères de la validation

Tous les critères de la validation analytique ne sont pas applicables à toutes les méthodes d'analyse, ceci dépendra du type de l'analyse [112], comme l'illustre le tableau (VII) ci-dessous :

**Tableau VII** : Critères de la validation en fonction du type d'analyse. [117]

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

## 9 Validation d'une procédure analytique quantitative par le profil d'exactitude

De nombreux documents à caractère normatif présentent les critères de performance rendant possible la validation d'une méthode de dosage, cependant ils se limitent aux concepts généraux, sans présentation du protocole expérimental à suivre. Raison pour laquelle, la commission SFSTP en 1992 a élaboré un guide de validation des procédures analytiques des spécialités pharmaceutiques, donnant un plan de validation, permettant son application aisée par les industriels du médicament.

Toutefois, la complexité des tests statistiques à réaliser, et la difficulté de leurs analyses et interprétations, ont poussé la commission SFSTP à partir de 2003 à proposer une démarche

harmonisée afin de simplifier l'approche de la validation des méthodes analytiques, se basant sur des critères décisionnels, reposant sur l'application du profil d'exactitude.

Cette approche de l'erreur totale (erreur systématique + erreur aléatoire), à la fois statistique et expérimentale, basée sur l'estimation d'un intervalle, dans lequel se situe le résultat d'un dosage, est représentée sous forme d'un graphique construit à partir de la combinaison des estimés de l'intervalle de tolérance  $\beta$  des mesures attendues à chaque niveau de concentration, et d'un intervalle d'acceptabilité ( $\pm \lambda$ ) fixé par l'analyste selon la finalité de la procédure analytique.

Le profil d'exactitude constitue de ce fait pour l'analyste, un outil visuel et pratique, de décision, quant à la capacité ou non d'une méthode analytique à fournir des résultats dans les limites d'acceptation. [112]

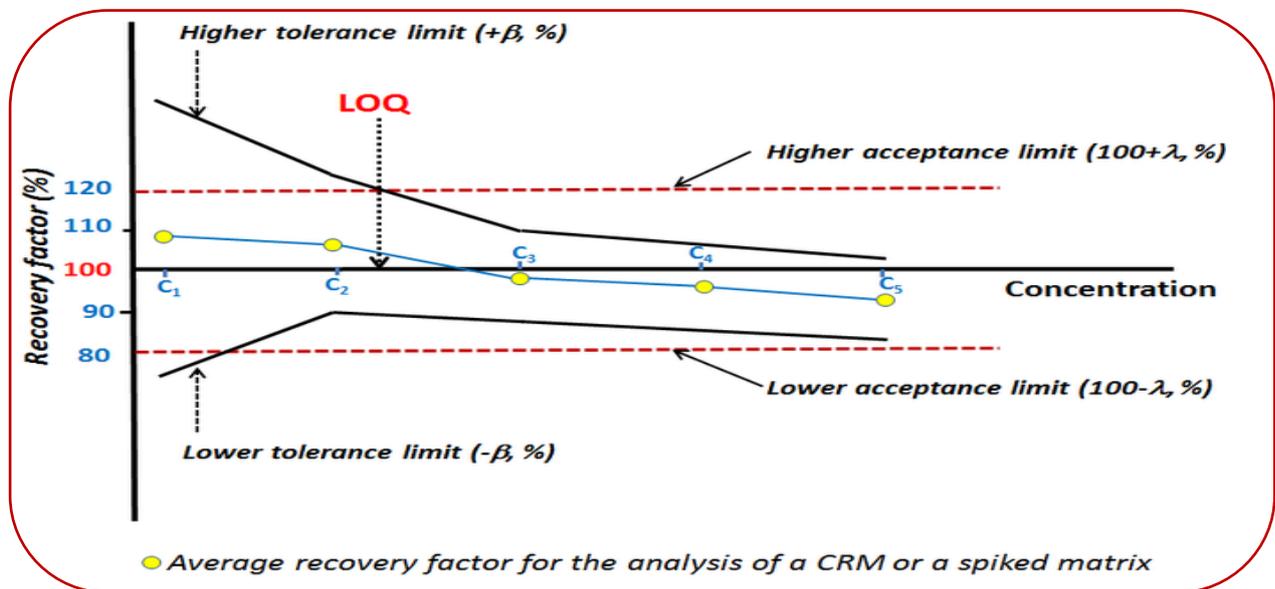


Figure 13 : Profil d'exactitude établi avec cinq niveaux de concentration. [118]

## 10 Étapes de validation d'une méthode analytique en utilisant le profil d'exactitude

Elles sont au nombre de dix :

**Étape 1 :** disposer du mode opératoire et définir le mesurande ;

**Étape 2 :** définir le domaine de validation de la méthode sous forme d'une gamme de concentrations, et fixer les limites d'acceptabilité qui refléteront les objectifs attendus de la méthode en termes de performances ;



**Étape 3 :** sélectionner les échantillons de validation ; il s'agit en fait, de choisir des échantillons clairement identifiés dont la concentration est bien connue correspondant à la valeur de référence et qui représentera la teneur attendue ;

**Étape 4 :** planifier les essais de validation ; ceci sert à estimer les performances en routine de la méthode.

**Étape 5 :** choisir un plan d'étalonnage ; exigé uniquement pour les méthodes indirectes, et sert à estimer les coefficients du modèle de la courbe d'étalonnage.

**Étape 6 :** réaliser les essais et collecter les données ;

**Étape 7 :** celle-ci est réservée pour les méthodes indirectes et consiste à calculer les concentrations prédites (dites aussi estimées ou retrouvées) par étalonnage inverse ;

**Étape 8 :** calculer pour chaque niveau de concentration :

- Les écarts-types de répétabilité et de fidélité intermédiaire ;
- La justesse ;
- L'intervalle de tolérance.

**Étape 9 :** construire le profil d'exactitude ; la représentation la plus classique et la plus retenue est l'expression de tous les résultats en valeurs relatives ramenés à la valeur de référence du niveau ;

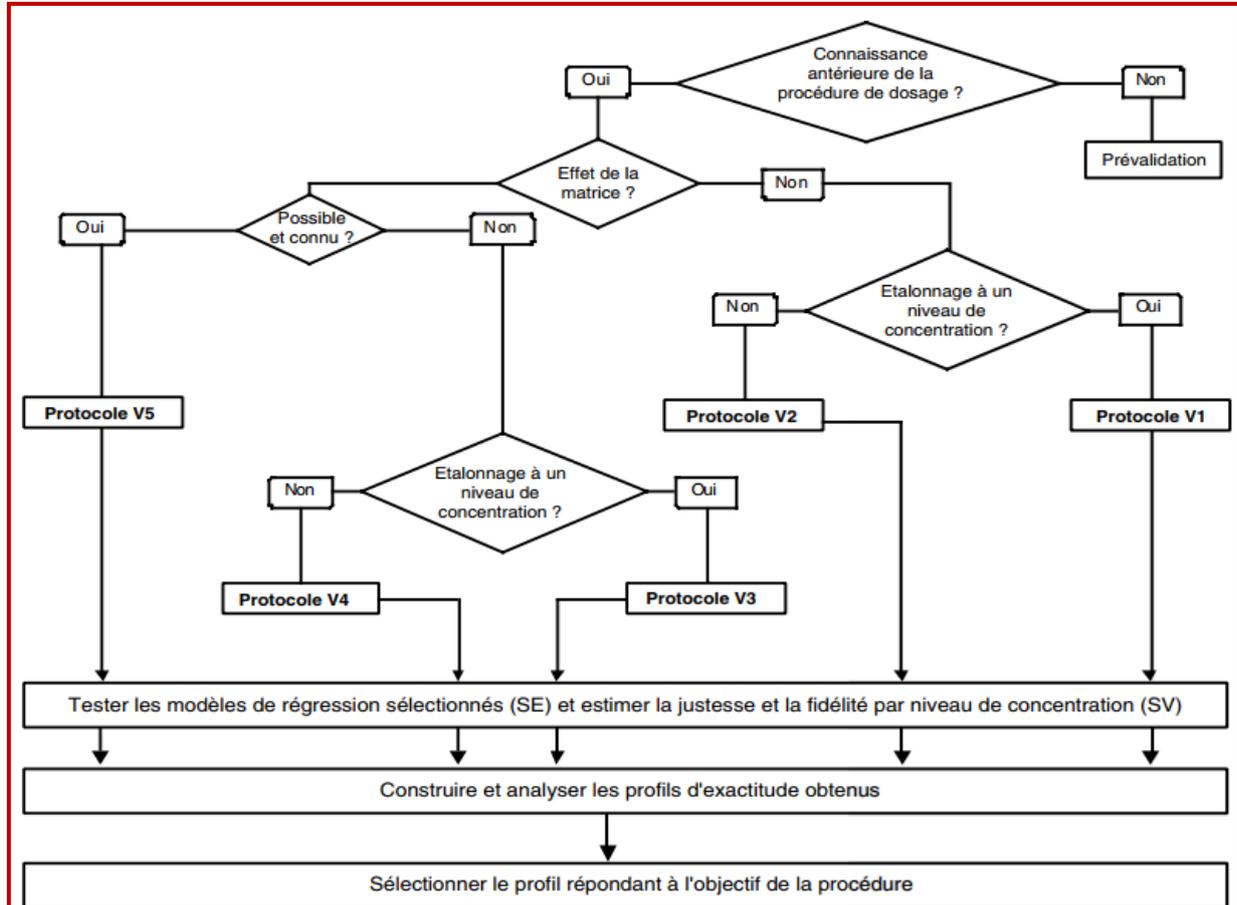
**Étape 10 :** interpréter le profil d'exactitude et prendre une décision concernant la validité de la méthode. [119]

## 11 Protocole en phase de validation

La commission SFSTP propose des protocoles détaillés, pour la mise en place de la validation par profil d'exactitude des méthodes d'analyse.

La sélection d'un protocole expérimental, dépend des contraintes ou des spécificités liées à la méthode de dosage en question. La démarche à suivre proposée dans le guide SFSTP pour le choix d'un protocole adéquat, est représentée dans le logigramme de la figure (14) suivante.

[112]



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

**Figure 14 :** Logigramme de sélection d'un protocole de validation. [112]

Pour chaque protocole, sont définis, le nombre de répétitions correspondant à chaque niveau de concentration des standards d'étalonnage et des standards de validation, ainsi que le nombre minimum de séries à faire, et donc le nombre total minimum des essais à réaliser. Les différents protocoles sont résumés dans le tableau suivant :

**Tableau VIII : Choix du nombre de standards d'étalonnage et de validation en fonction du protocole choisi. [112]**

Standards	Niveaux de concentration	Protocole				
		V1	V2	V3	V4	V5
Standard d'étalonnage sans la matrice	Bas	/	2	/	2	/
	Médian	2	2	2	2	/
	Haut	2	2	2	2	/
Standard d'étalonnage avec la matrice	Bas	/	/	/	2	2
	Médian	/	/	2	2	2
	Haut	/	/	2	2	2
	Additif	/	/	/	/	2
Standard de validation avec la matrice	Bas	3	3	3	3	3
	Médian	3	3	3	3	3
	Haut	3	3	3	3	3
Nombre minimum séries		3	3	3	3	3
Nbre total essais (minimum)		33	45	39	63	45

## 12 Etude statistique de la validation analytique

### 12.1 Spécificité

La spécificité d'une méthode d'analyse peut être démontrée de deux manières :

- Comparaison des signaux instrumentaux : les signaux obtenus à partir de la solution du standard d'étalonnage et de la solution du standard de validation doivent être comparables (des pics au même temps de rétention et avec des surfaces comparables), et le signal donné à partir de la solution placebo doit être nul ;
- Statistiquement par : comparaison des pentes  $a_1$  et  $a_2$  des droites  $D_1$  et  $D_2$  des gammes standard et forme reconstituée respectivement, en se basant sur le test t de Student, ainsi, si les deux pentes sont comparables, leur différence doit être non significative.

On a donc :

$$t_{\text{calculé}} = \frac{|a_1 - a_2|}{\sqrt{\sigma^2 a_1 - \sigma^2 a_2}}$$

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

Avec :



- $\sigma^2 a_1$  et  $\sigma^2 a_2$  : les variances des pentes  $a_1$  et  $a_2$  des droites  $D_1$  et  $D_2$  respectivement ;
- $n_1 + n_2$  : étant le nombre d'échantillons réalisés pour la gamme standard et la gamme forme pharmaceutique reconstituée ;
- $n_1 + n_2 - 4$  : degré de liberté (ddl).

Si  $t_{\text{calculé}} < t^\circ$  on déduit que les pentes sont comparables au risque  $\alpha$ , ce qui témoigne l'absence de l'effet matrice, la méthode est donc spécifique. [108]

## 12.2 Fonction de réponse

Après réalisation des expériences et collecte des données, il est convenable de déterminer, sur la base des standards d'étalonnage (SE), la relation entre la réponse de l'instrument  $Y$  et la quantité (concentration)  $X$ . Cette relation est exprimée par une fonction  $f$  de type :

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

Avec  $\varepsilon$ , l'erreur résiduelle associée à la fonction de réponse ; d'où la nécessité d'un ajustement de la fonction (c'est-à-dire que ses paramètres doivent être évalués de manière à ce que l'erreur résiduelle  $\varepsilon$  soit minimisée). Cette fonction n'est pas nécessairement linéaire, mais elle doit être strictement monotone sur l'intervalle de dosage envisagé.

Comme illustré dans le tableau ci-dessous, il existe différentes fonctions de réponse pouvant être utilisées lors de la validation des méthodes analytiques, et le choix se fera selon la nature de ces dernières.

**Tableau IX :** Exemples de fonctions de réponses.

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



Pour la plupart des méthodes physicochimiques, le choix se portera sur des droites pouvant passer par le 0 ou non. En ce qui concerne les méthodes bioanalytiques, la fonction quadratique peut être adoptée dans certains cas. Pour ce qui est des immuno-dosages, ils auront recours aux fonctions logistiques à 4 ou à 5 paramètres.

Certaines transformations mathématiques peuvent être appliquées à la concentration X ainsi qu'à la réponse Y, tel que le logarithme népérien, ou la racine carrée (ces transformations ne sont recommandées qu'avec les fonctions linéaires). [121]

### 12.3 Alignement des observations

Si, pour un niveau de concentration, les quantités introduites ne sont pas identiques pour toutes les séries (suite aux pesées indépendantes), l'alignement sur la concentration moyenne s'avère indispensable, du moment qu'un calcul de variance doit être réalisé (estimation de la répétabilité et de la fidélité intermédiaire). Il s'agit d'une transformation des 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.

L'alignement (en validation) s'applique aux réponses obtenues avec les échantillons de validation en utilisant les équations (ou la 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 :

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

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

$x_{ijk}$  : concentration introduite du niveau j de la série i répétition k. [121]

Et chaque type de fonction possède sa propre règle d'alignement comme le montre le tableau ci-dessous :

**Tableau X** : Règles d'alignement pour différentes fonctions de réponses. [121]

Fonction de réponse	Règle d'alignement
Droite passant ou non par l'origine	$y_{ijk,c} = y_{ijk} + \hat{\beta}_i [\bar{x}_{ij} - x_{ijk}]$
Fonction quadratique	$y_{ijk,c} = y_{ijk} + \hat{\beta}_i [\bar{x}_{ij} - x_{ijk}] + \hat{\gamma}_i [\bar{x}_{ij}^2 - x_{ijk}^2]$
Fonction logistique à 4 paramètres	$y_{ijk,c} = y_{ijk} + (\hat{\delta}_i - \hat{\alpha}_i) \left[ \frac{1}{1 + \left(\frac{\hat{\gamma}_i}{\bar{x}_{ij}}\right)^{\hat{\beta}_i}} - \frac{1}{1 + \left(\frac{\hat{\gamma}_i}{x_{ijk}}\right)^{\hat{\beta}_i}} \right]$

#### 12.4 Prédiction inverse

Les modèles d'étalonnage, pour les méthodes indirectes, servent à déterminer les concentrations calculées à partir des résultats de validation, en utilisant la fonction inverse du modèle d'étalonnage (appelée équation de prédiction inverse) selon la formule mathématique suivante [121] :

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

Pour les différents modèles de régression, les prédictions inverses s'obtiennent ainsi (tableau XIII) :

**Tableau XI** : Calcul des prédictions inverses pour différentes fonctions de réponses. [121]

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



Un remplacement des  $y_{ijk}$  par les  $y_{ijk,c}$  doit être effectué (dans le tableau précédent) si les observations ont été alignées.

Il ne faut pas oublier d'effectuer des transformations inverses si des transformations mathématiques ont été réalisées. Deux exemples sont illustrés dans le tableau qui suit :

**Tableau XII :** Calcul des prédictions inverses pour la droite ayant subi une transformation logarithmique ou racine carrée. [121]

Fonction de réponse	Concentration calculée (logarithme)	Concentration calculée (racine carrée)
<b>Droite</b>	$x_{ijk,calc} = e^{\frac{\ln(y_{ijk}) - \hat{a}_i}{\hat{b}_i}}$	$x_{ijk,calc} = \left( \frac{\sqrt{y_{ijk}} - \hat{a}_i}{\hat{b}_i} \right)^2$

## 12.5 Calcul de la justesse et de la fidélité

### 12.5.1 Modèle

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

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

Où :

- ✓  $X_{ijk}$  est la  $k$ -ième concentration calculée du niveau  $j$  de la  $i$ -ème série ;
- ✓  $\mu_j$  est la moyenne des concentrations calculées du niveau de concentration  $j$  ;
- ✓  $\alpha_{ij}$  est une variable aléatoire qui suit une loi normale de moyenne 0 et de variance  $\sigma^2_{B,j}$ . Pour un niveau de concentration  $j$  cette variable est égale à l'écart entre la moyenne de la  $i$ -ème série et la moyenne  $\mu_j$ , traduisant ainsi l'effet série ;
- ✓  $\epsilon_{ijk}$  est l'erreur expérimentale appelée aussi erreur résiduelle aléatoire, ayant une distribution normale de moyenne 0 et de variance  $\sigma^2_{w,j}$ . Cette erreur est supposée indépendante de la série. [121]

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

La méthode des moindres carrés est utilisée pour estimer à chaque niveau de concentration  $j$  les paramètres  $\mu_j$ ,  $\sigma^2_{B,j}$ ,  $\sigma^2_{w,j}$  du modèle.

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



Le traitement statistique des données issues d'un plan d'expérience équilibré se fait selon la norme ISO5725 par la méthode d'analyse de la variance à un facteur ANOVA. Ceci permet de décomposer la somme des carrés des écarts totaux en deux sommes des carrés d'écart pour des raisons de simplification l'indice  $j$  de niveau est omis dans la formule suivante :

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

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

$$SCE_t = SCE_B + SCE_r \text{ (Equation générale de l'analyse des variances)}$$

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

- $SCE_t$  : Somme totale des carrés des écarts à la moyenne générale du niveau ;
- $SCE_B$  : Somme des carrés des écarts inter-séries ;
- $SCE_r$  : Somme des carrés des écarts intra-série.

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

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

$$SCE_B = 0 \text{ si } SCE_B \leq 0. [119]$$

### 12.5.2 Justesse

La justesse (ou le biais) de la méthode est obtenue pour chaque niveau de concentration en calculant la différence entre la moyenne des concentrations introduites et la moyenne des concentrations calculées. Il existe différents modes d'expression de ce biais à savoir :

- ❖ Le biais absolu :

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

- ❖ Le biais relatif :

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



❖ Le taux de recouvrement :

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

Avec :

- $\mu_j$  : la moyenne des concentrations calculées (retrouvées) du niveau j ;
- $\bar{x}$  : la moyenne des concentrations introduites du niveau j. [121]

### 12.5.3 Fidélité

L'estimation de la fidélité d'une méthode peut être effectuée à trois niveaux : la répétabilité, la fidélité intermédiaire et la reproductibilité.

L'estimation de la reproductibilité n'est envisageable que dans le cadre d'une validation en inter-laboratoire.

#### 12.5.3.1 Calcul de la répétabilité et de la fidélité intermédiaire

Répétabilité : 
$$\hat{\sigma}_{W,j}^2 = \frac{SCE_r}{I(k-1)}$$

Avec :

SCE<sub>r</sub> : la somme des carrés des écarts intra-série ;

I : le nombre de séries ;

k : le nombre de répétitions par série.

Cette estimation de la variance intra série donne une estimation de la variance de répétabilité,

l'écart type de répétabilité est donc retrouvé par l'équation suivante :  $\hat{\sigma}_{w,j} = \sqrt{\hat{\sigma}_{W,j}^2}$

A partir de la variance intra série on pourra également calculer la variance inter série :

$$\hat{\sigma}_{B,j}^2 = \frac{\left(\frac{SCE_B}{I-1} - \hat{\sigma}_{w,j}^2\right)}{k}$$

La somme des estimations des variances intra- et intersérie donne une estimation de la variance de fidélité intermédiaire.

Fidélité intermédiaire : 
$$\hat{\sigma}_{IP,j}^2 = \hat{\sigma}_{w,j}^2 + \hat{\sigma}_{B,j}^2$$
 [120, 121]



## 12.6 Exactitude

L'exactitude d'un résultat (par opposition à celui de la méthode analytique) caractérise l'écart entre un mesurage individuel et la valeur de référence acceptée (appelée aussi valeur conventionnellement vraie) qui lui correspond. [114]

L'exactitude peut être exprimée :

- ❖ En valeur absolue :

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

- ❖ En valeur relative :

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

Avec :

X : la concentration prédite pour chaque mesure ;

$\mu$  : la concentration introduite.

Pour les mêmes données, l'erreur maximale relative observée pour chaque modèle de fonction de réponse utilisé nous donne une indication sur son efficacité relative et met en évidence l'impact du choix de la fonction de réponse sur l'exactitude des résultats. [121]

## 12.7 Erreur totale et profil d'erreur totale

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

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

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

$$X - \mu = \text{Erreur totale}_{\text{procédure}} = \text{Erreur de mesure}$$

Ces formules démontrent que l'erreur totale d'une procédure analytique évalue son aptitude à produire des résultats exacts [121]. Elle est égale à la somme des erreurs systématiques et aléatoires qui se définissent comme suit :

**Erreur systématique** : provient d'un défaut dans le système d'analyse et se caractérise par une déviation de tous les résultats dans la même direction. Elle se répète tant que la cause n'est pas éliminée et représente la justesse de la méthode.



**Erreur aléatoire** : elle concerne toute déviation positive ou négative des mesures répétées sur un même échantillon par rapport à la moyenne calculée. Elle est imprévisible et incontrôlable, due par exemple aux erreurs de manipulations et représente la fidélité de la méthode. [122, 123]

Étant un bon indicateur de l'exactitude des résultats d'une procédure d'analyse, l'estimation de l'erreur totale est fondamentale pour juger de la validité de cette procédure. [121]

### 12.8 Calcul de l'intervalle de tolérance

L'intervalle de tolérance est l'intervalle dans lequel on s'attend à avoir une proportion ( $\beta\%$ ) des futurs résultats. [120]

Il caractérise la dispersion des résultats déjà obtenus et donne une représentation ou une garantie de ce que la même procédure analytique pourra donner comme résultats dans le futur.

L'estimation des paramètres du biais et de la variance  $\mu_j$ ,  $\sigma_{B,j}$  et  $\sigma_{w,j}$  à chaque niveau de concentration  $j$  a pour but de permettre d'estimer la proportion attendue d'observations dans les limites d'acceptation prédéfinies  $[-\lambda, \lambda]$ , c'est-à-dire :

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

L'intervalle de tolérance (IT) est calculé pour chaque niveau de concentration envisagé avec les standards de validation comme suit :

❖ En valeur absolue :  $E_{\hat{\mu}_M, \hat{\sigma}_M} \{ P_X [ \hat{\mu}_M - K \hat{\sigma}_M < X < \hat{\mu}_M + K \hat{\sigma}_M / \hat{\mu}_M, \hat{\sigma}_M ] \} = \beta$

❖ En échelle relative ce même intervalle devient

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

Les coefficients intervenant dans cette formule sont déterminés de cette façon :

✓ Ecart type de fidélité intermédiaire :  $\sigma_{FI,j} = \sqrt{\sigma_{w,j}^2 + \sigma_{B,j}^2}$

✓ Coefficient B :  $B = \sqrt{\frac{R_j+1}{nR_j+1}}$

✓ Rapport de variances R : il traduit l'importance relative de l'effet jour (ou série) par rapport à la répétabilité (en termes de variances) ;  $R = \frac{\sigma_{B,j}^2}{\sigma_{w,j}^2}$



- ✓ Facteur de couverture de l'IT : appelé aussi facteur d'élargissement, il dépend de la valeur choisie de  $\beta$  et rend compte de la proportion de futures mesures qui sera prédite par l'IT ;  $Q_t = \left( t_{v, \frac{1+\beta}{2}} \right)$ ,  $v$  est le nombre de degré de liberté :

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

**NB :**

- $p$  : nombre de séries ;
- $n$  : nombre de répétitions ;
- L'écart type de l'IT = L'écart type de fidélité intermédiaire  $\times$  Le rapport de variances. [119, 121]

## 12.9 Profil d'exactitude

### 12.9.1 Calcul

Le profil d'exactitude s'obtient en reliant d'une part les bornes  $L_j$  entre elles ( $L_1 \dots L_m$ ) : [121]

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

Et d'autre part les bornes  $U_j$  entre elles ( $U_1 \dots U_m$ ) :

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

### 12.9.2 Choix de la fonction de réponse

- ❖ L'usage 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.
- ❖ Parmi les fonctions de réponses acceptables, certaines fournissent des résultats meilleurs que d'autres (limites de quantification étendues, simplicité du model...) ces dernières seront alors retenues.
- ❖ Le profil d'exactitude, représentant le reflet direct de ce que la procédure analytique est capable, permet de :
  - ◆ Juger l'adéquation des différentes pratiques ;
  - ◆ Prendre des décisions. [121]



### 12.10 Linéarité

Pour l'intervalle de concentration à valider, la linéarité est vérifiée en utilisant les données des premières répétitions de chaque niveau de concentration, pour les trois séries de validation.

La linéarité de la relation entre les concentrations retrouvées ( $x_{\text{calc}}$ ) et les concentrations introduites ( $x$ ) est examinée en représentant graphiquement la fonction  $[x_{\text{calc}} = f(x)]$  pour les 3 séries de validation conjointement.

La droite obtenue est analysée statistiquement en comparant la pente à la valeur de référence 1 et l'ordonnée à l'origine à la valeur de référence 0. [120]

Il est à noter que la linéarité de la fonction  $[x_{\text{calc}} = f(x)]$  est un prérequis à l'estimation de la justesse, en revanche elle n'implique pas que la méthode soit juste. [112]

### 12.11 Limite de quantification

Les limites de quantification sont bien les valeurs extrêmes qui peuvent être quantifiées avec une exactitude définie ; constituent de cette manière les deux bornes inférieure et supérieure de l'intervalle de dosage.

Les limites de quantification haute et basse représentent l'intersection entre le profil d'exactitude et les limites d'acceptations, ce profil d'exactitude se dessine à partir des incertitudes totales calculées et des limites d'acceptation prédéfinies. [121]

---

## **Partie pratique**

---



## CHAPITRE I : MATÉRIELS ET MÉTHODES

Plusieurs spécialités pharmaceutiques disponibles associent du paracétamol et de la caféine afin d'améliorer l'efficacité du paracétamol, et l'effet antalgique de ce dernier sera ainsi renforcé.

Ce présent travail a pour objectif d'optimiser et de valider une nouvelle méthode de dosage simultané des deux principes actifs, cités précédemment, 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, conformément aux directives de la commission de la Société Française des Sciences Techniques et Pharmaceutiques (SFSTP) publiées dans la revue STP Pharma Pratique en janvier 2006.

### 1 MATÉRIELS

#### 1.1 Verreries et autres

La verrerie et le matériel utilisés dans ce présent travail sont résumés dans le tableau suivant :

**Tableau XIII:** Verrerie et autres matériels utilisés dans ce présent travail.

Verreries	Autres
<ul style="list-style-type: none"><li>• Fioles jaugées : 20 ml, 25 ml, 50 ml, 100 ml, 200 ml, 250 ml, 500 ml, 1000 ml, 2000 ml ;</li><li>• Bêchers ;</li><li>• Pipettes graduées (Western Germany) : 5 ml ;</li><li>• Entonnoirs ;</li><li>• Vials ;</li><li>• Erlenmeyers.</li></ul>	<ul style="list-style-type: none"><li>• Filtre membrane 47 mm, pores 0,45 <math>\mu\text{m}</math> ;</li><li>• Papiers filtres ;</li><li>• Papier aluminium ;</li><li>• Comptes gouttes ;</li><li>• Poires ;</li><li>• Pissettes ;</li><li>• Spatules.</li></ul>



## 1.2 Appareillage

L' Appareillage utilisé dans ce présent travail est résumé dans le tableau suivant :

**Tableau XIV** : Appareillage utilisé dans ce présent travail.

Désignation	Spécification	Usage	
HPLC (SHIMADZU LC20)	Pompe	Lc20 at.	Séparation, dosage et obtention des chromatogrammes
	Injecteur automatique	SIL 20 A	
	Contrôleur	CBM-20	
	Compartiment de la colonne	CTO-20 A	
	Colonne	SHIMADZU Shim-pack GIST C18 (15 et 25 cm)	
	Détecteur	Spectrophotomètre UV visible SPD-20AV	
	Logiciel d'exploitation	LC-solution	
Spectrophotomètre UV-Visible	(Perkin Elmer Lambda 25) Double faisceaux	Obtention des spectres et longueurs d'onde d'absorption (Scan)	
Distillateur	Nuve	Eau distillée	
Pompe à vide (dispositif de filtration de la phase mobile sous vide)	Fisher bioblock scientific Pmax = 4 bars	Filtration de la phase mobile	
Bain ultrasons : Sonicateur	Advantage-LAB	Solubilisation	
Agitateur magnétique	NAHITA Model690-1	Homogénéisation des solutions (pour la détermination du pH de la phase mobile)	
Balances analytiques	KERN	Pesées	
	METLER TOLEDO		
Etuve	MEMMERT	Séchage de la verrerie	
pH-mètre	METLER TOLEDO	Détermination du pH du tampon et de la phase mobile	



### 1.3 Matières premières

Le tableau ci-dessous résume les matières premières utilisées dans ce présent travail.

**Tableau XV :** Matières premières utilisées dans ce présent travail.

Matières premières		Fournisseurs
Principes actifs	Paracétamol	Fourni gracieusement par le laboratoire pharmaceutique Biopharm industrie Algérie.
	Caféine	Fourni gracieusement par le laboratoire pharmaceutique Biopharm industrie Algérie.
Excipients	Povidone K30	Fourni gracieusement par le laboratoire pharmaceutique Biopharm industrie Algérie.
	Amidon de maïs	Fourni gracieusement par le laboratoire pharmaceutique Biopharm industrie Algérie.

### 1.4 Réactifs

Les réactifs utilisés dans ce présent travail sont résumés dans le tableau ci-dessous :

**Tableau XVI :** Réactifs utilisés dans ce présent travail.

Réactifs	Fournisseurs	Données physicochimiques
Méthanol grade HPLC	HONEYWELL Riedel-de-Haën™.	Mr = 32,04 g/mol Pureté ≥ à 99,9% N° CAS : 67-56-1
Acétonitrile grade HPLC	HONEYWELL Riedel-de-Haën™.	Mr = 41,05 g/mol Pureté ≥ à 99,9% N° CAS : 75-05-8
Ethanol	BIOCHEM Chemopharma.	Mr = 46,07 g/mol Pureté : min 96% N° CAS : 64-17-5
Tampon phosphate monobasique	SIGMA-ALDRICH.	Mr = 119,98 g/mol Pureté : 98-100,5 % N° CAS : 7558-80-7
Acide phosphorique	HONEYWELL Fluka™.	Mr = 98 g/mol Pureté : 85-88% N° CAS : 7664-38-2



## 2 MÉTHODES

### 2.1 Optimisation de la méthode

Afin d'optimiser notre méthode de dosage simultané de la caféine et du paracétamol par HPLC, nous avons fait varier plusieurs paramètres chromatographiques dans le but de sélectionner les conditions optimales et convenables permettant d'obtenir une meilleure séparation et donc une bonne résolution avec un temps d'analyse raisonnable.

Pour cela nous avons commencé par effectuer un scan à l'aide d'un spectrophotomètre UV-VISIBLE afin d'analyser les spectres d'absorption des deux molécules préparées dans des solutions séparément, de déterminer leurs  $\lambda_{\max}$  et par la suite de choisir une longueur d'onde  $\lambda$  où les deux molécules absorbent simultanément, ceci nous permettra de les analyser conjointement à cette même longueur d'onde. Dans ce sens, nous avons constaté que la longueur d'onde d'absorption commune pour ces deux dernières est de 220 nm.

Après avoir déterminé notre longueur d'onde d'analyse, on est passé au choix des colonnes chromatographiques (Colonnes RP 18 de 15 et 25 cm de longueur), pour lesquelles nous avons essayé plusieurs types de phases mobiles, à savoir un mélange Eau /Acétonitrile, Eau /Méthanol, Tampon phosphate de sodium monobasique / Acétonitrile puis on a remplacé ce dernier par le méthanol, et ce en essayant différentes proportions de phases organique et aqueuse.

Etant donné que le pH est un facteur essentiel, nous avons opéré le dosage en faisant varier le pH du tampon. A cette fin, un pH de 3 a donné des temps de rétention très faibles pour les deux PA, la valeur optimale était de 5,43 et c'est cette valeur qui a été choisie par la suite.

Pour atteindre l'objectif qu'on s'est fixé, et après plusieurs essais, nous avons enfin opté pour l'utilisation d'une colonne RP 18 de 15 cm et d'une PM constituée de 25% de méthanol et 75% de tampon phosphate monosodique à pH 5.43. Pour le choix du débit nous avons essayé trois débits de 0.8, 1 et 1.2 ml/min et on a opté pour celui de 1 ml/min qui a donné de meilleurs résultats avec un volume d'injection de 20 microlitres.

D'autre part la variation du facteur température a conclu à la non existence d'une différence de résultats entre les niveaux testés. De ce fait, et afin de simplifier la méthode, on a choisi de travailler à la température ambiante.



Cette optimisation a apporté une nette satisfaction pour les résultats obtenus, et nous a permis de commencer la validation de notre méthode.

## 2.2 Choix du protocole de validation

Suivant le logigramme de la figure (14) représentant la démarche à suivre, proposée dans le guide SFSTP pour le choix d'un protocole adéquat, dépendant des contraintes ou des spécificités liées à la méthode de dosage en question, et le tableau (XVII), et sachant que notre étude porte sur un dosage dans une spécialité pharmaceutique ; milieu caractérisé par l'absence d'effet matrice, on a opté pour le protocole V2 ; en utilisant 5 niveaux de concentration au lieu de trois pour les standards d'étalonnage sans matrice (SE) et les standards de validation (SV).

Le nombre d'essais obtenus est égale à :

- Standards d'étalonnage : 3(séries) x 2(répétitions) x 5(niveaux) = 30 essais.
- Standards de validation : 3(séries) x 3(répétitions) x 5(niveaux) = 45 essais.

## 2.3 Choix des paramètres de validation

### 2.3.1 Niveaux de concentration

Dans le présent travail, nous avons constitué une gamme de cinq niveaux de concentration, pour les deux principes actifs « paracétamol et caféine », régulièrement espacés et positionnés autour de la valeur théorique de 100% ; on a considéré l'intervalle allant de 80% à 120% en passant par trois niveaux intermédiaires.

### 2.3.2 Limites d'acceptabilité ( $\lambda$ )

L'objectif d'une procédure analytique est que la différence entre le résultat donné par cette dernière et la vraie valeur de l'échantillon soit inférieure à une limite d'acceptation ( $\lambda$ ).

La limite d'acceptabilité d'une méthode est une valeur seuil globale exprimée sous forme de pourcentage. Elle varie selon les exigences de l'analyste ou la finalité de la procédure analytique.

Selon les exigences de la commission SFSTP parue en 2003 dans les guides STP Pharma Pratiques, cette limite est fixée à 5% pour le dosage d'une substance active dans un produit fini.

Dans notre étude :  $\lambda = \pm 5\%$  ; signifiant que pour une teneur de 500 mg de paracétamol et 65 mg de caféine, le résultat sera compris au maximum entre 475 et 525 mg et entre 61,75 et 68,25 mg respectivement.



### 2.3.3 Probabilité de confiance ( $\beta$ ) et risque d'erreur accepté ( $\alpha$ )

Notre objectif est que la proportion des futures mesures comprises dans les limites d'acceptation fixées a priori soit de 95% ( $\beta = 95\%$ ), avec un risque  $\alpha$  de 5%.

### 2.3.4 Conditions expérimentales

#### 2.3.4.1 Choix de la dilution

On a utilisé cinq solutions stocks renfermant 50 mg de paracétamol et 6,5 mg de caféine dans une fiole de 100 ml, correspondant à une dilution au  $1/10^{\text{ème}}$  par rapport à la teneur du comprimé qui contient 500 mg de paracétamol et 65 mg de caféine dissouts dans 100 ml de solution. On a utilisé ces solutions stocks pour la préparation de tous les niveaux de concentration des standards d'étalonnage et de validation, par exemple pour le niveau 100% nous avons dilué la solution stock au  $1/10^{\text{ème}}$ , on a donc utilisé dans notre méthode une dilution au  $1/100^{\text{ème}}$  par rapport à la teneur d'un comprimé, celle-ci a été sélectionnée pour avoir une meilleure lecture des résultats.

#### 2.3.4.2 Choix du diluant

Le tampon phosphate a été sélectionné pour des raisons de solubilisation ; les deux principes actifs paracétamol et caféine présentent une solubilisation meilleure avec ce tampon, de plus c'est un diluant très adapté à la phase mobile dans laquelle il représente 75 %, ajouté à 25 % de méthanol.

### 2.3.4.3 Préparation des solutions

#### 2.3.4.3.1 Préparation du diluant

- Pour 2 litres de diluant, on a effectué une pesée de 2,4 g de la poudre du tampon phosphate monobasique ( $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ ) sur un verre de montre, qu'on a versée par la suite dans une fiole jaugée de 2L ;
- On a ajouté un volume suffisant d'eau distillée, puis on a porté la solution formée au sonicateur afin de dissoudre complètement la poudre du tampon ;
- On a ajusté au trait de jauge avec de l'eau distillée.

#### 2.3.4.3.2 Préparation des solutions mères

- Dans des fioles jaugées de 100 ml, on a pesé simultanément 50 mg de paracétamol et 6,5 mg de caféine ;
- On les a mises au sonicateur pour avoir une dissolution complète après l'ajout d'un volume suffisant de diluant ;



- On a ajusté au trait de jauge avec le même diluant et on a mélangé par retournement.

#### 2.3.4.3.3 Préparation des standards d'étalonnage

- On a prélevé différents volumes à partir de chacune des solutions mères, à l'aide d'une pipette graduée de 5 ml, dans des fioles ayant des volumes de 25 ml et de 50ml (comme illustré dans le tableau qui suit) ;
- On les a complétées au trait de jauge avec le diluant afin d'obtenir nos standards d'étalonnage.

**Tableau XVIII :** Les volumes à prélever et les fioles à utiliser pour chaque niveau de concentration.

Le niveau de concentration	Le volume prélevé	La fiole utilisée
80%	2 ml	25 ml
90%	4,5 ml	50 ml
100%	5 ml	50 ml
110%	5,5 ml	50 ml
120%	3 ml	25 ml

#### 2.3.4.3.4 Préparation des standards de validation

- A l'aide d'une pipette graduée de 5 ml, on a prélevé différents volumes à partir de chacune des solutions mères, dans des fioles ayant 25 ml et 50 ml comme volume ;
- On a ajouté un certain volume de la solution placebo déjà préparée et filtrée ;
- On a complété jusqu'au trait de jauge avec le diluant pour avoir nos solutions filles représentant les standards de validation.

Le tableau suivant détaille les volumes prélevés des solutions mères et de la solution placebo pour chaque niveau de concentration ainsi que les fioles utilisées.

**Tableau XIX :** Volumes prélevés et fioles utilisées pour les standards de validation.

Le niveau de concentration	Le volume prélevé de la solution mère	Le volume prélevé de la solution placebo	La fiole utilisée
80%	2 ml	2 ml	25 ml
90%	4,5 ml	4,5 ml	50 ml
100%	5 ml	5 ml	50 ml
110%	5,5 ml	5,5 ml	50 ml
120%	3 ml	3 ml	25 ml

#### 2.3.4.3.5 Préparation de la solution placebo

- Dans une fiole de 100 ml on a pesé 12,7 mg de placebo (amidon de maïs et povidone) ;



- On l'a mise au sonicateur pour avoir une dissolution complète, après avoir ajouté un volume suffisant de diluant ;
- On a ajusté au trait de jauge avec le même diluant puis filtré à l'aide d'un papier filtre.

#### 2.3.4.3.6 Préparation de la phase mobile

- Dans une fiole jaugée de 1L on a pesé 2,4 g de  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  ;
- On a ajouté 250 ml d'eau distillée à l'aide d'une fiole jaugée de 250 ml ;
- On l'a mise au sonicateur ;
- On a ajouté 500 ml d'eau distillée en utilisant une fiole jaugée de 500 ml ;
- On a rempli, jusqu'au trait de jauge, une autre fiole jaugée de 250 ml bien sèche avec du méthanol, qu'on a ensuite transvasé dans la fiole de 1L dans laquelle se trouve le tampon ;

La phase mobile ainsi obtenue est mélangée par retournement, dégazée et filtrée avant utilisation.

#### 2.3.4.4 Conditions chromatographiques

Les conditions chromatographiques appliquées dans ce présent travail sont résumées dans le tableau suivant :

**Tableau XX :** Conditions chromatographiques de la méthode de dosage.

Colonne	Longueur	15 cm
	Diamètre	4,6 mm
	Taille des particules	5 $\mu\text{m}$
	Phase stationnaire	Gel de silice octadecylesilyle (C18)
Phase mobile	Mélange de : <ul style="list-style-type: none"><li>• 75% de tampon phosphate monobasique <math>\text{NaH}_2\text{PO}_4</math> ajusté avec de l'eau distillée ;</li><li>• 25% de méthanol.</li></ul>	
Volume d'injection	20 $\mu\text{l}$	
Débit	1 ml/min	
Temps d'analyse	10 min	
Température	Ambiante	
Détection	Spectrophotomètre UV-visible : longueur d'onde $\lambda=220$ nm	



#### **2.3.4.5 Préparation de la feuille de calcul**

La feuille de calcul est préparée en utilisant le logiciel Excel de Microsoft office 2019.

Les équations rentrant dans l'étude statistique de la validation et la construction du profil d'exactitude sont introduites dans un tableur, ainsi il suffit juste d'introduire les données brutes en termes de prises d'essais et de leurs réponses instrumentales, pour avoir les résultats complets en tableaux et en graphes en fonction du model d'étalonnage choisi.

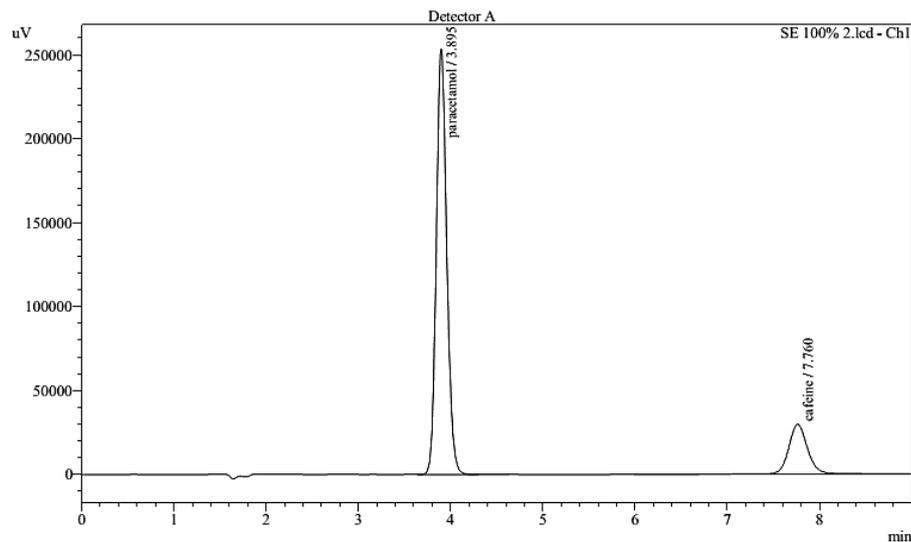


## CHAPITRE II : RÉSULTATS ET DISCUSSION

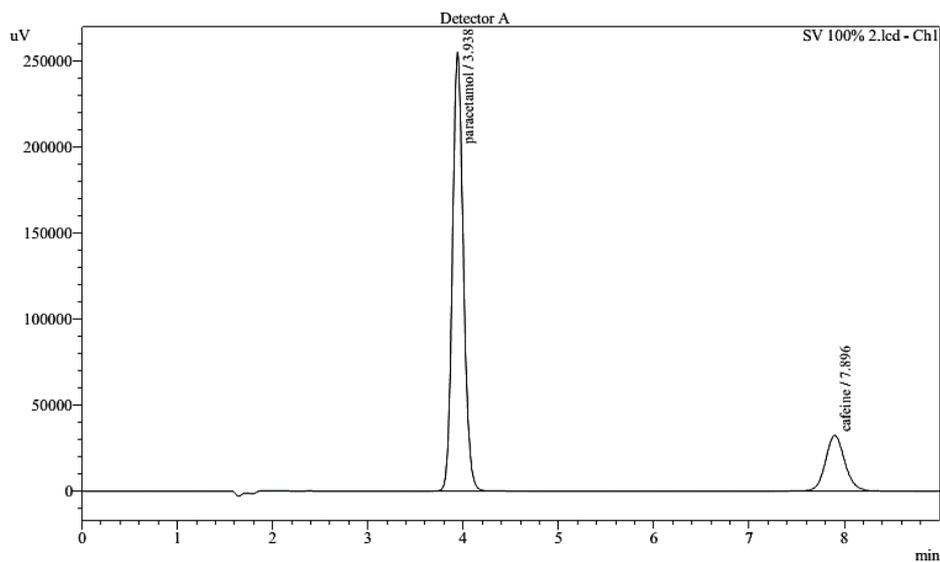
### 1 RÉSULTATS

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

#### 1.1 Chromatogrammes obtenus du dosage simultané des deux principes actifs



**Figure 15 :** Chromatogramme du standard d'étalonnage des deux principes actifs, niveau 100%.



**Figure 16 :** Chromatogramme du standard de validation des deux principes actifs, niveau 100%.



## 1.2 Temps de rétention obtenus

Le temps de rétention moyen du paracétamol = 3,897 min.

Le temps de rétention moyen de la caféine = 7,672 min.

## 1.3 Calcul de la résolution

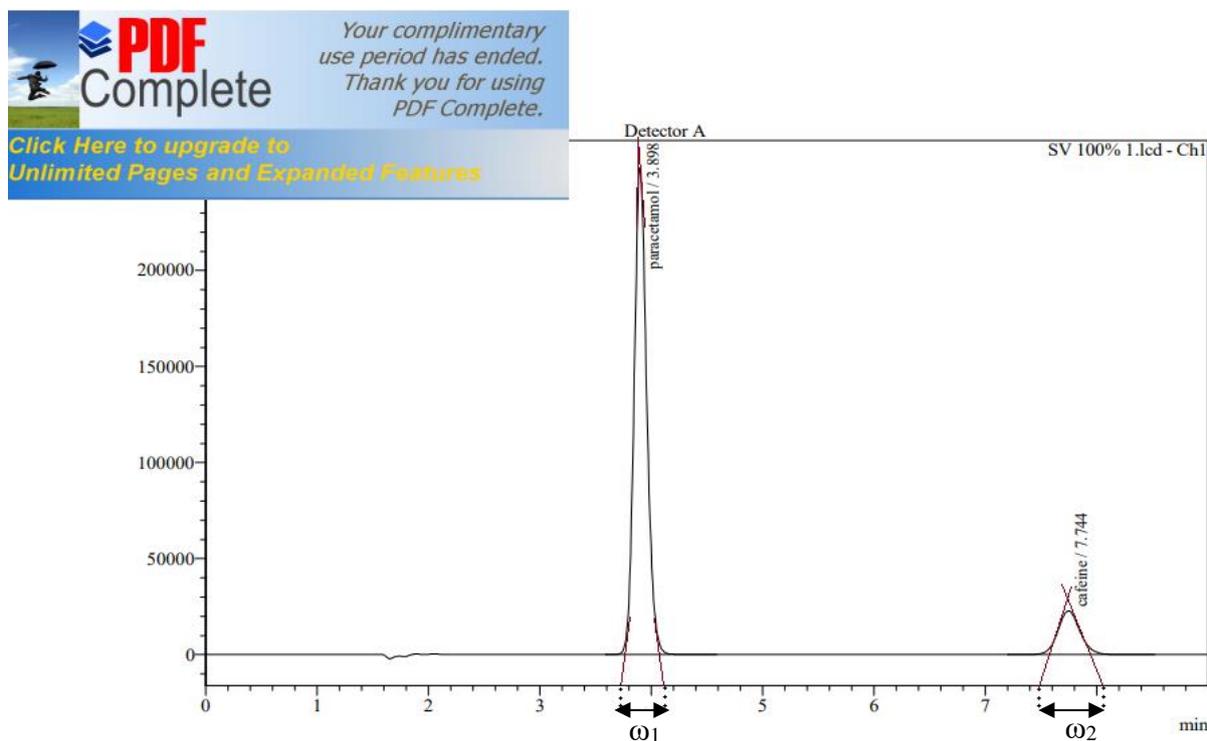
$$R_S = 2 \frac{t_{r2} - t_{r1}}{\omega_1 + \omega_2}$$

Avec :

$t_{r1}$  et  $t_{r2}$  : temps de rétention du paracétamol et de la caféine respectivement ;

$\omega_1$  et  $\omega_2$  : largeurs des pics à la base du paracétamol et de la caféine respectivement, déterminées, comme l'illustre la figure (17) ci-dessous, par l'intersection des tangentes aux points d'inflexion des pics avec la ligne de base.

Ces paramètres on les a déterminés à partir du chromatogramme du standard de validation du niveau 100%.



**Figure 17** : Détermination des largeurs des pics à la base et des temps de rétention à partir du chromatogramme du standard de validation (niveau 100%).



Les résultats obtenus sont résumés dans le tableau suivant :

**Tableau XXI** : Temps de rétention et largeurs des pics à la base des deux PA.

Principes actifs	Paracétamol	Caféine
Temps de rétention	3,898 min	7,744 min
Largeur du pic à la base	0,4 min	0,6 min

$$R_S = 2 \frac{7,744 - 3,898}{0,4 + 0,6} = 7,692$$

#### 1.4 Informations concernant les données brutes

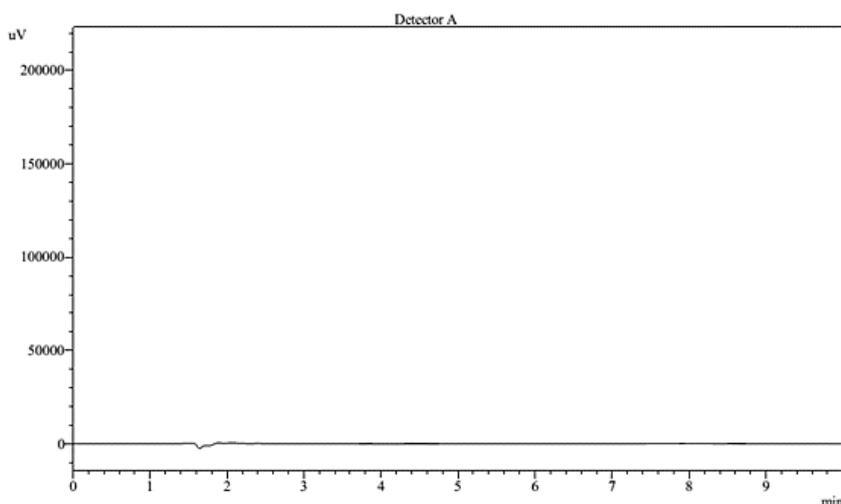
Les concentrations présentées sont les concentrations finales injectées, le niveau 100% correspond à la dissolution d'une quantité équivalente à la teneur théorique du comprimé (500 mg pour le paracétamol et 65 mg pour la caféine) dans un litre de diluant suivie d'une dilution au 1/10<sup>ème</sup>, ou alors dans 100 ml de diluant suivie d'une dilution au 1/100<sup>ème</sup>.

#### 1.5 Spécificité et effet matrice

##### 1.5.1 Comparaison des chromatogrammes

L'évaluation de la spécificité est faite par la comparaison du chromatogramme d'un SE et un SV d'un même niveau de concentration (niveau 100%) ainsi que celui des solutions placebo et diluant non chargées de PA.

Elle est illustrée dans les figures suivantes :



**Figure 18** : Chromatogramme du diluant non chargé de principe actif.

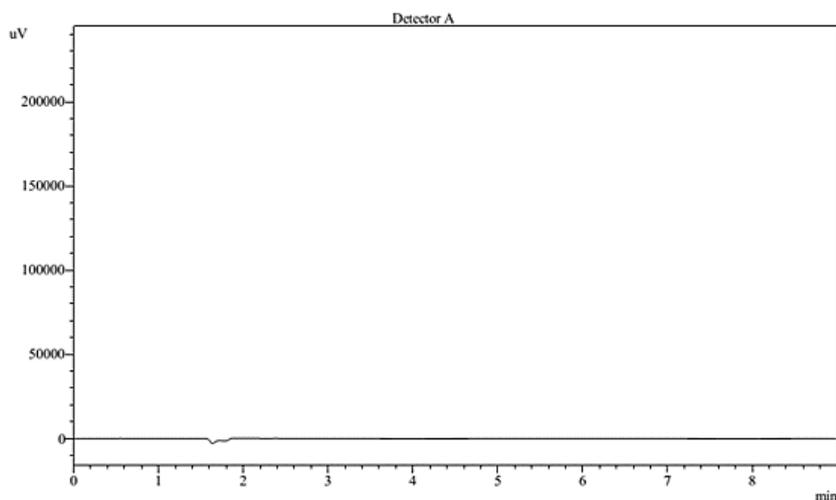


Figure 19 : Chromatogramme du diluant avec placebo non chargé de principe actif.

✓ Pour le paracétamol

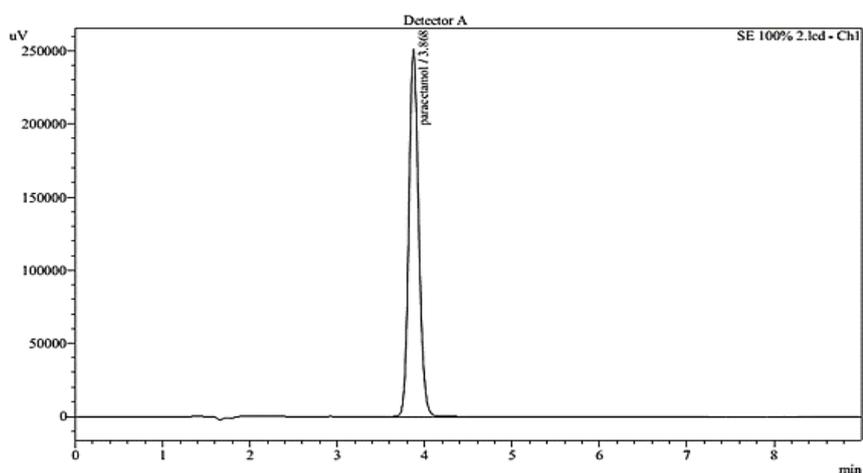


Figure 20 : Chromatogramme du standard d'étalonnage du paracétamol, niveau 100%.

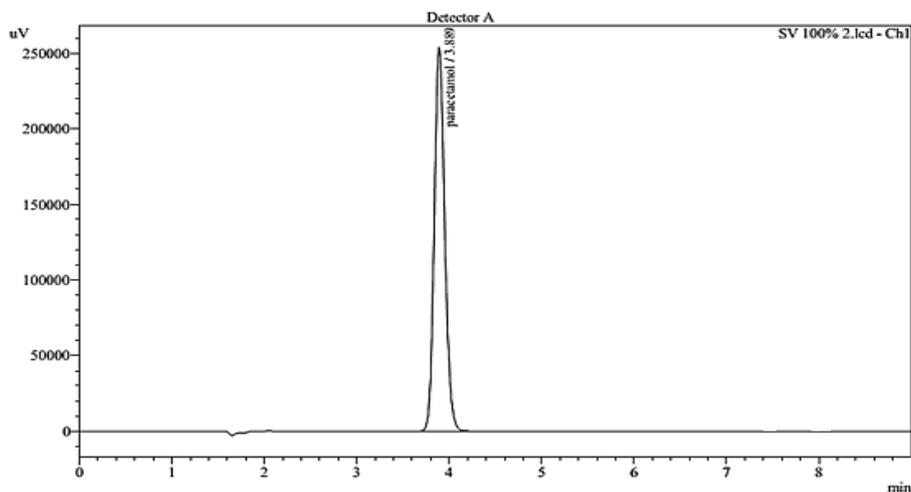
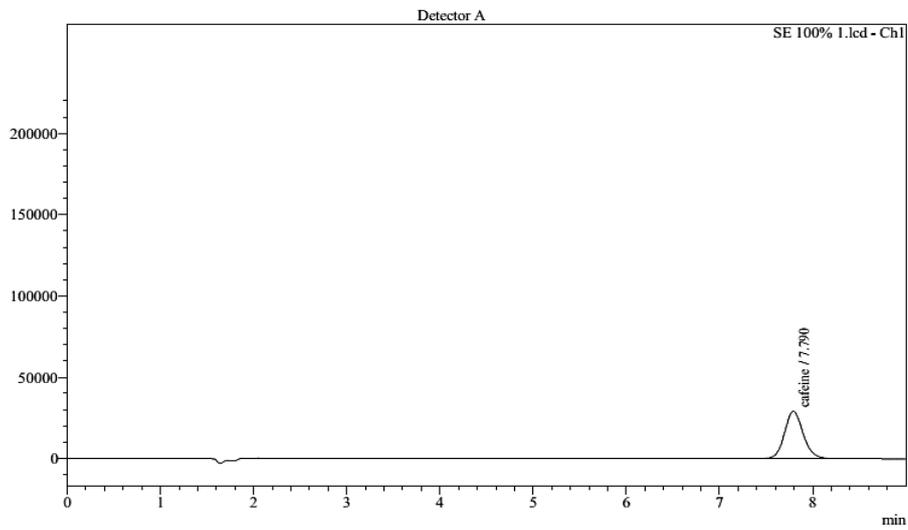


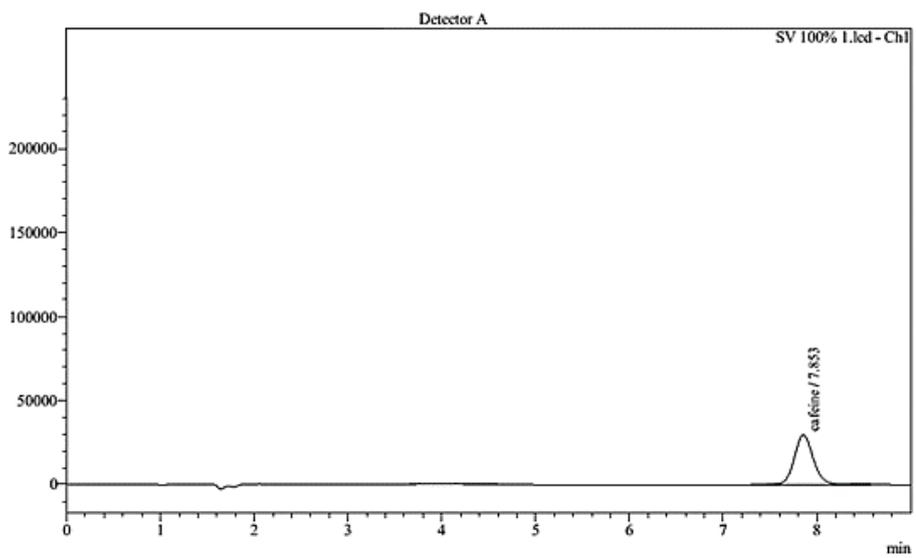
Figure 21 : Chromatogramme du standard de validation du paracétamol, niveau 100%.



✓ Pour la caféine



**Figure 22 :** Chromatogramme du standard d'étalonnage de la caféine, niveau 100%.



**Figure 23 :** Chromatogramme du standard de validation de la caféine, niveau 100%.



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

**Tableau XXII** : Résultats de la superposition des chromatogrammes.

Solutions	Temps de rétention		Superposition
Diluant non chargé	Absence		
Diluant avec placebo non chargé			
Standard d'étalonnage	Paracétamol	3,868 min	Concluante
	Caféine	7,790 min	
Standard de validation	Paracétamol	3,889 min	
	Caféine	7,853 min	

### 1.5.2 Confirmation de la spécificité sur les deux gammes d'étalonnage et de validation

L'étude statistique de la spécificité et d'effet matrice est réalisée sur les standards d'étalonnage avec le principe actif seul (PA) et les standards de validation avec la forme reconstituée par les excipients (FR), les résultats sont résumés dans les tableaux suivants :



## ➤ Paracétamol

**Tableau XXIII** : Résultats obtenus de l'étude de la spécificité et de l'effet matrice : standards d'étalonnage (PA seul) du Paracétamol.

Niveaux	1 <sup>ère</sup> répétition de chaque série	Concentrations des standards d'étalonnage (Xi) (mg /l)	Réponses instrumentales (Yi) (Air de pic)	Réponses calculées (Y*i)	(Yi-Y*i) <sup>2</sup>	(Xi-X') <sup>2</sup>
80%	1	40,048	1554191	1578488,42	590364432,6	99,23
	2	39,976	1614042	1575593,59	1478280229	100,67
	3	39,992	1547367	1576236,88	833470244,6	100,35
90%	1	45,054	1779268	1779759,24	241320,9565	24,56
	2	44,973	1810693	1776502,56	1168985853	25,37
	3	45,000	1772677	1777588,12	24119145,76	25,09
100%	1	50,060	1974627	1981030,07	40999336,36	0,00
	2	49,970	1995181	1977411,54	315753717,6	0,00
	3	50,000	1949761	1978617,72	832710133,6	0,00
110%	1	55,066	2174401	2182300,90	62408428,51	25,57
	2	54,967	2216120	2178320,51	1428801096	24,58
	3	55,000	2155513	2179647,31	582464915,1	24,91
120%	1	60,072	2357881	2383571,73	660013539,1	101,25
	2	59,964	2415069	2379229,49	1284470516	99,09
	3	60,000	2368184	2380676,90	156072613,5	99,81
<b>Pente</b>			<b>40205,919</b>			
<b>Ordonnée à l'origine</b>			<b>-31678,209</b>			
<b>Erreur pente</b>			<b>984,656</b>			
<b>Erreur ordonnée à l'origine</b>			<b>49732,225</b>			

**Tableau XXIV** : Résultats obtenus de l'étude de la spécificité et de l'effet matrice : standards de validation (FR) du Paracétamol.

Niveaux	1 <sup>ère</sup> répétition de chaque série	Concentrations des standards d'étalonnage (Xi) (mg /l)	Réponses instrumentales (Yi) (Air de pic)	Réponses calculées (Y*i)	$(Y_i - Y^*_i)^2$	$(X_i - X')^2$
<b>80%</b>	1	40,013	1591083	1601501	1,1E+08	99,41
	2	39,96	1628936	1599342	8,8E+08	100,47
	3	39,992	1585399	1600637	2,3E+08	99,83
<b>90%</b>	1	45,009	1804838	1803714	1262775	24,75
	2	44,955	1825766	1801528	5,9E+08	25,29
	3	44,991	1778714	1802986	5,9E+08	24,93
<b>100%</b>	1	50,01	1996698	2006144	8,9E+07	0
	2	49,95	2028215	2003715	6E+08	0
	3	49,99	1975345	2005334	9E+08	0
<b>110%</b>	1	55,011	2214087	2208573	3E+07	25,27
	2	54,945	2233359	2205902	7,5E+08	24,61
	3	54,989	2184383	2207683	5,4E+08	25,05
<b>120%</b>	1	60,012	2404569	2411003	4,1E+07	100,57
	2	59,94	2438291	2408089	9,1E+08	99,13
	3	59,988	2386499	2410031	5,5E+08	100,09
<b>Pente</b>			<b>40477,814</b>			
<b>Ordonnée à l'origine</b>			<b>-18151,672</b>			
<b>Erreur pente</b>			<b>836,548</b>			
<b>Erreur ordonnée à l'origine</b>			<b>42229,755</b>			



**Tableau XXV :** Comparaison des deux pentes et des deux ordonnées à l'origine du PA seul et de la FR du Paracétamol.

<b>Comparaison des deux pentes des deux droites de régression</b>	<b>t calculé</b>	<b>0,21</b>	<b>Différence non significative</b>
	<b>t°(α ; 26)</b>	<b>2,06</b>	
	<b>Condition</b>	<b>t calculé &lt; t°(α ; 26)</b>	
<b>Comparaison des ordonnées à l'origine des deux droites de régression</b>	<b>t calculé</b>	<b>0,21</b>	<b>Différence non significative</b>
	<b>t°(α ; 26)</b>	<b>2,06</b>	
	<b>Condition</b>	<b>t calculé &lt; t°(α ; 26)</b>	

➤ **Caféine**

**Tableau XXVI :** Résultats obtenus de l'étude de la spécificité et de l'effet matrice : standards d'étalonnage (PA seul) de la Caféine.

<b>Niveaux</b>	<b>1<sup>ère</sup> répétition de chaque série</b>	<b>Concentrations des standards d'étalonnage (Xi) (mg /l)</b>	<b>Réponses instrumentales (Yi) (Air de pic)</b>	<b>Réponses calculées (Y*i)</b>	<b>(Yi-Y*i)<sup>2</sup></b>	<b>(Xi-X')<sup>2</sup></b>
<b>80%</b>	<b>1</b>	5,200	321663	3,32E+05	1,05E+08	1,67E+00
	<b>2</b>	5,176	331443	3,30E+05	1,04E+06	1,73E+00
	<b>3</b>	5,200	330891	3,32E+05	1,05E+06	1,67E+00
<b>90%</b>	<b>1</b>	5,850	369345	3,72E+05	9,16E+06	4,13E-01
	<b>2</b>	5,823	370378	3,71E+05	9,77E+04	4,49E-01
	<b>3</b>	5,859	399781	3,73E+05	7,21E+08	4,02E-01
<b>100%</b>	<b>1</b>	6,500	406635	4,13E+05	3,83E+07	5,18E-05
	<b>2</b>	6,470	408376	4,11E+05	6,68E+06	5,20E-04
	<b>3</b>	6,510	407684	4,13E+05	3,32E+07	2,96E-04
<b>110%</b>	<b>1</b>	7,150	450786	4,53E+05	6,24E+06	4,32E-01
	<b>2</b>	7,117	453995	4,51E+05	7,65E+06	3,90E-01
	<b>3</b>	7,161	453334	4,54E+05	4,03E+05	4,46E-01
<b>120%</b>	<b>1</b>	7,800	490037	4,94E+05	1,37E+07	1,71E+00
	<b>2</b>	7,764	495008	4,91E+05	1,23E+07	1,62E+00
	<b>3</b>	7,812	496334	4,94E+05	3,41E+06	1,74E+00
<b>Pente</b>			<b>62240,523</b>			
<b>Ordonnée à l'origine</b>			<b>8264,063</b>			
<b>Erreur pente</b>			<b>2413,004</b>			
<b>Erreur ordonnée à l'origine</b>			<b>15823,382</b>			



**Tableau XXVII** : Résultats obtenus de l'étude de la spécificité et de l'effet matrice : standards de validation (FR) de la Caféine.

Niveaux	1 <sup>ère</sup> répétition de chaque série	Concentrations des standards d'étalonnage (Xi) (mg /l)	Réponses instrumentales (Yi) (Air de pic)	Réponses calculées (Y*i)	(Yi-Y*i) <sup>2</sup>	(Xi-X') <sup>2</sup>
80%	1	5,216	3,36E+05	3,29E+05	3,95E+07	1,66E+00
	2	5,168	3,31E+05	3,26E+05	1,91E+07	1,79E+00
	3	5,208	3,14E+05	3,29E+05	2,20E+08	1,68E+00
90%	1	5,895	3,79E+05	3,71E+05	7,78E+07	3,72E-01
	2	5,814	3,74E+05	3,66E+05	7,68E+07	4,78E-01
	3	5,859	3,52E+05	3,68E+05	2,61E+08	4,17E-01
100%	1	6,550	4,19E+05	4,10E+05	6,77E+07	2,02E-03
	2	6,460	4,16E+05	4,05E+05	1,20E+08	2,03E-03
	3	6,510	3,92E+05	4,08E+05	2,71E+08	2,43E-05
110%	1	7,205	4,53E+05	4,50E+05	5,96E+06	4,90E-01
	2	7,106	4,59E+05	4,44E+05	2,20E+08	3,61E-01
	3	7,161	4,33E+05	4,48E+05	2,02E+08	4,30E-01
120%	1	7,860	4,83E+05	4,90E+05	4,60E+07	1,84E+00
	2	7,752	5,02E+05	4,83E+05	3,39E+08	1,55E+00
	3	7,812	4,72E+05	4,87E+05	2,15E+08	1,71E+00
<b>Pente</b>			<b>60773,465</b>			
<b>Ordonnée à l'origine</b>			<b>12380,094</b>			
<b>Erreur pente</b>			<b>3622,460</b>			
<b>Erreur ordonnée à l'origine</b>			<b>23800,446</b>			

**Tableau XXVIII** : Comparaison des deux pentes et des deux ordonnées à l'origine du PA seul et de la FR de la Caféine.

Comparaison des deux pentes des deux droites de régression	t calculé	0,34	Différence non significative
	t°(α ; 26)	2,06	
	Condition	t calculé < t°(α ; 26)	
Comparaison des ordonnées à l'origine des deux droites de régression	t calculé	0,14	Différence non significative
	t°(α ; 26)	2,06	
	Condition	t calculé < t°(α ; 26)	



## 1.6 Fonction de réponse

Dans le but de choisir le modèle d'étalonnage le plus adéquat qui est capable de produire une proportion suffisante des futures mesures qui se situeront à l'intérieur des limites d'acceptabilité, nous avons étudié quatre modèles reliant les aires des pics aux concentrations introduites.

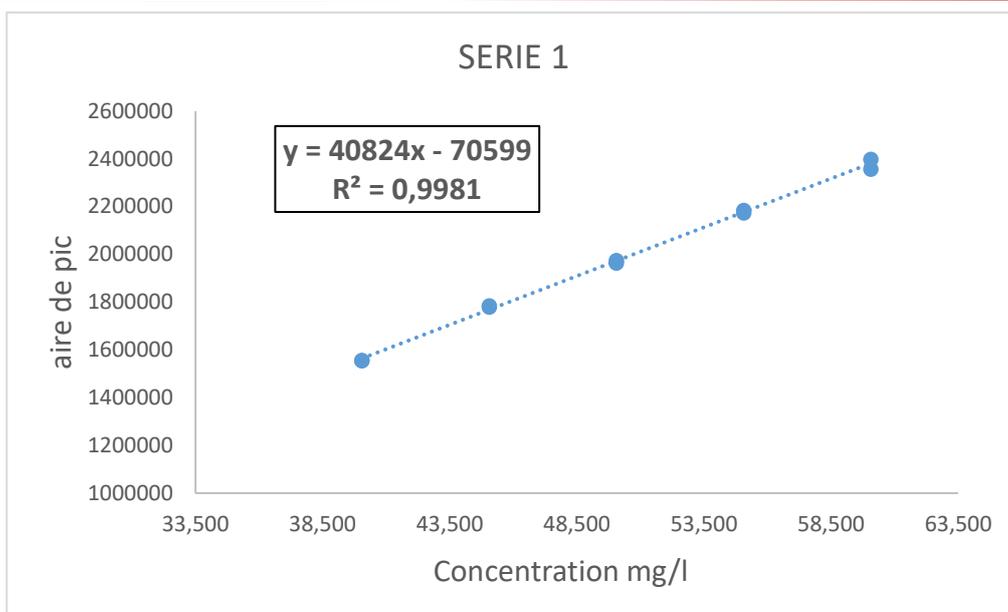
Les tableaux suivants regroupent les résultats des calculs statistiques pour tous les modèles suivis par leurs courbes d'étalonnage correspondantes à chaque série :

- **1<sup>er</sup> modèle : Droite :  $Y = bX + a$**

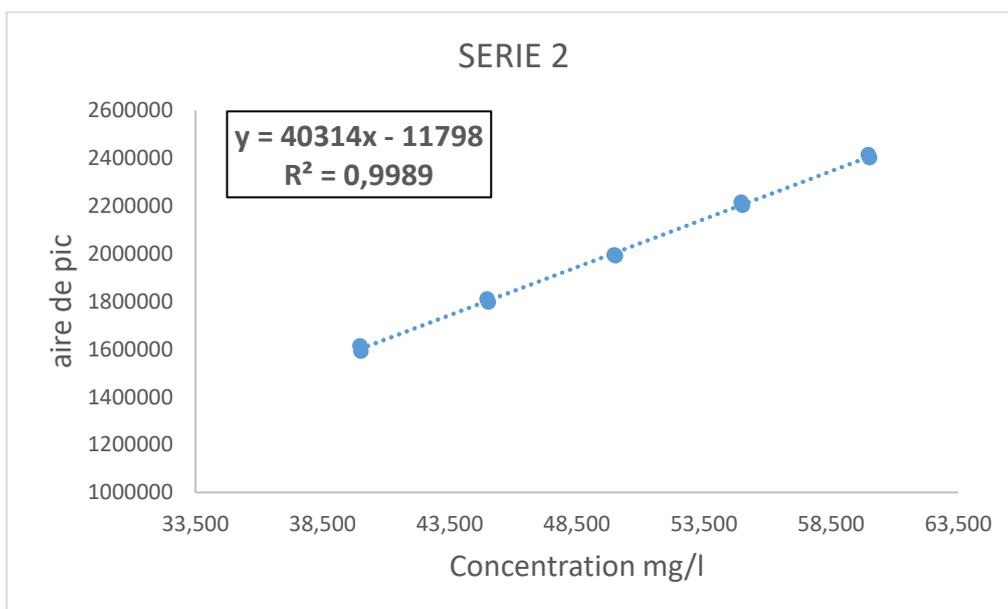
### ➤ Paracétamol

**Tableau XXIX :** Paramètres d'étalonnage obtenus pour le Paracétamol avec la fonction  $y = bx + a$  (PA seul).

Niveaux	Répétitions	Séries (Jours)									
		1		2		3					
		X <sub>i</sub> (mg/l)	Y <sub>i</sub>	X <sub>i</sub> (mg/l)	Y <sub>i</sub>	X <sub>i</sub> (mg/l)	Y <sub>i</sub>				
80%	1	40,048	1554191	39,976	1614042	40,000	1570055				
	2	40,048	1556301	40,016	1592132	39,992	1547367				
90%	1	45,054	1779268	44,973	1810693	45,000	1772677				
	2	45,054	1785310	45,018	1797584	44,991	1793071				
100%	1	50,060	1974627	49,970	1995181	50,000	1949761				
	2	50,060	1964619	50,020	1991892	49,990	1958321				
110%	1	55,066	2174401	54,967	2216120	55,000	2155513				
	2	55,066	2185384	55,022	2203037	54,989	2181638				
120%	1	60,072	2357881	59,964	2415069	60,000	2368184				
	2	60,072	2398672	60,024	2401358	59,988	2388646				
Pente		40824,30		Pente		40314,20		Pente		40505,60	
Ordonnée à l'origine		-70599,10		Ordonnée à l'origine		-11797,83		Ordonnée à l'origine		-56554,14	



**Figure 24 :** Courbe d'étalonnage du Paracétamol obtenue avec la fonction  $y = bx + a$  (série 1).



**Figure 25 :** Courbe d'étalonnage du Paracétamol obtenue avec la fonction  $y = bx + a$  (série 2).

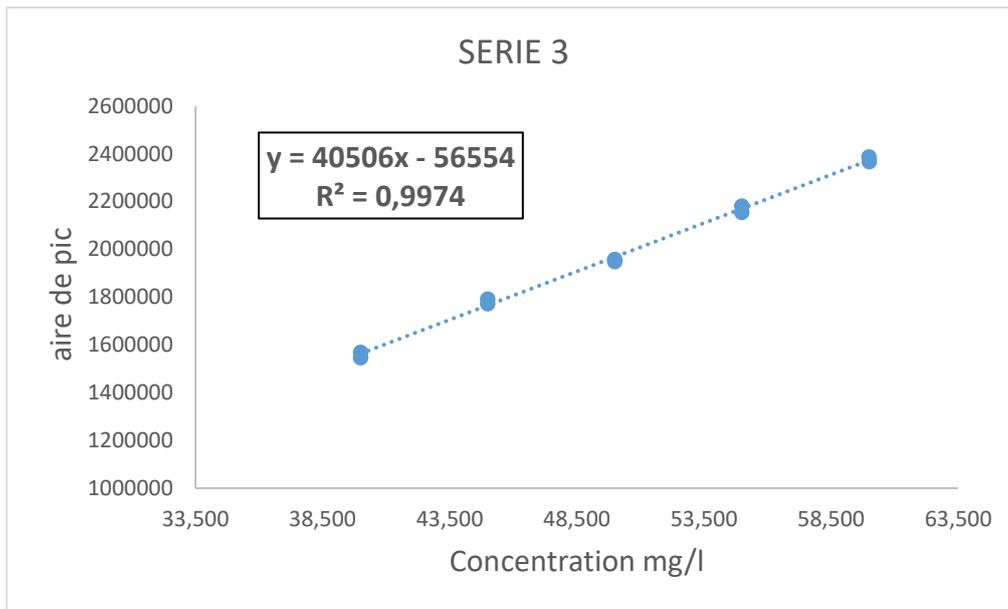
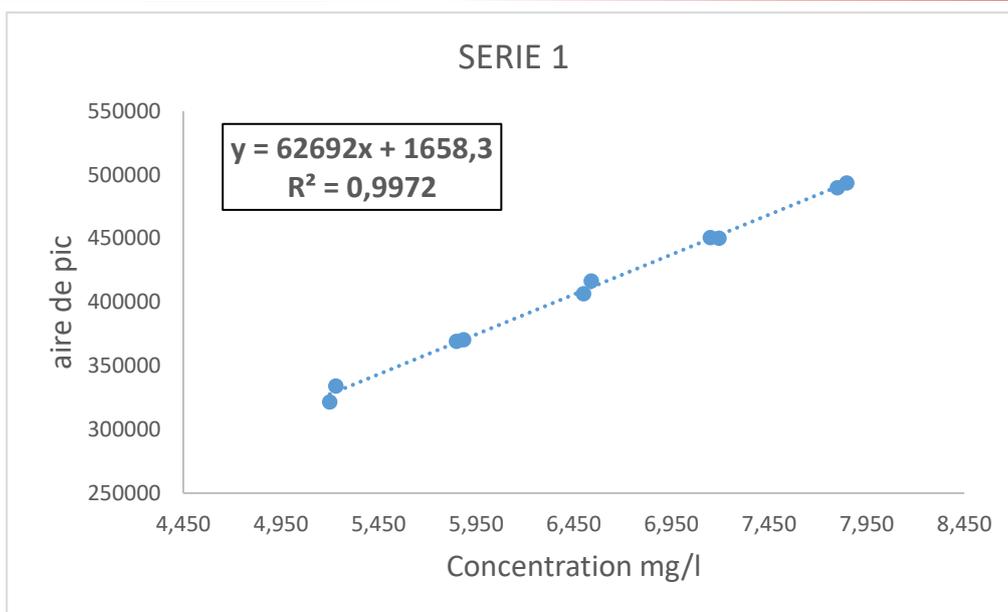


Figure 26 : Courbe d'étalonnage du Paracétamol obtenue avec la fonction  $y = bx + a$  (série 3).

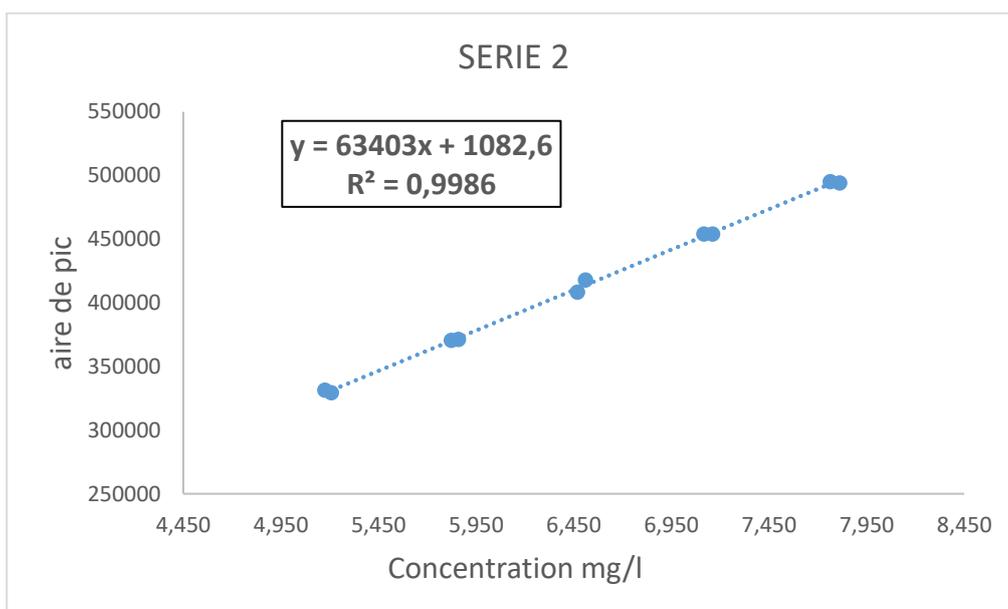
➤ **Caféine**

Tableau XXX : Paramètres d'étalonnage obtenus pour la Caféine avec la fonction  $y = bx + a$  (PA seul).

Niveaux	Répétitions	Séries (Jours)									
		1		2		3					
		$X_i$ (mg/l)	$Y_i$	$X_i$ (mg/l)	$Y_i$	$X_i$ (mg/l)	$Y_i$				
80%	1	5,200	321663	5,176	331443	5,208	330065				
	2	5,232	334234	5,208	329223	5,200	330891				
90%	1	5,850	369345	5,823	370378	5,859	399781				
	2	5,886	370564	5,859	371282	5,850	370071				
100%	1	6,500	406635	6,470	408376	6,510	407684				
	2	6,540	416635	6,510	417885	6,500	413456				
110%	1	7,150	450786	7,117	453995	7,161	453334				
	2	7,194	450434	7,161	454026	7,150	454223				
120%	1	7,800	490037	7,764	495008	7,812	496334				
	2	7,848	493765	7,812	494046	7,800	497554				
Pente		62691,94		Pente		63402,72		Pente		61774,18	
Ordonnée à l'origine		1658,3		Ordonnée à l'origine		1082,6		Ordonnée à l'origine		13498,3	



**Figure 27 :** Courbe d'étalonnage de la Caféine obtenue avec la fonction  $y = bx + a$  (série 1).



**Figure 28 :** Courbe d'étalonnage de la Caféine obtenue avec la fonction  $y = bx + a$  (série 2).

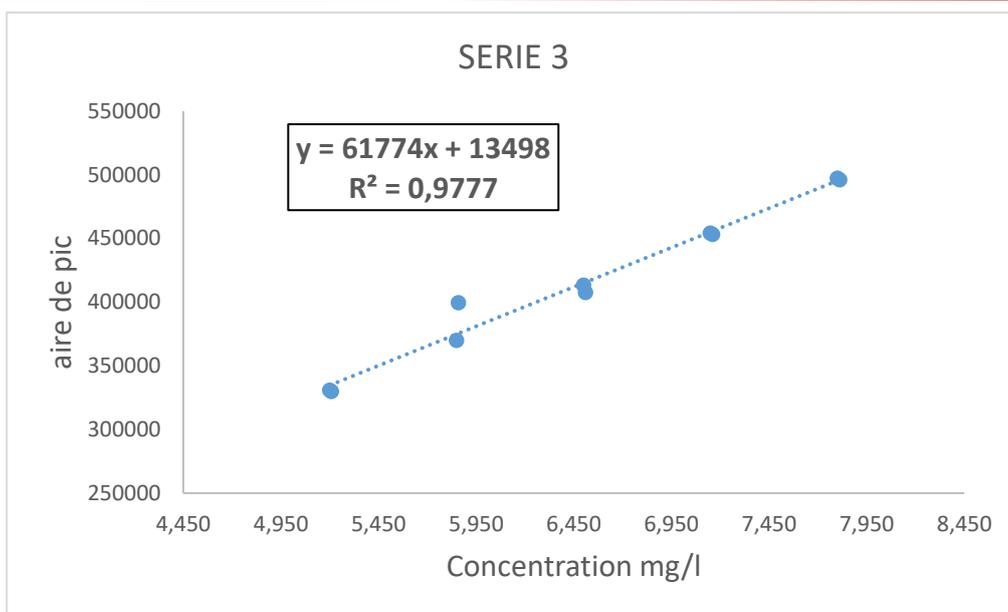


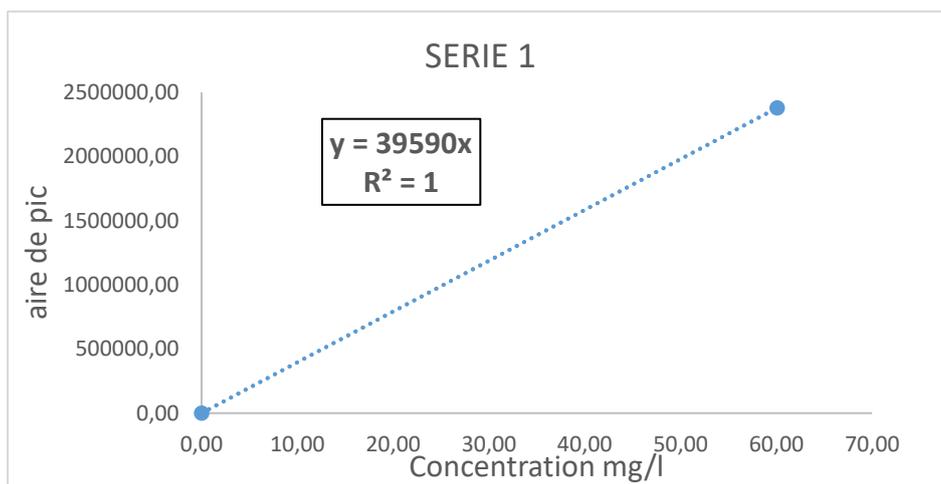
Figure 29 : Courbe d'étalonnage de la Caféine obtenue avec la fonction  $y = bx + a$  (série 3).

- 2<sup>ème</sup> modèle : Droite passant par 0 :  $y = bx$  (niveau 120%)

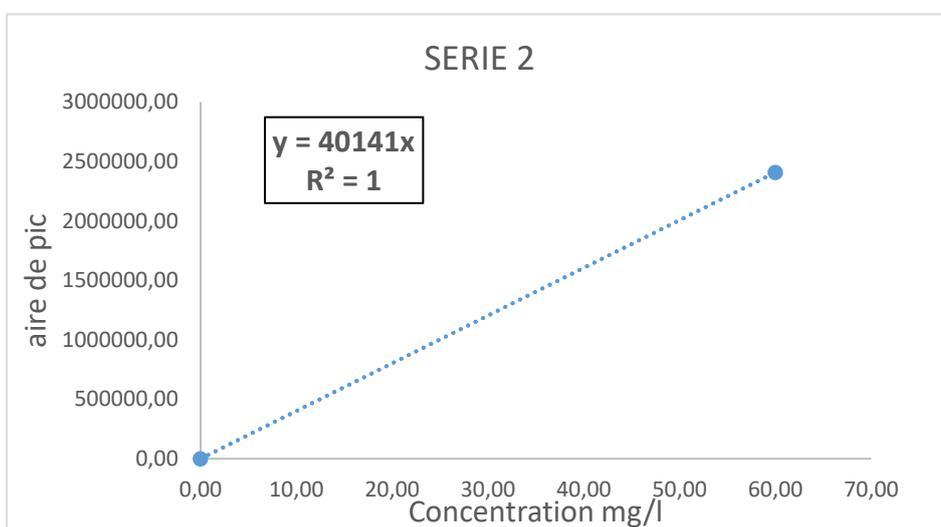
➤ Paracétamol

Tableau XXXI : Paramètres d'étalonnage obtenus pour le Paracétamol avec la fonction  $y = bx$  (PA seul).

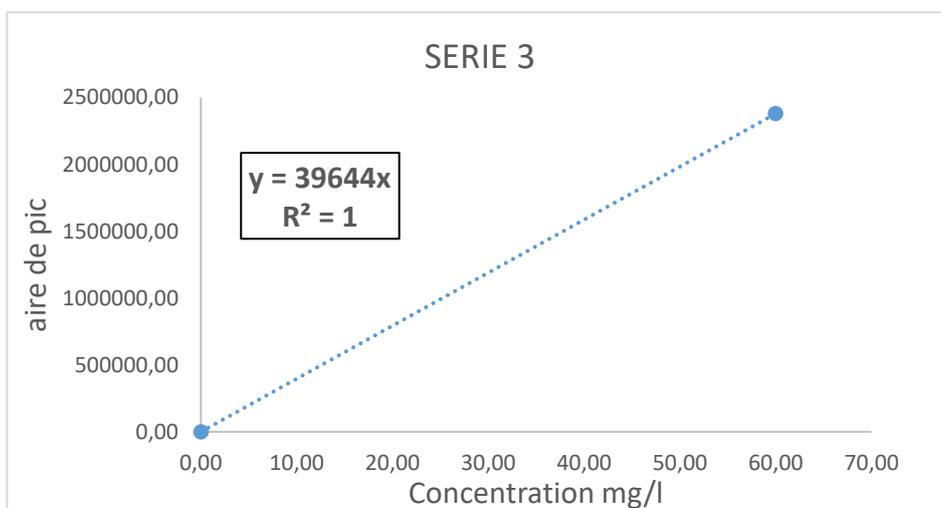
Niveaux	Répétitions	Séries (Jours)									
		1		2		3					
		X <sub>i</sub> (mg/l)	Y <sub>i</sub>	X <sub>i</sub> (mg/l)	Y <sub>i</sub>	X <sub>i</sub> (mg/l)	Y <sub>i</sub>				
120%	1	60,072	2357881,00	59,964	2415069	60,000	2368184				
	2	60,072	2398672,00	60,024	2401358	59,988	2388646				
Pente		39590,43		Pente		40140,91		Pente		39644,21	
Ordonnée à l'origine		0		Ordonnée à l'origine		0		Ordonnée à l'origine		0	



**Figure 30 :** Courbe d'étalonnage du Paracétamol obtenue avec la fonction  $y = bx$  (Série 1).



**Figure 31 :** Courbe d'étalonnage du Paracétamol obtenue avec la fonction  $y = bx$  (Série 2).



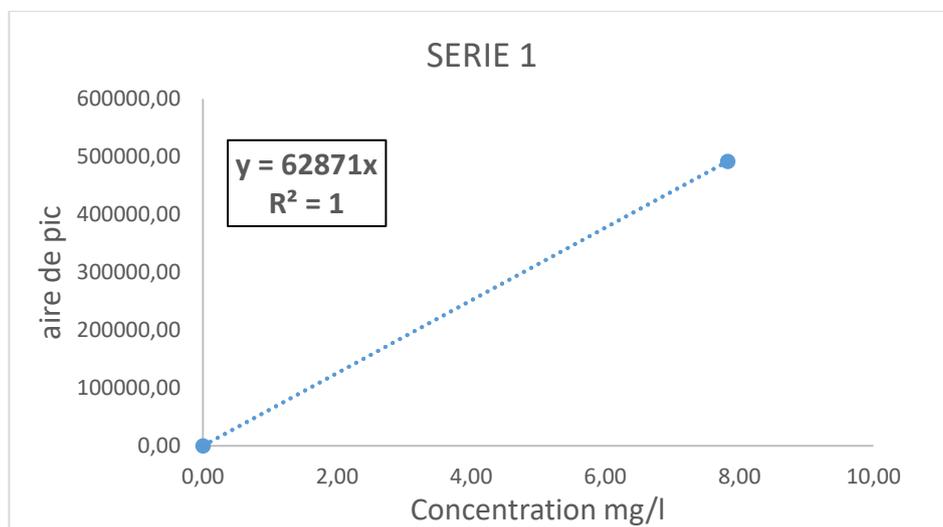
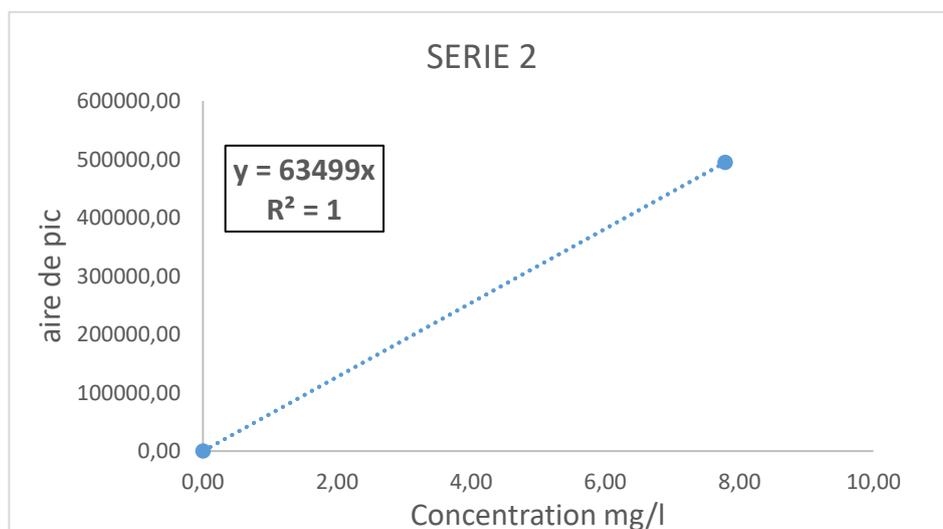
**Figure 32 :** Courbe d'étalonnage du Paracétamol obtenue avec la fonction  $y = bx$  (Série 3).



## ➤ Caféine

**Tableau XXXII** : Paramètres d'étalonnage obtenus pour la caféine avec la fonction  $y = bx$  (PA seul).

Niveaux	Répétitions	Séries (Jours)									
		1		2		3					
		$X_i$ (mg/l)	$Y_i$	$X_i$ (mg/l)	$Y_i$	$X_i$ (mg/l)	$Y_i$				
120%	1	7,800	490037,00	7,764	495008	7,812	496334				
	2	7,848	493765,00	7,812	494046	7,800	497554				
Pente		62870,78		Pente		63498,59		Pente		63661,80	
Ordonnée à l'origine		0		Ordonnée à l'origine		0		Ordonnée à l'origine		0	

**Figure 33** : Courbe d'étalonnage de la caféine obtenue avec la fonction  $y = bx$  (Série 1).**Figure 34** : Courbe d'étalonnage de la caféine obtenue avec la fonction  $y = bx$  (Série 2).

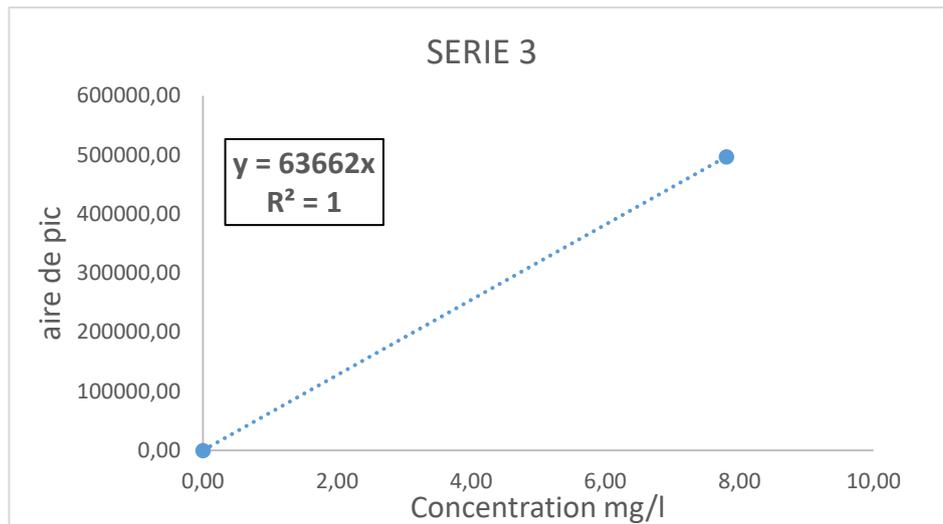


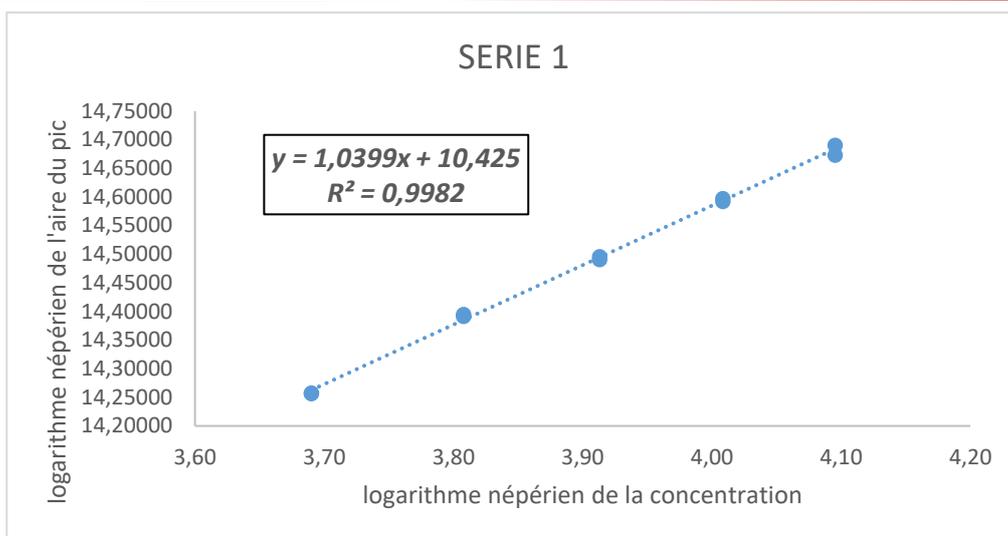
Figure 35 : Courbe d'étalonnage de la caféine obtenue avec la fonction  $y = bx$  (Série 3).

- 3<sup>ème</sup> modèle : Fonction Logarithmique :  $\ln y = f(\ln x)$

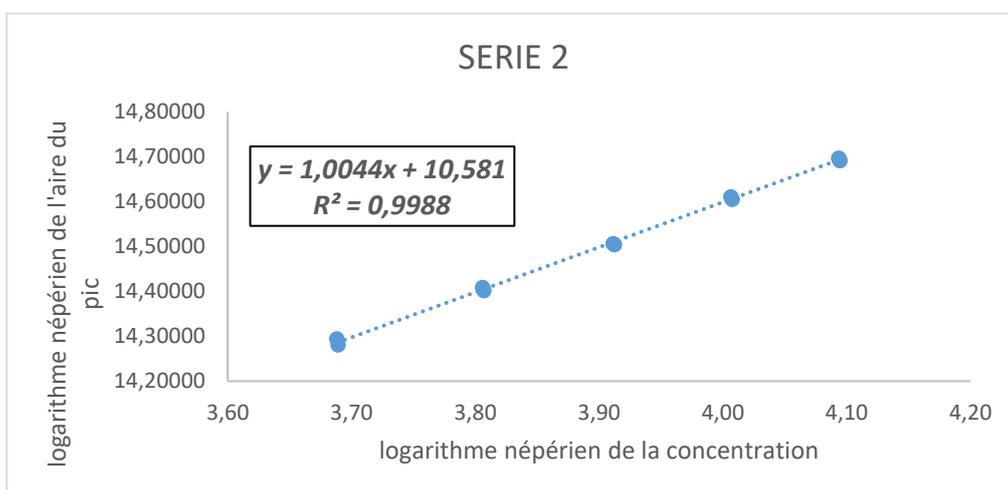
➤ Paracétamol

Tableau XXXIII : Paramètres d'étalonnage obtenus pour le Paracétamol avec la fonction  $\ln y = f(\ln x)$  (PA seul).

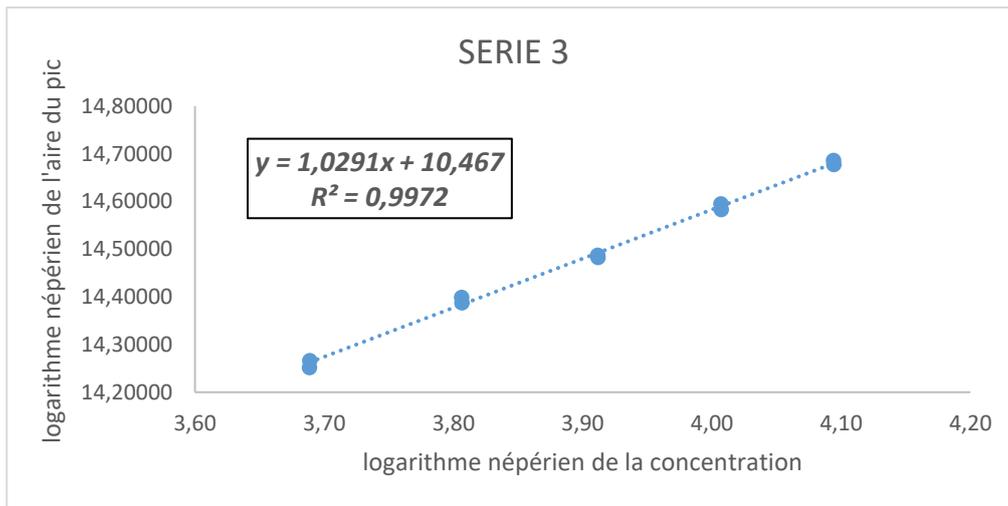
Niveaux	Répétitions	Séries (Jours)									
		1		2		3					
		$\ln X_i$	$\ln Y_i$	$\ln X_i$	$\ln Y_i$	$\ln X_i$	$\ln Y_i$				
80%	1	3,69	14,25647	3,69	14,29425	3,69	14,26662				
	2	3,69	14,25782	3,69	14,28058	3,69	14,25207				
90%	1	3,81	14,39171	3,81	14,40922	3,81	14,38800				
	2	3,81	14,39510	3,81	14,40195	3,81	14,39944				
100%	1	3,91	14,49589	3,91	14,50625	3,91	14,48322				
	2	3,91	14,49081	3,91	14,50460	3,91	14,48760				
110%	1	4,01	14,59226	4,01	14,61127	4,01	14,58354				
	2	4,01	14,59730	4,01	14,60535	4,01	14,59559				
120%	1	4,10	14,67327	4,09	14,69724	4,09	14,67763				
	2	4,10	14,69043	4,09	14,69154	4,09	14,68624				
Pente		1,0399		Pente		1,0044		Pente		1,0291	
Ordonnée à l'origine		10,4252		Ordonnée à l'origine		10,5814		Ordonnée à l'origine		10,4668	



**Figure 36 :** Courbe d'étalonnage du Paracétamol obtenue avec la fonction  $\ln y = f(\ln x)$  (Série 1).



**Figure 37 :** Courbe d'étalonnage du Paracétamol obtenue avec la fonction  $\ln y = f(\ln x)$  (Série 2).

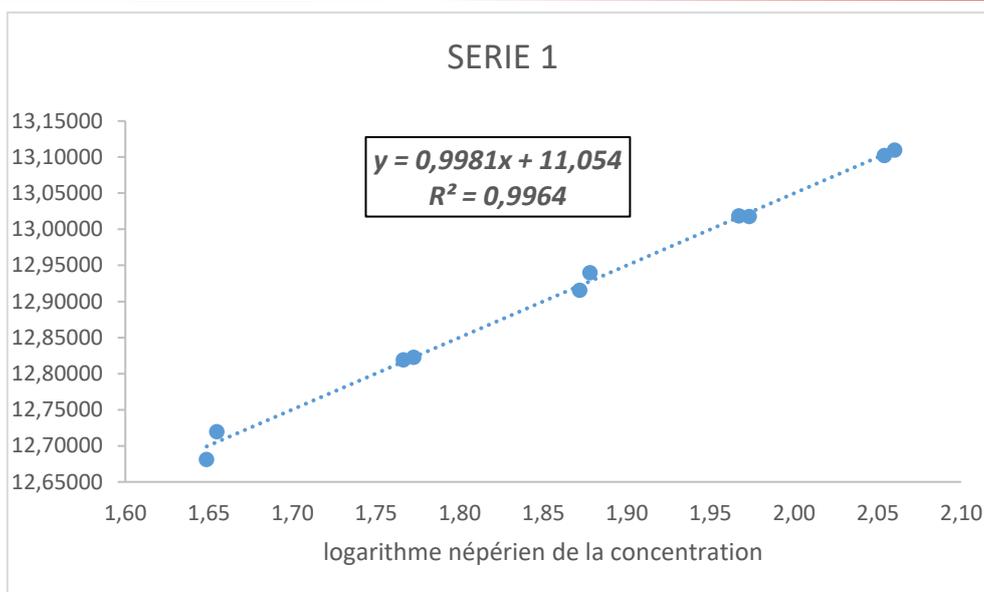


**Figure 38** : Courbe d'étalonnage du Paracétamol obtenue avec la fonction  $\ln y = f(\ln x)$  (Série 3).

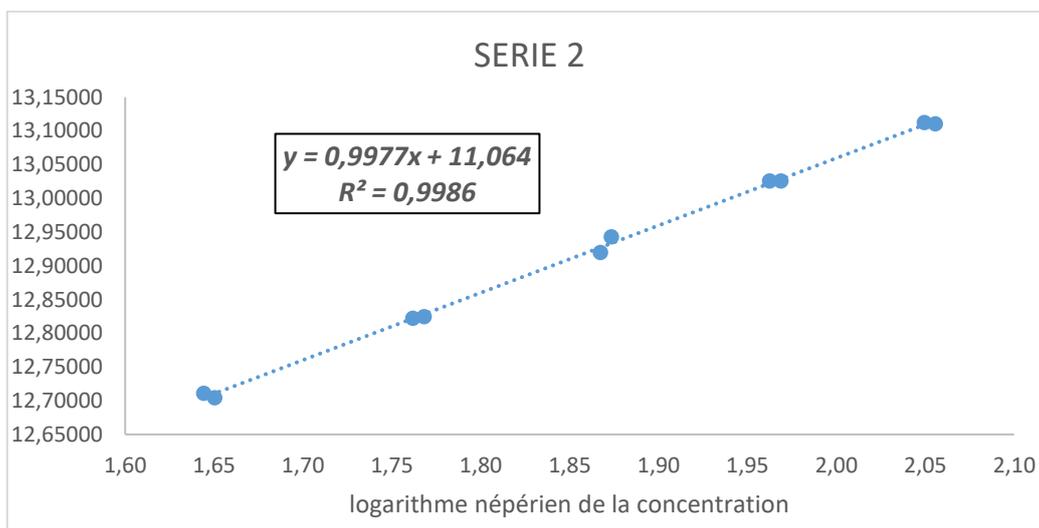
➤ **Caféine**

**Tableau XXXIV** : Paramètres d'étalonnage obtenus pour la Caféine avec la fonction  $\ln y = f(\ln x)$  (PA seul).

Niveaux	Répétitions	Séries (Jours)					
		1		2		3	
		LnXi	LnYi	lnXi	lnYi	lnXi	LnYi
80%	1	1,65	12,68126	1,64	12,71121	1,65	12,70704
	2	1,65	12,71960	1,65	12,70449	1,65	12,70954
90%	1	1,77	12,81949	1,76	12,82228	1,77	12,89867
	2	1,77	12,82278	1,77	12,82472	1,77	12,82145
100%	1	1,87	12,91567	1,87	12,91994	1,87	12,91825
	2	1,88	12,93997	1,87	12,94296	1,87	12,93231
110%	1	1,97	13,01875	1,96	13,02584	1,97	13,02438
	2	1,97	13,01797	1,97	13,02591	1,97	13,02634
120%	1	2,05	13,10224	2,05	13,11233	2,06	13,11500
	2	2,06	13,10981	2,06	13,11038	2,05	13,11746
<b>Pente</b>		<b>0,9981</b>	Pente	<b>0,9977</b>	Pente		<b>0,9713</b>
<b>Ordonnée à l'origine</b>		<b>11,0537</b>	<b>Ordonnée à l'origine</b>	<b>11,0642</b>	<b>Ordonnée à l'origine</b>		<b>11,1181</b>



**Figure 39** : Courbe d'étalonnage de la Caféine obtenue avec la fonction  $\ln y = f(\ln x)$  (Série 1).



**Figure 40** : Courbe d'étalonnage de la Caféine obtenue avec la fonction  $\ln y = f(\ln x)$  (Série 2).

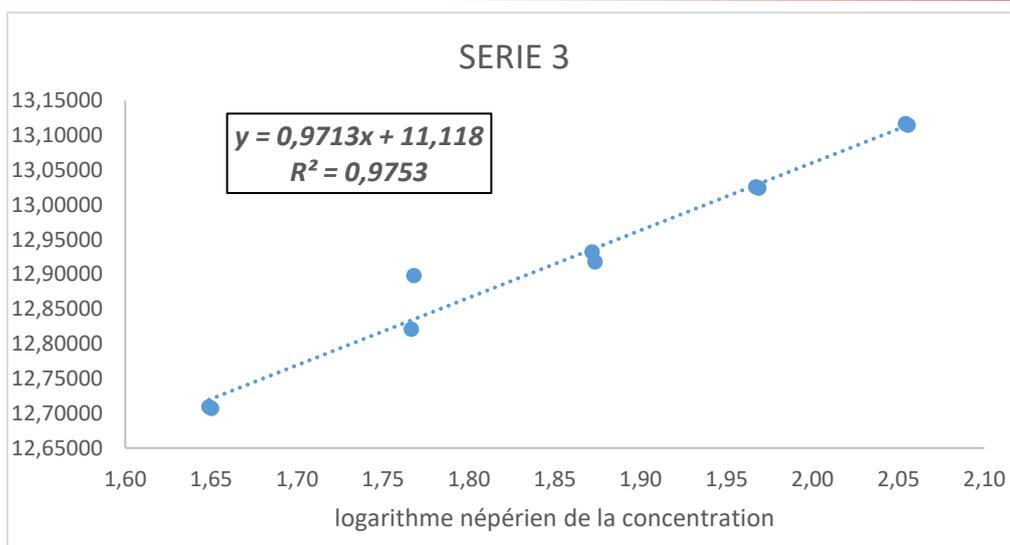


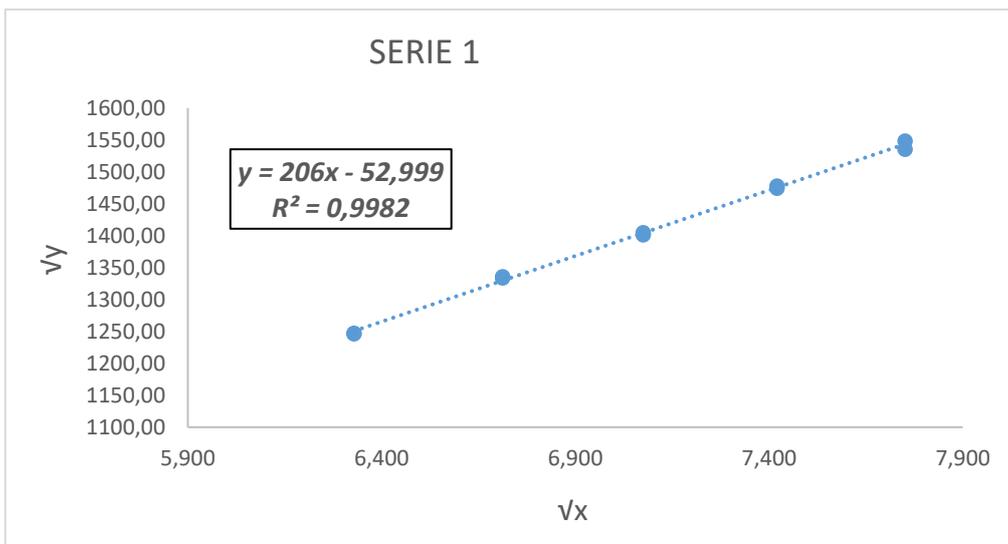
Figure 41 : Courbe d'étalonnage de la Caféine obtenue avec la fonction  $\ln y = f(\ln x)$  (Série 3).

- 4<sup>ème</sup> modèle : Changement de variables par la racine carrée :  $\sqrt{y} = f(\sqrt{x})$

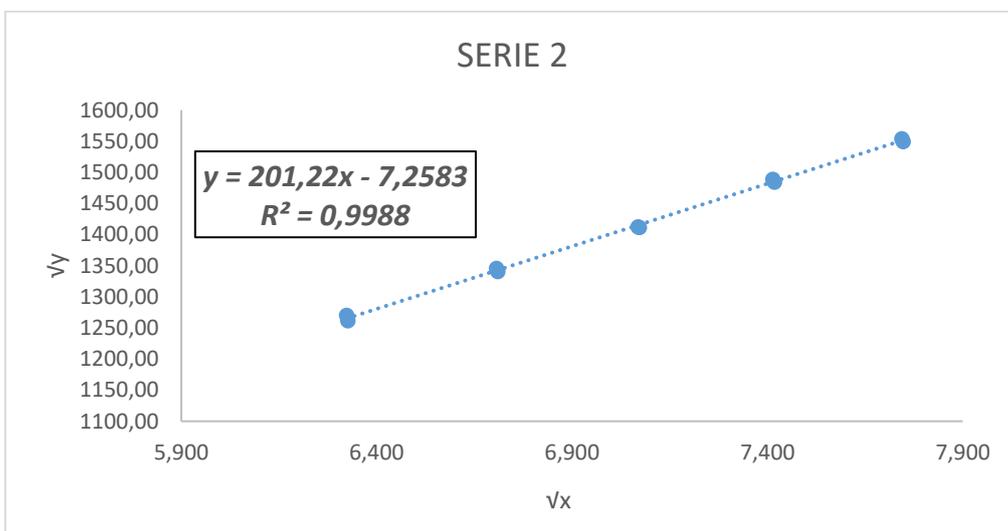
➤ Paracétamol

Tableau XXXV : Résultats du Paracétamol obtenus avec la fonction  $\sqrt{y} = f(\sqrt{x})$  (PA seul).

Niveaux	Répétitions	Séries (Jours)					
		1		2		3	
		$\sqrt{X_i}$	$\sqrt{Y_i}$	$\sqrt{X_i}$	$\sqrt{Y_i}$	$\sqrt{X_i}$	$\sqrt{Y_i}$
80%	1	6,328	1246,67	6,323	1270,45	6,325	1253,02
	2	6,328	1247,52	6,326	1261,80	6,324	1243,93
90%	1	6,712	1333,89	6,706	1345,62	6,708	1331,42
	2	6,712	1336,15	6,710	1340,74	6,708	1339,06
100%	1	7,075	1405,21	7,069	1412,51	7,071	1396,34
	2	7,075	1401,65	7,072	1411,34	7,070	1399,40
110%	1	7,421	1474,59	7,414	1488,66	7,416	1468,17
	2	7,421	1478,30	7,418	1484,26	7,415	1477,04
120%	1	7,751	1535,54	7,744	1554,05	7,746	1538,89
	2	7,751	1548,76	7,748	1549,63	7,745	1545,52
Pente		205,9997	Pente	201,2188	Pente		204,1215
Ordonnée à l'origine		-52,9987	Ordonnée à l'origine	-7,2583	Ordonnée à l'origine		-40,3592



**Figure 42 :** Courbe d'étalonnage du Paracétamol obtenue avec la fonction  $\sqrt{y} = f(\sqrt{x})$  (série 1).



**Figure 43 :** Courbe d'étalonnage du Paracétamol obtenue avec la fonction  $\sqrt{y} = f(\sqrt{x})$  (série 2).

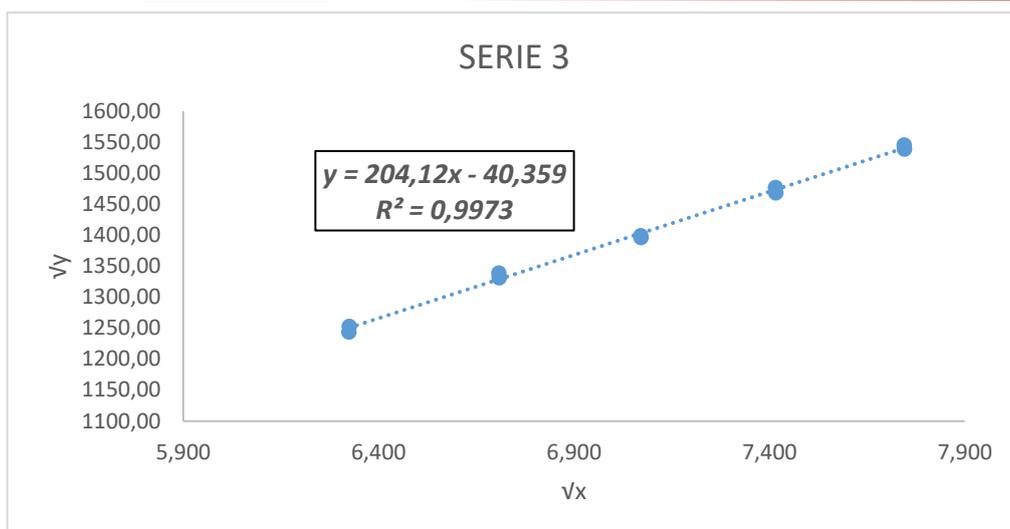
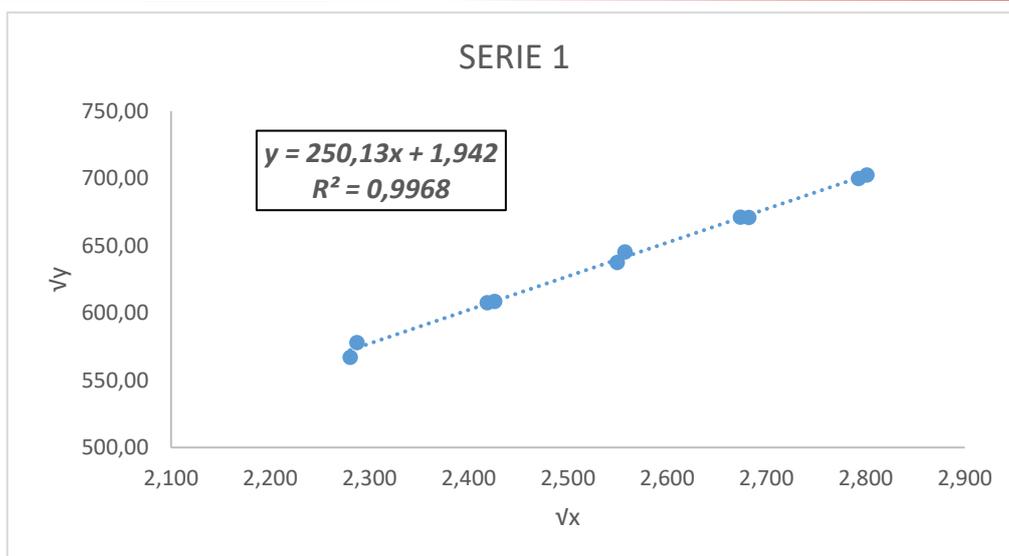


Figure 44 : Courbe d'étalonnage du Paracétamol obtenue avec la fonction  $\sqrt{y} = f(\sqrt{x})$  (série 3).

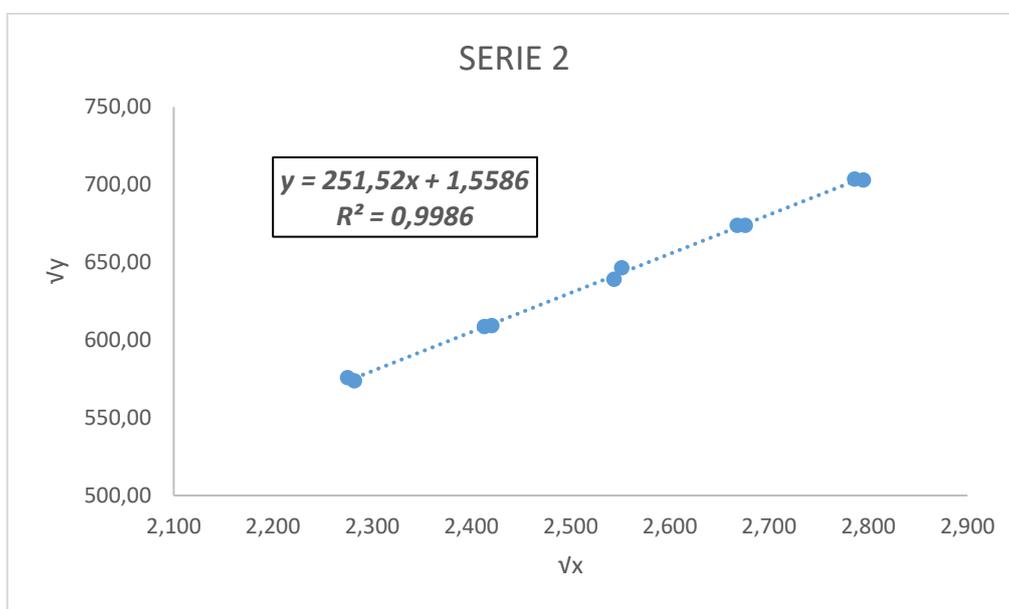
➤ **Caféine**

Tableau XXXVI : Résultats de la caféine obtenus avec la fonction  $\sqrt{y} = f(\sqrt{x})$  (PA seul).

Niveaux	Répétitions	Séries (Jours)									
		1		2		3					
		$\sqrt{X_i}$	$\sqrt{Y_i}$	$\sqrt{X_i}$	$\sqrt{Y_i}$	$\sqrt{X_i}$	$\sqrt{Y_i}$				
80%	1	2,280	567,15	2,275	575,71	2,282	574,51				
	2	2,287	578,13	2,282	573,78	2,280	575,23				
90%	1	2,419	607,74	2,413	608,59	2,421	632,28				
	2	2,426	608,74	2,421	609,33	2,419	608,33				
100%	1	2,550	637,68	2,544	639,04	2,551	638,50				
	2	2,557	645,47	2,551	646,44	2,550	643,01				
110%	1	2,674	671,41	2,668	673,79	2,676	673,30				
	2	2,682	671,14	2,676	673,81	2,674	673,96				
120%	1	2,793	700,03	2,786	703,57	2,795	704,51				
	2	2,801	702,68	2,795	702,88	2,793	705,38				
<b>Pente</b>		<b>250,1304</b>		<b>Pente</b>		<b>251,5188</b>		<b>Pente</b>		<b>244,9103</b>	
<b>Ordonnée à l'origine</b>		<b>1,9420</b>		<b>Ordonnée à l'origine</b>		<b>1,5586</b>		<b>Ordonnée à l'origine</b>		<b>19,8388</b>	



**Figure 45 :** Courbe d'étalonnage de la Caféine obtenue avec la fonction  $\sqrt{y} = f(\sqrt{x})$  (série 1).



**Figure 46 :** Courbe d'étalonnage de la Caféine obtenue avec la fonction  $\sqrt{y} = f(\sqrt{x})$  (série 2).

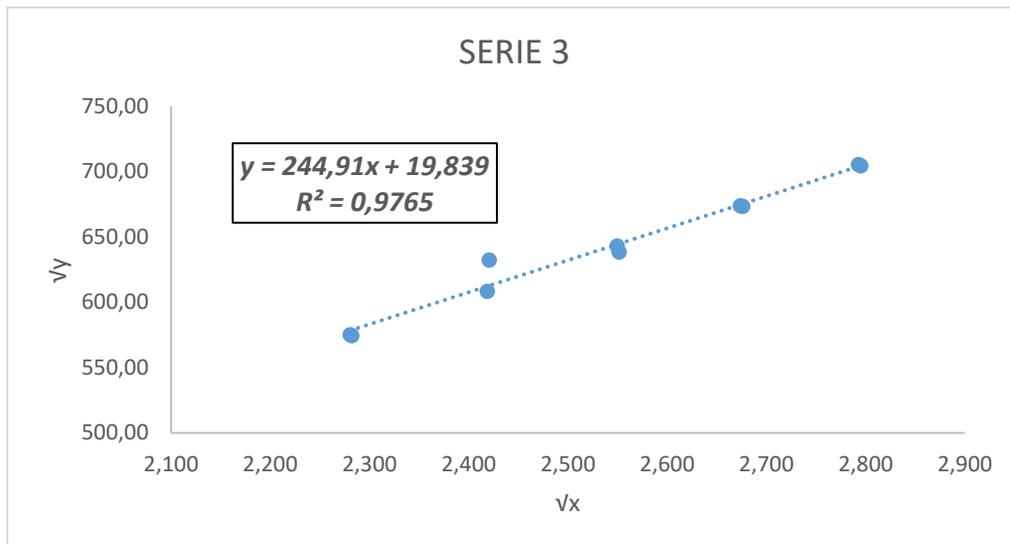


Figure 47 : Courbe d'étalonnage de la Caféine obtenue avec la fonction  $\sqrt{y} = f(\sqrt{x})$  (série 3).

### 1.7 Profils d'exactitude obtenus

Nous avons cité dans le tableau ci-dessous les différents profils d'exactitude à titre indicatif pour justifier notre choix de la fonction de réponse.

#### ➤ Paracétamol

Tableau XXXVII : Profils d'exactitude obtenus pour le Paracétamol.

Fonction de réponse	Profils d'exactitude	Intervalle de dosage (mg/L)	Paramètres de validation
$y = bx + a$		[40 – 60]	$\lambda = \pm 5\%$ $\beta = 95\%$



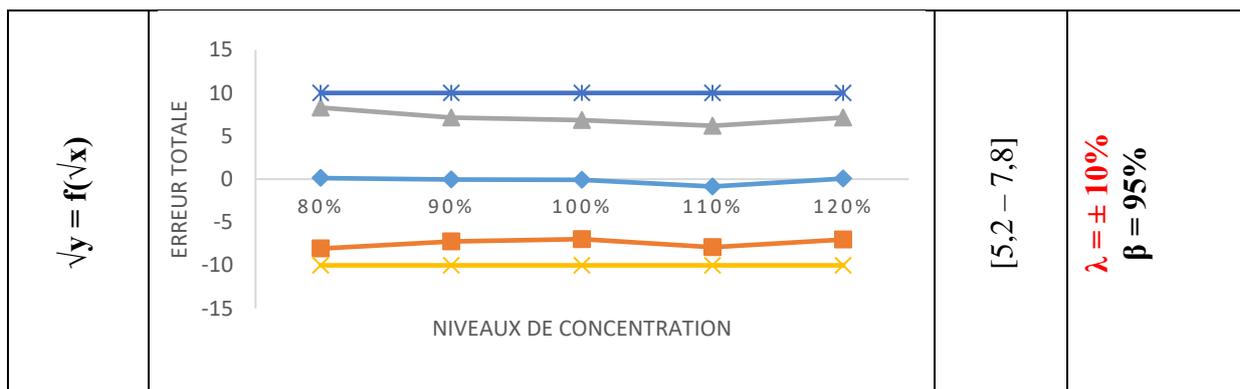
$y = bx$		<p>[40 – 60]</p>	$\lambda = \pm 5\%$ $\beta = 95\%$
$\ln y = f(\ln x)$		<p>[40 – 60]</p>	$\lambda = \pm 5\%$ $\beta = 95\%$
$\sqrt{y} = f(\sqrt{x})$		<p>[40 – 60]</p>	$\lambda = \pm 5\%$ $\beta = 95\%$



➤ **Caféine**

**Tableau XXXVIII : Profils d'exactitude obtenus pour la Caféine.**

Fonction de réponse	Profils d'exactitude	Intervalle de dosage (mg/L)	Paramètres de validation
$y = bx + a$	<p>ERREUR TOTALE %</p> <p>NIVEAUX DE CONCENTRATION %</p>	[5,2 – 7,8]	$\lambda = \pm 7\%$ $\beta = 95\%$
$y = bx$	<p>ERREUR TOTALE %</p> <p>NIVEAU DE CONCENTRATION %</p>	[0,52 – 0,78]	$\lambda = \pm 7\%$ $\beta = 95\%$
$\ln y = f(\ln x)$	<p>ERREUR TOTALE %</p> <p>NIVEAUX DE CONCENTRATION %</p>	[5,2 – 7,8]	$\lambda = \pm 5\%$ $\beta = 95\%$



### 1.8 Choix de la fonction de réponse

Notre objectif est de choisir un modèle d'étalonnage qui donne les meilleurs résultats de validation à savoir :

- ✓ Un intervalle de tolérance le plus étroit ;
- ✓ Une limite d'acceptabilité  $\lambda$  la plus basse et une probabilité  $\beta$  la plus élevée ;
- ✓ Une simplicité d'utilisation et de transformation lors du calcul des concentrations.

Le calcul des différents critères de validation est détaillé pour les fonctions choisies, sachant que ce sont les mêmes étapes aussi suivies avec les autres modèles.

### 1.9 Alignement des observations

Pour chaque niveau de concentration, on applique un alignement des réponses obtenues à partir des standards de validation sur la moyenne des concentrations introduites pour avoir des réponses corrigées qui prennent en considération les variations des masses introduites lors des pesées. Les résultats sont résumés dans les tableaux suivants :



## ➤ Paracétamol

Tableau XXXIX : Tableau d'alignement des réponses observées avec les trois séries de validation pour le Paracétamol.

Niveaux	Répétitions	Séries (Jours)									Moyenne des PE(mg)
		1			2			3			
		Concentration introduite (mg/L)	Réponses instrumentales	Réponses alignées	Concentration introduite (mg/L)	Réponses instrumentales	Réponses alignées	Concentration introduite (mg/L)	Réponses instrumentales	Réponses alignées	
80%	1	40,008	1591083	1591301	39,960	1628936	1629904	39,992	1585399	1585939	40,001
	2	40,040	1615794	1614705	39,992	1594594	1594271	40,008	1590409	1590301	
	3	39,992	1596372	1597243	40,000	1627410	1626765	40,016	1583736	1583304	
90%	1	45,009	1804838	1805083	44,955	1825766	1826854	44,991	1778714	1779322	45,001
	2	45,045	1814332	1813107	44,991	1824542	1824179	45,009	1790634	1790512	
	3	44,991	1824519	1825499	45,000	1819288	1818562	45,018	1778401	1777915	
100%	1	50,010	1996698	1996970	49,950	2028215	2029424	49,990	1975345	1976020	50,001
	2	50,050	2002770	2001409	49,990	2025668	2025265	50,010	1986145	1986010	
	3	49,990	2001596	2002685	50,000	2021012	2020206	50,020	1966814	1966274	
110%	1	55,011	2214087	2214386	54,945	2233359	2234689	54,989	2184383	2185126	55,001
	2	55,055	2223255	2221758	54,989	2248463	2248020	55,011	2200861	2200712	
	3	54,989	2220581	2221779	55,000	2234914	2234027	55,022	2214754	2214160	
120%	1	60,012	2404569	2404896	59,940	2438291	2439742	59,988	2386499	2387309	60,001
	2	60,060	2433963	2432330	59,988	2447783	2447299	60,012	2389193	2389031	
	3	59,988	2406825	2408131	60,000	2428823	2427855	60,024	2380529	2379881	
Pente		40824,30			40314,20407			40505,59928			
Ord. à l'origine		-70599,1			-11797,83226			-56554,13585			



## ➤ Caféine

Tableau XL : Tableau d'alignement des réponses observées avec les trois séries de validation pour la Caféine.

Niveaux	Répétitions	Séries (Jours)									Moyenne des PE (lnX)
		1			2			3			
		Concentration introduite (lnX)	Réponses instrumentales	Réponses alignées	Concentration introduite (lnX)	Réponses instrumentales	Réponses alignées	Concentration introduite (lnX)	Réponses instrumentales	Réponses alignées	
80%	1	1,66	12,72385	12,71568	1,64	12,70934	12,71498	1,65	12,65737	12,65537	1,65
	2	1,64	12,68357	12,68766	1,64	12,75783	12,76346	1,65	12,71689	12,71489	
	3	1,65	12,70872	12,70208	1,65	12,70300	12,70247	1,64	12,73036	12,73434	
90%	1	1,77	12,84650	12,83833	1,76	12,83330	12,83893	1,77	12,77220	12,77020	1,77
	2	1,76	12,80749	12,81158	1,76	12,82915	12,83479	1,77	12,83643	12,83443	
	3	1,77	12,83893	12,83228	1,77	12,81075	12,81023	1,76	12,84786	12,85184	
100%	1	1,88	12,94485	12,93668	1,87	12,93826	12,94389	1,87	12,87786	12,87586	1,87
	2	1,87	12,91251	12,91661	1,87	12,94478	12,95042	1,87	12,94017	12,93817	
	3	1,88	12,93058	12,92393	1,87	12,91839	12,91787	1,87	12,95006	12,95404	
110%	1	1,97	13,02297	13,01480	1,96	13,03694	13,04257	1,97	12,97936	12,97736	1,97
	2	1,96	13,00933	13,01342	1,96	13,03741	13,04304	1,97	13,04385	13,04185	
	3	1,97	13,03268	13,02603	1,97	13,01864	13,01812	1,96	12,95273	12,95672	
120%	1	2,06	13,08835	13,08018	2,05	13,12619	13,13183	2,06	13,06574	13,06374	2,05
	2	2,05	13,08902	13,09311	2,05	13,13347	13,13911	2,06	13,12643	13,12442	
	3	2,06	13,11383	13,10718	2,05	13,10864	13,10812	2,05	13,13971	13,14370	
<b>Pente</b>		<b>0,9981</b>			<b>0,9977</b>			<b>0,9713</b>			
<b>Ord. à l'origine</b>		<b>11,0537</b>			<b>11,0642</b>			<b>11,1181</b>			



## 1.10 Prédiction inverses

Les concentrations prédites à partir des réponses alignées sont représentées pour chaque prise d'essai dans les tableaux suivants :

## ➤ Paracétamol

Tableau XLI : Concentrations calculées par prédiction inverse pour le Paracétamol.

Niveaux	Moyenne des prédictions (mg/L)	Répétitions	Série 1		Série 2		Série 3	
			Réponses alignées (Aire)	Prédictions inverses (mg/L)	Réponses alignées (Aire)	Prédictions inverses (mg/L)	Réponses alignées (Aire)	Prédictions inverses (mg/L)
80%	40,64	1	1591300,73	<b>40,709</b>	1629903,54	<b>40,723</b>	1585939,07	<b>40,550</b>
		2	1614705,35	<b>41,282</b>	1594271,49	<b>39,839</b>	1590300,99	<b>40,657</b>
		3	1597242,92	<b>40,854</b>	1626764,97	<b>40,645</b>	1583303,94	<b>40,485</b>
90%	45,70	1	1805082,95	<b>45,945</b>	1826854,48	<b>45,608</b>	1779321,58	<b>45,324</b>
		2	1813107,27	<b>46,142</b>	1824179,17	<b>45,542</b>	1790512,48	<b>45,600</b>
		3	1825498,78	<b>46,445</b>	1818562,34	<b>45,402</b>	1777914,93	<b>45,289</b>
100%	50,48	1	1996970,16	<b>50,646</b>	2029424,43	<b>50,633</b>	1976020,09	<b>50,180</b>
		2	2001409,19	<b>50,754</b>	2025264,86	<b>50,530</b>	1986009,98	<b>50,427</b>
		3	2002684,65	<b>50,786</b>	2020205,72	<b>50,404</b>	1966273,93	<b>49,939</b>
110%	55,88	1	2214386,38	<b>55,971</b>	2234689,37	<b>55,724</b>	2185125,60	<b>55,342</b>
		2	2221758,11	<b>56,152</b>	2248019,54	<b>56,055</b>	2200712,48	<b>55,727</b>
		3	2221778,51	<b>56,152</b>	2234027,09	<b>55,708</b>	2214159,92	<b>56,059</b>
120%	60,65	1	2404895,59	<b>60,638</b>	2439742,31	<b>60,811</b>	2387309,11	<b>60,334</b>
		2	2432330,03	<b>61,310</b>	2447299,23	<b>60,998</b>	2389030,98	<b>60,376</b>
		3	2408131,38	<b>60,717</b>	2427855,46	<b>60,516</b>	2379880,91	<b>60,151</b>

## ➤ Caféine

Tableau XLII : Concentrations calculées par prédiction inverse pour la Caféine.

Niveaux	Moyenne des prédictions (mg/L)	Répétitions	Série 1		Série 2		Série 3	
			Réponses alignées (Aire)	Prédictions inverses (mg/L)	Réponses alignées (Aire)	Prédictions inverses (mg/L)	Réponses alignées (Aire)	Prédictions inverses (mg/L)
80%	5,214	1	12,716	<b>5,287</b>	12,715	<b>5,287</b>	12,655	<b>5,287</b>
		2	12,688	<b>5,141</b>	12,763	<b>5,141</b>	12,715	<b>5,141</b>
		3	12,702	<b>5,215</b>	12,702	<b>5,215</b>	12,734	<b>5,215</b>
90%	5,913	1	12,838	<b>5,978</b>	12,839	<b>5,978</b>	12,770	<b>5,978</b>
		2	12,812	<b>5,820</b>	12,835	<b>5,820</b>	12,834	<b>5,820</b>
		3	12,832	<b>5,942</b>	12,810	<b>5,942</b>	12,852	<b>5,942</b>
100%	6,526	1	12,937	<b>6,597</b>	12,944	<b>6,597</b>	12,876	<b>6,597</b>
		2	12,917	<b>6,466</b>	12,950	<b>6,466</b>	12,938	<b>6,466</b>
		3	12,924	<b>6,514</b>	12,918	<b>6,514</b>	12,954	<b>6,514</b>



<b>110%</b>	<b>7,158</b>	<b>1</b>	13,015	<b>7,134</b>	13,043	<b>7,134</b>	12,977	<b>7,134</b>
		<b>2</b>	13,013	<b>7,125</b>	13,043	<b>7,125</b>	13,042	<b>7,125</b>
		<b>3</b>	13,026	<b>7,215</b>	13,018	<b>7,215</b>	12,957	<b>7,215</b>
<b>120%</b>	<b>7,720</b>	<b>1</b>	13,080	<b>7,617</b>	13,132	<b>7,617</b>	13,064	<b>7,617</b>
		<b>2</b>	13,093	<b>7,717</b>	13,139	<b>7,717</b>	13,124	<b>7,717</b>
		<b>3</b>	13,107	<b>7,826</b>	13,108	<b>7,826</b>	13,144	<b>7,826</b>

### 1.11 Justesse

La justesse est exprimée en termes de biais absolu, de biais relatif et de taux de recouvrement pour chaque niveau de concentration des standards de validation.

#### ➤ Paracétamol

**Tableau XLIII :** Justesse calculée pour chaque niveau de concentration des standards de validation pour le Paracétamol.

Niveau de concentration	80%	90%	100%	110%	120%
Moyenne des Concentrations introduites (mg/L)	40,001	45,001	50,001	55,001	60,001
Moyenne des Concentrations calculées (mg/L)	40,638	45,700	50,478	55,877	60,650
Biais absolu	0,637	0,699	0,476	0,876	0,649
Biais relatif (%)	1,59	1,55	0,95	1,59	1,08
Taux de recouvrement (%)	101,59	101,55	100,95	101,59	101,08

#### ➤ Caféine

**Tableau XLIV :** Justesse calculée pour chaque niveau de concentration des standards de validation pour la Caféine.

Niveau de concentration	80%	90%	100%	110%	120%
Moyenne des Concentrations introduites (mg/L)	5,197	5,847	6,497	7,146	7,796
Moyenne des Concentrations calculées (mg/L)	5,214	5,913	6,526	7,158	7,720
Biais absolu	0,017	0,066	0,029	0,012	-0,076
Biais relatif (%)	0,326	1,137	0,446	0,165	-0,972
Taux de recouvrement (%)	100,33	101,14	100,45	100,16	99,03

**1.12 Fidélité**

La fidélité est évaluée pour chaque niveau de concentration, elle est calculée par les écarts types et les coefficients de variation qui estiment la répétabilité et la fidélité intermédiaire, les résultats sont résumés dans les tableaux ci-dessous :

➤ **Paracétamol**

**Tableau XLV :** Fidélité calculée pour chaque niveau de concentration des standards de validation pour le Paracétamol.

Niveaux de Concentrations	80%	90%	100%	110%	120%
Concentration moyenne retrouvée	40,64	45,70	50,48	55,88	60,65
SCE résiduelle	0,67180	0,20708	0,15573	0,35585	0,41680
SCE totale	1,14390	1,25295	0,61248	0,58507	1,02921
SCE inter séries	0,47209	1,04587	0,45674	0,22922	0,61241
Ecart type de répétabilité	0,33461	0,18578	0,16111	0,24353	0,26357
Ecart type inter séries	0,00000	0,00000	0,00000	0,00000	0,00000
Ecart type de fidélité intermédiaire	0,33461	0,18578	0,16111	0,24353	0,26357
CV de répétabilité	0,823	0,407	0,319	0,436	0,435
CV de fidélité intermédiaire	0,823	0,407	0,319	0,436	0,435

➤ **Caféine**

**Tableau XLVI :** Fidélité calculée pour chaque niveau de concentration des standards de validation pour la Caféine.

Niveaux de Concentrations	80%	90%	100%	110%	120%
Concentration moyenne retrouvée	5,21	5,91	6,53	7,16	7,72
SCE résiduelle	0,03213	0,04118	0,02653	0,01483	0,06554
SCE totale	0,03213	0,04118	0,02653	0,01483	0,06554
SCE inter séries	0,00000	0,00000	0,00000	0,00000	0,00000
Ecart type de répétabilité	0,07318	0,08285	0,06650	0,04972	0,10452
Ecart type inter séries	0,00000	0,00000	0,00000	0,00000	0,00000
Ecart type de fidélité intermédiaire	0,07318	0,08285	0,06650	0,04972	0,10452
CV de répétabilité	1,403	1,401	1,019	0,695	1,354
CV de fidélité intermédiaire	1,403	1,401	1,019	0,695	1,354



### 1.13 Exactitude

A partir des concentrations prédites, on peut calculer l'exactitude relative par rapport à la concentration introduite. Les tableaux ci-dessous résument les résultats obtenus :



## ➤ Paracétamol

Tableau XLVII : Résultats du calcul de l'exactitude relative pour le Paracétamol.

Niveaux %	Répétitions	Séries (Jour)								
		1			2			3		
		Concentration introduite (mg/L)	Concentration prédite (mg/L)	Exactitude relative (%)	Concentration introduite (mg/L)	Concentration prédite (mg/L)	Exactitude relative (%)	Concentration introduite (mg/L)	Concentration prédite (mg/L)	Exactitude relative (%)
80%	1	40,008	40,709	-1,72	39,96	40,723	-1,87	39,99	40,550	-1,38
	2	40,040	41,282	-3,01	39,99	39,839	0,38	40,01	40,657	-1,60
	3	39,992	40,854	-2,11	40,00	40,645	-1,59	40,02	40,485	-1,16
90%	1	45,009	45,945	-2,04	44,96	45,608	-1,43	44,99	45,324	-0,73
	2	45,045	46,142	-2,38	44,99	45,542	-1,21	45,01	45,600	-1,30
	3	44,991	46,445	-3,13	45,00	45,402	-0,89	45,02	45,289	-0,60
100%	1	50,010	50,646	-1,25	49,95	50,633	-1,35	49,99	50,180	-0,38
	2	50,050	50,754	-1,39	49,99	50,530	-1,07	50,01	50,427	-0,83
	3	49,990	50,786	-1,57	50,00	50,404	-0,80	50,02	49,939	0,16
110%	1	55,011	55,971	-1,72	54,95	55,724	-1,40	54,99	55,342	-0,64
	2	55,055	56,152	-1,95	54,99	56,055	-1,90	55,01	55,727	-1,29
	3	54,989	56,152	-2,07	55,00	55,708	-1,27	55,02	56,059	-1,85
120%	1	60,012	60,638	-1,03	59,94	60,811	-1,43	59,99	60,334	-0,57
	2	60,060	61,310	-2,04	59,99	60,998	-1,66	60,01	60,376	-0,60
	3	59,988	60,717	-1,20	60,00	60,516	-0,85	60,02	60,151	-0,21



## ➤ Caféine

Tableau XLVIII : Résultats du calcul de l'exactitude relative pour la Caféine.

Niveaux %	Répétitions	Séries (Jour)								
		1			2			3		
		Concentration introduite (mg/L)	Concentration prédite (mg/L)	Exactitude relative (%)	Concentration introduite (mg/L)	Concentration prédite (mg/L)	Exactitude relative (%)	Concentration introduite (mg/L)	Concentration prédite (mg/L)	Exactitude relative (%)
80%	1	5,240	5,287	-0,89	5,17	5,287	-2,25	5,21	5,287	-1,49
	2	5,176	5,141	0,69	5,17	5,141	0,53	5,21	5,141	1,31
	3	5,232	5,215	0,32	5,20	5,215	-0,29	5,18	5,215	-0,75
90%	1	5,895	5,978	-1,39	5,81	5,978	-2,75	5,86	5,978	-1,99
	2	5,823	5,820	0,05	5,81	5,820	-0,11	5,86	5,820	0,67
	3	5,886	5,942	-0,94	5,85	5,942	-1,55	5,82	5,942	-2,00
100%	1	6,550	6,597	-0,72	6,46	6,597	-2,08	6,51	6,597	-1,32
	2	6,470	6,466	0,06	6,46	6,466	-0,09	6,51	6,466	0,68
	3	6,540	6,514	0,41	6,50	6,514	-0,21	6,47	6,514	-0,67
110%	1	7,205	7,134	0,99	7,11	7,134	-0,40	7,16	7,134	0,37
	2	7,117	7,125	-0,11	7,11	7,125	-0,26	7,16	7,125	0,51
	3	7,194	7,215	-0,29	7,15	7,215	-0,90	7,12	7,215	-1,36
120%	1	7,860	7,617	3,18	7,75	7,617	1,77	7,81	7,617	2,55
	2	7,764	7,717	0,61	7,75	7,717	0,46	7,81	7,717	1,23
	3	7,848	7,826	0,28	7,80	7,826	-0,34	7,76	7,826	-0,80



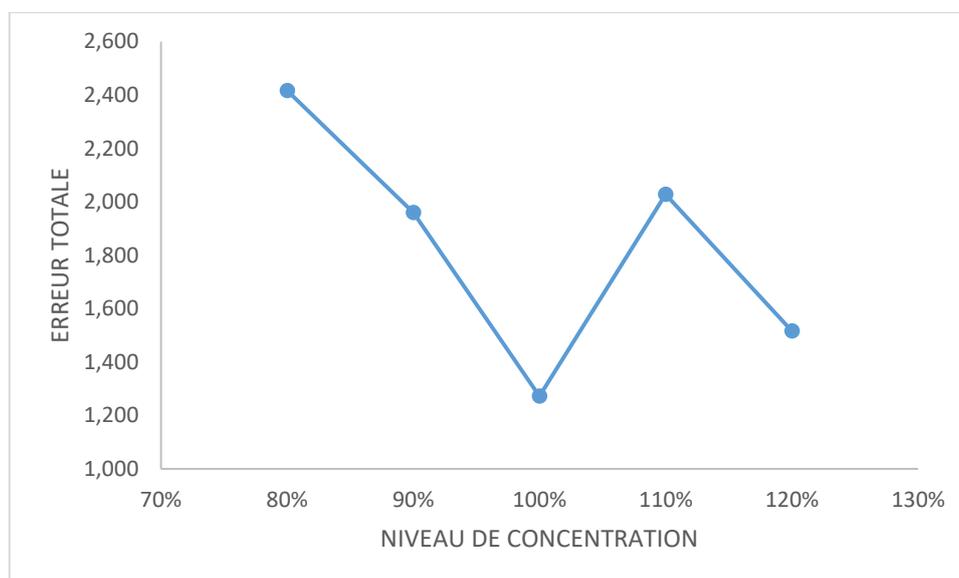
### 1.14 Erreur totale et profil d'erreur totale

On a calculé l'erreur totale absolue et relative pour chaque niveau de concentration et les résultats sont résumés dans les tableaux suivants :

#### ➤ Paracétamol

**Tableau XLIX :** Calcul de l'erreur totale pour chaque niveau de concentration des standards de validation du Paracétamol.

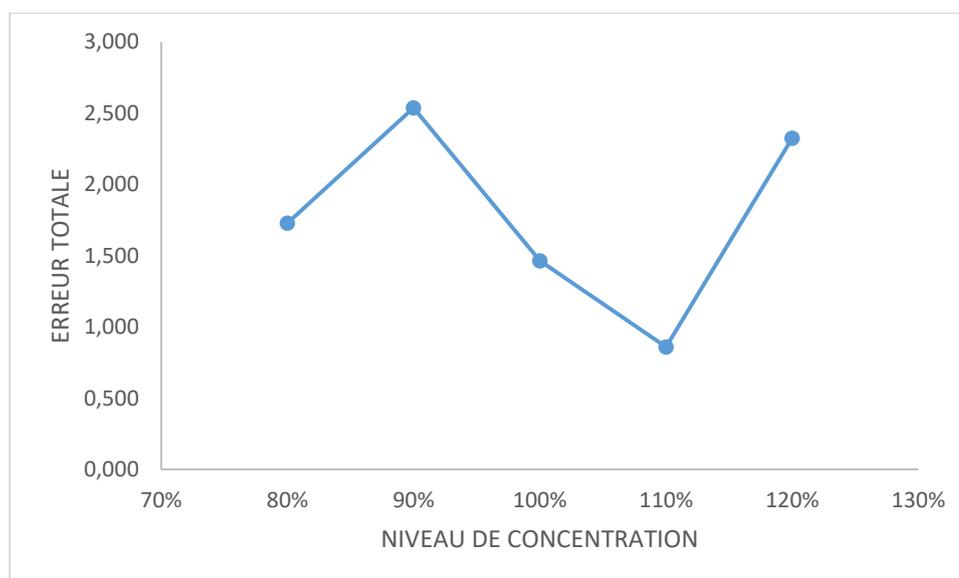
Niveau	80%	90%	100%	110%	120%
Moyenne des concentrations théoriques (mg/L)	40,00	45,00	50,00	55,00	60,00
Biais relatif (%)	1,593	1,553	0,953	1,592	1,081
Biais relatif en valeur absolue	1,593	1,553	0,953	1,592	1,081
Coefficient de variation de fidélité intermédiaire (%)	0,823	0,407	0,319	0,436	0,435
Erreur totale (%)	<b>2,416</b>	<b>1,959</b>	<b>1,272</b>	<b>2,028</b>	<b>1,516</b>



**Figure 48 :** Profil d'erreur totale du Paracétamol.

➤ **Caféine****Tableau L** : Calcul de l'erreur totale pour chaque niveau de concentration des standards de validation de la Caféine.

Niveau	80%	90%	100%	110%	120%
Moyenne des concentrations théoriques (mg/L)	5,20	5,85	6,50	7,15	7,80
Biais relatif (%)	0,326	1,137	0,446	0,165	-0,972
Biais relatif en valeur absolue	0,326	1,137	0,446	0,165	0,972
Coefficient de variation de fidélité intermédiaire (%)	1,403	1,401	1,019	0,695	1,354
Erreur totale (%)	<b>1,729</b>	<b>2,538</b>	<b>1,465</b>	<b>0,859</b>	<b>2,326</b>

**Figure 49** : Profil d'erreur totale de la Caféine.**1.15 Intervalle de tolérance**

Les limites de l'intervalle de tolérance sont calculées et résumées dans les tableaux ci-dessous :

➤ **Paracétamol****Tableau LI** : Limites de tolérance du Paracétamol.

Niveau de concentration	80%	90%	100%	110%	120%
Limite intervalle tolérance basse (%)	-0,09	0,72	0,30	0,70	0,20
Limite intervalle tolérance haute (%)	3,28	2,39	1,60	2,48	1,97

➤ **Caféine****Tableau LII** : Limites de tolérance de la Caféine.

Niveau de concentration	80%	90%	100%	110%	120%
Limite intervalle tolérance basse (%)	-3,31	-2,52	-2,20	-1,63	-4,43
Limite intervalle tolérance haute (%)	3,96	4,79	3,09	1,96	2,49

**1.16 Profil d'exactitude**

Après le calcul des critères de validation on collecte toutes les données obtenues pour tracer le profil d'exactitude qui réunit le biais relatif, les deux bornes de l'intervalle de tolérance et celles de l'intervalle d'acceptabilité, dans une courbe qui donne l'exactitude (%) en fonction des niveaux de concentrations introduites.

Les profils d'exactitude obtenus en utilisant la fonction choisie sont représentés ci-dessous :



➤ Paracétamol

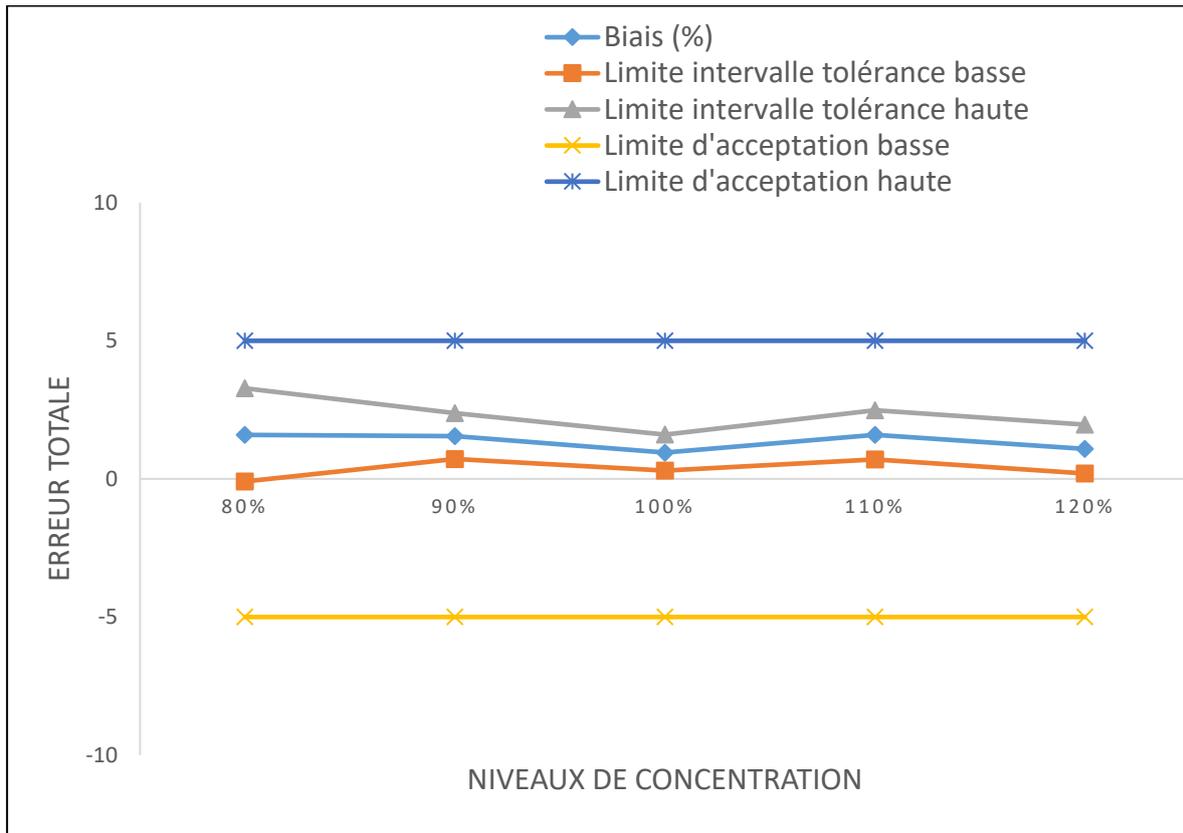
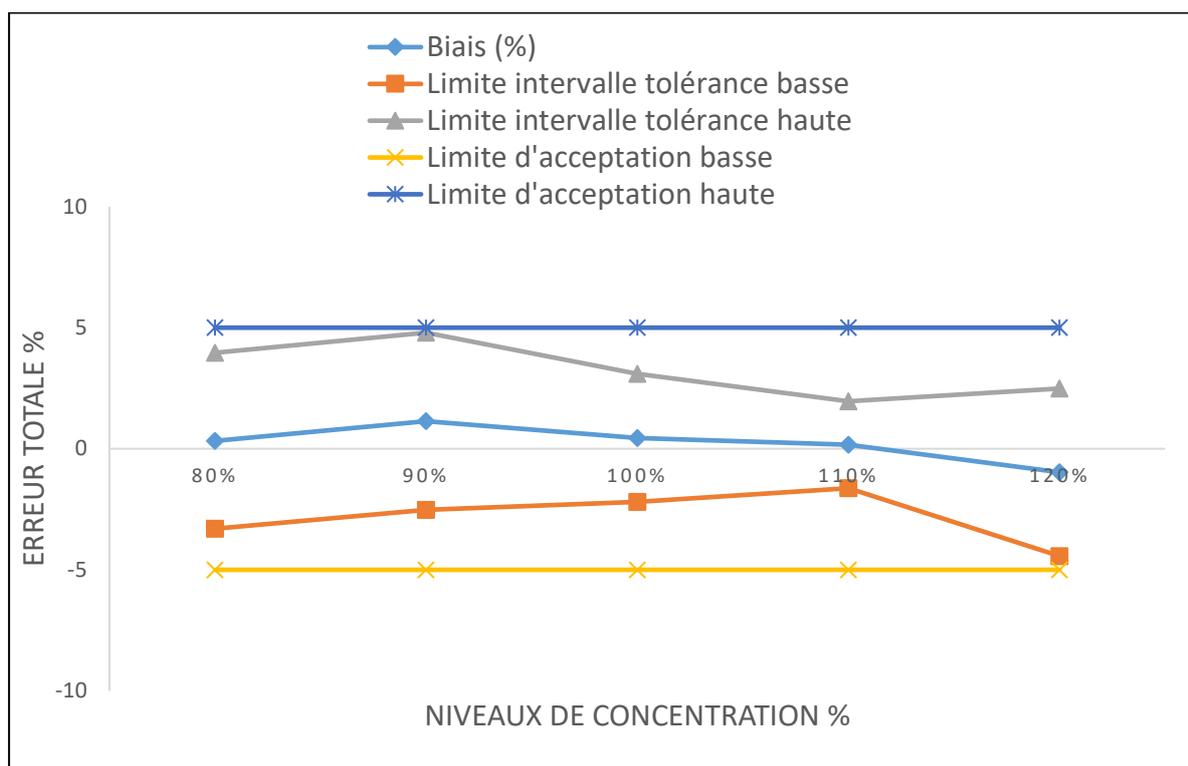


Figure 50 : Profil d'exactitude du Paracétamol ( $\beta = 95\%$  et  $\lambda = 5\%$ ).

➤ **Caféine**

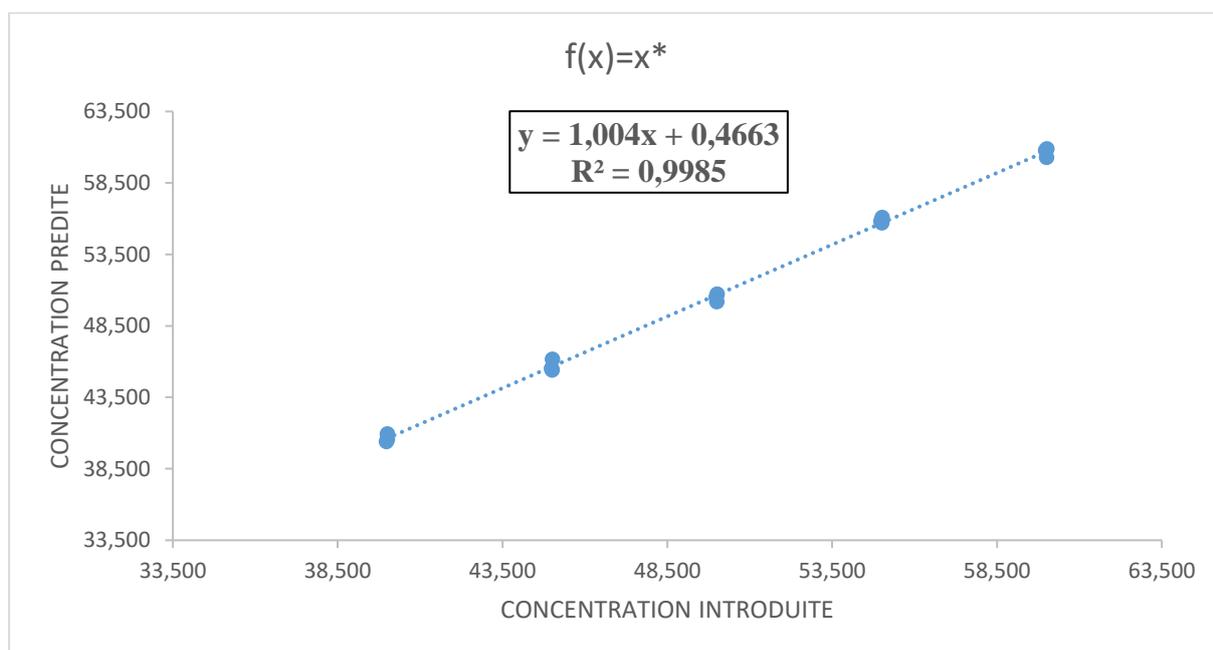
**Figure 51** : Profil d'exactitude de la Caféine ( $\beta = 95\%$  et  $\lambda = 5\%$ ).

### 1.17 Linéarité

Le calcul de la linéarité nécessite différents paramètres qui nous permettent de tracer des droites de régression linéaire de la concentration prédite en fonction de la concentration introduite.



## ➤ Paracétamol



**Figure 52 :** Droite de linéarité entre la concentration prédite en fonction de la concentration introduite du Paracétamol.

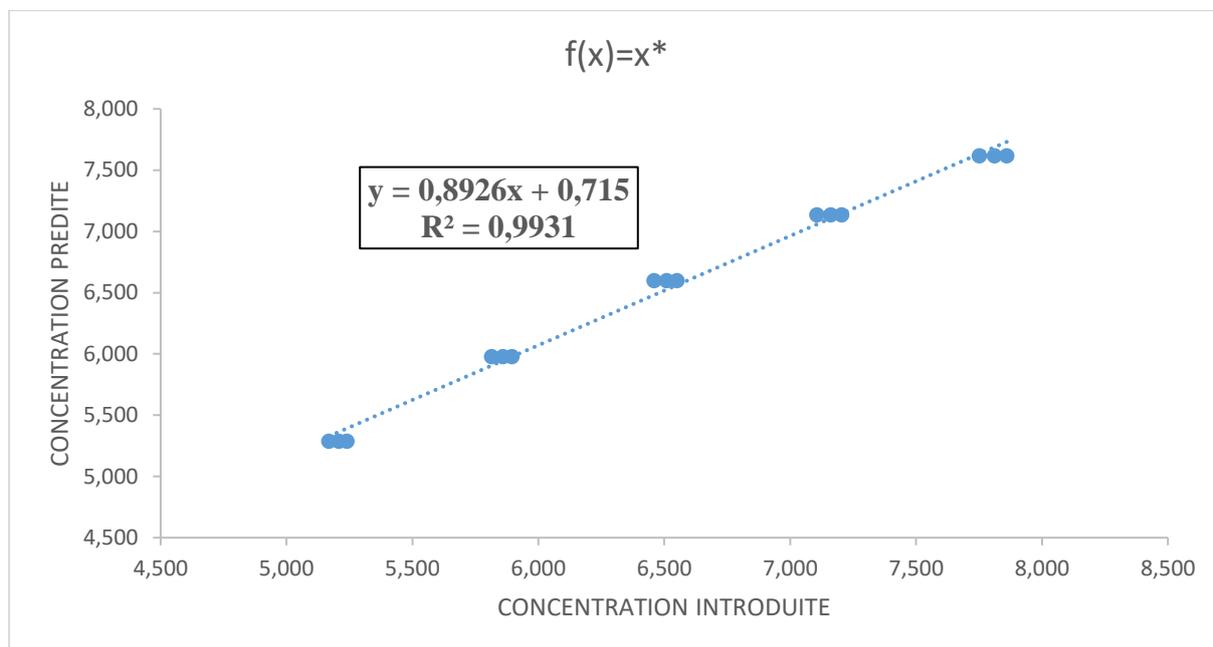
La linéarité de la concentration prédite est évaluée statistiquement en comparant la pente avec 1 et l'ordonnée à l'origine avec 0.

Les résultats obtenus de l'évaluation statistique de la linéarité sont résumés dans les tableaux suivants :

**Tableau LIII :** Évaluation statistique de la linéarité du Paracétamol.

<b>Pente</b>	1,0040
<b>Ordonnée à l'origine</b>	0,4663
<b>Erreur pente</b>	0,0108
<b>Erreur ordonnée à l'origine</b>	0,5451

<b>Comparaison de la pente avec 1</b>	<b>t calculé</b>	<b>0,37</b>	<b>Différence non significative</b>
	<b>t°(α ; 13)</b>	<b>2,16</b>	
	<b>Condition</b>	<b>t calculé &lt; t°(α ; 13)</b>	
<b>Comparaison de l'ordonnées à l'origine avec 0</b>	<b>t calculé</b>	<b>0,86</b>	<b>Différence non significative</b>
	<b>t°(α ; 13)</b>	<b>2,16</b>	
	<b>Condition</b>	<b>t calculé &lt; t°(α ; 13)</b>	

➤ **Caféine**

**Figure 53 :** Droite de linéarité entre la concentration prédite en fonction de la concentration introduite de la Caféine.

**Tableau LIV :** Évaluation statistique de la linéarité de la Caféine.

<b>Pente</b>	<b>0,8926</b>
<b>Ordonnée à l'origine</b>	<b>0,015</b>
<b>Erreur pente</b>	<b>0,0206</b>
<b>Erreur ordonnée à l'origine</b>	<b>0,1352</b>

<b>Comparaison de la pente avec 1</b>	<b>t calculé</b>	<b>0,39</b>	<b>Différence non significative</b>
	<b><math>t^\circ(\alpha ; 13)</math></b>	<b>2,16</b>	
	<b>Condition</b>	<b><math>t \text{ calculé} &gt; t^\circ(\alpha ; 13)</math></b>	
<b>Comparaison de l'ordonnées à l'origine avec 0</b>	<b>t calculé</b>	<b>0,11</b>	<b>Différence non significative</b>
	<b><math>t^\circ(\alpha ; 13)</math></b>	<b>2,16</b>	
	<b>Condition</b>	<b><math>t \text{ calculé} &lt; t^\circ(\alpha ; 13)</math></b>	



### 1.18 Limites de quantification

Les limites de quantification sont obtenues à partir du profil d'exactitude en calculant les concentrations (hautes et basses) à partir desquelles les limites supérieures ou inférieures de l'intervalle de tolérance sortent des limites d'acceptabilité ( $\pm\lambda$ ) au niveau de la probabilité choisi ( $\beta$ ).

A partir du profil d'exactitude du Paracétamol et de la Caféine on constate qu'il n'y a pas ces points d'intersection, 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.

- ✓ Pour le Paracétamol, les limites de quantification sont : **[40 ; 60] mg/L** correspondant à une teneur théorique de **[400 ; 600] mg** par comprimé, suivant le protocole de dosage établi ;
- ✓ Pour la Caféine, les limites de quantification sont : **[5,2 ; 7,8] mg/L** correspondant à une teneur théorique de **[52 ; 78] mg** par comprimé, suivant le protocole de dosage établi.



## 2 DISCUSSION

### 2.1 Résolution

La résolution calculée est égale à **7,692** ; elle est largement supérieure à 1,5 ce qui traduit une très bonne séparation des deux principes actifs, on peut donc faire un dosage simultané du paracétamol et de la caféine par Chromatographie Liquide à Haute Performance.

### 2.2 Spécificité et effet matrice

Après la confirmation des temps de rétention du paracétamol et de la caféine en injectant leurs standards séparément, on est passé à l'étude de la spécificité par deux méthodes :

#### 2.2.1 Comparaison des chromatogrammes

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

- ✓ L'absence des pics aux temps de rétention des deux PA (paracétamol et caféine) dans les chromatogrammes obtenus à partir des solutions du diluant et du placebo ;
- ✓ Les temps de rétention correspondants au paracétamol et à la caféine obtenus sur les chromatogrammes du standard d'étalonnage et du standard de validation d'un même niveau de concentration sont comparables.

#### ➤ Paracétamol

Comparaison des deux pentes  $a_1$  et  $a_2$ , et des deux ordonnées à l'origine  $b_1$  et  $b_2$  :

D'après ce qu'illustre le tableau (XXV), on conclut que :

- ◆ Les deux pentes ne sont pas significativement différentes au risque  $\alpha = 5\%$  considéré, d'où l'absence de l'effet matrice ;
- ◆ Il n'existe pas de différence significative entre les ordonnées à l'origine au risque  $\alpha = 5\%$  considéré, expliquant ainsi l'absence d'erreur systématique.

L'interprétation des résultats obtenus est résumée dans le tableau (LVI) qui suit :

**Tableau LVI:** Signification des résultats des deux pentes et des deux ordonnées à l'origine entre elles pour le Paracétamol.

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



On peut déduire qu'avec un risque de 5%, la méthode n'a ni d'effet matrice, ni d'erreur systématique, elle est donc statistiquement **spécifique**.

### ➤ **Caféine**

Comparaison des deux pentes  $a_1$  et  $a_2$ , et des deux ordonnées à l'origine  $b_1$  et  $b_2$  selon les données du tableau (LVII) :

- ◆ Les deux pentes ne sont pas significativement différentes au risque  $\alpha = 5\%$  considéré, d'où l'absence de l'effet matrice ;
- ◆ Il n'existe pas de différence significative entre les ordonnées à l'origine au risque  $\alpha = 5\%$  considéré, expliquant ainsi l'absence d'erreur systématique.

La discussion des résultats obtenus est résumée dans le tableau (LX) qui suit :

**Tableau LVIII:** Signification des résultats des deux pentes et des deux ordonnées à l'origine entre elles pour la caféine.

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

On conclut, qu'avec un risque de 5%, la méthode est statistiquement **spécifique** (elle n'a ni effet matrice, ni erreur systématique).

Ces résultats confirment ceux obtenus par l'étude des chromatogrammes.

## 2.3 Choix de la fonction de réponse

### ➤ **Paracétamol**

D'après les profils d'exactitude élucidés, on constate que le modèle qui convient le plus à notre méthode est le modèle de régression linéaire avec la fonction  $y = bx + a$  : **un étalonnage sans matrice (PA seul)**, en raison de son intervalle de tolérance qui paraît plus étroit que le modèle logarithmique et racine carré, en plus du fait qu'il est construit avec 5 niveaux d'étalonnage contrairement au modèle utilisant la fonction  $y = bx$  construit avec un seul niveau passant par 0.



➤ **Caféine**

La fonction de réponse qui a donné des résultats valides sur tout l'intervalle de concentration testé avec le plus petit  $\lambda$  (5%) et la plus grande  $\beta$  (95%) correspond au modèle de régression  $\ln Y = b \ln X + a$  : **un étalonnage sans matrice (PA seul)**, ce qui nous a permis de le choisir comme le modèle le plus convenable pour le dosage de la caféine par notre méthode.

❖ **Remarque**

Il ne faut pas oublier de calculer les concentrations à chaque fois par transformation inverse du logarithme népérien (ln) des résultats obtenus pour la Caféine.

## 2.4 Justesse

L'accord entre la valeur de la concentration moyenne prédite obtenue à partir des trois séries de validation et la valeur de la moyenne des concentrations introduites considérée comme étant la valeur de référence est assez étroit pour tous les niveaux de concentration du Paracétamol et de la Caféine en tenant compte que les biais relatifs de ces derniers sont largement inférieurs à 2.5 % confirmant la justesse de notre méthode.

## 2.5 Fidélité

Etant donné que les coefficients de variation de la répétabilité et de la fidélité intermédiaire de tous les niveaux de concentration sont inférieurs à 2.5% pour le Paracétamol ainsi que pour la Caféine, le degré de dispersion des concentrations prédites obtenues est assez étroit pour tous les niveaux, la méthode est donc fidèle.

Le CV maximal de fidélité intermédiaire a atteint 0,823% pour le paracétamol (niveau 80%) et 1,403% pour la caféine (niveau 80%), expliqué par l'augmentation de la dispersion des résultats en allant vers les concentrations les plus faibles.

Cependant ces estimations de la fidélité et de la justesse ne sont pas une fin en soi, elles ne permettent pas de prendre une décision quant à la validité de la méthode, elles servent par contre à la construction du profil d'exactitude utilisé pour l'interprétation des résultats, elles sont donc une étape intermédiaire obligatoire pour pouvoir évaluer si la procédure analytique va vraisemblablement pouvoir ou non quantifier avec une exactitude suffisante chacune des quantités inconnues.



## 2.6 Erreur totale

Selon les profils d'erreur totale élucidés dans les figures (48) et (49) on peut conclure que tous les niveaux de concentration du Paracétamol ainsi que de la Caféine sont inclus dans l'intervalle de validité, vu qu'ils présentent des erreurs totales relatives acceptables ne dépassant pas les limites d'acceptabilité prédéfinies (5%) avec une erreur maximale de 2,416% pour le paracétamol et de 2,538% pour la caféine, observées pour les plus faibles niveaux de concentration.

## 2.7 Profil d'exactitude

En se référant aux profils d'exactitude présentés dans la figure (50) pour le Paracétamol et la figure (51) pour la Caféine, on considère que la méthode utilisée dans ce présent travail est valide sur l'intervalle de dosage allant de 40 à 60 mg/L pour le Paracétamol et de 5,2 à 7,8 mg/L pour la Caféine, et ce du fait que dans les deux cas les limites de l'intervalle de tolérance ne sortent pas des limites d'acceptabilité ( $\pm 5\%$ ) sur l'ensemble des concentrations étudiées pour les deux principes actifs. Le domaine de validité est donc compris entre les niveaux de concentrations 80% et 120%. Cela signifie que l'analyste peut garantir que la méthode est capable de produire une proportion de 95% des résultats acceptables et seulement 5% des futures mesures d'échantillons inconnus peuvent être en dehors de ces limites.

## 2.8 Limites de quantification et intervalle de dosage

### ➤ Paracétamol

La méthode est considérée valide dans l'intervalle **[40 ; 60] mg/L** pour lequel le profil d'exactitude est inclus dans les limites d'acceptation choisies [ -5% ; +5% ] correspondant à des teneurs théoriques de **[400 ; 600] mg** suivant les dilutions utilisées dans notre méthode.

### ➤ Caféine

La méthode est considérée valide dans l'intervalle **[5,2 ; 7,8] mg/L** pour lequel le profil d'exactitude est inclus dans les limites d'acceptation choisies [ -5% ; +5% ] correspondant à des teneurs théoriques de **[52 ; 78] mg** suivant les dilutions utilisées dans notre méthode.



## 2.9 Linéarité

La linéarité a été évaluée à partir de cinq niveaux de concentration (80%, 90%, 100%, 110%, 120%) avec trois répétitions indépendantes pour chaque niveau de concentration.

La droite de régression linéaire obtenue pour le paracétamol est sous forme  $y = 1,004x + 0,04663$ , où 1,004 représente la pente de la droite et 0,04663 l'ordonnée à l'origine, avec un coefficient de détermination  $R^2$  de 0,9985, signifiant ainsi que la variabilité totale de la concentration prédite est expliquée à 99,85% par la variabilité de la concentration introduite de l'échantillon.

La droite de régression linéaire obtenue pour la caféine est sous forme  $y = 0,8926x + 0,715$ , où 0,8926 représente la pente de la droite et 0,715 l'ordonnée à l'origine.  $y$  représente la concentration prédite et  $x$  la concentration introduite en mg/L, avec un coefficient de détermination  $R^2$  de 0,9931, signifiant ainsi que la variabilité totale de la concentration prédite est expliquée à 99,31% par la variabilité de la concentration introduite de l'échantillon.

Le coefficient de détermination linéaire de la relation existante entre la concentration introduite et la concentration prédite est très acceptable (pour le paracétamol et pour la caféine). Bien que ce coefficient ne nous renseigne que très peu sur la qualité de la régression, sa valeur peut nous orienter, surtout par le fait qu'elle est très proche de 1.

L'étude statistique de la linéarité pour nos deux molécules, illustrée par les tableaux (LIII et LIV), a confirmé que la pente est statistiquement non différente de 1 et que l'ordonnée à l'origine est comparable statistiquement avec 0 ce qui prouve la validité de la régression et de la linéarité.

## 2.10 Comparaison avec d'autres études

L'article intitulé « Validated LC method for simultaneous analysis of Paracetamol and Caffeine in model tablet formulation » élaboré par Boyka TSVETKOVA, Bistra KOSTOVA, Ivanka PENCHEVA, Alexander ZLATKOV, Dimitar RACHEV et Plamen PEIKOV, et publié dans « International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences » en 2012, décrit le développement et la validation d'une procédure analytique par Chromatographie Liquide à Haute Performance pour la détermination simultanée du Paracétamol et de la Caféine dans une formulation modèle de comprimé contenant 500 mg et 65 mg des deux principes actifs, respectivement.



Cette procédure analytique a été appliquée à des tests d'identification, de pureté et de dosage conformément aux exigences de la Pharmacopée Européenne et à l'ICH, et elle a été validée pour les paramètres analytiques suivants : spécificité, linéarité, précision, exactitude, LOD, LOQ et robustesse.

La séparation a été réalisée sur une colonne C18 à un débit de 1,5 ml/min, avec une détection UV à 220 nm. La phase mobile était composée d'un tampon phosphate 1mM pH = 3,0 – acétonitrile (85 :15 v/v) contenant 0,2% de triéthylamine (v/v).

Il a été rapporté que cette procédure a été utilisée avec succès pour l'analyse de routine.

Les résultats obtenus par notre méthode sont assez comparables à ceux publiés dans cet article.

Un autre article intitulé « Development and Validation of a Simple RP-HPLC Method for Determination of Caffeine in Pharmaceutical Dosage Forms » décrivant une étude visant à développer et à valider une méthode simple pour la détermination de la caféine dans les formes pharmaceutiques par la RP-HPLC a été rédigé par Sharmin Reza Chowdhury, Mahfuza, Maleque et Mahbul Hoque Shihan, et publié en 2012.

La détermination chromatographique a été effectuée à température ambiante, sur une colonne C18 en phase inversée, en utilisant un mélange d'eau et de méthanol (60 ; 40) comme phase mobile, à un débit de 1ml/min avec détection UV à 272nm.

La validité de la méthode de dosage de la caféine combinée avec le paracétamol a été démontrée sur tout l'intervalle de dosage conformément aux exigences de l'ICH.

Les résultats obtenus dans notre méthode concernant le dosage de la caféine sont comparables avec ceux retrouvés dans l'étude publiée dans cet article.

Toutefois, la démarche statistique suivie surtout pour la démonstration de l'exactitude n'est pas la même et au lieu de traiter chaque paramètre seul, nous avons utilisé le profil d'exactitude, ceci étant très bénéfique vu qu'il facilite la prise des décisions.

### **2.11 Commentaire sur le profil d'exactitude**

Le Profil d'exactitude, qui intègre de façon statistiquement correcte dans un seul graphique l'ensemble des éléments essentiels de la validation, à savoir le biais, la fidélité, le risque et les limites de quantification, son emploi nous a permis non seulement de simplifier l'approche de la validation de notre méthode mais aussi de contrôler le risque associé à son utilisation en



calculant tous les paramètres de validation et divers critères complémentaires comme la limite de quantification.

---

---

## **Conclusion**

---

---

## Conclusion

Les décisions quotidiennes prises au sujet de la libération d'un lot d'un produit de santé dépendent directement de la confiance qu'on a sur les résultats générés. C'est pourquoi, en industrie pharmaceutique, toute méthode utilisée au contrôle qualité des médicaments, doit être validée conformément aux normes internationales.

La validation analytique est en effet, une étape ultime du cycle de vie d'une méthode analytique ; c'est la toute dernière phase où la fiabilité et donc l'exactitude des résultats qui seront générés par ces méthodes peut être évaluée avant leur mise en routine, elle représente ainsi un critère essentiel de l'assurance qualité mais également une exigence réglementaire.

Notre étude visait à optimiser et à valider la méthode de dosage simultané de deux principes actifs (Paracétamol et Caféine) dans des comprimés, et ce par Chromatographie Liquide à Haute Performance, en utilisant le profil d'exactitude comme outil de décision ; cette démarche consiste à évaluer l'exactitude d'une manière globale au lieu de mesurer les critères statistiques séparément.

Selon les résultats obtenus, on constate que notre méthode répond aux exigences élaborées dans l'approche harmonisée ; elle est spécifique, linéaire et exacte dans l'intervalle de concentration étudié [40 ; 60] mg/L pour le paracétamol et dans l'intervalle de concentration étudié [5,2 ; 7,8] mg/L pour la caféine, avec une proportion  $\beta = 95\%$  de mesures dans les limites d'acceptabilité  $\pm 5\%$ .

On peut donc conclure qu'elle est valide et qu'elle peut être utilisée en routine par les laboratoires de contrôle qualité pharmaceutique en toute confiance.

---

## **Références bibliographiques**

---

1. Driad Y. Stabilité du paracétamol: application à un sachet produit en industrie pharmaceutique: UHP-Université Henri Poincaré; 2009.
2. Bertolini A, Ferrari A, Ottani A, Guerzoni S, Tacchi R, Leone S. Paracetamol: new vistas of an old drug. *CNS drug reviews*. 2006;12(3-4):250-75.
3. Sneader W. *Drug discovery: a history*: John Wiley & Sons; 2005.
4. Silverman M, Lydecker M, Lee P. *Bad medicine: the prescription drug industry in the third world*: Stanford University Press; 1992.
5. Tremblay P-Y. Mécanismes d'action et de toxicité de l'acétaminophène. *Bulletin d'information toxicologique*. 2011;27(1).
6. Hassani F, Djaroun T. Une étude théorique comparative de l'aspirine et du paracétamol: UMMTO; 2016.
7. <https://pharmawiki.in/paracetamol-child-adults-dosage-weight-calculator-uses-side-effects-structure/paracetamol-structure-acetaminophen-chemical-structure/> consulté le 3 février 2021.
8. Pharmacopée Européenne 7ème édition.
9. Le Garrec S, Burnat P, Gentes P. Le paracétamol. *Lyon pharmaceutique*. 1994;45(4):227-42.
10. Behera S, Ghanty S, Ahmad F, Santra S, Banerjee S. UV-visible spectrophotometric method development and validation of assay of paracetamol tablet formulation. *J Anal Bioanal Techniques*. 2012;3(6):151-7.
11. Forrest JA, Clements J, Prescott L. Clinical pharmacokinetics of paracetamol. *Clinical pharmacokinetics*. 1982;7(2):93-107.
12. Fairbrother JE. Acetaminophen. *Analytical profiles of drug substances*. 3: Elsevier; 1974. p. 1-109.
13. Koshy KT, Lach JL. Stability of aqueous solutions of N-acetyl-p-aminophenol. *Journal of pharmaceutical sciences*. 1961;50(2):113-8.
14. Antoine T. Suivi de lancement d'un nouvel antalgique de palier II: association fixe de paracétamol-tramadol 2005.
15. Prescott L. Kinetics and metabolism of paracetamol and phenacetin. *British journal of clinical pharmacology*. 1980;10(S2):291S-8S.
16. Gibb IA, Anderson B. Paracetamol (acetaminophen) pharmacodynamics: interpreting the plasma concentration. *Archives of disease in childhood*. 2008;93(3):241-7.
17. Dangoumau J, Moore N, Molimard M, Fourrier-Reglat A, Latry K, Haramburu F, et al. *Pharmacologie générale*. Bordeaux: Université Victor Segalen. 2006.
18. Bannwarth B, Péhourcq F. [Pharmacologic basis for using paracetamol: pharmacokinetic and pharmacodynamic issues]. *Drugs*. 2003;63 Spec No 2:5-13.
19. Rawlins M, Henderson D, Hijab A. Pharmacokinetics of paracetamol (acetaminophen) after intravenous and oral administration. *European journal of clinical pharmacology*. 1977;11(4):283-6.
20. Aronoff DM, Oates JA, Boutaud O. New insights into the mechanism of action of acetaminophen: its clinical pharmacologic characteristics reflect its inhibition of the two prostaglandin H<sub>2</sub> synthases. 2006.
21. Anderson BJ. Paracetamol (Acetaminophen): mechanisms of action. *Pediatric Anesthesia*. 2008;18(10):915-21.
22. Ayoub SS, Flower RJ. Loss of hypothermic and anti-pyretic action of paracetamol in cyclooxygenase-1 knockout mice is indicative of inhibition of cyclooxygenase-1 variant enzymes. *European journal of pharmacology*. 2019;861:172609.
23. BARRIERE D, ESCHALIER A, MALLET C. Le paracétamol, de nouvelles cibles pour un vieux médicament. *La lettre de l'institut UPSA de la douleur*. 2010;33:88.

24. Sandrini M, Romualdi P, Vitale G, Morelli G, Capobianco A, Pini LA, et al. The effect of a paracetamol and morphine combination on dynorphin A levels in the rat brain. *Biochemical pharmacology*. 2001;61(11):1409-16.
25. Sprott H, Shen H, Gay S, Aeschlimann A. Acetaminophen may act through  $\beta$  endorphin. *Annals of the rheumatic diseases*. 2005;64(10):1522-.
26. Barriere DA, Mallet C, Blomgren A, Simonsen C, Daulhac L, Libert F, et al. Fatty acid amide hydrolase-dependent generation of antinociceptive drug metabolites acting on TRPV1 in the brain. *PLoS One*. 2013;8(8):e70690.
27. Dictionnaire Vidal. 2018.
28. Eschalier A. La douleur : Guide pharmacologique et thérapeutique.
29. Moneret-Vautrin D, Morisset M, Humbert J, Beaudouin E, Tupin N. Acetaminophen-induced rhabdomyolysis. *Allergy (Copenhagen)*. 1999;54(10):1115-6.
30. McCrae J, Morrison E, MacIntyre I, Dear J, Webb D. Long-term adverse effects of paracetamol—a review. *British journal of clinical pharmacology*. 2018;84(10):2218-30.
31. Buxeraud J. Le paracétamol: ami ou ennemi? *Actualités pharmaceutiques*. 2015;546(54):1.
32. van den Bersselaar LR, van den Brule JMD, van der Hoeven JG. Acetaminophen Use Concomitant with Long-Lasting Flucloxacillin Therapy: A Dangerous Combination. *European Journal of Case Reports in Internal Medicine*. 2020;7(7).
33. Toes MJ, Jones AL, Prescott L. Drug interactions with paracetamol. *American journal of therapeutics*. 2005;12(1):56-66.
34. Pinson GM, Beall JW, Kyle JA. A review of warfarin dosing with concurrent acetaminophen therapy. *Journal of pharmacy practice*. 2013;26(5):518-21.
35. Leong D, Wu PE. Warfarin and acetaminophen interaction in a 47-year-old woman. *CMAJ*. 2020;192(19):E506-E8.
36. KhabazianZadeh F, Kazemi T, Nakhaee S, Ng PC, Mehrpour O. Acetaminophen poisoning-induced heart injury: a case-based review. *Daru : journal of Faculty of Pharmacy, Tehran University of Medical Sciences*. 2019;27(2):839-51.
37. Tittarelli R, Pellegrini M, Scarpellini M, Marinelli E, Bruti V, Di Luca N, et al. Hepatotoxicity of paracetamol and related fatalities. *Eur Rev Med Pharmacol Sci*. 2017;21(1 Suppl):95-101.
38. Arnaud M. The pharmacology of caffeine. *Progress in drug research/Fortschritte der Arzneimittelforschung/Progrès des recherches pharmaceutiques*. 1987:273-313.
39. Jaussaud P. La caféine: esquisse d'une histoire phytochimique. 2016.
40. FRANCE ADAD. La caféine et ses cousins Novembre 2020 [Available from: [https://www.academie-agriculture.fr/sites/default/files/publications/encyclopedie/final\\_s08-01-15\\_cafeine\\_et\\_ses\\_cousins.pdf](https://www.academie-agriculture.fr/sites/default/files/publications/encyclopedie/final_s08-01-15_cafeine_et_ses_cousins.pdf) consulté le 28 février 2021.
41. Zajac MA, Zakrzewski AG, Kowal MG, Narayan S. A novel method of caffeine synthesis from uracil. *Synthetic communications*. 2003;33(19):3291-7.
42. González-Calderón D, González-Romero C, González-González CA, Fuentes-Benités A. Synthesis of caffeine from theobromine: Bringing back an old experiment in a new setting. *Educación Química*. 2015;26(1):9-12.
43. Aniszewski T. *Alkaloids-Secrets of Life:: Alkaloid Chemistry, Biological Significance, Applications and Ecological Role*: Elsevier; 2007.
44. [Available from: <https://www.hielscher.com/wp-content/uploads/Chemical-structure-caffeine-opt.png> consulté le 12 février 2021.
45. Santé OMS [Available from: <http://www.intox.org/databank/documents/supplem/supp/sup2f.htm> consulté le 5 mars 2021.
46. Khazaeli P, Pardakhty A, Shoorabi H. Caffeine-loaded niosomes: characterization and in vitro release studies. *Drug delivery*. 2007;14(7):447-52.

47. Arnaud MJ. Components of Coffee. Caffeine, coffee, and health. 1993;43.
48. BONNIN A-L. AUTOUR DU CAFÉ: Université Angers; 2016.
49. Magkos F, Kavouras SA. Caffeine use in sports, pharmacokinetics in man, and cellular mechanisms of action. *Critical reviews in food science and nutrition*. 2005;45(7-8):535-62.
50. Astrid Nehlig SPHA, ASSOCIATE EDITOR. Interindividual Differences in Caffeine Metabolism and Factors Driving Caffeine Consumption [Available from: <https://pharmrev.aspetjournals.org/content/70/2/384/tab-figures-data> consulté le 8 mars 2021.
51. Fredholm BB, Bättig K, Holmén J, Nehlig A, Zwartau EE. Actions of caffeine in the brain with special reference to factors that contribute to its widespread use. *Pharmacological reviews*. 1999;51(1):83-133.
52. Girard P. Les stimulants : en vente partout, près de chez vous. *Le Médecin du Québec*, volume 42, numéro 1. janvier 2007.
53. Nehlig A, Daval JL, Debry G. Caffeine and the central nervous system: mechanisms of action, biochemical, metabolic and psychostimulant effects. *Brain research Brain research reviews*. 1992;17(2):139-70.
54. Huyghe A. Bienfaits et limites de la consommation de caféine: Faculté des Sciences Pharmaceutiques et Biologiques de Lille; 2014.
55. Marx B, Scuvée É, Scuvée-Moreau J, Seutin V, Jouret F. Mécanismes de l'effet diurétique de la caféine. *médecine/sciences*. 2016;32(5):485-90.
56. Nehlig A. Effets physiologiques du café et santé humaine. Une revue. *Cahiers Agricultures*. 2012;21(2-3):197-207 (1).
57. Astrid N. La caféine peut-elle être considérée comme une drogue de dépendance ? *Le Courrier des addictions* (3), n° 4.
58. Debry G. *Le café et la santé*: John Libbey Eurotext; 1993.
59. Costentin J, Delaveau P. *Café, thé, chocolat: Les bienfaits pour le cerveau et le corps*: Odile Jacob; 2010.
60. van Dam RM, Hu FB, Willett WC. Coffee, caffeine, and health. *New England Journal of Medicine*. 2020;383(4):369-78.
61. Beaumont M. Gestion de la vigilance au poste de travail: intérêt de la caféine à libération prolongée. *Médecine du sommeil*. 2006;3(9):19-24.
62. Sawynok J. Caffeine and pain. *Pain*. 2011;152(4):726-9.
63. Baratloo A, Rouhipour A, Forouzanfar MM, Safari S, Amiri M, Negida A. The role of caffeine in pain management: a brief literature review. *Anesthesiology and pain medicine*. 2016;6(3).
64. Lebouvier T, Carvalho K, Blum D. Caféine et maladie d'Alzheimer Caffeine and Alzheimer's disease : mise au point *Correspondances en Médecine Cognition & Vieillesse*. 2020.
65. Arendash GW, Cao C. Caffeine and coffee as therapeutics against Alzheimer's disease. *Journal of Alzheimer's Disease*. 2010;20(s1):S117-S26.
66. Postuma RB, Anang J, Pelletier A, Joseph L, Moscovich M, Grimes D, et al. Caffeine as symptomatic treatment for Parkinson disease (Cafe-PD): a randomized trial. *Neurology*. 2017;89(17):1795-803.
67. Pickering C, Grgic J. Caffeine and exercise: what next? *Sports Medicine*. 2019;49(7):1007-30.
68. Richmond GH. Action of caffeine and aminophylline as respiratory stimulants in man. *Journal of applied physiology*. 1949;2(1):16-23.
69. Schmidt B, Roberts RS, Davis P, Doyle LW, Barrington KJ, Ohlsson A, et al. Long-term effects of caffeine therapy for apnea of prematurity. *New England Journal of Medicine*. 2007;357(19):1893-902.

70. Schmidt B, Roberts RS, Davis P, Doyle LW, Barrington KJ, Ohlsson A, et al. Caffeine therapy for apnea of prematurity. *New England Journal of Medicine*. 2006;354(20):2112-21.
71. Kua KP, Lee SWH. Systematic review and meta-analysis of clinical outcomes of early caffeine therapy in preterm neonates. *British journal of clinical pharmacology*. 2017;83(1):180-91.
72. Welsh EJ, Bara A, Barley E, Cates CJ. Caffeine for asthma. *Cochrane database of systematic reviews*. 2010(1)
73. Nieber K. The impact of coffee on health. *Planta medica*. 2017;83(16):1256-63.
74. O'Keefe JH, Bhatti SK, Patil HR, DiNicolantonio JJ, Lucan SC, Lavie CJ. Effects of habitual coffee consumption on cardiometabolic disease, cardiovascular health, and all-cause mortality. *Journal of the American College of Cardiology*. 2013;62(12):1043-51.
75. Horrigan LA, Kelly JP, Connor TJ. Immunomodulatory effects of caffeine: friend or foe? *Pharmacology & therapeutics*. 2006;111(3):877-92.
76. Metro D, Cernaro V, Santoro D, Papa M, Buemi M, Benvenga S, et al. Beneficial effects of oral pure caffeine on oxidative stress. *Journal of Clinical & Translational Endocrinology*. 2017;10:22-7.
77. Herman A, Herman AP. Caffeine's mechanisms of action and its cosmetic use. *Skin pharmacology and physiology*. 2013;26(1):8-14
78. Nawrot P, Jordan S, Eastwood J, Rotstein J, Hugenholtz A, Feeley M. Effects of caffeine on human health. *Food Additives & Contaminants*. 2003;20(1):1-30.
79. Lovallo WR, Pincomb GA, Sung BH, Passey RB, Sausen KP, Wilson MF. Caffeine may potentiate adrenocortical stress responses in hypertension-prone men. *Hypertension*. 1989;14(2):170-6.
80. VIDAL. COMPLEMENT ALIMENTAIRE : CAFEINE [Available from: <https://www.vidal.fr/parapharmacie/complements-alimentaires/cafeine-theine.html#:~:text=Les%20pr%C3%A9cautions%20C3%A0%20prendre%20avec,'estomac%2C%20diarrh%C3%A9%2C%20etc> consulté le 10 mars 2021.
81. Musgrave IF, Farrington RL, Hoban C, Byard RW. Caffeine toxicity in forensic practice: possible effects and under-appreciated sources. *Forensic science, medicine, and pathology*. 2016;12(3):299-303.
82. Plamondon L, Dubé P-A. Les boissons énergisantes: entre menace et banalisation: mise à jour du TOPO numéro 2, 2011: Institut national de santé publique du Québec; 2013.
83. Decaestecker A, Glowacki F, Cauffiez C, Blum D, Scherpereel A, Cortot A, et al. Impact de la consommation chronique de caféine sur le risque d'insuffisance rénale aiguë aux sels de platine: à partir d'une cohorte prospective. *Néphrologie & Thérapeutique*. 2020;16(5):295.
84. Desgrez J. Contribution à l'étude de la toxicité de la caféine: nécessité de l'expérimentation physiologique dans l'essai des médicaments: Faculté de médecine de Paris; 1925.
85. Bouvenot G, Sassard J, Montastruc J-L. Pour une utilisation optimale des associations fixes de médicaments. Recommandations de prescription. *Bulletin de l'Académie Nationale de Médecine*. 2017;201(1-3):41-4.
86. Ali Z, Burnett I, Eccles R, North M, Jawad M, Jawad S, et al. Efficacy of a paracetamol and caffeine combination in the treatment of the key symptoms of primary dysmenorrhoea. *Current medical research and opinion*. 2007;23(4):841-51.
87. Derry CJ, Derry S, Moore RA. Caffeine as an analgesic adjuvant for acute pain in adults. *Cochrane Database of Systematic Reviews*. 2014(12).
88. Gonçalves DF, de Carvalho NR, Leite MB, Courtes AA, Hartmann DD, Stefanello ST, et al. Caffeine and acetaminophen association: Effects on mitochondrial bioenergetics. *Life sciences*. 2018;193:234-41.

89. Uddin MS, Wali MW, Al Mamun A, Asaduzzaman M, Amran MS, Rashid M. Assessment of risk involved in the combination medicine of paracetamol and caffeine. *Journal of Advances in Medical and Pharmaceutical Sciences*. 2016;1-8.
90. Tefera M, Geto A, Tessema M, Admassie S. Simultaneous determination of caffeine and paracetamol by square wave voltammetry at poly (4-amino-3-hydroxynaphthalene sulfonic acid)-modified glassy carbon electrode. *Food chemistry*. 2016;210:156-62.
91. Pasquali J. Plan d'assurance qualité (PAQ): un outil de partenariat. 1998.
92. Roda J-M. Peut-on confondre la qualité et l'excellence des produits forestiers? 2000.
93. Aubreton R. Contribution à l'optimisation des méthodologies. La validation analytique et ses limites : pré-requis, exigences, méthodes, application.: Université de Limoges; 2000.
94. ISO N. CEI 17025, Exigences générales concernant la compétence des laboratoires d'étalonnages et d'essais. 2005.
95. Guideline IHT. Validation of analytical procedures: text and methodology. Q2 (R1). 2005;1(20):05.
96. Junior VRA, Gómez-Ríos GA, Tascon M, Queiroz MEC, Pawliszyn J. Analysis of endocannabinoids in plasma samples by biocompatible solid-phase microextraction devices coupled to mass spectrometry. *Analytica chimica acta*. 2019;1091:135-45.
97. Nussbaumer S. Analyse de médicaments produits en milieu hospitalier: applications aux composés non-UV absorbants et cytotoxiques: University of Geneva; 2011.
98. Blanchin M-D. Validation des méthodes d'analyse. Journées Qualité et Chimie. 2010.
99. Belardi RP, Pawliszyn JB. The application of chemically modified fused silica fibers in the extraction of organics from water matrix samples and their rapid transfer to capillary columns. *Water Quality Research Journal*. 1989;24(1):179-91.
100. ISO/IEC. Exigences générales concernant la compétence des laboratoires d'étalonnages et d'essais. 2017;1-5.
101. (IBN) Ibdn. Exactitude (justesse et fidelite) des resultats et methodes de mesure - Partie 2 : Méthode de base pour la détermination de la repetabilite d'une methode de mesure normalisée. ISO; 1996.
102. Guideline for Industry : Text on Validation of Analytical Procedures. ICH; 1995.
103. Guidance for Industry : Q2B Validation of Analytical Procedures: Methodology. ICH; 1996.
104. Christof Finkler FH, Roche. Revision of ICH Q2(R1) and new ICH Q14 guidance : Opportunities for the life cycle management of analytical procedures. 2019.
105. FDA U. Guidance for industry: bioanalytical method validation. US Department of Health and Human Services. Food and Drug Administration, Center for Drug Evaluation and Research (CDER), Center for Veterinary Medicine (CV). 2001.
106. FDA U. Guidance for industry: analytical procedures and methods validation for drugs and biologics. US Department of Health and Human Services, FDA, Center for Drug Evaluation and Research. 2015.
107. (RSSC) FFPRSSC. Guidelines for the Validation of Chemical Methods for the FDA Foods Program, 3rd Edition October 17, 2019:[43 p.].
108. Caporal-Gautier J, Nivet J, Algranti P, Guilloteau M, Histe M. Guide de validation analytique. Rapport d'une commission SFSTP. I: Méthodologie. *STP pharma prat*. 1992;2(4):205-26.
109. Caporal-Gautier J, Nivet J, Algranti P, Guilloteau M, Histe M. Guide de validation analytique. Rapport d'une commission SFSTP. II: Exemples d'application. *STP pharma pratiques*. 1992;2(4):227-39.
110. Chapuzet E, Mercier N, LAPARRA M, LAURENTIE M, NIVET J. Méthodes chromatographiques de dosage dans les milieux biologiques: stratégie de validation. Rapport d'une commission SFSTP. *STP pharma sciences*. 1997;7(3):169-94.

111. Chapuzet E, Mercier N, LAPARRA M, LAURENTIE M, NIVET J. Méthodes chromatographiques de dosage dans les milieux biologiques. Exemple d'application de la stratégie de validation. Rapport d'une commission SFSTP. STP pharma pratiques. 1998;8(2):81-107.
112. Hubert P, Nguyen-Huu JJ, Laurentie M, Mercier N, Muzard G, Nivet C, et al. Validation des procédures analytiques quantitatives harmonisation des démarches; Validation of quantitative analytical procedure, harmonization of approaches. STP pharma prat. 2003;13(3):101-38.
113. DE FONTENAY G, RESPAUD J, PUIG P, LEMAIRE C. Analyse des performances d'une méthode analytique. Evaluation des risques lors d'une utilisation en routine. STP pharma pratiques. 2011;21(2).
114. Feinberg M. Techniques de l'ingénieur Validation des méthodes d'analyse quantitatives au moyen du profil d'exactitude. 2013;1-28.
115. Milla P, Ferrari F, Muntoni E, Sartori M, Ronco C, Arpicco S. Validation of a simple and economic HPLC-UV method for the simultaneous determination of vancomycin, meropenem, piperacillin and tazobactam in plasma samples. Journal of Chromatography B. 2020;1148:122151.
116. Guideline on bioanalytical method validation. EMA European Medicines Agency. 2011.
117. VIAL J. Journée de Formation Scientifique en Spectrométrie Atomique. Définition de la validation de méthode et outils associés. 14 novembre 2006.
118. Jitaru P, Chekri R, Fiscaro P, Guérin T. METHOD VALIDATION BY MEANS OF THE ACCURACY PROFILE: A REALISTIC APPROACH FOR ROUTINE CHEMICAL LABORATORIES. 2016.
119. Feinberg M, Laurentie M. Validation des méthodes d'analyse quantitative par le profil d'exactitude. Numéro special du cahier des techniques de l'Inra. 2010.
120. Pinguet I. Validation analytique: application de la procédure SFSTP 2003-2006 au domaine de la phytothérapie. Sciences pharmaceutiques. 2015:P14.
121. Hubert P, Nguyen-Huu J-J, Boulanger B, Chapuzet E, Cohen N, Compagnon P-A, et al. Validation des procédures analytiques quantitatives: harmonisation des démarches-Partie II. Statistiques. STP pharma prat. 2006;16(2):87-121.
122. Bouabidi A. Etude Critique des Différentes Approches de Validation des Méthodes Analytiques. 2014.
123. Greg Cooper C, MHA Leçons de Base de Contrôle de Qualité au Laboratoire: Bio-Rad Laboratories, Inc. Quality Systems Division; 2009.
124. COURS DE CHROMATOGRAPHIE LIQUIDE [Available from: [http://www.chimie-briere.com/CHROMATO/Cours\\_1/Cours%20\\_1.pdf](http://www.chimie-briere.com/CHROMATO/Cours_1/Cours%20_1.pdf) consulté le 31 mai 2021.
125. Chromatographes HPLC [Available from: <http://www.tunlab.com/gamme-de-produit/laboratoire/equipement/chromatographes-hplc-gc/> consulté le 31 mai 2021.
126. HPLC Principe et appareillage [Available from: <https://sms-bse-bgb.discip.ac-caen.fr/spip.php?article475> consulté le 15 mai 2021.
127. Ben Saad L. Study of the separation of fluoroquinolones using HPLC: Application to the study of their degradation by gamma radiation; Etude de la separation des fluoroquinolones par HPLC: Application a l'etude de leur degradation par rayonnement Gamma. 2013.
128. Quelles sont les bases de l'HPLC [Available from: <http://chimactiv.agroparistech.fr/fr/bases/hplc> consulté le 28 mai 2021.
129. Rouessac F, Rouessac A, Cruché D. Analyse chimique-6e éd.: Méthodes et techniques instrumentales: Dunod; 2004.
130. CAUDE M, JARDY A. Chromatographie en phase liquide: Appareillage et applications.

- Techniques de l'ingénieur Analyse et caractérisation. 1995;2(P1456):p1456. 1-p. 15.
131. Chromatographie Liquide Haute Performance HPLC [Available from: <https://chimieanalytique.com/chromatographie-liquide-haute-performance-hplc/> consulté le 22 mai 2021.
132. LaCourse ME, LaCourse WR. General instrumentation in HPLC. Liquid Chromatography: Elsevier; 2017. p. 417-29.
133. HPLC Column Ascentis C8, 5 µm, 150 x 4.6 mm [Available from: <https://www.analytics-shop.com/gb/su581424-u-gb.html> consulté le 11 mai 2021.
134. CHROMATOGRAPHIE LIQUIDE. Available from: <https://www.farm.ucl.ac.be/tpao/tpintegres/HPLC/documents/chapitre4.pdf>. Consulté le : 12 mai 2021
135. Douglas A. Skoog DMW, F. James Holler. CHIMIE ANALYTIQUE
136. Mahuzier G, Hamon M, Ferrier D, Prognon P. Chimie analytique. vol. 2, méthodes de séparation.
137. CAUDE M, JARDY A. Chromatographie en phase, liquide: Théorie et méthodes de séparation. Techniques de l'ingénieur Analyse et caractérisation. 1994;2(P1455):p1455. 1-p. 44.
138. Mendham J. Analyse chimique quantitative de Vogel: De Boeck Supérieur; 2005.
139. NOTIONS FONDAMENTALES DE CHROMATOGRAPHIE [Available from: <https://www.chemphys.fr/mpb/teach/chromato1/chromato1.pdf> consulté le 15 mai 2021.
140. La chromatographie liquide [Available from: <https://moodle.umontpellier.fr/pluginfile.php/568339/course/overviewfiles/polycop%20cours%20chromato%20liquide.pdf?forcedownload=1> consulté le 30 mai 2021.
141. [Available from: <https://folk.uib.no/nkjsm/KJEM230/vdterms/index.html> consulté le 23 mai 2021.
142. AOUDJEGHOUT R, AZIDANE A, KAHLOUCHE M. Etude de l'impact de la sécabilité des comprimés sur l'uniformité de la masse et de la teneur en principe actif; cas pratique: Furosémide 2020.
143. Méthodes d'étalonnage pour la quantification des polluants [Available from: <https://www.inrs.fr/dms/inrs/PDF/metropol-analyse-et-alonnage/metropol-analyse-et-alonnage.pdf> consulté le 3 juin 2021.

---

## ANNEXES

---

---

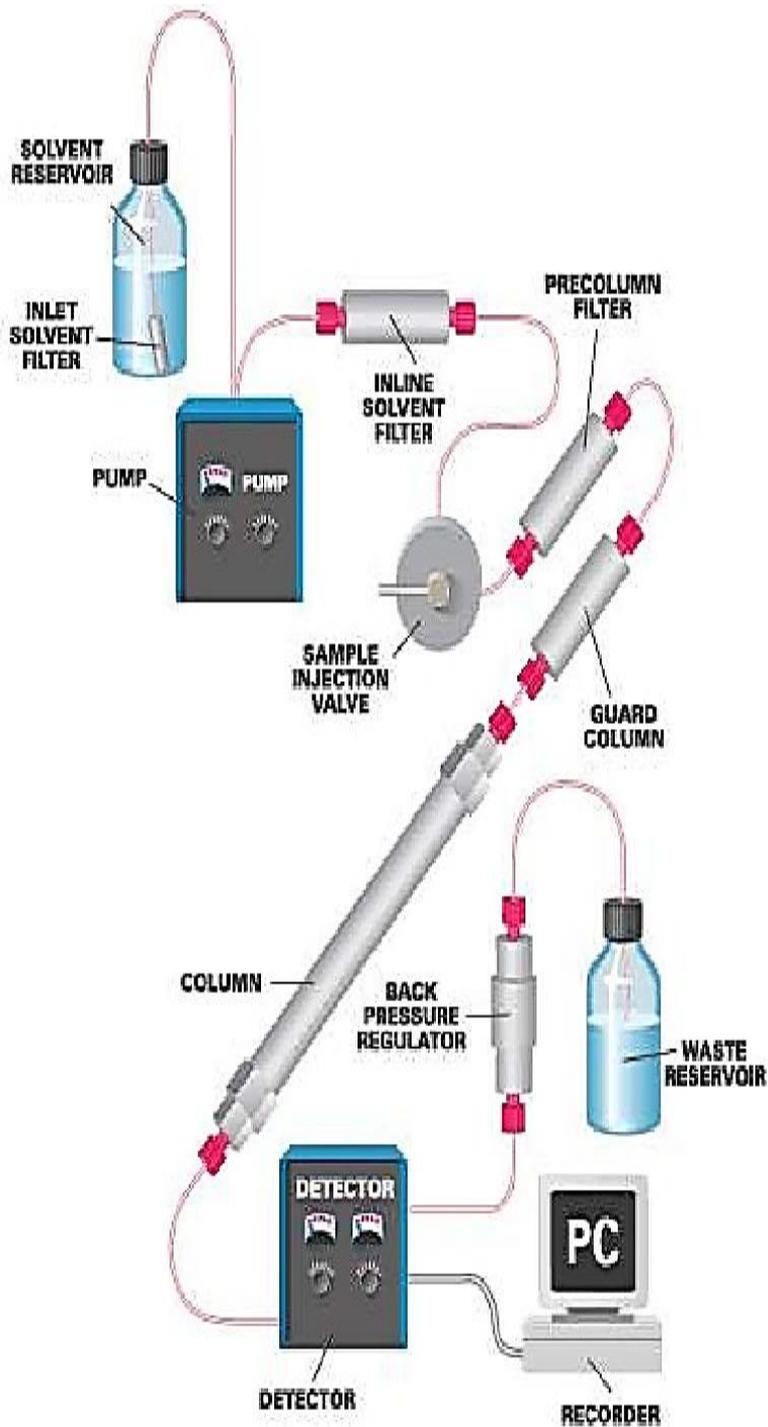
---

**ANNEXE I**  
**CHROMATOGRAPHIE LIQUIDE**  
**HAUTE PERFORMANCE**  
**HPLC**

---

---

# HPLC



## Généralités

La chromatographie est une méthode physico-chimique qui permet la séparation ou la purification d'un ou de plusieurs composés d'un mélange en vue de leur identification et de leur quantification. Plusieurs techniques existent, cependant celle de la chromatographie liquide à haute performance reste la plus utilisée actuellement du fait de son large domaine d'application (analyse des composés thermosensibles ou de masses moléculaires à la fois très grandes et même polaires). Elle a permis de réaliser des analyses qui n'étaient auparavant pas possibles avec les techniques de chromatographie sur couche mince ou en phase gazeuse.

A l'origine la chromatographie en phase liquide se faisait sur des colonnes en verre. Le liquide traversait la phase stationnaire par gravité ou sous faible pression, puis pour augmenter le débit, des manipulations ont été réalisées sous pression plus forte. C'est ce que l'on a appelé la chromatographie liquide sous haute pression (HPLC). Très rapidement le P de pression est devenu le P de performance lorsque l'on a optimisé la technique (diminution de la taille de particules de la phase stationnaire, régularité de cette phase...).

## Principe

C'est une technique chromatographique, dont le principe de base de la séparation est le passage d'un liquide (phase mobile) au travers d'une colonne (support solide = phase stationnaire).

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, les composés en solution se répartissent alors suivant leur affinité entre la phase mobile et la phase stationnaire. En sortie de colonne grâce à un détecteur approprié les différents solutés sont caractérisés par des pics chromatographiques. L'ensemble de ces pics enregistrés est appelé chromatogramme. [124-127]

# Appareillage

Un appareil d'HPLC comprend différents modules :

- Un réservoir à solvant contenant la phase mobile ;
- Un système de pompage ;
- Un injecteur ;
- Une colonne ;
- Un détecteur ;
- Un système d'acquisition de données.

Ces différents compartiments sont reliés par des canalisations courtes et de très faible diamètre interne, ces dernières sont soit à base d'acier inoxydable ou de polymères de polyether ether ketone, elles ont pour rôle d'assurer la circulation de la phase mobile. [124-127]

## Réservoir de la phase mobile

Il s'agit le plus souvent d'une bouteille en verre dans laquelle plonge un tube avec une extrémité filtrante en téflon. Il contient la phase mobile en quantité suffisantes. S'il est nécessaire, le dégazage peut se faire à l'aide des dispositifs de dégazage par agitation puis conservation du solvant sous atmosphère d'hélium.

**Tableau 1 :** Pouvoir d'élution du solvant selon le type de chromatographie liquide pour un soluté apolaire. [128]

Phase stationnaire polaire	Solvants classés par polarité croissante	Phase stationnaire apolaire
	Hexane Toluène Trichloroéthane Dichlorométhane Éther Acétate d'éthyle Acétonitrile Méthanol Eau	

## Phase mobile

En chromatographie dite en phase normale, où la phase stationnaire est polaire, une phase mobile peu ou pas polaire est utilisée. Le contraire est correct en cas de chromatographie à polarité de phase inversée.

En variant la composition de la phase mobile, et donc sa polarité, on fait varier le coefficient de distribution  $k$  ce qui influence le pouvoir d'élution.

Différents types d'interactions entre les molécules de solvant et de soluté existent, elles peuvent être ioniques, diélectriques, de dispersion ou par liaisons hydrogène. [129]

## Pompe

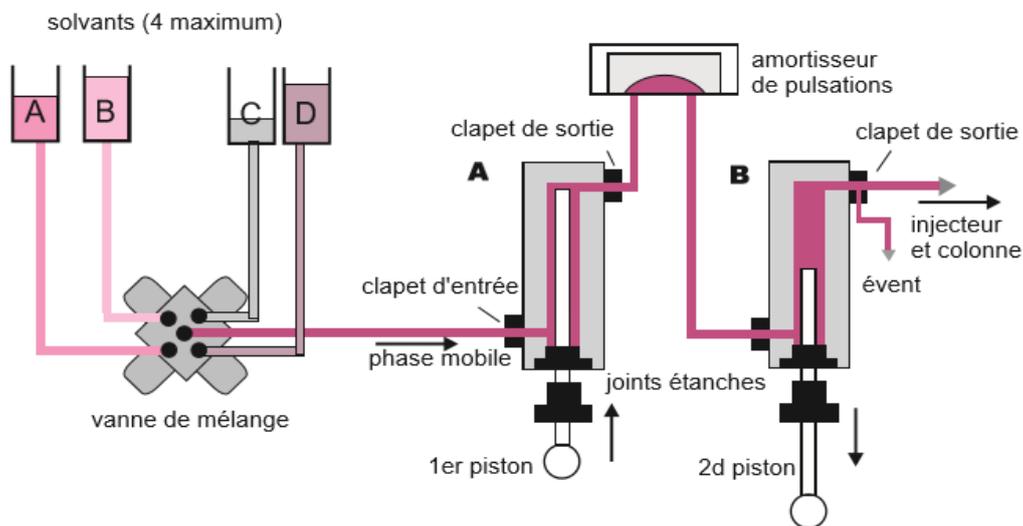
La pompe force la phase mobile à traverser la colonne dont la phase fixe très compacte crée une perte de charge qui peut atteindre 2 mPa en utilisation courante. Le maintien d'une pression extrêmement élevée en amont de l'injecteur permet de vaincre cette perte de charge. La pression à imposer dépend des facteurs suivants :

- ❖ Débit de la phase mobile ;
- ❖ Viscosité de l'éluant ;
- ❖ Taille des grains de la phase stationnaire ;
- ❖ Géométrie de la colonne.

Les pompes doivent répondre aux exigences suivantes :

- ❖ Fournir des pressions élevées jusqu'à 400 bars ;
- ❖ Débit stable, non pulsé et réglable de 0,1 à 10 ml/min avec un contrôle meilleur que 0,5 % ;
- ❖ Résistance à la corrosion quel que soit le solvant utilisé.

Des pompes à deux pistons fonctionnant en mode série ou en mode parallèle ont été conçues, et ce afin d'éviter un flux pulsé.



**Figure :** Principe de fonctionnement d'une pompe à deux têtes en série. [129]

## Injecteurs

L'injection de l'échantillon directement dans la colonne, à l'aide d'une seringue à travers un septum, n'est pas utilisée vu les pressions élevées en tête de colonne. [130]

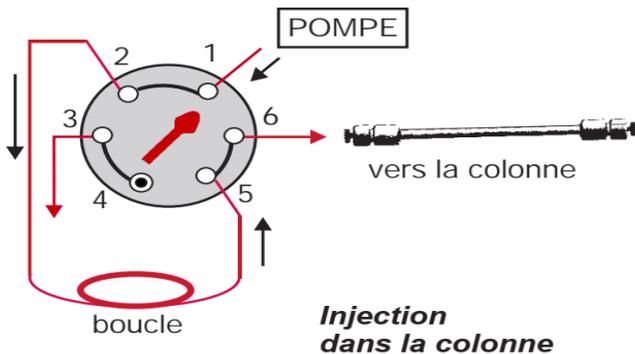
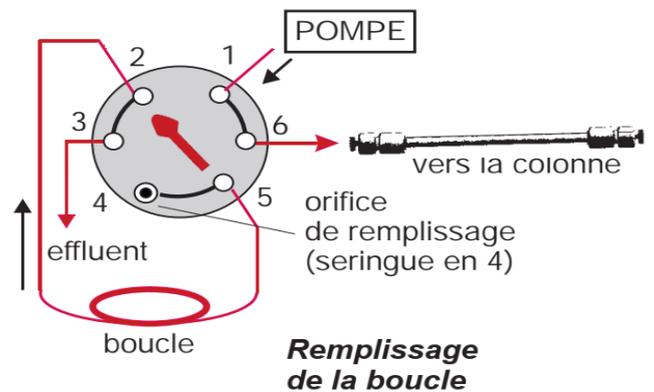
La méthode d'injection, la plus couramment utilisée, permettant d'introduire l'échantillon dans le système HPLC sans le dépressuriser, est basée sur une boucle d'échantillonnage. Cette dernière pouvant être placée dans ou hors du circuit d'écoulement de la phase mobile, par rotation de la vanne :



**Figure :** boucle pour vanne d'injection. [131]

**Figure :** vanne d'injection. [131]

- ❖ En position de chargement (load position) : l'échantillon est introduit dans la boucle (dont le volume est compris entre 5 et 500 µl) à pression atmosphérique. Pour de meilleurs résultats, un volume d'échantillon 2 à 5 fois supérieur au volume d'injection est introduit dans la boucle, afin de s'assurer de l'absence de traces de l'échantillon précédent.



- ❖ En position d'injection (inject position) : la boucle est reliée au flux de la phase mobile à haute pression, l'échantillon est ainsi entraîné vers la colonne. [132]

L'injection de l'échantillon peut être effectuée manuellement, mais des échantillonneurs automatiques programmables, appelés « auto-injecteurs » ou également « passeurs d'échantillon » existent, où des échantillons sont mis dans des vials placés dans des racks, une aiguille entraînée par un pousse-seringue aspire un volume préprogrammé d'échantillon de la position spécifiée. Ces auto-injecteurs permettent d'avoir une amélioration de la reproductibilité d'injection, et donc de la précision du système HPLC, en plus de la possibilité de traitement des dizaines ou des milliers d'échantillon à la fois, qu'ils confèrent. [132]

## Colonnes

La colonne se présente sous forme d'un tube souvent en acier inoxydable rempli par une phase stationnaire. Elle est considérée comme le cœur du système HPLC.

La qualité d'une séparation étant dépendante de la colonne chromatographique, le choix de cette dernière semble être d'une importance capitale.

Le volume mort des connexions et raccords doit être le plus faible possible. Des colonnes de garde remplies de la même phase stationnaire que la colonne analytique, permettent de retenir certaines impuretés et d'éviter donc le colmatage de la colonne, prolongeant ainsi son efficacité et sa durée de vie. [130]



Figure : colonnes HPLC. [133]

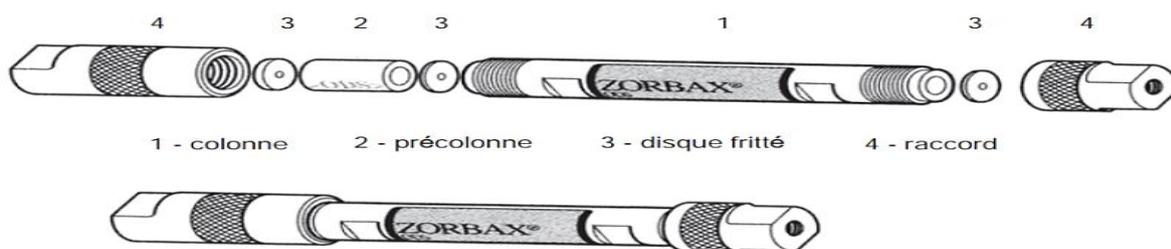


Figure : colonne standard et précolonne de l'HPLC. [129]

## Phase stationnaire

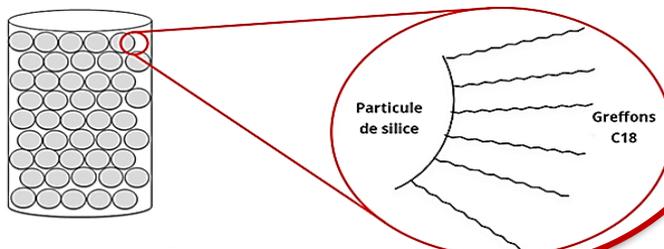
Des phases stationnaires de nature et de structures diverses ont été conçues, dans le but d'arriver à une bonne résolution chromatographique et donc à une meilleure efficacité. [129]

### Phase normale (gel de silice)

- Solide amorphe de formule  $\text{SiO}_2(\text{H}_2\text{O})_n$  (avec  $n$  très proche de 0) ;
- Polymère inorganique réticulé, très polaire comportant des groupements silanols  $\text{Si-OH}$  en nombre variable ;
- Afin de remplir la colonne de manière homogène, le gel de silice est préparé soit sous forme de microparticules sphériques soit d'un monolithe poreux ;
- Mécanisme d'action : adsorption. [129]

### Phase inverse (silice greffée)

- Liquide immobilisé, obtenu par fixation de molécules organiques par des liaisons covalentes sur les groupements silanols du gel de silice.
- De nature hydrophobe, elle est à l'origine de la chromatographie de partage à polarité de phase inversée. [129]



## Détecteurs

L'objectif de la chromatographie étant de repérer la présence ou de doser un composé, selon la nature duquel, un détecteur approprié a été choisi. Le passage de l'effluent de la colonne à travers le détecteur se traduit par un signal.

Les principales caractéristiques d'un détecteur idéal sont :

- ✓ Grande fiabilité, facilité d'emploi, bonne stabilité et une sensibilité élevée ;
- ✓ Linéarité de la réponse ;
- ✓ Délai de réponse réduit ;
- ✓ Non-destructibilité de l'échantillon ;
- ✓ Faible volume mort. [132]

### Les principaux détecteurs utilisés en HPLC

#### Spectrophotomètre UV-visible (détecteurs par absorption dans l'ultraviolet et le visible)

Mesure de l'absorbance  $A$  de(s) analyte(s) à une ou plusieurs longueurs d'ondes  $\lambda$  dans l'UV ou le visible. La phase mobile ne devant pas ou très peu absorber de rayonnement, la détection est fondée sur la loi de Beer-Lambert  $A = \epsilon.l.C$  ( $\epsilon$  : coefficient d'absorption molaire /  $l$  : longueur du trajet optique /  $C$  : concentration du soluté dans l'effluent.)

#### Réfractomètre différentiel

Mesure la différence de l'indice de réfraction du faisceau lumineux de l'effluent en sortie de la colonne par rapport à la phase mobile seule. La différence apparaît sous forme d'un pic dans le chromatogramme.

#### Spectrofluorimètre

Détection de composés fluorescents ; absorbant et émettant une lumière. L'intensité de la fluorescence est linéaire en fonction de la concentration, aux faibles valeurs de celle-ci.

#### Conductimètre

Détection de composés ionisés en association avec la chromatographie ionique. Un signal est généré lors du passage des analytes conducteurs à travers le détecteur.

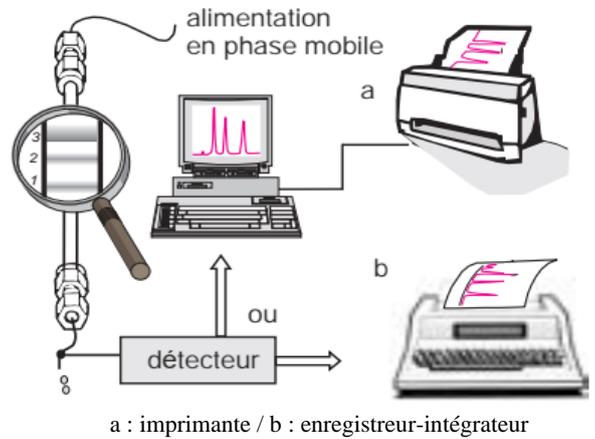
#### Electrochimie

Détection basée sur les propriétés oxydo-réductrices des analytes, en mesurant le courant associé à l'oxydation ou à la réduction de ces derniers une fois élués de la colonne. [129, 132]

Outre les détecteurs cités précédemment, il existe différents types de couplage telle que la spectrométrie de masse, la résonance magnétique nucléaire, et les détecteurs de radioactivité.

## Enregistreur-intégrateurs

Les variations en fonction du temps, du signal électrique transmis par le détecteur, sont traduites sous forme d'un chromatogramme, présenté en temps réel, ou en différé à partir des données mémorisées dans un micro-ordinateur. Le chromatogramme est obtenu avec un enregistreur graphique ou un enregistreur-intégrateur, actuellement des logiciels de chromatographie recalculent les valeurs obtenues pour être mises au format désiré qui sera par la suite imprimé. [129]



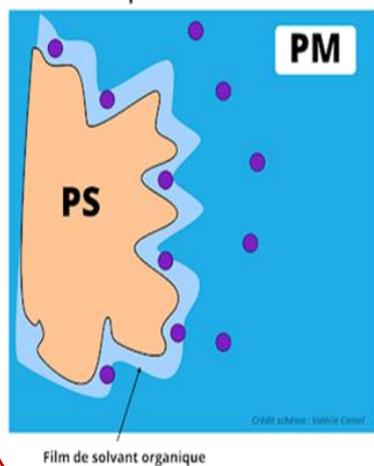
## Conteneur de déchets

Après passage à travers le détecteur, l'éluant est dirigé vers un récipient à déchets, qui doit être étiqueté convenablement pour une élimination éventuelle par des moyens acceptables pour l'environnement. Si le mode est isocratique (éluant de composition fixe) un dispositif de recyclage de la phase mobile peut être mis en place après le détecteur, il renvoie le solvant propre vers le réservoir de phase mobile. [132]

# Les principales chromatographies liquides

## La chromatographie de partage

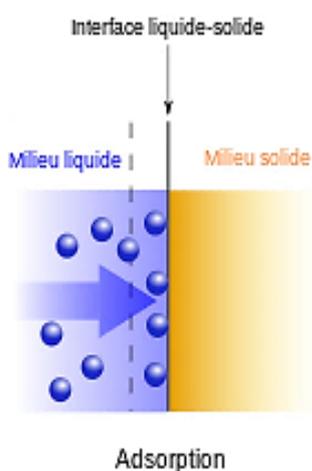
### PARTAGE en phase inverse



Est la technique chromatographique la plus utilisée notamment pour séparer des molécules très polaires de masse moléculaire inférieure à 3000 ou des homologues d'une même série mal séparés par une chromatographie d'adsorption, son principe repose sur le partage des solutés entre deux phases (stationnaire et mobile) non miscibles. Selon la polarité relative des phases mobile et stationnaire on distingue :

- La chromatographie de partage en phase normale (appelée également chromatographie classique) : la phase stationnaire est polaire (triéthylèneglycol ou eau), la phase mobile est apolaire (éther, chloroforme), l'analyte le moins polaire est élué en premier, et l'augmentation de la polarité de la phase mobile réduit son temps d'éluion.
- La chromatographie de partage en phase inversée : la phase stationnaire est apolaire (souvent des hydrocarbures) alors que la phase mobile est polaire, le constituant le plus polaire est élué en premier, et l'augmentation de la polarité allonge son temps d'éluion. [134-136]

## La chromatographie d'adsorption



C'est la plus ancienne méthode de chromatographie, elle s'applique à la plupart des composés organiques de masse molaire inférieure à 3000, elle est complémentaire à la chromatographie de partage et très utile pour les isomères.

L'adsorption est un phénomène physico-chimique qui consiste en la fixation réversible du soluté sur une phase solide, faisant intervenir des forces complexes qui peuvent être électrostatiques, inductives et autres.

La désorption a lieu par la suite (remise en solution du soluté via une rupture des liaisons à l'aide d'un éluant), les molécules du soluté sont alors substituées par celles de l'éluant, et entraînées par ce dernier hors de la colonne.

La phase mobile est généralement un solvant organique ou un mélange de solvants organiques, alors que la phase stationnaire est composée de fines particules de silice ( $\text{SiO}_2$ ) ou d'alumine ( $\text{Al}_2\text{O}_3$ ). [134-136]

### La chromatographie d'exclusion stérique (par perméation /par filtration sur gel)

Particules de gel de phase stationnaire.



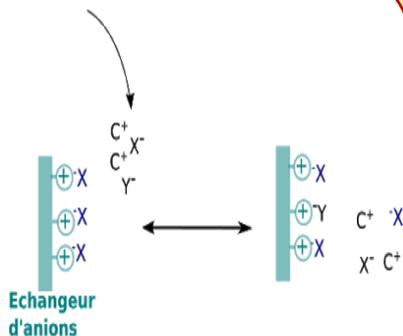
Est la technique la plus récente de chromatographie liquide, elle est puissante, appliquée surtout pour les espèces de masse molaire élevée notamment pour séparer les polymères (protéines, sucres), elle est également très utile pour la détermination de la masse molaire.

Contrairement aux autres méthodes chromatographiques, celle-ci est pratiquement indépendante de la nature du solvant.

Elle consiste en la séparation des molécules en fonction de leur taille en se basant sur leur possibilité ou non à pénétrer à l'intérieur de la phase stationnaire.

Les grains du gel organique formant la phase stationnaire doivent avoir des pores avec une taille supérieure à celle des espèces à séparer, ainsi les particules les plus petites diffusent à l'intérieur des grains alors que les plus grosses vont être entraînées par la phase mobile (eau, chloroforme, ...) rapidement. [134-136]

### La chromatographie d'échange d'ions



Pour ce type de chromatographie, les analytes sont des ions dissous dans une phase mobile aqueuse, alors que la phase stationnaire est représenté par des résines échangeuses d'ions ; et qui sont des substances insolubles dans l'eau, inertes, et qui ont la propriété d'échanger certains de leurs ions au contact d'une solution d'électrolytes, elles peuvent être d'origine minérale ou organique, échangeuses d'anions (essentiellement des dérivés amines) ou de cations (dérivés du type : sulfurique, carboxylique, hydroxylique,... ). [134-136]

# Application de l'HPLC à l'analyse

## Caractéristiques d'un pic chromatographique

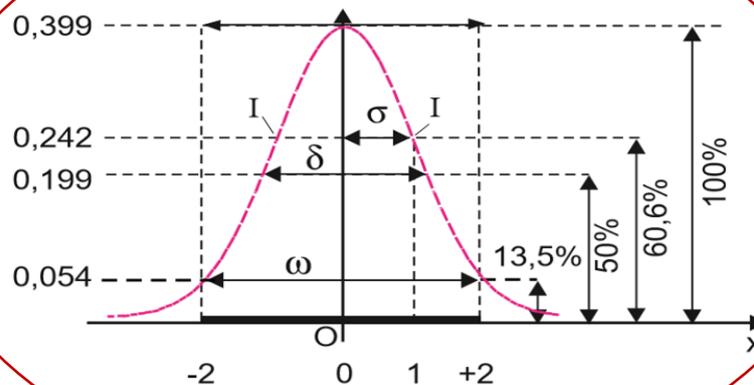
Le chromatogramme est un tracé (diagramme), obtenu après séparation des composés par chromatographie. Il est présenté sur un papier ou un écran et il traduit la variation du signal du détecteur en fonction du temps (ou rarement du volume d'éluion). Ce signal est proportionnel à la concentration instantanée du soluté en sortie de la colonne. [129]

Le pic chromatographique a une allure gaussienne et se caractérise par les paramètres suivants : [129]

$\sigma$  : écart-type du pic, il correspond à  $\frac{1}{2}$  de la largeur du pic aux points d'inflexion, c'est à dire à 60,6% de sa hauteur totale

$\omega$  : largeur du pic à la base, elle est mesurée à 13,5% de sa hauteur et est égale à  $4\sigma$  et à 1,78

**A** :  
surface  
du pic



**H** :  
hauteur  
du pic

$\omega_{1/2}$  ou  $\delta$  : largeur du pic à mi-hauteur, elle est égale à  $2,35\sigma$

$v$  : variance du pic, avec  $v = \sigma^2$

**RSD** : Relative Standard Deviation :

$$\%RSD = 100 \frac{\sigma}{A'}$$

Avec  $A'$  : Moyenne des aires du pic.

## Grandeurs de rétention

**$t_m$**  : temps mort : c'est le temps mis par un composé non retenu par la PS pour traverser la colonne, il correspond ainsi au temps passé dans la phase mobile et il est également appelé temps de rétention nul. [137]

$$t_m = \frac{L \text{ (cm)}}{U \text{ (}\frac{\text{cm}}{\text{s}}\text{)}}$$

Avec :

L : la longueur de la colonne.

U : vitesse linéaire de la PM dans la colonne.

**$t_r$**  : le temps de rétention : c'est le temps nécessaire pour qu'une substance arrive au système de détection et il correspond au temps passé par celle-ci dans la PS et dans le volume mort de la colonne. Sur le chromatogramme, il est représenté par le temps écoulé entre l'instant de l'injection et le sommet du pic qui lui est lié. [126]

**$t_r'$**  : le temps réduit appelé aussi temps corrigé, il correspond au temps passé par un soluté dans la PS et il est donné par la formule suivante :  $t_r' = t_r - t_m$  [126]

**$V_r$**  : volume de rétention ou volume d'élution : il représente le volume de la PM nécessaire à l'élution du composé. Il correspond sur le chromatogramme au volume de la PM qui s'est écoulé entre le temps d'injection et celui correspondant au maximum du pic. Si le débit D de la PM est stationnaire :  $V_r = t_r \cdot D$  [129]

**$V_r'$**  : volume de rétention réduit, corrigé ou relatif ; il correspond à la différence entre le volume de rétention et le volume mort :  $V_r' = V_r - V_m$  [136]

**$V_m$**  : volume mort : il correspond au volume interstitiel accessible et occupé par la PM, il ne dépend que de la géométrie et du remplissage de la colonne :  $V_m = t_m \cdot D$  [129]

**K** : coefficient de partage, d'adsorption ou de distribution ; c'est le paramètre physico-chimique de base en chromatographie, il caractérise pour un système chromatographique donné, la distribution de chaque soluté entre les deux phases (stationnaire et mobile), et il est défini par la relation suivante :  $K = \frac{C_s}{C_m}$

Avec  $C_s$  et  $C_m$  les concentrations du soluté à l'équilibre dans la phase stationnaire et mobile respectivement. [137]

**K'** : facteur de rétention, appelé aussi facteur de capacité, il représente le rapport entre la quantité de soluté se trouvant dans la PS et celle se trouvant dans la PM :  $K' = \frac{Q_s}{Q_m} = \frac{C_s V_s}{C_m V_m} = k \frac{V_s}{V_m}$

C'est aussi le rapport du temps passé par le soluté dans la PS et le temps passé par ce même soluté dans la PM.

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

Ce facteur dépend de la nature du soluté, de la PS, de la PM et de la température.

En fonction des valeurs de K', on peut voir si l'élution est bonne ou pas. L'élution idéale est pour un K'= 5, si :

- K' < 1 : élution rapide, difficile à étudier ;
- 2 < K' < 10 : élution optimale ;
- K' > 10 : élution trop longue. [126, 137, 138, 139]

## Efficacité de la colonne

La largeur d'un pic est caractéristique de l'efficacité de la séparation : plus le pic est fin, plus la chromatographie est efficace. [126]

Il est possible de rendre compte de cette efficacité en déterminant : [129]

**Le nombre de plateaux théoriques** : noté N<sub>th</sub>, il est propre à chaque composé pour une PM et une PS données et il correspond au nombre d'équilibres successifs qu'a rencontré un soluté dans la colonne. Plus N est grand, plus la colonne est efficace et plus le pic est fin.

$$N_{th} = 16 \frac{t_r^2}{\omega^2} = 5,54 \frac{t_r^2}{\delta^2} = \frac{t_r^2}{\sigma^2}$$

**La hauteur équivalente à un plateau théorique** : la colonne est d'autant plus efficace que la HEPT est petite.

$$HEPT = \frac{L}{N_{th}}$$

Avec : L : longueur de la colonne.

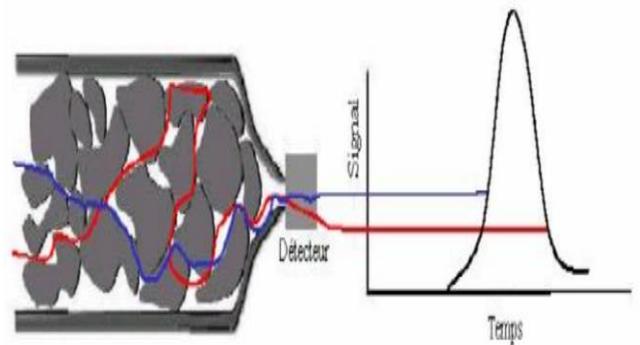
Afin de comparer les performances de colonnes de conceptions différentes, vis-à-vis d'un même composé, on remplace le temps de rétention t<sub>r</sub> par le temps de rétention réduit et on calcule le nombre de plateaux théoriques effectifs N<sub>eff</sub> :

$$N_{eff} = 16 \frac{t_r'^2}{\omega^2} = 5,54 \frac{t_r'^2}{\delta^2} = \frac{t_r'^2}{\sigma^2}$$

$$HEPT_{eff} = \frac{L}{N_{eff}}$$

## ❖ Mécanismes d'élargissement d'un pic

**Diffusion turbulente :** elle est due à l'écoulement irrégulier de la PM à travers la PS. En effet, suivant la taille et la forme des particules de la PS, il existe plusieurs trajets possibles, de longueur différente pour les molécules d'un soluté, elles arrivent ainsi en sortie de la colonne à des instants différents ; d'où l'élargissement du pic. [136]

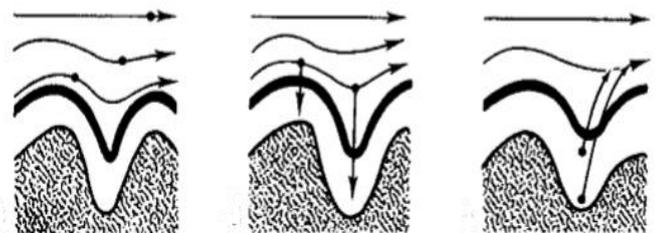


**Figure :** Image illustrant la diffusion turbulente. [140]



**Figure :** Diffusion longitudinale des molécules d'un soluté. [141]

**Résistance au transfert de masse :** elle représente les inégalités de passage des molécules d'une phase à l'autre. En effet, certaines molécules peuvent être entraînées avant d'être transférées sur la PS alors que d'autres stagnent et s'accumulent dans les anfractuosités de cette phase, ce qui empêche l'établissement de l'équilibre entre la PM et la PS. [136]



**Figure :** Résistance au transfert de masse. [136]

## Qualité de la séparation

### ❖ La sélectivité

Appelée aussi facteur de séparation, il permet de préciser les positions relatives de 2 pics adjacents sur un chromatogramme. Il ne peut être inférieur à 1 et il est égal par définition au rapport des temps de rétention corrigés :

$$\alpha = \frac{t'_{r2}}{t'_{r1}}$$

Pour des pics non adjacents, on définit le facteur de rétention relative « r », qui est calculé de la même façon que alpha. [129, 136]

### ❖ La résolution (Rs)

Elle quantifie la qualité de la séparation en caractérisant le fait qu'il y ait ou non chevauchement de 2 pics contigus. [126]

Rs peut être calculée en appliquant la formule suivante :

$$R_s = 2 \frac{t_{r2} - t_{r1}}{\omega_1 + \omega_2}$$

Pour  $w_1 = w_2$  on utilise la formule de Purnell : [129]

$$R_s = \frac{1}{4} \sqrt{N_2} \frac{\alpha - 1}{\alpha} \cdot \frac{K_2}{1 + K_2}$$

Une bonne séparation est un compromis entre une résolution suffisante des pics et un temps de séparation raisonnable.

Plus Rs est grand, plus la séparation est meilleure, si : [136]

$R_s \leq 0.8$  : séparation insuffisante ;

$R_s \leq 1$  : chevauchement des pics ;

$R_s = 1$  : 2% de chevauchement des pics ;

$R_s \geq 1.5$  : bonne séparation.

## Analyse quantitative

Cette analyse est basée sur le fait que l'aire du pic chromatographique est proportionnelle à la concentration ou à la quantité du produit élué. [136]

### Méthode d'étalonnage externe

Elle consiste à faire éluer successivement et dans les mêmes conditions chromatographiques un volume  $V$  de l'étalon de concentration bien connue  $C_{\text{réf}}$  et un même volume de l'échantillon contenant la substance à doser de concentration inconnue  $C_{\text{éch}}$ , puis à comparer les chromatogrammes résultants dont les aires sont respectivement  $A_{\text{réf}}$  et  $A_{\text{éch}}$ . Puisque les volumes injectés sont égaux, il y a une proportionnalité entre les aires, qui dépendent des masses injectées, et les concentrations correspondantes ( $m_i = C_i \cdot V$ ).

$$C_{\text{éch}} = C_{\text{réf}} \frac{A_{\text{éch}}}{A_{\text{réf}}}$$

La précision est améliorée en calculant la moyenne des aires obtenues à partir de plusieurs injections identiques de l'étalon, toutefois, cette démarche nécessite plusieurs mesures, il est donc préférable de procéder à un étalonnage multipoints ; qui revient à tracer une courbe d'étalonnage  $A = f(C)$ , obtenue par injection de volumes égaux d'une série de solutions étalons, puis à déterminer par extrapolation la concentration de l'échantillon à analyser. [129]

### Méthode d'étalonnage interne

Cette méthode permet de s'affranchir de l'imprécision concernant les volumes injectés, et ce en utilisant le coefficient de réponse relatif de chaque composé à doser vis-à-vis d'un marqueur introduit comme référence appelé étalon interne.

Elle consiste à ajouter à la solution de référence et à la solution à analyser un même constituant (étalon interne) qui n'interfère avec aucune des substances présentes dans l'échantillon et est de concentration connue. On obtient alors deux chromatogrammes : un chromatogramme d'étalonnage qui servira à déterminer les coefficients de réponse relatifs et un chromatogramme pour l'analyse de l'échantillon. [137]

## Méthode des ajouts dosés

Elle est beaucoup plus utilisée pour le dosage des traces. Dans ce cas l'échantillon sera analysé avec des suppléments ou ajouts connus de la substance à doser, afin d'augmenter le signal de réponse. [142]

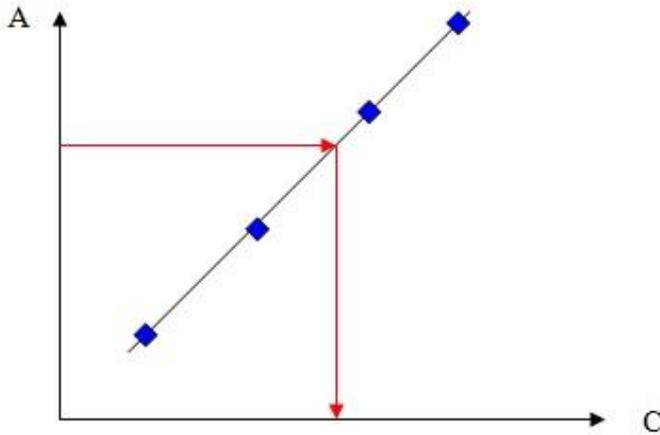


Figure : courbe d'étalonnage externe. [141]

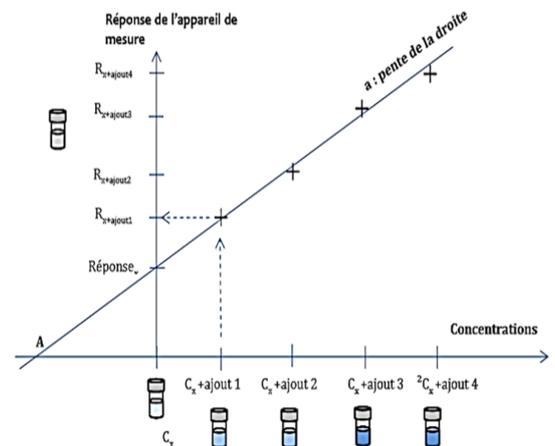


Figure : représentation graphique de l'étalonnage par ajouts dosés. [143]

## Analyse qualitative

Les méthodes chromatographiques, à savoir l'HPLC, servent également à l'identification des composants d'un mélange. Il s'agit en fait, de méthodes comparatives, et la grandeur qui reflète la substance est le temps de rétention. Dans les mêmes conditions expérimentales et sans changer d'appareillage, l'identification du composé est basée sur la comparaison de son temps de migration à celui d'une substance de référence, l'égalité des  $t_r$  oriente vers la même substance.

Toutefois, cette identification à partir du chromatogramme est quelquefois aléatoire. Une association de deux techniques complémentaires : un chromatographe et un spectromètre de masse ou un spectromètre infrarouge, donne deux types d'informations indépendantes (temps de migration et « spectre ») et permet ainsi de déterminer avec certitude la composition de mélanges complexes. [129]

---

---

**ANNEXE II**  
**MONOGRAPHIES**

---

---

---

---

# **MONOGRAPHIE DU PARACÉTAMOL**

---

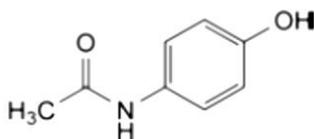
---

## PARACÉTAMOL

01/2008 : 0049

corrigé 6.0

### Paracetamolum



C8 H9 NO2

Mr 151,2

[103-90-2]

### DÉFINITION

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'acétyl (2.3.1). Effectuez le chauffage sur une flamme nue.

## 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  $\mu$ 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 : 1,5ml/min.

-Détection : spectrophotomètre à 245 nm.

-Injection : 20 µl.

-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) :

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.

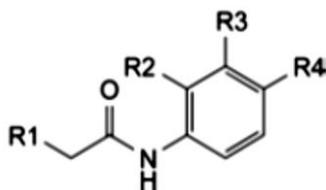
## DOSAGE

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 C<sub>8</sub> H<sub>9</sub> NO<sub>2</sub>.

## CONSERVATION

A l'abri de la lumière.

## IMPURETÉS



**A.** R<sub>1</sub>=R<sub>3</sub>=R<sub>4</sub>=H, R<sub>2</sub>=OH : N-(2-hydroxyphényl) acétamide,

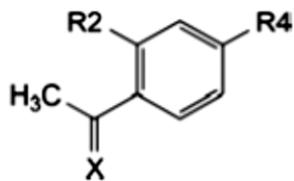
**B.** R<sub>1</sub> = CH<sub>3</sub>, R<sub>2</sub> = R<sub>3</sub> = H, R<sub>4</sub> = OH : N-(4-hydroxyphényl) propanamide,

**C.** R<sub>1</sub> = R<sub>2</sub> = H, R<sub>3</sub> = Cl, R<sub>4</sub> = OH : N-(3-chloro-4- hydroxyphényl) acétamide,

**D.** R<sub>1</sub> = R<sub>2</sub> = R<sub>3</sub> = R<sub>4</sub> = H : N-phénylacétamide,

**H.** R<sub>1</sub> = R<sub>2</sub> = R<sub>3</sub> = H, R<sub>4</sub> = O-CO-CH<sub>3</sub> : acétate de 4-(acétylamino) phényle,

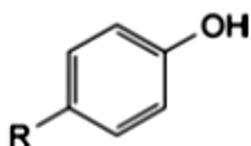
**J.** R<sub>1</sub> = R<sub>2</sub> = R<sub>3</sub> = H, R<sub>4</sub> = Cl : N-(4-chlorophényl) acétamide (chloroacétanilide),



**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 = NO<sub>2</sub> : 4-nitrophénol,

**K.** R = NH<sub>2</sub> : 4-aminophénol

---

---

# **MONOGRAPHIE DE LA CAFÉINE**

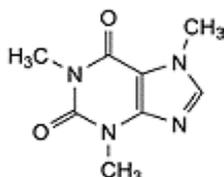
---

---

## CAFÉINE

04/2008 : 0267

### Coffeinum



$C_8H_{10}N_4O_2$

$M_r$  194,2

[58-08-2]

### DÉFINITION

1,3,7-Triméthyl-3,7-dihydro-1H-purine-2,6-dione.

Teneur : 98,5 pour cent à 101,5 pour cent (substance desséchée).

### CARACTÈRES

Aspect : poudre cristalline, blanche ou sensiblement blanche, ou cristaux soyeux, blancs ou sensiblement blancs.

Solubilité : assez soluble dans l'eau, facilement soluble dans l'eau bouillante, peu soluble dans l'éthanol à 96 pour cent. La caféine se dissout dans les solutions concentrées de benzoates ou de salicylates alcalins.

La caféine se sublime facilement.

### IDENTIFICATION

Première identification : A, B, E.

Seconde identification : A, C, D, E, F.

A. Point de fusion (2.2.14) : 234 °C à 239 °C.

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

Comparaison : caféine SCR.

C. A 2 mL d'une solution saturée de caféine, ajoutez 0,05 mL de solution d'iodure de potassium iodée R. La solution reste limpide. Ajoutez 0,1 mL d'acide chlorhydrique dilué R. Il se forme

un précipité brun qui se dissout après neutralisation par la solution diluée d'hydroxyde de sodium R.

D. Dans un tube à bouchon rodé, dissolvez environ 10 mg de caféine dans 0,25 mL d'un mélange de 0,5 mL d'acétylacétone R et de 5 mL de solution diluée d'hydroxyde de sodium R. Chauffez au bain-marie à 80 °C pendant 7 min. Refroidissez et ajoutez 0,5 mL de solution de diméthylaminobenzaldéhyde R2. Chauffez de nouveau au bain-marie à 80 °C pendant 7 min. Laissez refroidir et ajoutez 10 mL d'eau R. Il se développe une coloration bleu intense.

E. Perte à la dessiccation (voir Essai).

F. La caféine donne la réaction des xanthines (2.3.1).

## ESSAI

**Solution S.** Dissolvez à chaud 0,5 g de caféine dans 50 mL d'eau exempte de dioxyde de carbone R préparée à partir d'eau distillée R. Refroidissez et complétez à 50 mL avec le même solvant.

**Aspect de la solution.** La solution S est limpide (2.2.1) et incolore (2.2.2, Procédé II).

**Acidité.** A 10 mL de solution S, ajoutez 0,05 mL de solution de bleu de bromothymol R1. La solution est verte ou jaune. Le virage de l'indicateur au bleu ne nécessite pas plus de 0,2 mL d'hydroxyde de sodium 0,01M.

**Substances apparentées.** Chromatographie liquide (2.2.29).

Solution à examiner. Dissolvez 0,100g de caféine dans la phase mobile et complétez à 50,0mL avec la phase mobile.

Prélevez 1,0 mL de cette solution et complétez à 10,0 mL avec la phase mobile.

Solution témoin (a). Prélevez 2,0 mL de solution à examiner et complétez à 100,0 mL avec la phase mobile. Prélevez 1,0 mL de cette solution et complétez à 10,0 mL avec la phase mobile.

Solution témoin (b). Dissolvez 5 mg de caféine pour conformité du système SCR (contenant les impuretés A, C, D et F) dans la phase mobile et complétez à 5 mL avec la phase mobile.

Prélevez 2 mL de cette solution et complétez à 10 mL avec la phase mobile.

Colonne :

- Dimensions : l = 0,15m, Ø = 4,6mm,
- Phase stationnaire : gel de silice octadécylsilylé pour chromatographie, désactivé pour les bases, postgreffé R (5µm).

Phase mobile : mélangez 20 volumes de tétrahydrofurane R, 25 volumes d'acétonitrile R et 955 volumes d'une solution contenant 0,82 g/L d'acétate de sodium anhydre R préalablement ajustée à pH 4,5 avec de l'acide acétique glacial R.

Débit : 1,0 mL/min.

Détection : spectrophotomètre à 275 nm.

Injection : 10 µL.

Enregistrement : 1,5 fois le temps de rétention de la caféine.

Identification des impuretés : utilisez le chromatogramme fourni avec la caféine pour conformité du système SCR et le chromatogramme obtenu avec la solution témoin (b) pour identifier les pics dus aux impuretés A, C, D et F.

Temps de rétention : caféine = environ 8 min.

Conformité du système : solution témoin (b) :

- Résolution : au minimum 2,5 entre les pics dus aux impuretés C et D et au minimum 2,5 entre les pics dus aux impuretés F et A.

#### **Limites :**

- Impuretés non spécifiées : pour chaque impureté, au maximum 0,5 fois la surface du pic principal du chromatogramme obtenu avec la solution témoin (a) (0,10 pour cent),
- Total : au maximum 0,5 fois la surface du pic principal du chromatogramme obtenu avec la solution témoin (a) (0,1 pour cent),
- Limite d'exclusion : 0,25 fois la surface du pic principal du chromatogramme obtenu avec la solution témoin (a) (0,05 pour cent).

**Sulfates (2.4.13) :** au maximum 500 ppm, déterminé avec 15 mL de solution S.

Préparez le témoin avec un mélange de 7,5 mL de solution à 10 ppm de sulfate (SO<sub>4</sub>) R et 7,5 mL d'eau distillée R.

**Métaux lourds (2.4.8) :** au maximum 20 ppm.

1,0 g de caféine satisfait à l'essai C. Préparez la solution témoin avec 2 mL de solution à 10 ppm de plomb (Pb) R.

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

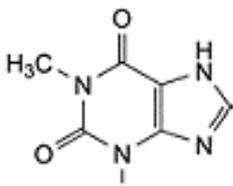
**Cendres sulfuriques (2.4.14) :** au maximum 0,1 pour cent, déterminé sur 1,0 g de caféine.

## DOSAGE

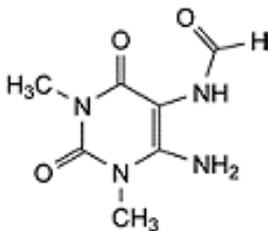
Dissolvez 0,170 g de caféine dans 5 mL d'acide acétique anhydre R en chauffant. Laissez refroidir. Ajoutez 10 mL d'anhydride acétique R et 20 mL de toluène R. Titrez par l'acide perchlorique 0,1M. Déterminez le point de fin de titrage par potentiométrie (2.2.20). 1mL d'acide perchlorique 0,1M correspond à 19,42 mg de C<sub>8</sub>H<sub>10</sub>N<sub>4</sub>O<sub>2</sub>.

## IMPURETÉS

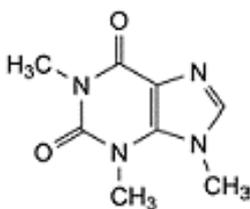
Autres impuretés décelables (si elles sont présentes à une teneur suffisante, les substances suivantes seront détectées par l'un des essais de la monographie. Elles sont limitées par le critère général d'acceptation applicable aux autres impuretés ou impuretés non spécifiées, ou par les dispositions de la monographie générale Substances pour usage pharmaceutique (2034). Il n'est donc pas nécessaire de les identifier pour démontrer la conformité de la substance. Voir également chapitre 5.10. Contrôle des impuretés dans les substances pour usage pharmaceutique) : A, B, C, D, E, F.



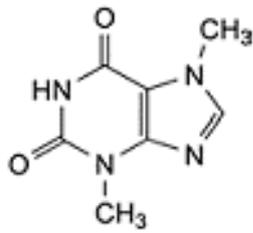
A. 1,3-diméthyl-3,7-dihydro-1H-purine-2,6-dione (théophylline),



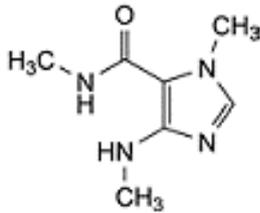
B. N-(6-amino-1,3-diméthyl-2,4-dioxo-1,2,3,4-tétrahydropyrimidin-5-yl) formamide,



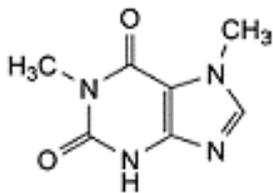
C. 1,3,9-triméthyl-3,9-dihydro-1H-purine-2,6-dione (isocaféine),



D. 3,7-diméthyl-3,7-dihydro-1H-purine-2,6-dione (théobromine),



E. N,1-diméthyl-4-(méthylamino)-1H-imidazole-5-carboxamide (caféidine),



F. 1,7-diméthyl-3,7-dihydro-1H-purine-2,6-dione.

---

**ANNEXE III**

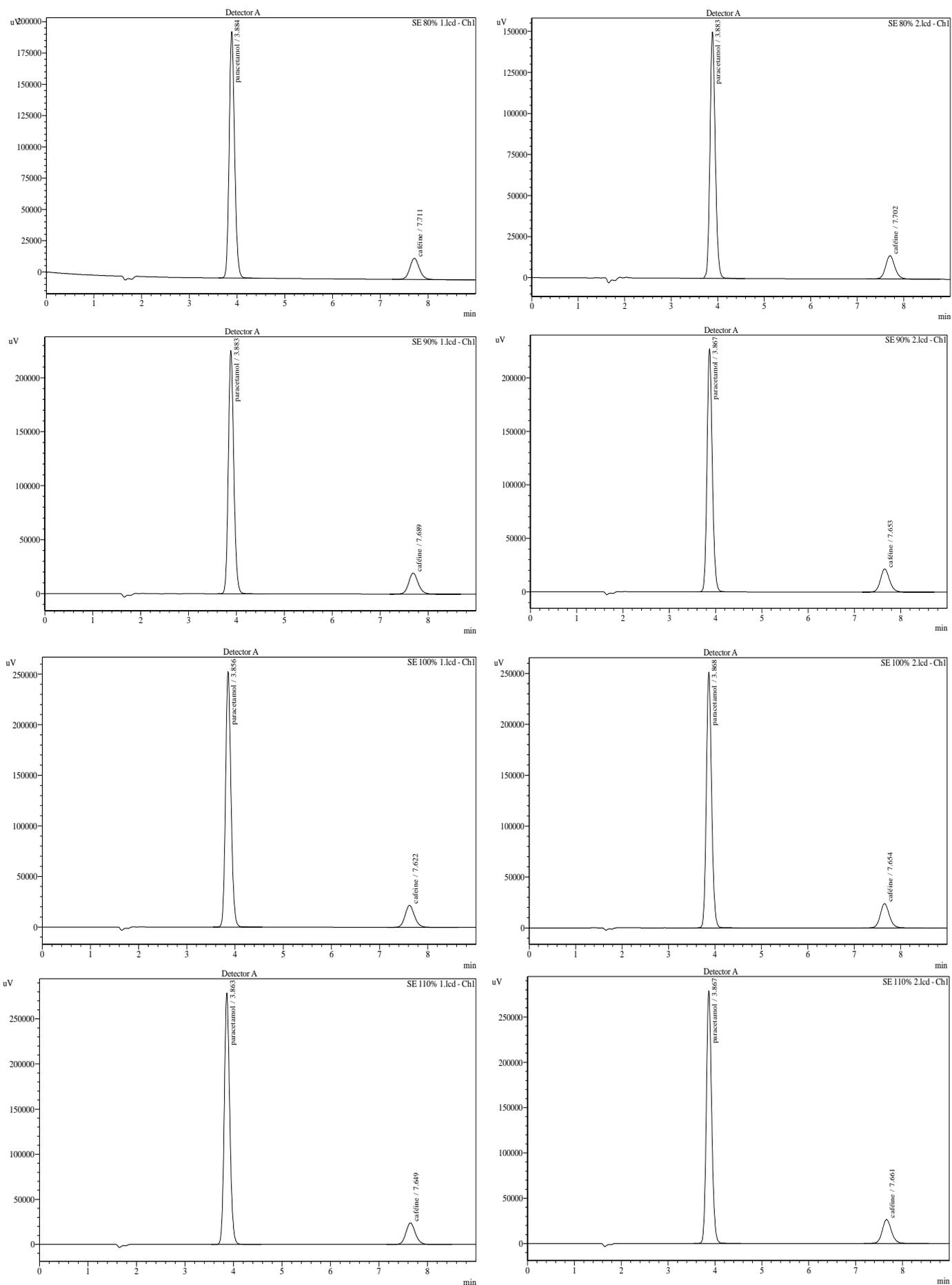
**DONNEE BRUTES DE LA**

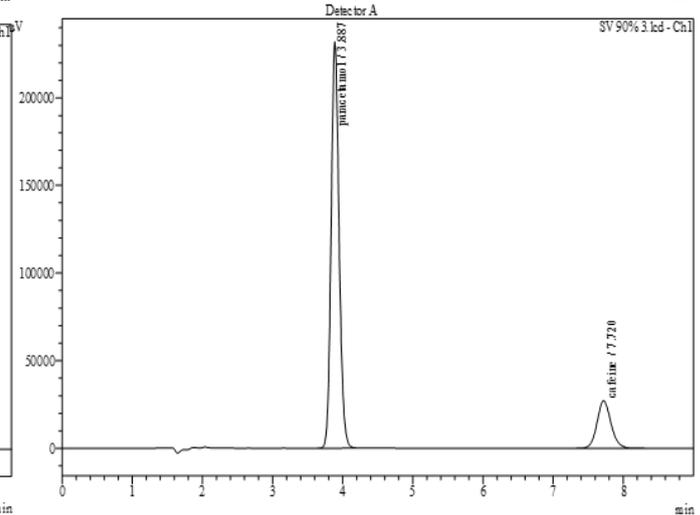
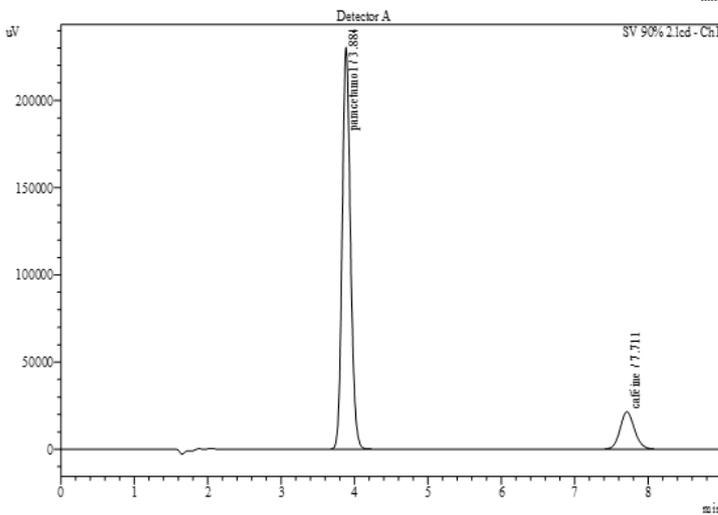
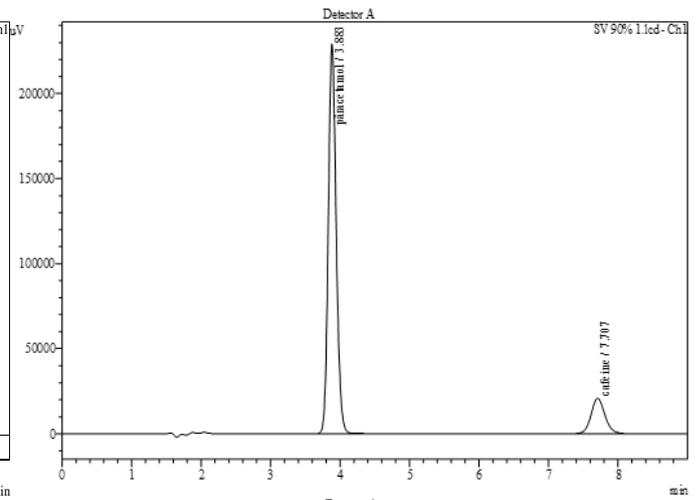
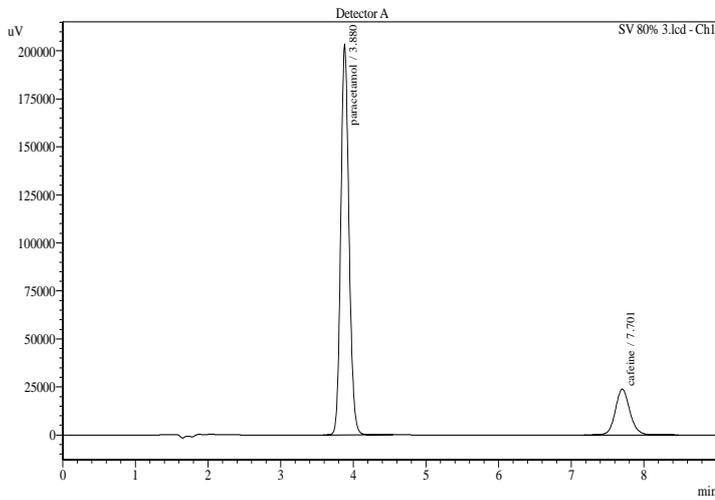
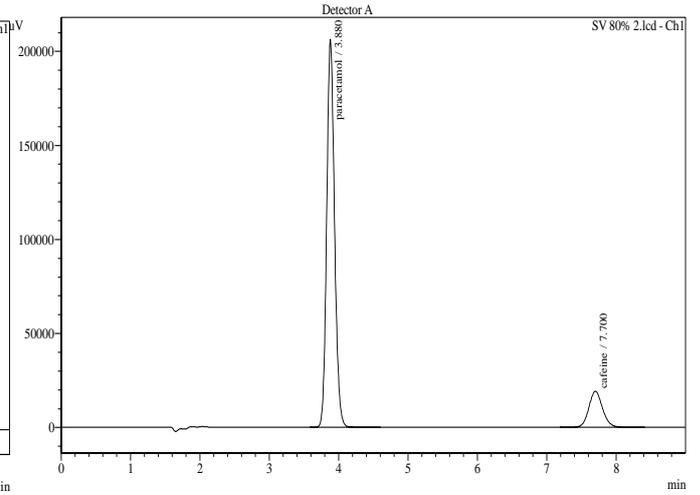
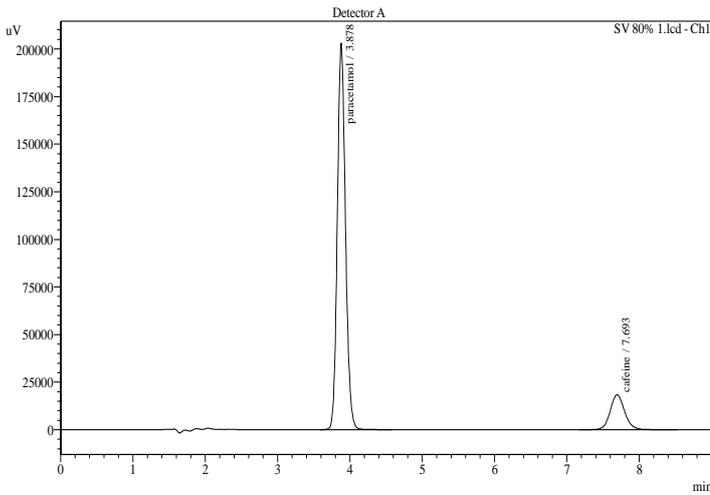
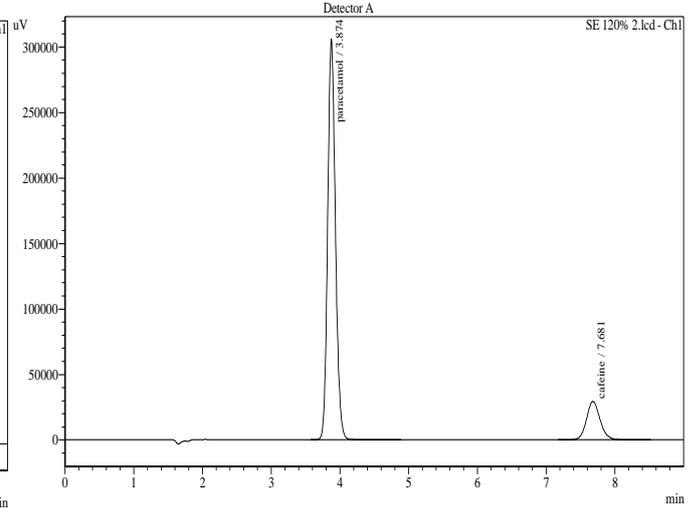
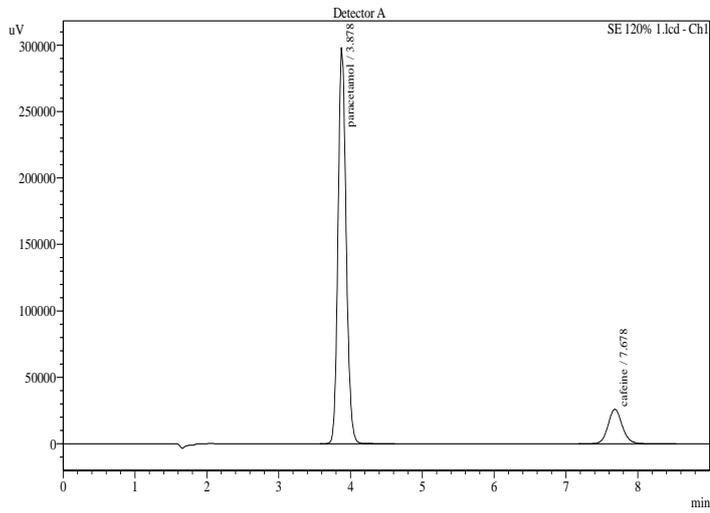
**VALIDATION ANALYTIQUE**

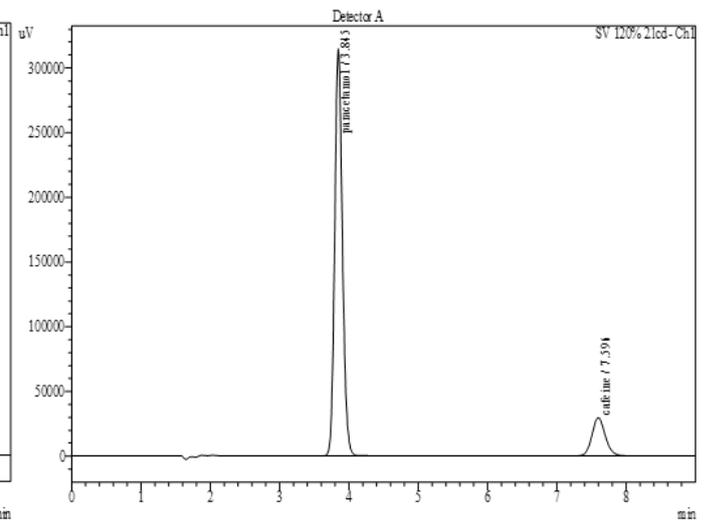
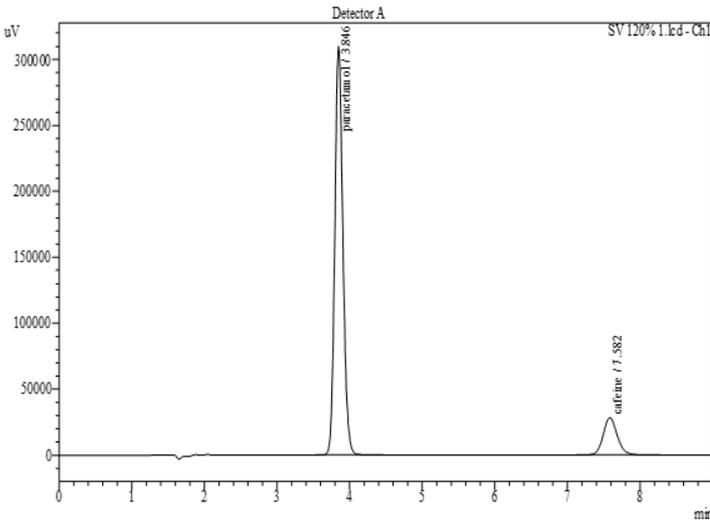
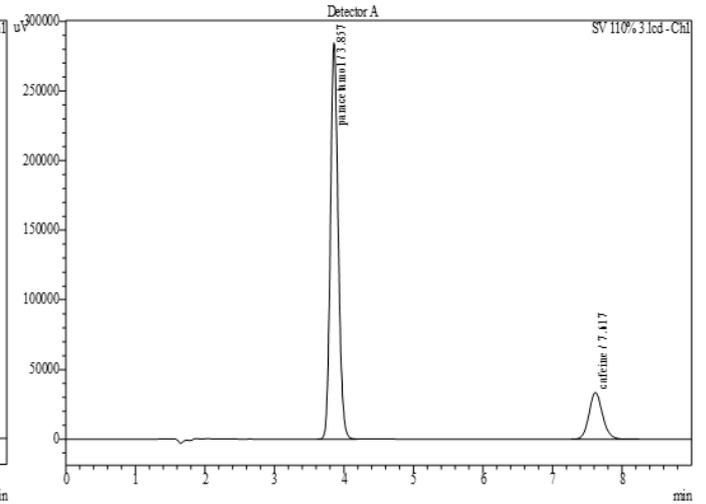
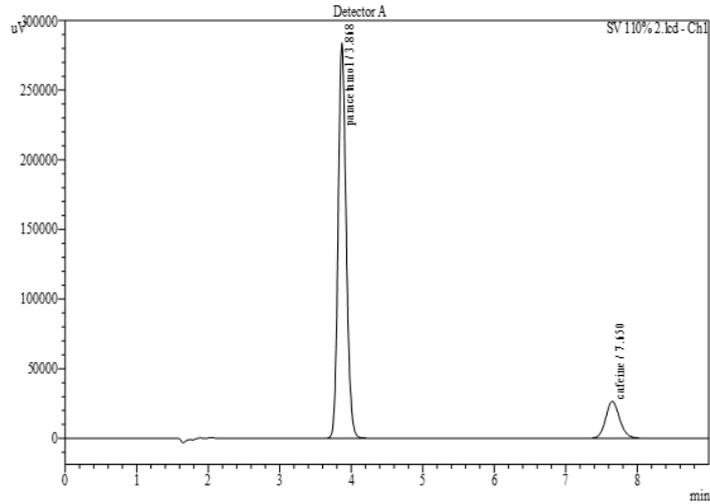
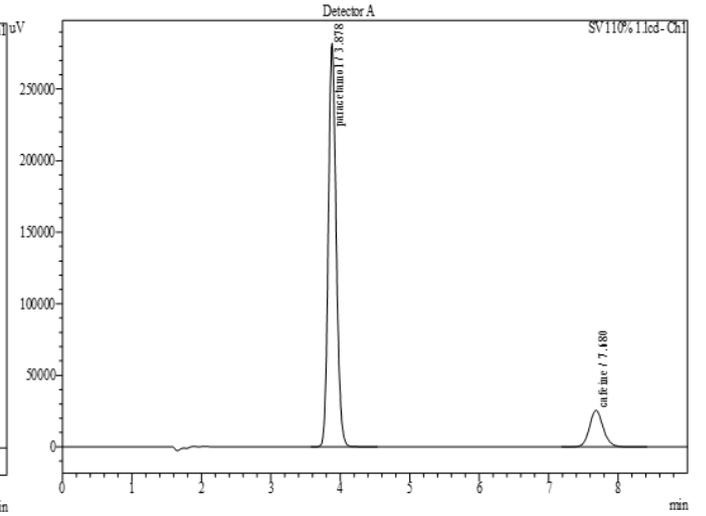
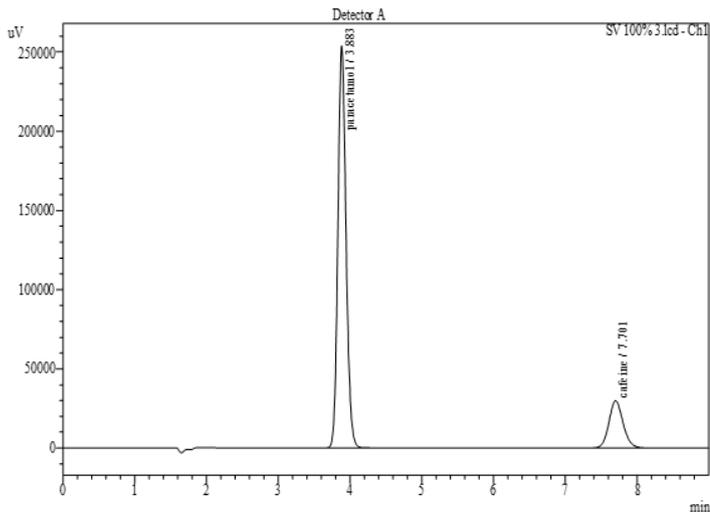
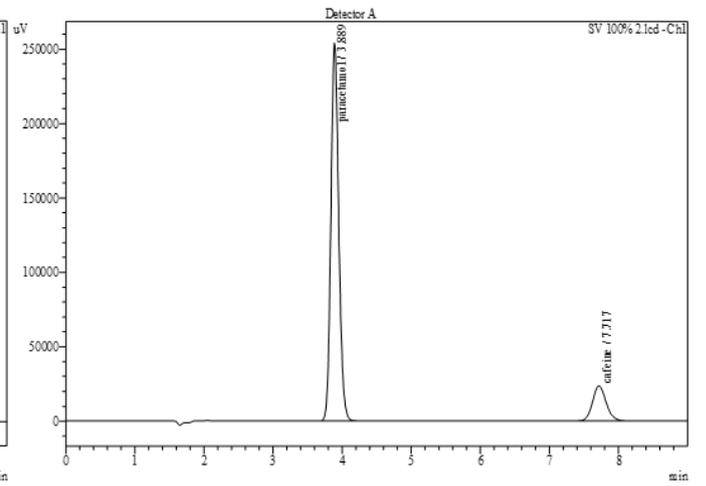
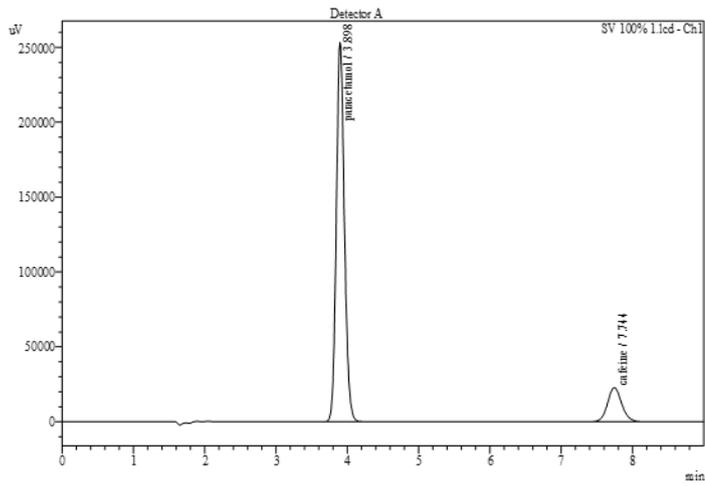
---

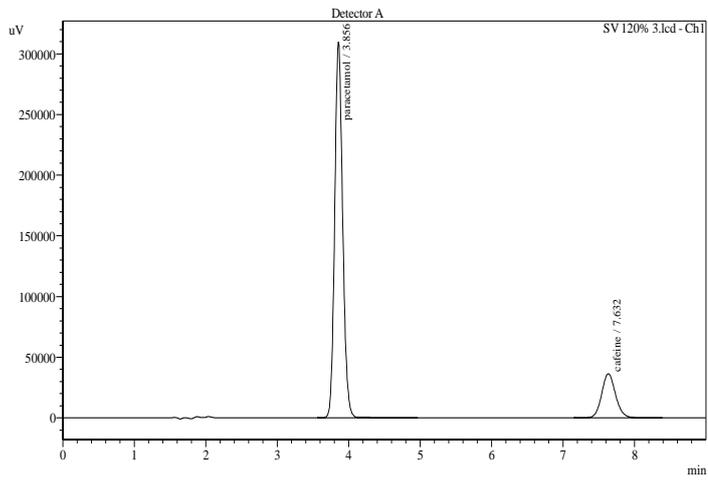
# Chromatogrammes obtenus

## Série 1

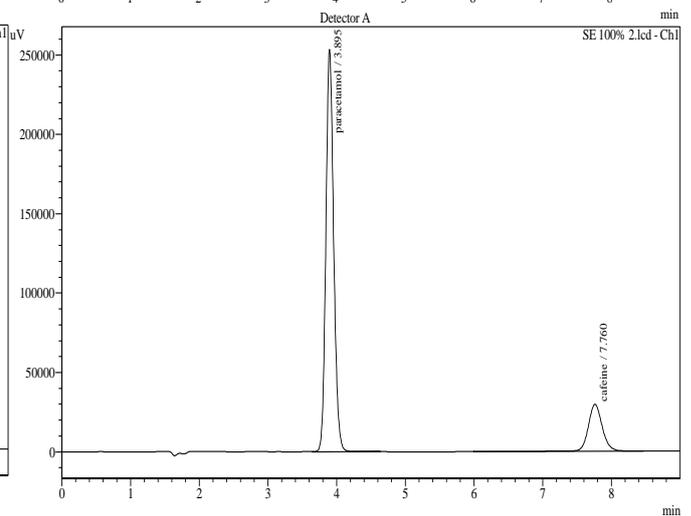
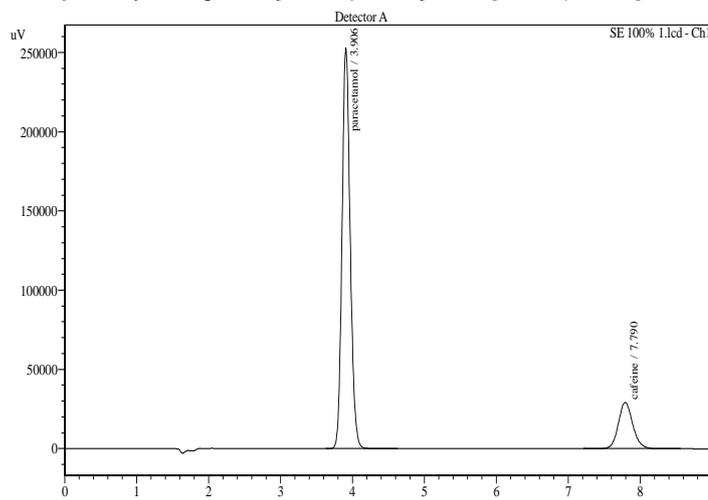
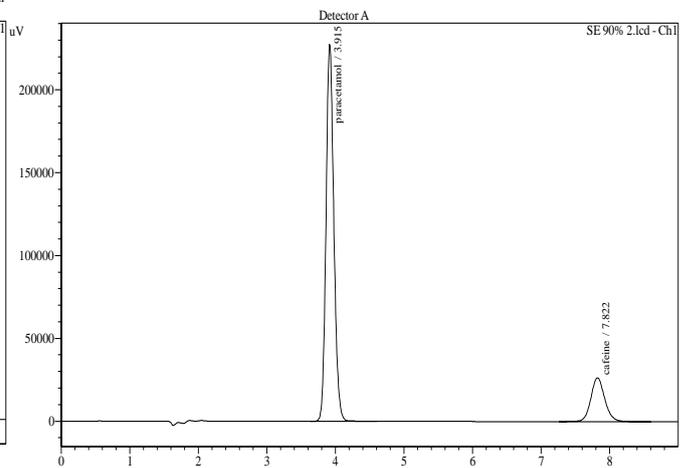
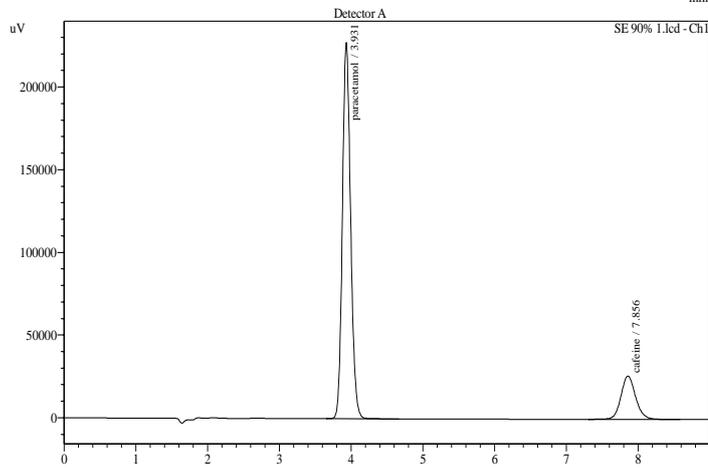
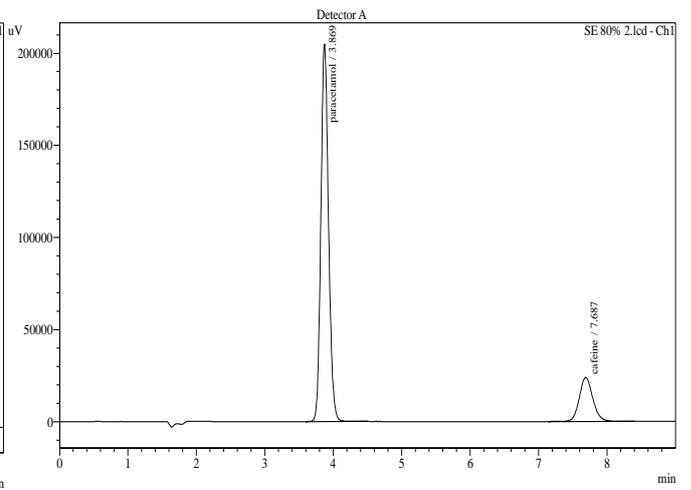
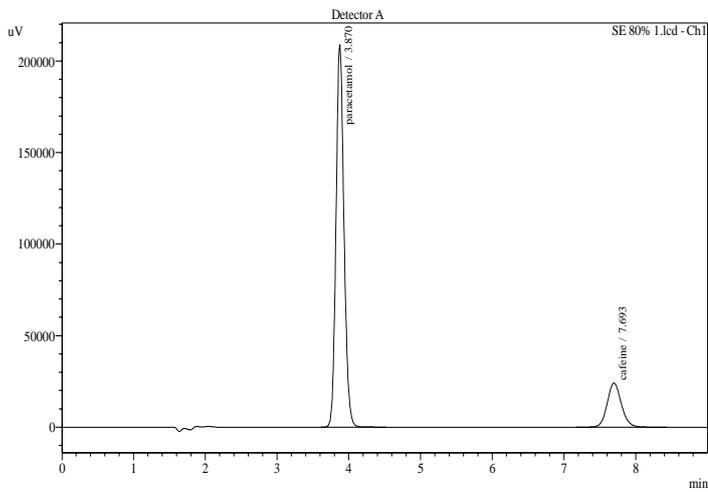


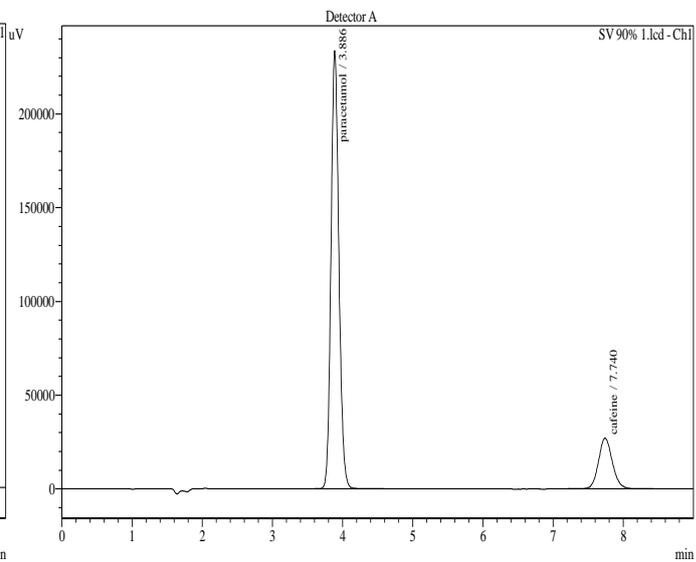
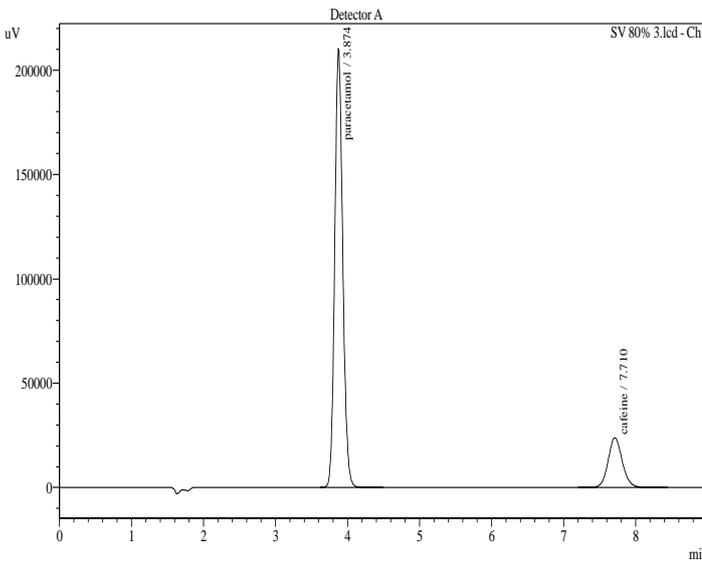
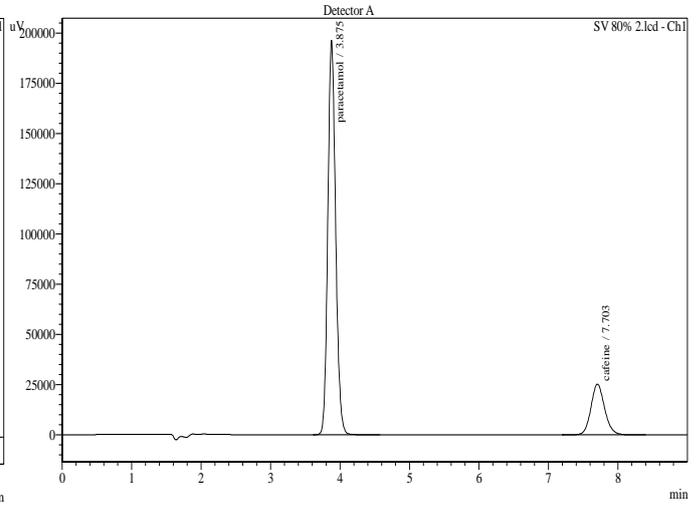
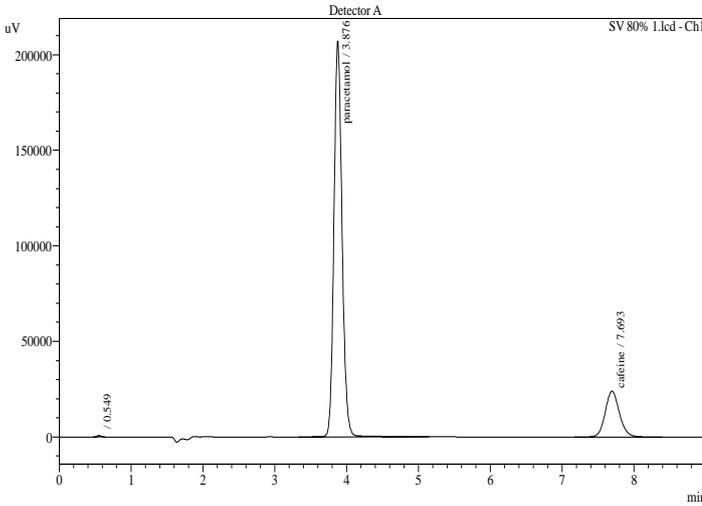
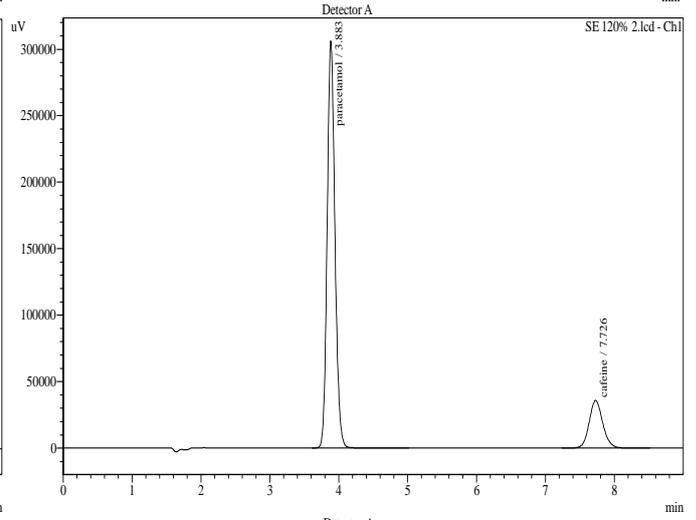
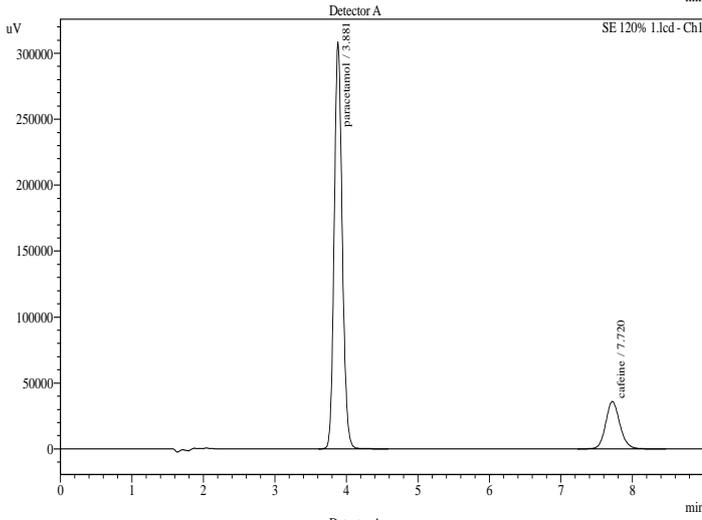
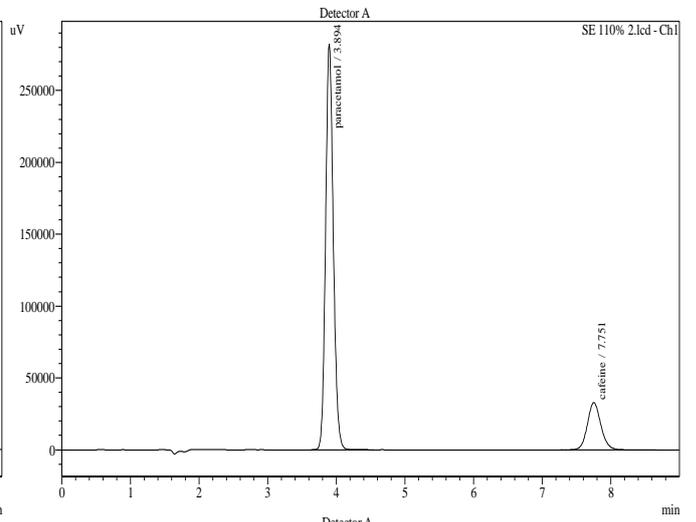
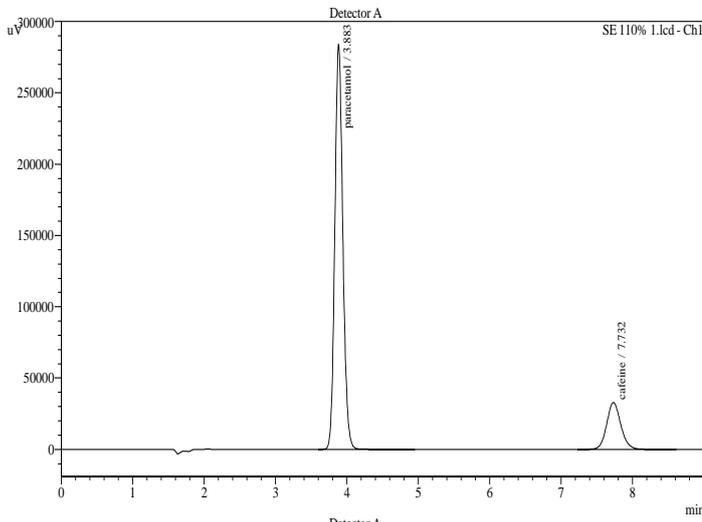


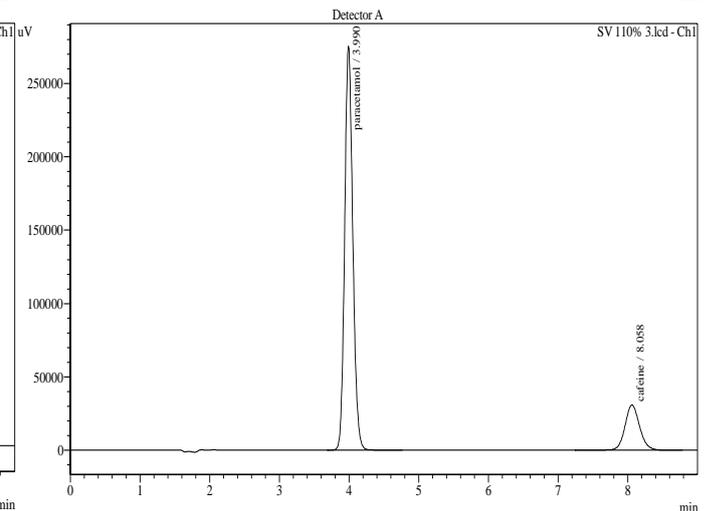
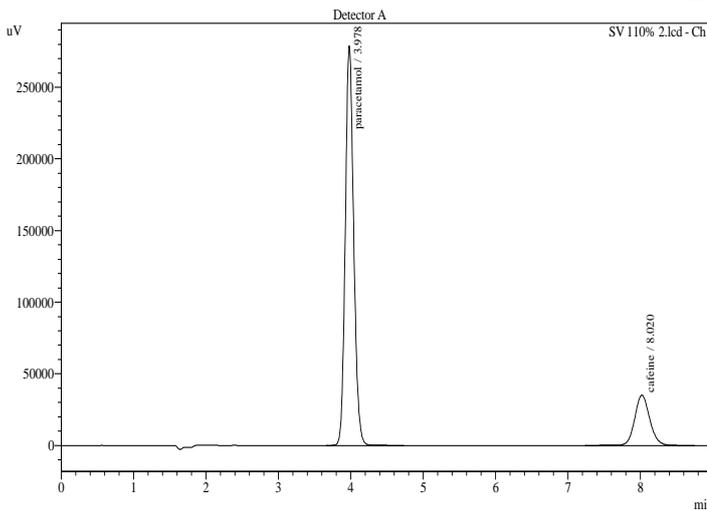
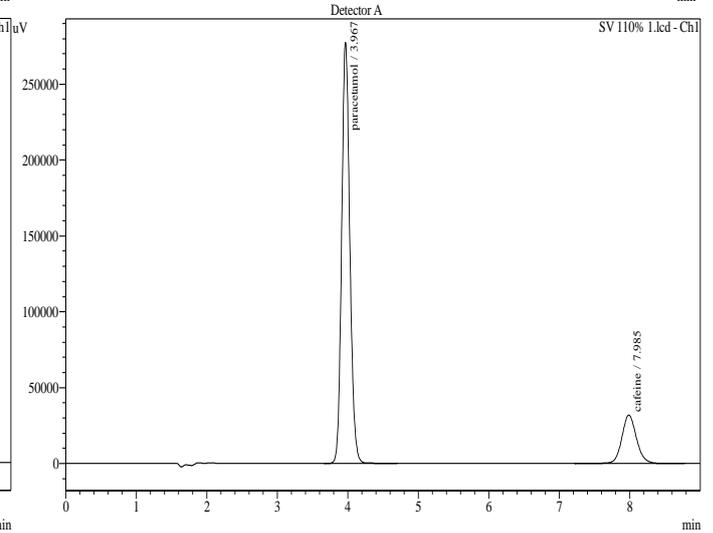
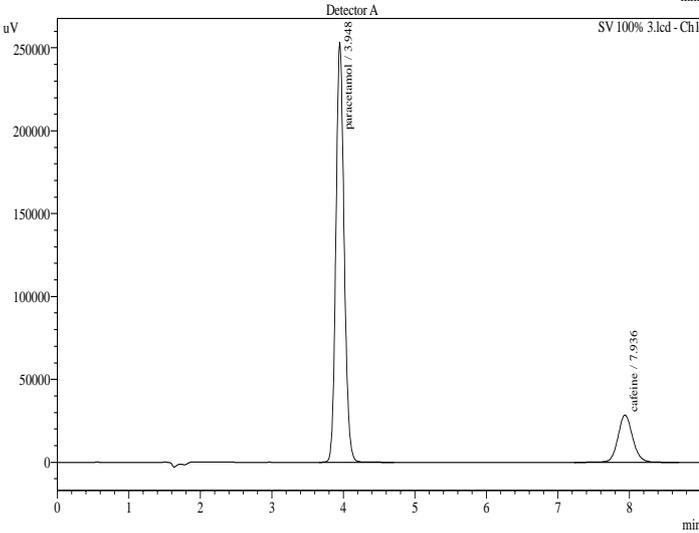
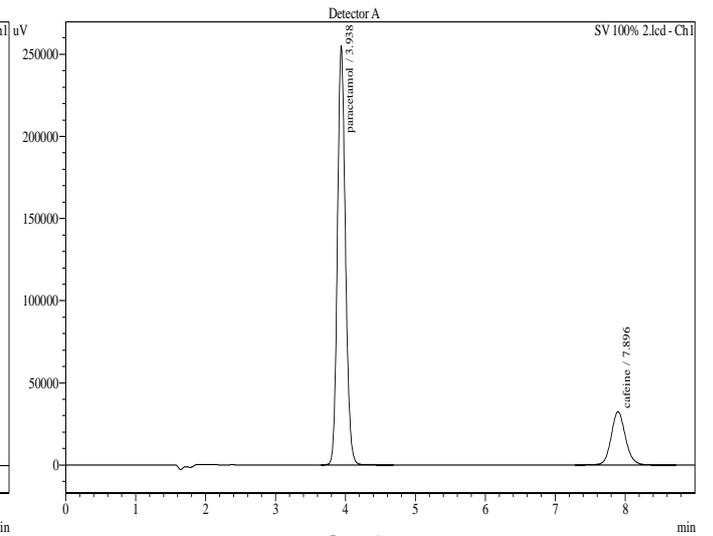
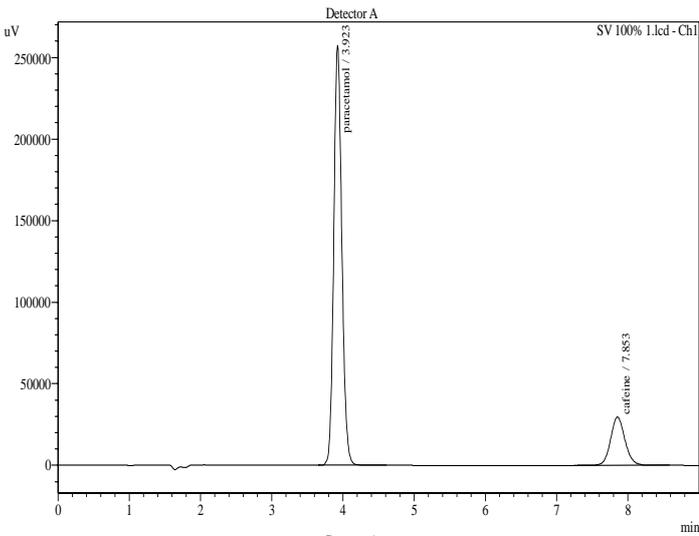
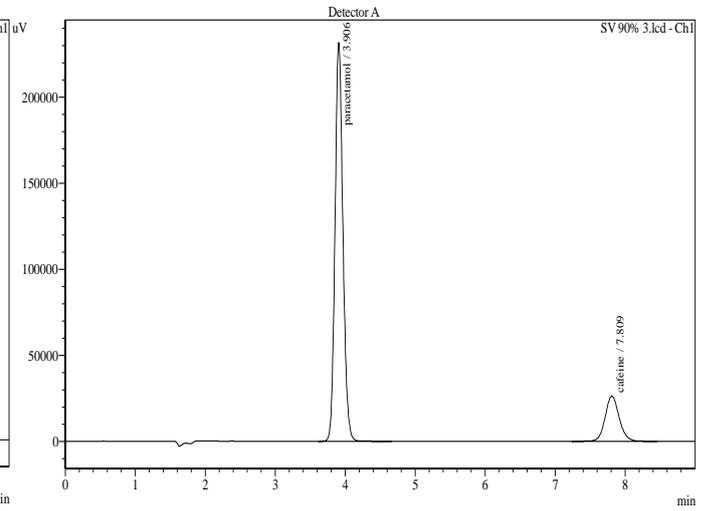
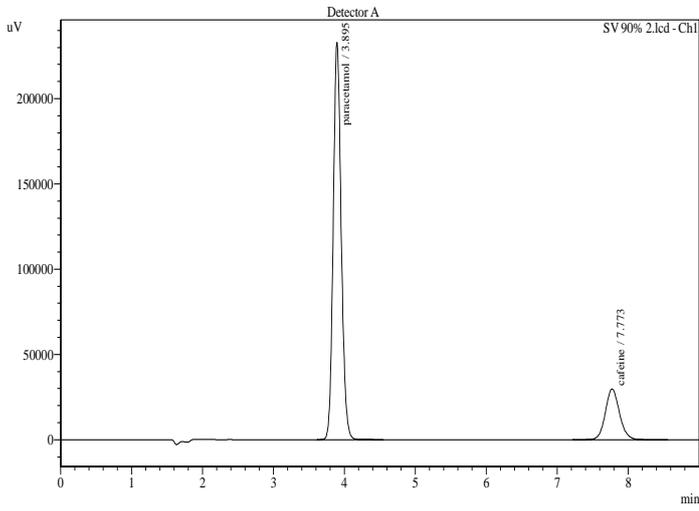


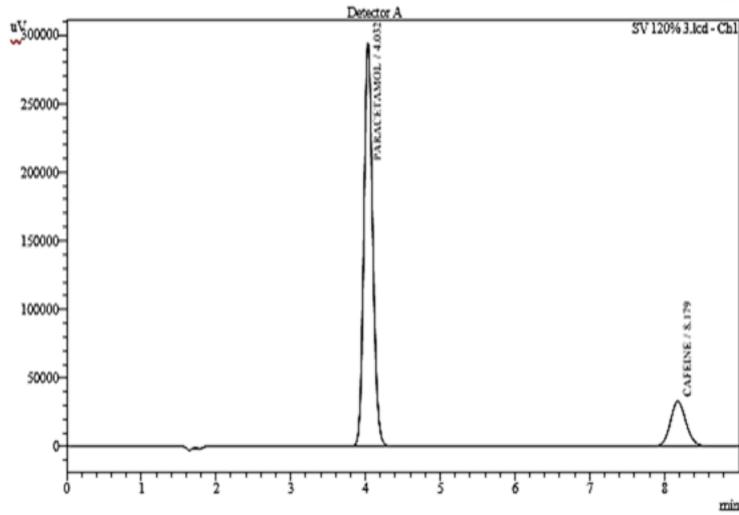
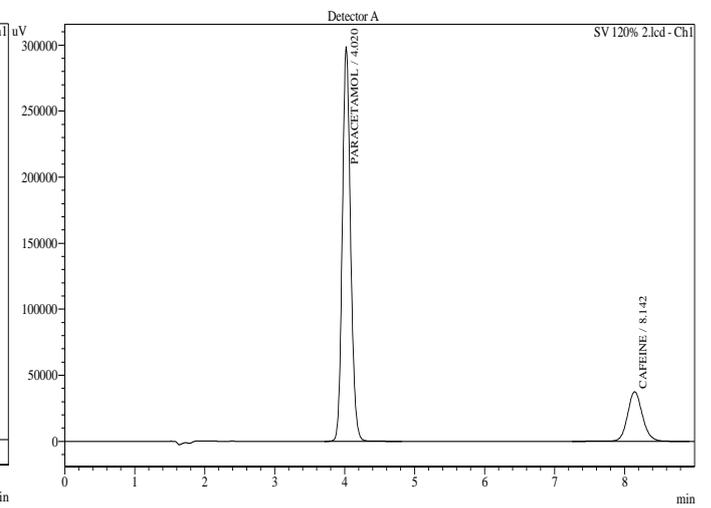
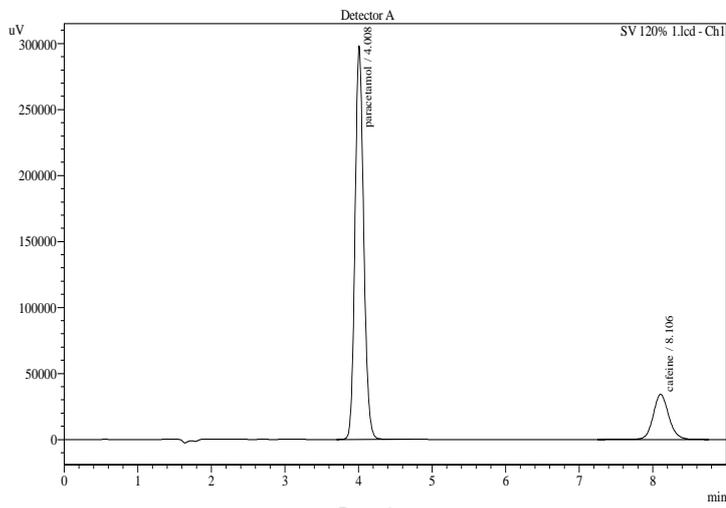


## Série 2

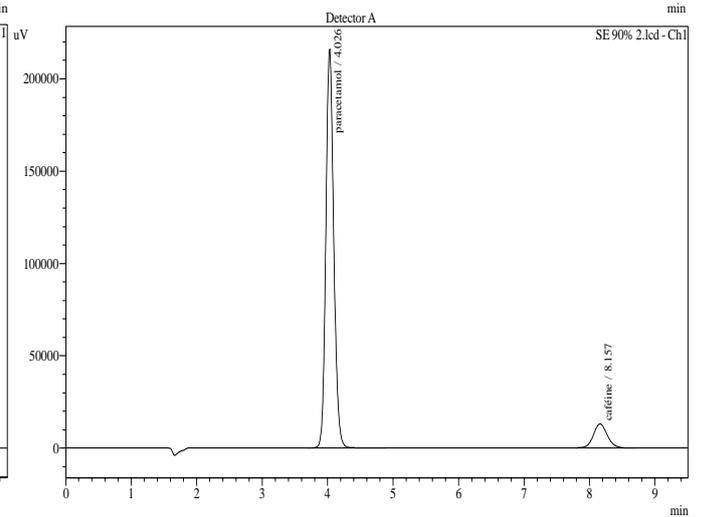
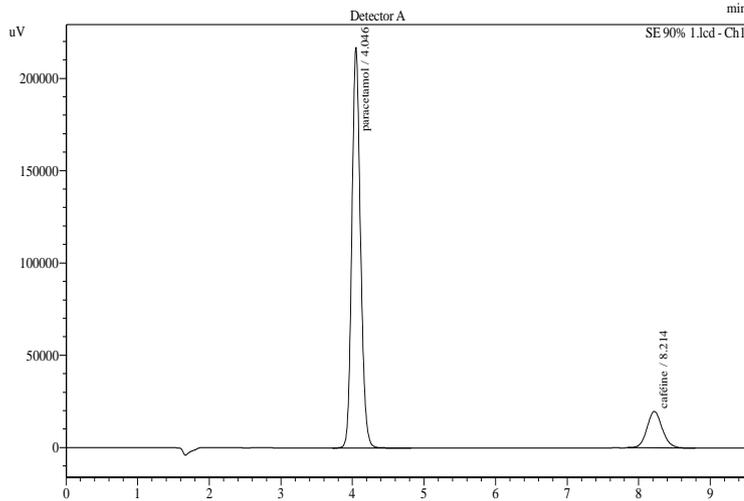
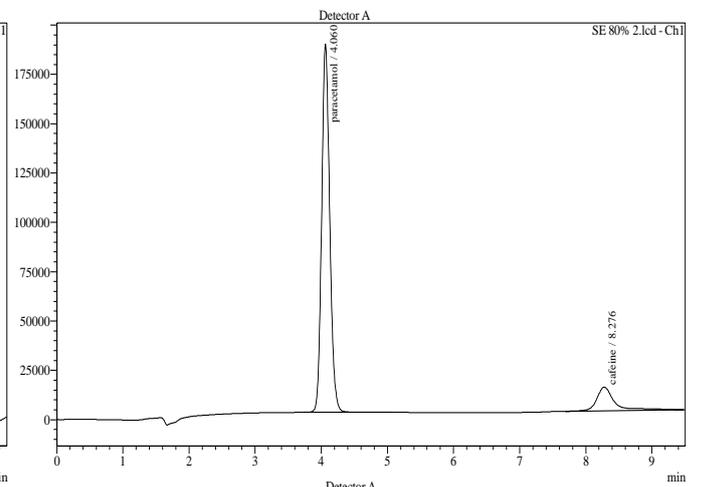
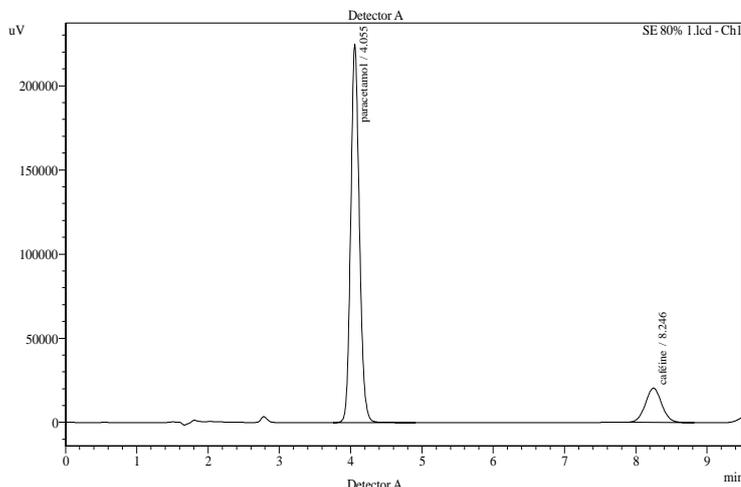


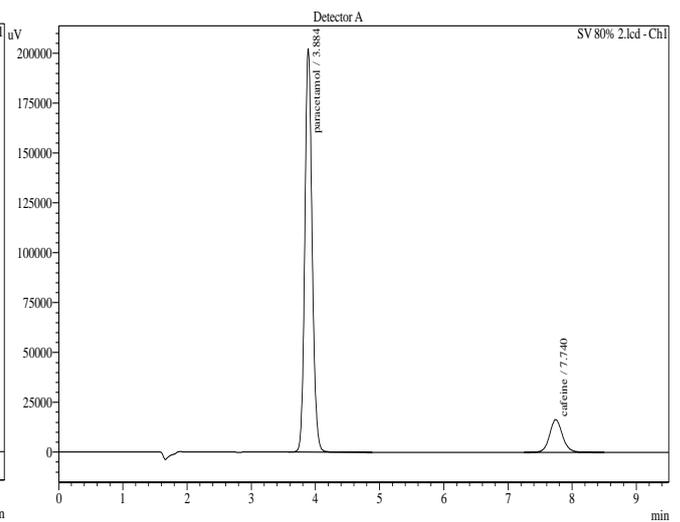
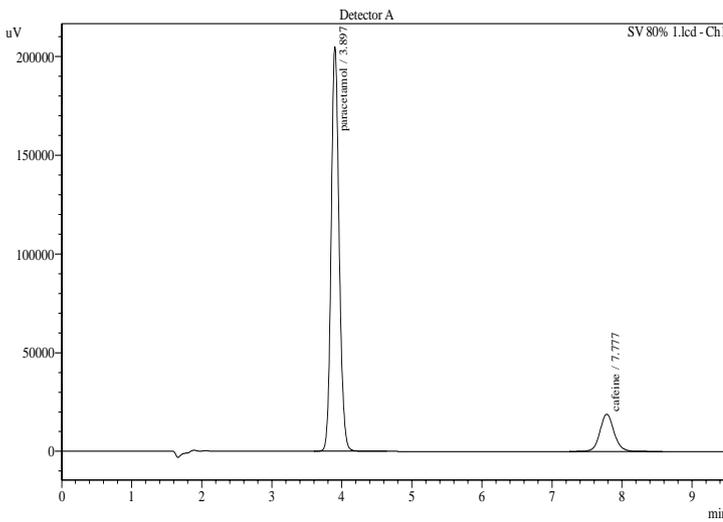
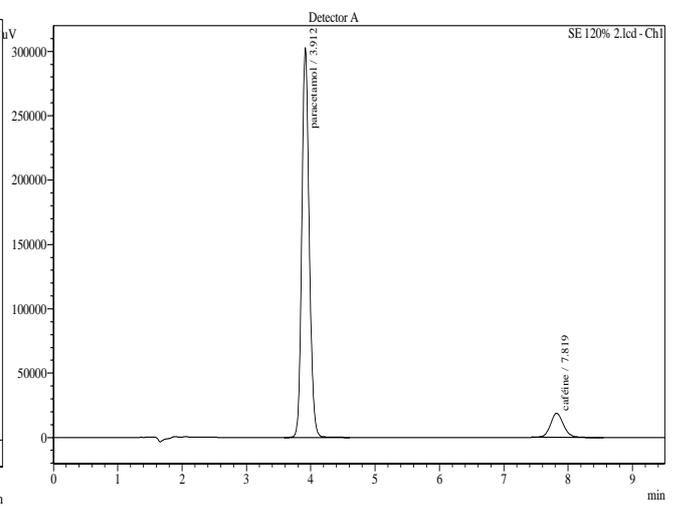
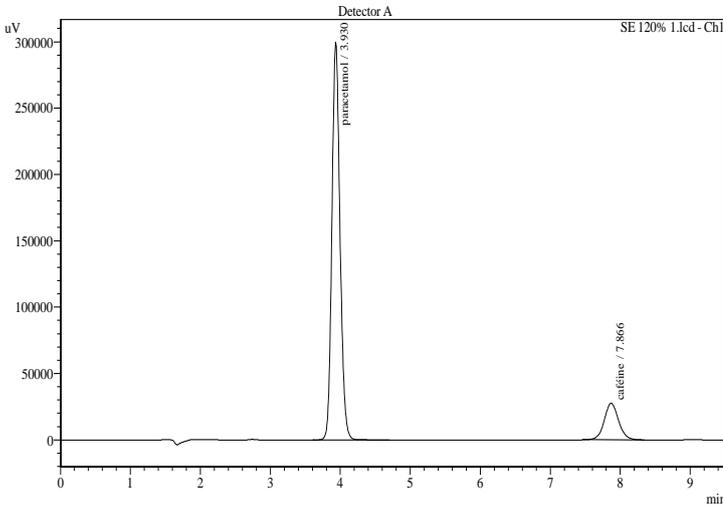
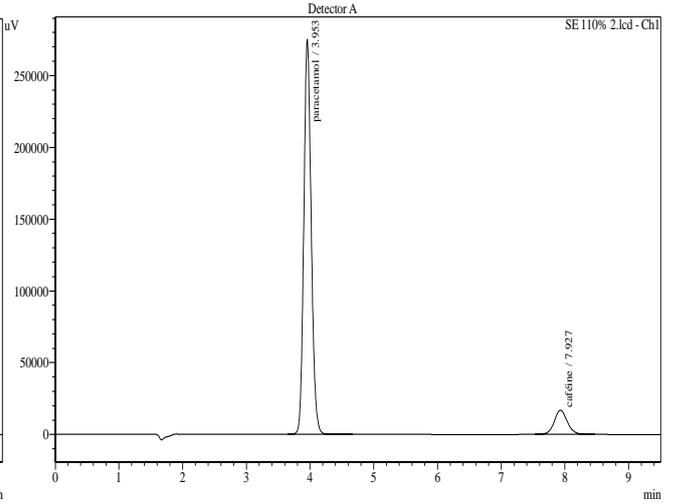
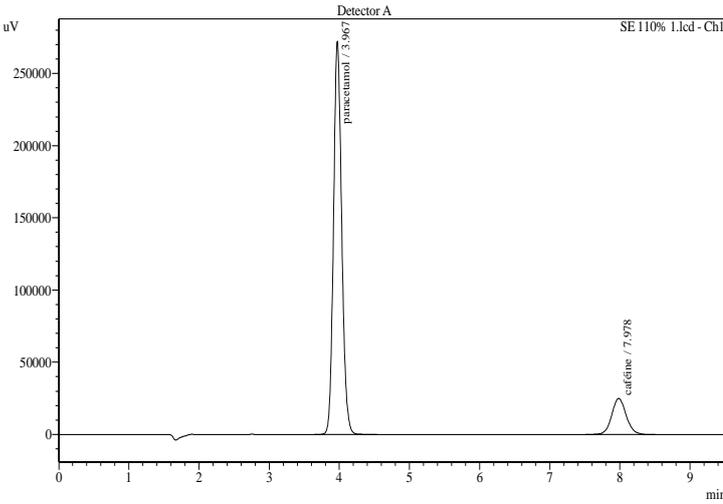
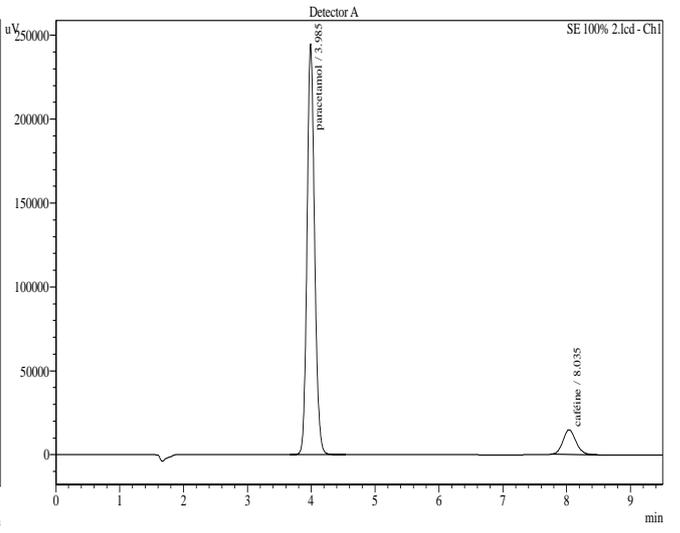
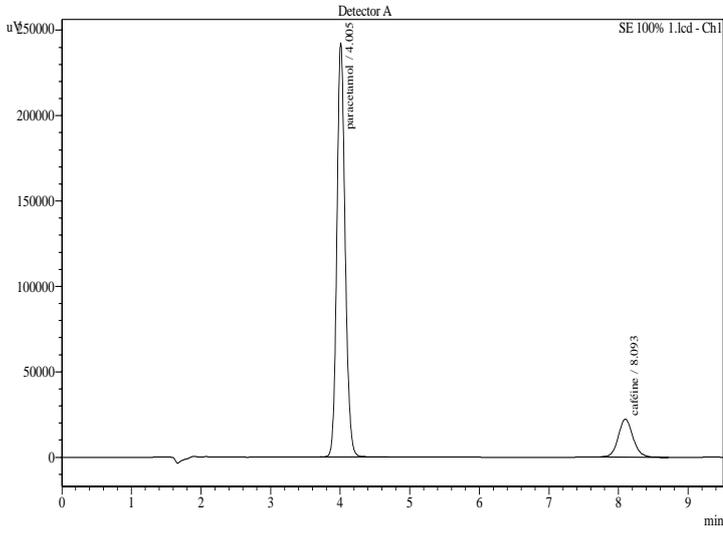


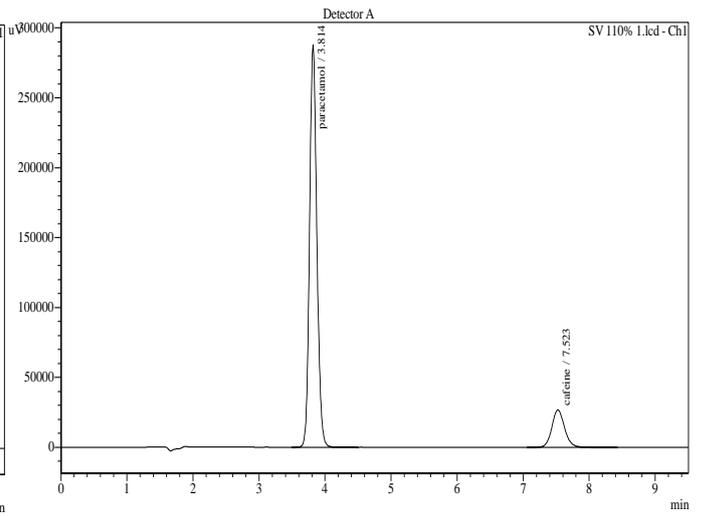
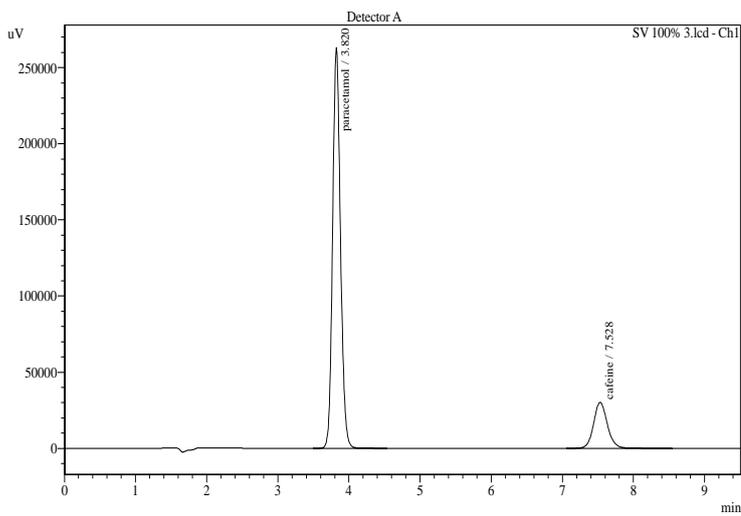
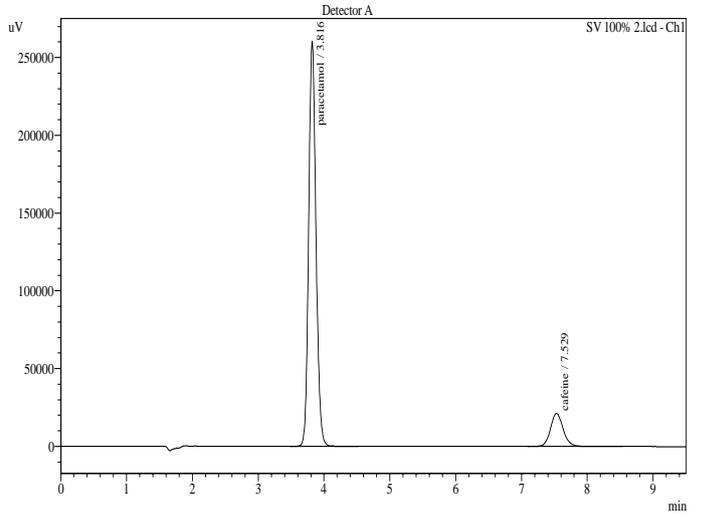
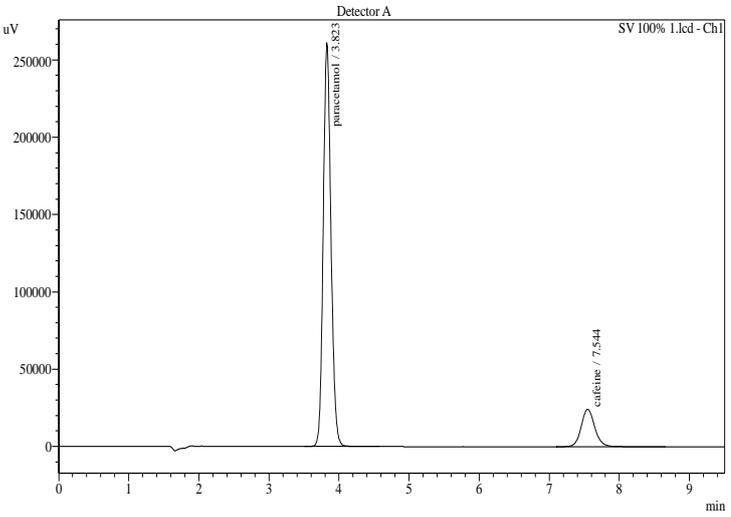
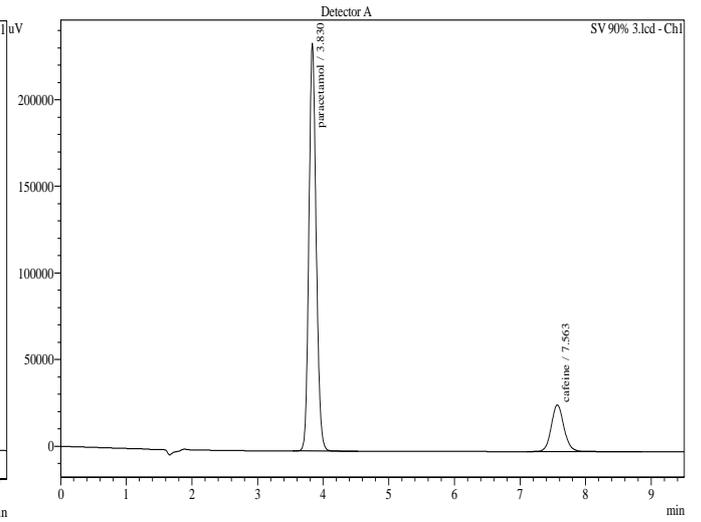
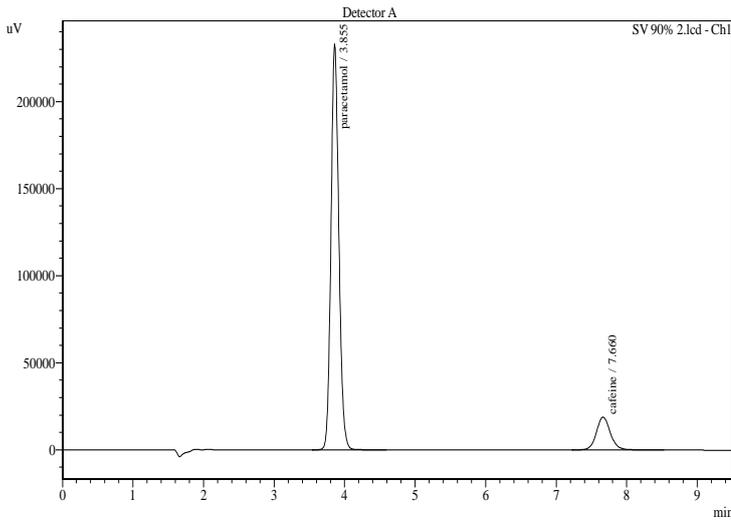
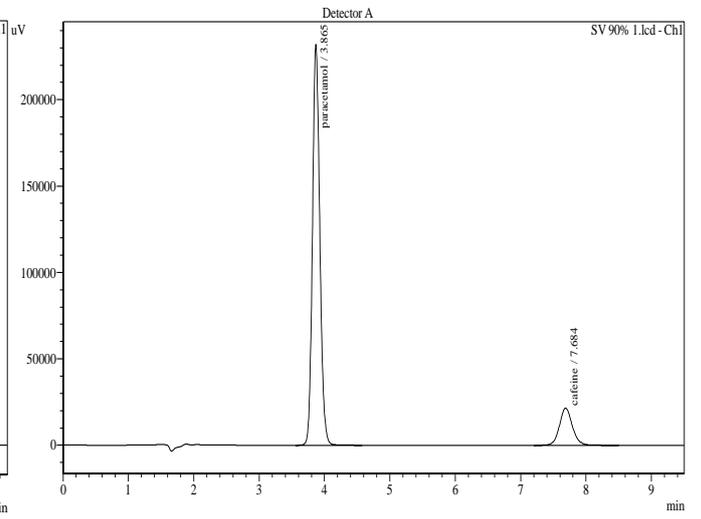
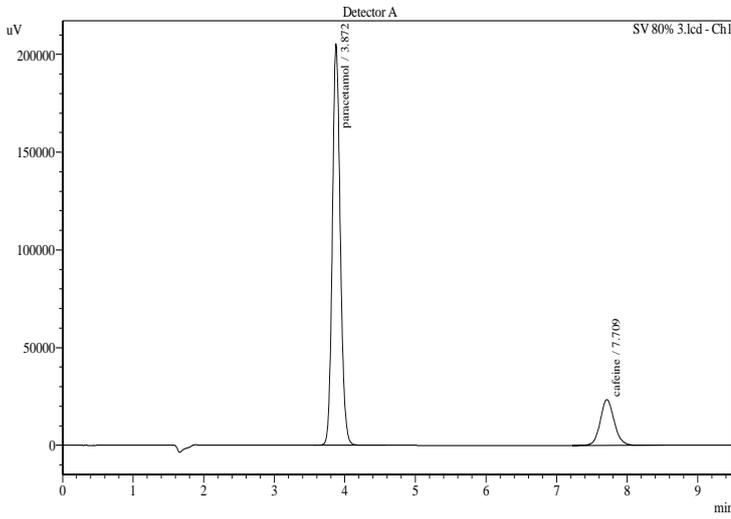


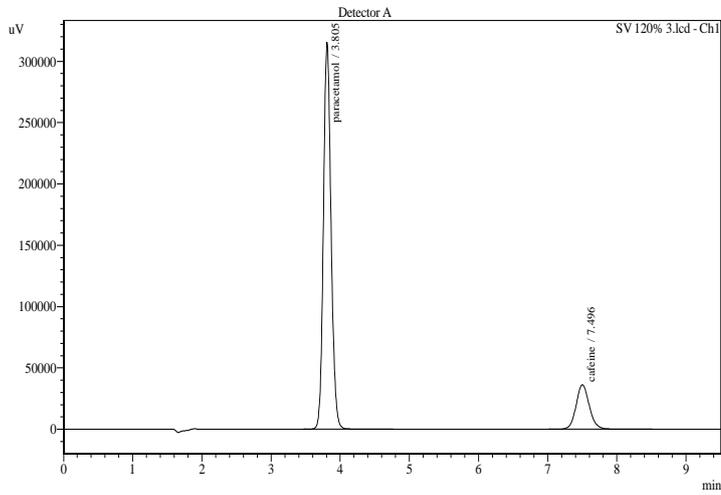
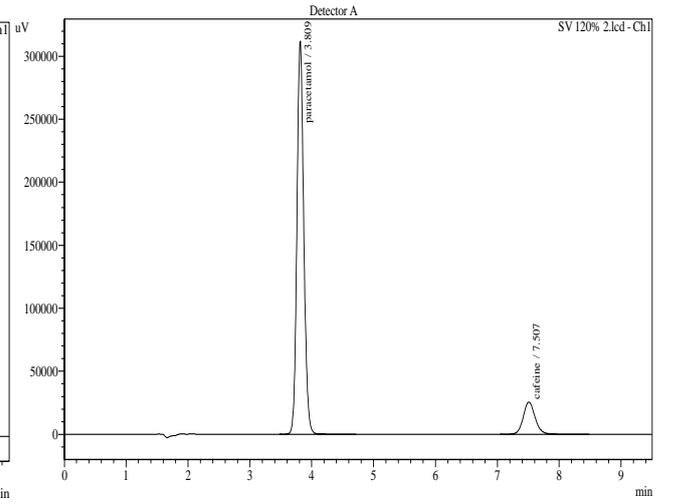
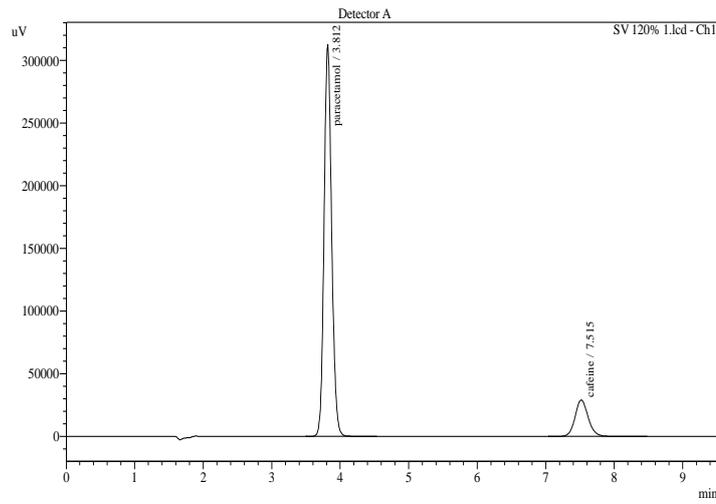
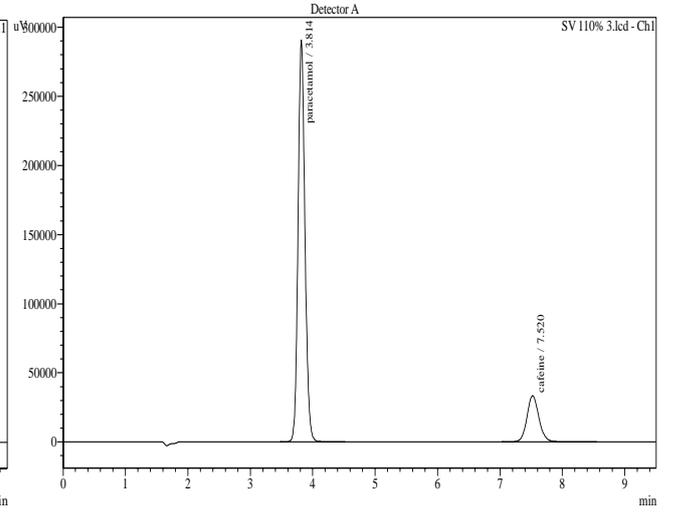
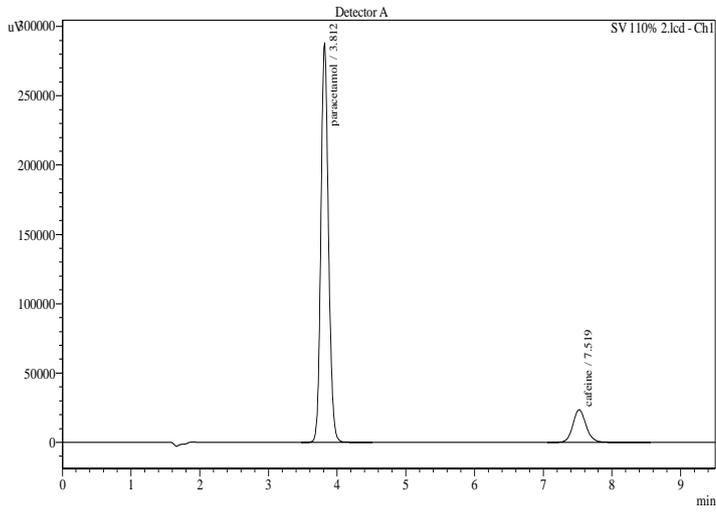


### Série 3









---

---

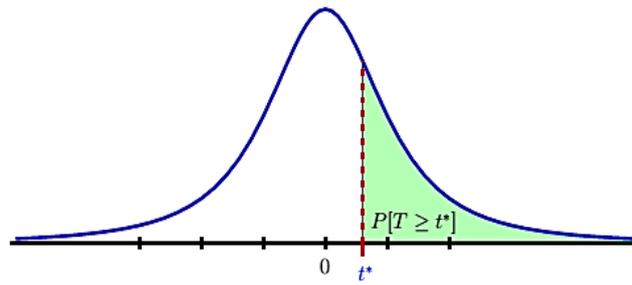
**ANNEXE IV**  
**TABLE DE STUDENT**

---

---

Tableau T

Tableau de  $t^*$  tel qu'une variable de Student à  $dl$  degrés de liberté ait probabilité  $p$  d'être supérieure à  $t^*$



$dl$	$P[T \geq t^*] = p$											
	0.25	0.2	0.15	0.1	0.05	0.025	0.02	0.01	0.005	0.0025	0.001	0.0005
1	1.000	1.376	1.963	3.078	6.314	12.71	15.89	31.82	63.66	127.3	318.3	636.6
2	.8165	1.061	1.386	1.886	2.920	4.303	4.849	6.965	9.925	14.09	22.33	31.60
3	.7649	.9785	1.250	1.638	2.353	3.182	3.482	4.541	5.841	7.453	10.21	12.92
4	.7407	.9410	1.190	1.533	2.132	2.776	2.999	3.747	4.604	5.598	7.173	8.610
5	.7267	.9195	1.156	1.476	2.015	2.571	2.757	3.365	4.032	4.773	5.893	6.869
6	.7176	.9057	1.134	1.440	1.943	2.447	2.612	3.143	3.707	4.317	5.208	5.959
7	.7111	.8960	1.119	1.415	1.895	2.365	2.517	2.998	3.499	4.029	4.785	5.408
8	.7064	.8889	1.108	1.397	1.860	2.306	2.449	2.896	3.355	3.833	4.501	5.041
9	.7027	.8834	1.100	1.383	1.833	2.262	2.398	2.821	3.250	3.690	4.297	4.781
10	.6998	.8791	1.093	1.372	1.812	2.228	2.359	2.764	3.169	3.581	4.144	4.587
11	.6974	.8755	1.088	1.363	1.796	2.201	2.328	2.718	3.106	3.497	4.025	4.437
12	.6955	.8726	1.083	1.356	1.782	2.179	2.303	2.681	3.055	3.428	3.930	4.318
13	.6938	.8702	1.079	1.350	1.771	2.160	2.282	2.650	3.012	3.372	3.852	4.221
14	.6924	.8681	1.076	1.345	1.761	2.145	2.264	2.624	2.977	3.326	3.787	4.140
15	.6912	.8662	1.074	1.341	1.753	2.131	2.249	2.602	2.947	3.286	3.733	4.073
16	.6901	.8647	1.071	1.337	1.746	2.120	2.235	2.583	2.921	3.252	3.686	4.015
17	.6892	.8633	1.069	1.333	1.740	2.110	2.224	2.567	2.898	3.222	3.646	3.965
18	.6884	.8620	1.067	1.330	1.734	2.101	2.214	2.552	2.878	3.197	3.610	3.922
19	.6876	.8610	1.066	1.328	1.729	2.093	2.205	2.539	2.861	3.174	3.579	3.883
20	.6870	.8600	1.064	1.325	1.725	2.086	2.197	2.528	2.845	3.153	3.552	3.850
21	.6864	.8591	1.063	1.323	1.721	2.080	2.189	2.518	2.831	3.135	3.527	3.819
22	.6858	.8583	1.061	1.321	1.717	2.074	2.183	2.508	2.819	3.119	3.505	3.792
23	.6853	.8575	1.060	1.319	1.714	2.069	2.177	2.500	2.807	3.104	3.485	3.768
24	.6848	.8569	1.059	1.318	1.711	2.064	2.172	2.492	2.797	3.091	3.467	3.745
25	.6844	.8562	1.058	1.316	1.708	2.060	2.167	2.485	2.787	3.078	3.450	3.725
26	.6840	.8557	1.058	1.315	1.706	2.056	2.162	2.479	2.779	3.067	3.435	3.707
27	.6837	.8551	1.057	1.314	1.703	2.052	2.158	2.473	2.771	3.057	3.421	3.690
28	.6834	.8546	1.056	1.313	1.701	2.048	2.154	2.467	2.763	3.047	3.408	3.674
29	.6830	.8542	1.055	1.311	1.699	2.045	2.150	2.462	2.756	3.038	3.396	3.659
30	.6828	.8538	1.055	1.310	1.697	2.042	2.147	2.457	2.750	3.030	3.385	3.646
40	.6807	.8507	1.050	1.303	1.684	2.021	2.123	2.423	2.704	2.971	3.307	3.551
50	.6794	.8489	1.047	1.299	1.676	2.009	2.109	2.403	2.678	2.937	3.261	3.496
60	.6786	.8477	1.045	1.296	1.671	2.000	2.099	2.390	2.660	2.915	3.232	3.460
80	.6776	.8461	1.043	1.292	1.664	1.990	2.088	2.374	2.639	2.887	3.195	3.416
100	.6770	.8452	1.042	1.290	1.660	1.984	2.081	2.364	2.626	2.871	3.174	3.390
1000	.6747	.8420	1.037	1.282	1.646	1.962	2.056	2.330	2.581	2.813	3.098	3.300
$z^*$	0.674	0.842	1.036	1.282	1.645	1.960	2.054	2.326	2.576	2.807	3.090	3.291
	0.25	0.2	0.15	0.1	0.05	0.025	0.02	0.01	0.005	0.0025	0.001	0.0005

---

---

**ANNEXE V**  
**PROTOCOLE EXPERIMENTAL**

---

---

## Protocole expérimental

Broyer 5 comprimés, faire la pesée et prendre une prise d'essai PE (en mg)



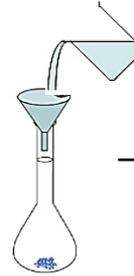
1

Verser la PE dans une fiole jaugée de 100ml



2

Ajouter environ 50ml de diluant



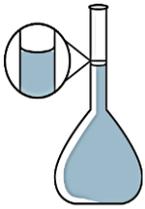
3

Mettre au sonicateur pendant 5 à 10 minutes



4

Compléter au trait de jauge avec le même diluant



8

Faire une dilution 1/100<sup>ème</sup>



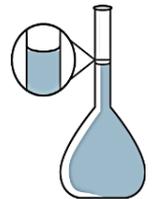
7

Mélanger par retournement



6

Compléter au trait de jauge avec le même diluant



5

Mélanger par retournement



9

Remplir les vials



10

Injecter



11

### Résultats

#### Paracétamol

On retrouve la concentration fille ( $C_1$ ) par calcul direct.

La masse contenue dans la PE =  $X_1 = C_1 \times \frac{1}{f} \times V$

Avec :  $\frac{1}{f}$  = inverse du facteur de dilution et  $V = 100\text{ml}$

- $X_1 \rightarrow \text{PE}$
- $T$  (teneur)  $\rightarrow$  Masse moyenne (MM) de 5Cp

$$T = \frac{MM \times X_1}{PE} = \frac{MM \times C_1 \times V}{f \times PE} \text{ mg/Cp}$$

#### Caféine

Pour trouver la concentration fille en caféine ( $C_2$ ), il faut faire à chaque fois une transformation inverse du logarithme népérien (ln) des résultats obtenus.

La masse contenue dans la PE =  $X_2 = C_2 \times \frac{1}{f} \times V$

- $X_2 \rightarrow \text{PE}$
- $T'$  (teneur)  $\rightarrow$  Masse moyenne (MM) de 5Cp

$$T' = \frac{MM \times X_2}{PE} = \frac{MM \times C_2 \times V}{f \times PE} \text{ mg/Cp}$$

---

**ANNEXE VI**  
**GLOSSAIRE**

---

## Glossaire

**Acylation** : c'est une substitution dans une molécule, d'un atome d'hydrogène par un radical acyle R-CO-. (C'est une des réactions les plus importantes de la synthèse organique.)

**Alcaloïdes** : ce sont des composés organiques, azotés, d'origine végétale. Ils peuvent être classés, selon qu'ils possèdent ou non un acide aminé comme précurseur direct, en trois grandes classes :

- Les alcaloïdes vrais : généralement toxiques, ont une structure hétérocyclique azotée et dérivent des acides aminés ;
- Les pseudo-alcaloïdes : ils ont une structure hétérocyclique azotée, mais ne dérivent pas des acides aminés ;
- Les proto-alcaloïdes : l'atome d'azote dérivé d'un acide aminé ne fait pas partie d'un hétérocycle.

**Angiogenèse** : est le processus de formation de néo-vaisseaux à partir de vaisseaux préexistants au cours du développement et chez l'adulte. Physiologiquement, elle joue un rôle primordial non seulement lors du développement embryonnaire, mais aussi plus tard, dans la transformation cyclique de l'endomètre et dans les phénomènes de cicatrisation tissulaire et d'adaptation des tissus à une hypoxie ou une inflammation locale.

**Apnée de la prématurité** : L'apnée du prématuré est définie comme des pauses respiratoires > à 20 s ou des pauses < à 20 s associées à une bradycardie (< à 80 battements/minute), à une cyanose et/ou à une saturation en oxygène < à 85% chez un nourrisson né avant 37 semaines de gestation, en l'absence de troubles sous-jacents cause d'apnée.

**$\beta$  endorphine** : c'est un neuropeptide opioïde endogène naturel composé de 31 acides aminés, résultant de l'hydrolyse partielle du fragment COOH-terminal de la proopiomélanocortine (POMC). Il est sécrété par le système nerveux central mais aussi par la médullosurrénale.

**Canaux RyRs (récepteurs de la ryanodine)** : ils constituent une classe de canaux calciques dans diverses formes de muscles. Ce sont des homotétramères, formés de 4 sous-unités identiques, insérées dans la membrane du réticulum sarcoplasmique.

**Carbone asymétrique** : est un carbone tétraédrique (c'est-à-dire lié à quatre atomes ou groupes d'atomes) qui possède quatre substituants de nature différente.

**Clairance de la créatinine :** la créatinine déchet organique éliminé exclusivement par filtration rénale, la mesure de sa clairance ; rapport entre son débit d'élimination et sa concentration dans le sang, permet d'évaluer la filtration rénale.

**Couplage excitation-contraction :** c'est le processus qui associe les événements électrochimiques au niveau de la membrane de surface à la libération du  $\text{Ca}^{2+}$  par le réticulum sarcoplasmique.

**COX3 :** c'est une nouvelle variante d'épissage de la COX1, qui contrairement à cette dernière a conservé l'intron 1 dans ces séquences d'ARN.

**Demi-vie :** correspond au temps nécessaire pour que, après l'administration d'un médicament, sa concentration plasmatique diminue de moitié. Elle est exprimée en unité de temps et peut varier de quelques minutes à plusieurs semaines selon les médicaments.

**Dynorphine A :** c'est un peptide opioïde endogène, agoniste des récepteurs opioïdes mu ( $\mu$ ), kappa ( $\kappa$ ) et delta ( $\delta$ ). Mais elle agit principalement sur le récepteur ( $\kappa$ ) à l'origine de ses activités inhibitrices c'est-à-dire antinociceptives ou opioïdes. D'autre part, elle se fixe sur les récepteurs de la bradykinine au niveau du système nerveux central provoquant un effet pronociceptif ou non opioïde. La dynorphine A est régulée à la hausse dans de nombreux états douloureux, telles que les douleurs neuropathiques ; elle n'est pas nécessaire pour le déclenchement de la douleur mais plutôt pour son maintien.

**Fibrose hépatique :** La fibrose est une cicatrisation excessive résultant de l'accumulation de tissu conjonctif dans le foie, suite à une agression chronique surtout en cas de composante inflammatoire.

**Guarana :** plante brésilienne hautement caféinée, d'où le nom guaranine de la caféine.

**Hémodynamique :** partie de la physiologie étudiant les lois d'écoulement du sang dans les vaisseaux tel que le débit, la pression, et la vitesse.

**Méthylxanthines :** sont des dérivés de la xanthine portant des radicaux de méthyle ( $\text{CH}_3$  : radical monovalent dérivé du méthane  $\text{CH}_4$ ) au niveau du nitrogène "azote" = "N" à l'emplacement 1, 3,7 du noyau de la xanthine.

**Phosphodiésterases :** sont les enzymes qui catabolisent les nucléotides cycliques, seconds messagers : AMPc et GMPc.

**Prostaglandines :** ce sont des médiateurs chimiques impliqués dans la fièvre, l'inflammation et la douleur.

**Prostaglandines H2 synthétase :** appelées communément cyclooxygénases, dont il existe deux isoformes : la PGHS1 constitutive (COX1) et la PGHS2 inducible (COX2), sont des enzymes qui catalysent la transformation de l'acide arachidonique en prostaglandines. Elles comportent deux sites catalytiques : un domaine de la cyclooxygénase ou COX (site de fixation des AINS) et un domaine de la peroxydase ou POX sur lequel se fixerait le paracétamol.

**Récepteurs cannabinoïdes de type 1 (CB<sub>1</sub>) :** le système cannabinoïde est composé de deux récepteurs : CB<sub>1</sub> et CB<sub>2</sub>, d'autres travaux suggèrent l'existence d'autres sous-types de récepteurs aux cannabinoïdes. Les récepteurs CB<sub>1</sub> sont des hétérorécepteurs présynaptiques (répondent aux neurotransmetteurs, aux neuromodulateurs et aux neurohormones), appartenant à la famille des récepteurs à 7 hélices transmembranaires, couplés à des protéines G. Ils sont présents majoritairement au niveau central, mais également au niveau périphérique. Leur distribution au niveau du cerveau est bien corrélée aux effets comportementaux des cannabinoïdes sur la mémoire, la perception sensorielle et le contrôle des mouvements. L'activation des récepteurs CB<sub>1</sub> entraîne notamment une diminution de l'excitabilité neuronale et une inhibition de la libération de neurotransmetteurs pronociceptifs.

**Récepteurs TRPV<sub>1</sub> :** ce sont des récepteurs ionotropiques, c'est-à-dire que la fixation des neurotransmetteurs sur ces derniers entraîne l'ouverture des canaux ioniques. Ils sont activés par des molécules de la famille des vanilloïdes telle que la capsaïcine. Ces récepteurs sont exprimés au niveau de l'enveloppe cutanée, des muqueuses et dans certaine région du système nerveux central. Activés au niveau de la périphérie, ils manifestent leur caractère pronociceptif ; mobilisés au niveau cérébral par le paracétamol, ils sont antalgiques.

**Stéréo-isomères :** sont des composés ayant la même formule de constitution (formule semi-développée) mais qui diffèrent par l'agencement spatial (ou configuration spatiale) de leurs atomes.

**Théobromine :** substance présente dans le chocolat, son nom est d'origine grec, vient de « theobroma », composé de theo (Dieu) et bromo (nourriture) signifiant « nourriture des dieux », avec le suffixe « ine » donné aux alcaloïdes. C'est une molécule organique, d'origine végétale, extraite notamment à partir des graines du cacaoyer. Elle est très proche de la caféine ; a un effet stimulant et énergisant, mais son action est plus longue et plus douce.

**Théophylline** : c'est une base xanthique, l'une des principales substances actives des feuilles de thé, d'où elle tire son nom.

**Tétrade DHPR** : capteur de tension formé par quatre récepteurs identiques de dihydropyridine.

**Volume de distribution (Vd)** : représente l'espace de dilution du médicament. Ce paramètre correspond au volume fictif dans lequel le médicament devrait être réparti pour être à la même concentration que dans le plasma. Le Vd traduit l'intensité de la diffusion du médicament dans l'organisme.

## RÉSUMÉ

Le concept de l'assurance qualité devient de plus en plus une nécessité inexorable dans le domaine de l'industrie pharmaceutique. Pour cela toute méthode de dosage mise au point doit être validée avant sa mise en routine, afin de garantir qu'un produit pharmaceutique est d'une qualité optimale.

L'apparition de la caféine dans la composition de nombreuses spécialités pharmaceutiques notamment les médicaments antidouleur, a fait l'objet de nombreuses études confirmant le renforcement de l'efficacité de ces derniers par la caféine associée. Différentes méthodes de dosage simultané ont été alors développées dans le but de bénéficier de la réduction du temps et du coup de l'analyse par les laboratoires de contrôle qualité dans l'industrie pharmaceutique.

Dans cette thèse, nous nous sommes intéressés à l'optimisation d'une méthode de dosage simultané du paracétamol et de la caféine dans des comprimés par Chromatographie Liquide à Haute Performance (HPLC), ainsi que sa validation suivant la démarche harmonisée basée sur des critères décisionnels, reposant sur l'application du profil d'exactitude, publiée par la Société Française des Sciences et Techniques Pharmaceutiques (SFSTP) dans la revue STP Pharma Pratique en janvier 2006.

La présente étude est introduite par une partie théorique définissant les caractéristiques du paracétamol, de la caféine, leur association, ainsi que de la validation des méthodes analytiques. La partie expérimentale a été réalisée au niveau du laboratoire de chimie analytique du département de Pharmacie de la faculté de Médecine de TIZI OUZOU, où nous avons effectué une série de tests afin d'optimiser la méthode de dosage, cette étape s'est concrétisée par l'élaboration d'un protocole de validation, objet de la suite du travail.

En conclusion, les résultats de notre étude ont démontré que la méthode est spécifique, linéaire et exacte dans l'intervalle [40 ; 60] mg/L pour le paracétamol et [5,2 ; 7,8] mg/L pour la caféine, correspondant à des teneurs théoriques de [400 ; 600] mg et [52 ; 78] mg successivement suivant les dilutions utilisées dans notre méthode, avec une probabilité de confiance de 95% que les futures mesures soient comprises dans les limites d'acceptation préétablies de  $\pm 5\%$ , Ce qui atteste sa validité et son aptitude à être appliquée en routine pour le dosage simultané du paracétamol et de la caféine dans les comprimés dosés à 500 mg et 65 mg des deux principes actifs respectivement.

**Mots clés : paracétamol, caféine, dosage simultané, HPLC, optimisation, validation analytique, SFSTP, profil d'exactitude.**

## ABSTRACT

The concept of quality assurance is becoming more and more of an inexorable necessity in the pharmaceutical industry. For this reason, every developed assay method has to be validated before allowing its routine use, in order to guarantee that a pharmaceutical product is of an optimal quality.

The appearance of caffeine in the composition of many pharmaceutical specialties, particularly painkillers, has been the subject of numerous studies confirming that the effectiveness of these analgesics can be enhanced by the associated caffeine. Different simultaneous determination methods were then developed in order to reduce the time and the cost of the analysis by the quality control laboratories in the pharmaceutical industry.

In this thesis, we have optimized a method for the simultaneous determination of paracetamol and caffeine in tablets by High Performance Liquid Chromatography (HPLC), as well as its validation according to the harmonized approach based on decision criteria, relying on the application of the accuracy profile, published by the French Society of Pharmaceutical Sciences and Techniques (SFSTP) in the journal STP Pharma Pratique in January 2006.

The present study is introduced by a theoretical part defining the characteristics of paracetamol, caffeine, their association, and the validation of analytical methods.

The experimentation was conducted at the laboratory of analytical chemistry of the department of Pharmacy of the faculty of Medicine TIZI OUZOU, where a series of test was carried out in order to optimize the method of dosage and to develop the validation protocol.

In conclusion, the results of our study demonstrated that the method is accurate with good selectivity and linearity in the range 40-60 mg/L for paracetamol and 5.2-7.8 mg/L for caffeine, corresponding to theoretical contents of 400-600 mg and 52-78 mg successively according to the dilutions used in our method, with a 95% confidence probability that the future measurements will be included in the pre-set acceptance limits of  $\pm 5\%$ , This confirms its validity and its suitability for routine application for the simultaneous determination of paracetamol and caffeine in 500 mg and 65 mg tablets of the two active ingredients respectively.

**Keywords : paracetamol, caffeine, simultaneous determination, HPLC, optimization, analytical validation, SFSTP, accuracy profile.**