

N° d'ordre :

REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE  
MINISTERE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR ET DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE

UNIVERSITE DE MOULOUD MAMMARI DE TIZI-OUZOU  
FACULTE DES SCIENCES

DEPARTEMENT DE CHIMIE



## **MEMOIRE**

Présenté pour obtenir le Grade de

## **MASTER**

Filière : Chimie

Spécialité : Chimie pharmaceutique

Par

**M<sup>lle</sup>Djebbar Nassira.**

**M<sup>lle</sup>Zaouchi Fouzia**

Thème

**MISE AU POINT ET VALIDATION D'UNE METHODE DE  
DOSAGE DU DICLOFENAC DE SODIUM DANS DES  
SUPPOSITOIRES PAR UV-VISIBLE**

Soutenu le 10 juillet 2012, devant le jury composé de :

M <sup>me</sup> Fernane Farida	MCAPrésident de jury
M <sup>me</sup> Belmahdi Lila	MCB Promotrice
M <sup>r</sup> . Mamou Marzouk	MCBCo- promoteur
M <sup>elle</sup> Touzouirt Saida	MCBExaminatrice
M <sup>me</sup> Ayati Fadila	MCBExaminatrice

# Remerciements

Nous tenons à exprimer notre profonde gratitude à notre promotrice,

Madame Belmahdi pour nous avoir encadrés et guidés tout au long de notre travail.

Nos vifs remerciements vont aussi au,

Docteur Mamou, nous a entourées par sa générosité, il s'est donné à fond pour mener à terme notre pratique au sein de leur laboratoire de biochimie situé a biomédical de l'université Mouloud Mammeri de Tiziouzou

Madame Kéchidi Djamilia qui nous a aidées, malgré ses préoccupations, pour procurer la matière première au niveau de l'unité de Saidal.

Que les membres du jury trouvent ici nos remerciements les plus vifs pour avoir accepté d'honorer par leurs jugements notre travail.

Nos sincères sentiments vont à tous ceux qui, de près ou de loin ont contribué à la réalisation de ce travail.



# Dédicaces

*C'est avec un grand et immense plaisir que  
je dédie*

*ce modeste travail à :*

*Mes chers parents qui m'ont soutenu  
durant tout mon parcours d'étude.*

*Mes frères Rabah et Malik.*

*Ma cher sœur Farida.*

*Mon oncle et sa famille*

*Ma tante et sa famille*

*A toi Nassiara et toute ta famille*

*A tous mes amis(es )*

**Fouzia**



# Dédicaces

*C'est avec un grand et immense plaisir que je  
dédie*

*ce modeste travail à :*

*Mes chers parents qui m'ont soutenu durant  
tout mon parcours d'étude.*

*Mes frères Hamid, Hakim et Youcef.*

*Mes chers sœurs.*

*Mes belles sœurs et mes beaux frères .*

*Mes nièces et nouveaux: Kenza ,Celia, Massi,  
Assalasse, Yacine, Melissa et Lilia.*

*A toi Fouzia et toute ta famille*

*A tous mes amis(es )*

## Nassira

# Sommaire

## Partie bibliographique

### Introduction.

### Chapitre I Anti-inflammatoires et Diclofénac sodique.

I. Les anti-inflammatoires .....	1
I.1 Définition.....	1
I.2 Les différents types des anti-inflammatoires .....	1
I.2.1 Anti-histaminiques .....	2
I.2.2 Anti-PAF .....	2
I.2.3 Anti-bradykinines.....	3
I.2.4 Anti-leucotriennes .....	3
I.2.5Anti-inflammatoires hormonaux (corticoïdes).....	4
I.2.6Anti-inflammatoires non hormonaux(AINS) .....	4
I. Diclofénac	
II. 1Structure et propriétés physico-chimiques de Diclofénac.....	5
II. 2 Mécanisme d’action de Diclofénac sodique.....	6
II. 3 Pharmacocinétique de Diclofénac sodique.....	8
II. 3.1 Absorption.....	8
II. 3.2Distribution .....	8
II. 3.3 Métabolisme .....	8
II. 3.4 Excrétion .....	8
II. 4 Indication .....	9
II. 5Contre indication .....	9
II. 6 Effets indésirables .....	10

## **Chapitre II Les suppositoires**

### Introduction

I. Les formes galéniques destinées à la voie rectale .....	12
II. Les suppositoires .....	13
1. Définition .....	13
2. Mode d'action des suppositoires.....	13
III. Fabrication des suppositoires.....	13

## **Chapitre III Spectrométrie UV-visible.**

### Introduction

I.Définition.....	17
II.Les limites de la spectrométrie UV- visible et l'origine del'absorption.....	17
III.La loi de Beer Lambert.....	18
1.Loi de Lambert.....	18
2.Loi de Beer.....	19
IV.Leschromophores.....	20
V.Les transitions électroniques.....	20
Transition $\alpha \rightarrow \alpha^*$ .....	20
Transition $n \rightarrow \alpha^*$ .....	21
Transition $\pi \rightarrow \pi^*$ .....	21
VI.Instrumentation dans l'UV-VIS (Appareillage).....	21
1.Sources lumineuses.....	21
2.Systèmes dispersifs.....	22
3.Cuve.....	22
4.Détecteurs.....	22

## **Chapitre IV Validation analytique**

### Introduction

I.Définition .....	23
II.But de la validation .....	23
III.Les critères de la validation .....	24
III.1. Spécificité .....	24
III.2. Linéarité.....	25
III.3. Exactitude .....	25
III.4. Fidélité .....	25
III.5. sensibilité .....	26
III.6. Seuil de détection .....	26
III.7. Seuil de quantification .....	26
IV.Aspect réglementaire de la validation.....	26

## **Partie expérimentale**

### Introduction

I.Matériel et méthode.....	28
I.1.Matériel.....	28
I.2.Méthode .....	29
I.2.1Préparation des solutions .....	29
I.2.2. Mise au point des Conditions d'analyse.....	30
I.2.3Validation analytique de la méthode de dosage .....	31
I.2.3.1Etude de la linéarité.....	32
I.2.3.2Etude de l'exactitude .....	40
I.2.3.3Etude de la fidélité.....	41
I.2.3.4Etude de la spécificité.....	43
II.Résultats et discussion.....	43
II.1.Mise au point des Conditions d'analyse.....	43
II.1.1Choix de la longueur d'onde .....	43

II.1.2 Test de conformité du système .....	44
II.2. Validation de la méthode de dosage .....	45
II. 2.1 Linéarité .....	45
Résultats du standard (principe actif seul) .....	45
Résultats sur l'échantillon .....	47
II. 2.2 Exactitude.....	54
II. 2.2.1 Principe actif .....	54
II. 2.2.2 Forme reconstituée .....	57
II. 2.3 Fidélité .....	59
II. 2.4 spécificité .....	62
Conclusion .....	63

Conclusion générale.

Références bibliographiques.

Annexe

## Liste des figures

Figure 1 : Formule développée de Diclofénac sodique (3)

Figure 2 : mécanisme d'action des AINS (4)

Figure3 : Schéma de l'appareillage de l'UV (12)

Figure 4 : Schéma résumant le protocole expérimental de l'étude de la linéarité sur standard

Figure 5 : Schéma résumant le protocole expérimental de l'étude de linéarité sur échantillon

Figure 6 : Stratégie statistique

Figure 7 : Spectre d'absorption de Diclofénac sodique dans NaOH(0,05M)

Figure8 : Courbe d'étalonnage sur standard

Figure9 : Courbe d'étalonnage sur placebo chargé

## Liste des tableaux

Tableau 1 : Propriétés physico-chimiques du Diclofénac sodique(1)

Tableau 2 : Les critères de la validation analytique (16)

Tableau3 : Test de l'existence d'une pente significative

Tableau4 : Test de validité de la droite de régression

Tableau5 : Test de validité des moyennes

Tableau6 : Résultats du standard (principe actif seul)

Tableau7 : Résultats de l'échantillon (forme reconstituée)

Tableau 8 : Résultats du standard après changement de variable

Tableau 9 : Résultats de l'échantillon après changement de variable

Tableau 10:Résultat de l'exactitude sur standard

Tableau11 : Résultat de l'exactitude sur forme reconstituée

Tableau 12 :Résultats de la première série de l'étude de la fidélité

Tableau13 :Résultats de la deuxième série de l'étude de la fidélité

Tableau 14 :Résultats de la troisième série de l'étude de la fidélité

## Liste des abréviations

$X_{ij}$  : valeur brute indépendante

$Y_{ij}$  : valeur brute dépendante.

—  
 $\bar{X}$  : moyenne des valeurs  $X_{ij}$  du groupe j.

$X_j$  : moyenne des valeurs  $X_{ij}$  du groupe j.

—  
 $\bar{Y}$  : moyenne des observations  $Y_{ij}$ .

—  
 $\bar{X}$  : moyenne des valeurs  $X_j$  des k groupe.

$Y$  : moyenne des valeurs  $Y_j$  des k groupes.

$S$  : écart type estimé de n valeurs.

$S_a$  : écart type de l'ordonnée à l'origine.

$r$  : coefficient de corrélation.

$n_j$  : nombre d'observation du groupe j.

$m_j$  : moyenne de  $n_j$  valeurs du groupe j.

CV : coefficient de variation.

$S^2$  : variance.

$S^2$  max : plus grande des variances.

$N$  : nombre total d'observations  $Y_{ij}$  dans l'ensemble des k groupe.

IRM : intervalle de confiance du recouvrement moyen RM .

$K$  : nombre de groupe.

$t$  : test de Student.

$C$  : test Cochran.

F : test de Fisher.

DDL : degrés de liberté .

$S_J$  : écart type à l'intérieure du groupe j.

$S_j^2$  : la variance des répétitions à l'intérieure du groupe.

$S_R^2$  : variance de répétabilité.

$S_g^2$  : variance inter-groupes.

a : ordonnée à l'origine de la droite de régression.

b : pente de la droite de régression.

PA : principe actif.

FR : forme reconstituée.

ICH : Internationale Conférence on harmonisation.

SFSTP : Guide de validation analytique c'est une commission (SFSTP).

AINS : anti-inflammatoires non stéroïdiens.

UV : ultra- violet.

## I. Anti-inflammatoires

À une agression par un agent pathogène, l'organisme répond par une réaction défensive qui prend deux aspects :

- l'inflammation, non spécifique, qui s'accompagne de la libération et de l'intervention de multiples autacoïdes et comporte des phénomènes vasculaires et cellulaires.
- l'immunité, spécifique, soit humorale, soit tissulaire.

Ces réactions peuvent entraîner :

- des phénomènes désagréables ou pénibles que l'on cherche à soulager.
- des phénomènes dangereux que l'on cherche à prévenir ou à combattre.
- des phénomènes pervers (allergies, maladies auto-immunes) que l'on cherche à contenir.

Les médicaments utilisés sont les anti-inflammatoires et les immunodépresseurs, sans que la frontière entre ces deux classes soit absolue.

### **I-1 Définition :**

Les anti-inflammatoires sont les médicaments destinés à prévenir ou à contenir les manifestations inflammatoires.

Ils agissent sur la physiopathologie de l'inflammation. Ils en atténuent ou suppriment les symptômes, sans agir sur leur étiologie. Celle-ci doit être si possible traitée de son côté.

L'arrêt du traitement anti-inflammatoire peut être suivi, si la cause de l'inflammation n'a pas disparu spontanément ou thérapeutiquement, de la réapparition des symptômes.

Les anti-inflammatoires sont des médicaments symptomatiques. Leur arrêt peut être suivi d'un phénomène de rebond. **(1)**

### **I-2- Différents types des anti- inflammatoire :**

#### **I-2-1-Anti-histaminiques H1 :**

L'histamine est libérée à partir des mastocytes, essentiellement au cours des processus d'hypersensibilité immédiate (allergies de type I).

Elle est également libérée directement par des venins et certains médicaments (histamino-libération).

L'histamine, par stimulation des récepteurs H1, entraîne les effets inflammatoires classiques : vasodilatation, augmentation de la perméabilité vasculaire (surtout des veinules), douleur (par stimulation des terminaisons nociceptives). Ces effets sont rapides, brutaux et brefs.

Les antihistaminiques H1 s'opposent aux effets de l'histamine. Ce sont des antagonistes de compétition (histaminolytiques) des récepteurs H1 de l'histamine. Ils sont plus efficaces en traitement préventif que curatif. Leur action ne peut pas être complète car ils sont totalement ou largement, spécifiques de l'histamine. (1)

#### **I-2-2-Anti-paf :**

Le PAF est le « platelet-activating-factor », aussi appelé « PAF-aceter ». C'est un phospholipide (en fait, un mélange de dérivés voisins).

Le PAF se forme lors de l'inflammation au sein de nombreuses cellules sans y être stocké (polynucléaires, éosinophiles, mastocytes, macrophages, plaquettes, etc.). Sa synthèse est commandée par la phospholipase A2 (comme celle des prostaglandines).

Les récepteurs du PAF sont spécifiques et largement répandus dans l'organisme.

Les effets de leur stimulation sont variés :

- effets inflammatoires (vasodilatation, augmentation de la perméabilité vasculaire, effet nociceptif, chimiotactisme)
- agrégation et lyse des plaquettes
- effet spasmogène notamment bronchique

## Anti –inflammatoire et Diclofénac sodique

---

Etant donné cette intervention du PAF au cours de l'inflammation, les anti-PAF pourraient en théorie constituer des anti-inflammatoires, des anti-allergiques et, peut-être, des antiasthmatiques. (1)

### **I-2-3-Anti-bradykinines :**

La bradykinine se forme à partir d'une  $\alpha$ -globuline plasmatique, le kininogène, grâce à une enzyme protéolytique, la kallikréine. On trouve aussi des kallikréines dans de nombreux tissus (pancréas, glandes salivaires, côlon, peau, etc.) où elles génèrent surtout de la kallidine

Effets pharmacodynamiques :

- vasodilatation et augmentation de la perméabilité capillaire, par un mécanisme indirect (libération de NO et de PGI<sub>2</sub> au niveau de l'épithélium vasculaire)
- nociception, au niveau des terminaisons libres des fibres centripètes de la douleur
- effet spasmogène, lent et prolongé, notamment au niveau de l'utérus et de l'intestin
- stimulation du transport de l'eau et des ions (glandes exocrines, vésicule biliaire, intestin, bronches). (1)

### **I-2-4-Anti-leucotriennes :**

Les leucotriennes sont multiples.

Effets pharmacodynamiques :

- chimiotactisme et activation des macrophages
- vasodilatation (sauf coronaires) et augmentation de la perméabilité vasculaire
- bronchoconstriction.

Rôle physiopathologique : les leucotriennes se forment au cours de l'inflammation aiguë et chronique, notamment au cours de l'asthme.

Les anti-leucotriennes (antagonistes directs au niveau des récepteurs ou inhibiteurs de la lipooxygénase) sont des anti-inflammatoires et des anti-asthmatiques (montélukast Singular). (1)

### **I-2-5- Anti-inflammatoires hormonaux (Corticoïdes) :**

Les anti-inflammatoires hormonaux, couramment appelés « corticoïdes » sont des dérivés semi synthétiques des hormones corticosurréaliennes et, plus exactement, des glucocorticoïdes.

Ce sont des anti-inflammatoires et des immunodépresseurs tout en conservant des propriétés hormonales résiduelles.

Contrairement aux anti-autacoïdes spécifiques précédents, les corticoïdes ont de multiples mécanismes d'action. Ceci rend compte à la fois de la multiplicité de leurs propriétés pharmacodynamiques, du grand nombre de leurs indications, mais aussi de leurs effets indésirables. Ces derniers en font strictement des médicaments de prescription (à la différence des AINS) pour lesquels le rapport bénéfice/risque doit être soigneusement pesé, surtout en traitement prolongé.

Les corticoïdes sont une des classes pharmaco thérapeutiques les plus importantes car parmi les plus largement utilisées aussi bien en médecine générale qu'en spécialités. (1)

### **I-2-6-Anti-inflammatoires non stéroïdiens (AINS) :**

L'origine de l'appellation « anti-inflammatoires non hormonaux » ou encore « anti-inflammatoires non stéroïdiens », couramment « AINS », est historique. En effet, à l'époque de leur découverte, on ne connaissait comme anti-inflammatoires que les dérivés des hormones surréaliennes qui sont chimiquement des stéroïdes. Leur mécanisme d'action n'a de même été connu qu'après la découverte des prostaglandines. Le terme d'AINS devenu classique a été conservé alors que ceux d'« inhibiteurs de la synthèse des prostaglandines » ou d'« anti-prostaglandines » seraient plus appropriés, d'autant que leurs effets pharmacologiques et leur utilisation thérapeutique débordent le cadre de l'inflammation.

Les AINS sont sans doute la classe pharmaco thérapeutique la plus utilisée aussi bien en automédication qu'en prescription dans des syndromes aigus ou des

## Anti –inflammatoire et Diclofénac sodique

affections chroniques, notamment rhumatismales. Ils figurent aussi parmi les principaux fournisseurs d'effets indésirables souvent graves. (1)

### II. Diclofénac sodique :

Le diclofénac sodique est un anti-inflammatoire non stéroïdien largement prescrit comme analgésique, anti-inflammatoire et antipyrétique.

Le volume consommé au niveau mondial de diclofénac est estimé à 940 tonnes par an avec une dose définie journalière de 100 mg(2).

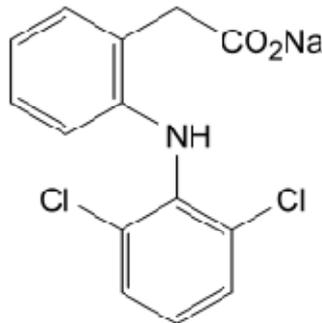
#### II.1. Structure et propriétés physico-chimique du diclofénac sodique :

Le diclofénac sodique est une poudre cristalline, blanche à faiblement jaunâtre, faiblement hygroscopique contient au minimum 99,0 pour cent et au maximum 101,0 pour cent du [2-[(2,6-dichlorophényl) amine] phényl] acétate de sodium, calculé par rapport à la substance desséchée.

**Tableau 1 : Propriétés physico-chimique du diclofénac sodique.(1)**

<b>Masse molaire</b>	<b>318,13 mol/g</b>
<b>Point de fusion</b>	<b>280°C</b>
<b>PKa</b>	<b>4</b>
<b>solubilité</b>	assez soluble dans l'eau, facilement soluble dans le méthanol, soluble dans l'alcool, peu soluble dans l'acétone

### La structure du diclofénac sodique :



**Figure1** :formule développée du diclofénac sodique(3)

### II.2.Mécanisme d'action du Diclofénac sodique :

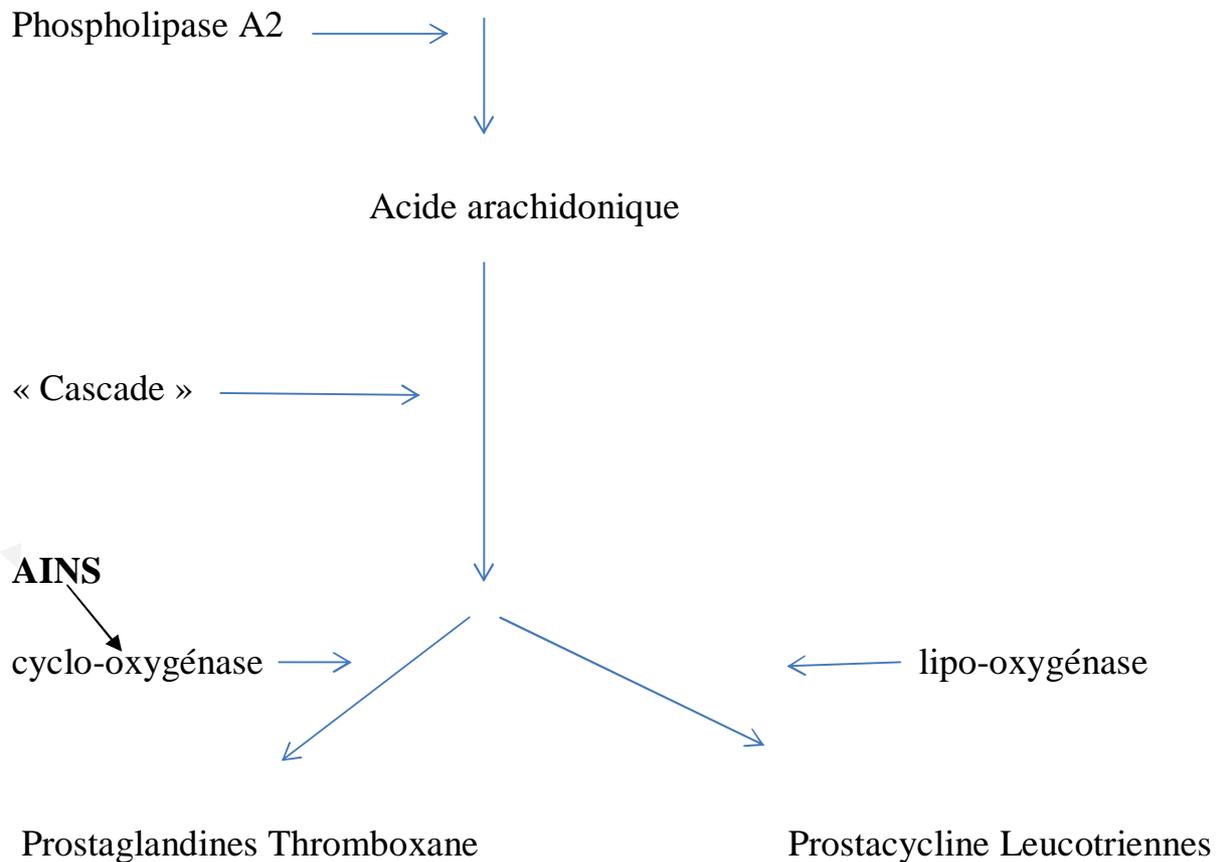
Le Diclofénac de sodium fait partie des anti-inflammatoires non stéroïdiens, c'est l'un des plus utilisés.

Les anti-inflammatoires non stéroïdiens (**AINS**) sont des médicaments symptomatiques à action rapide qui ont des propriétés analgésiques, antipyrétiques et anti-inflammatoires. Malgré leur hétérogénéité chimique, ils ont un mode d'action commun : diminution de la production tissulaire des prostaglandines (**PG**) et thromboxane (**TX**), par inhibition réversible de la cyclooxygénase (**COX**) dont il existe deux iso-enzymes (**COX-1**, constitutive et ubiquitaire et **COX-2**, inductible dans les monocytes macrophages et les polynucléaires).

Les effets indésirables (gastro-toxicité ; effets sur le rein et un effet plaquettaire) pourraient être le fait de l'inhibition de la **COX-1** gastrique et rénale, alors que les propriétés thérapeutiques probablement celles de l'inhibition de la **COX-2**. Ce mode d'action explique à la fois les propriétés thérapeutiques et la plupart des effets indésirables. (4)

## Anti -inflammatoire et Diclofénac sodique

### PHOSPHOLIPIDES



**Figure 2 : mécanisme d'action des AINS(1)**

### II.3. Pharmacocinétique du Diclofénac sodique :

#### II. 3.1-Absorption:

Administration orale: le diclofénac sodique administré par voie orale est absorbé rapidement et presque complètement et distribué par le sang à tous les organes. La concentration plasmatique montre une relation linéaire avec la dose administrée. Après l'administration d'un comprimé entérique de 50 mg de diclofénac sodique sur un estomac vide, la concentration plasmatique maximale moyenne de pointe (C<sub>MAX</sub>) était rapportée à environ 1,500 ug/ml après environ 2 heures. Il n'y a pas d'accumulation, à condition que les intervalles de la dose recommandée soient observés(6).

### II. 3.2-Distribution :

Le diclofénac est fortement lié aux protéines plasmatiques (> 99 %). Dans le plasma, la décroissance des concentrations de diclofénac est bi-phasique. Elle correspond à une phase rapide de distribution tissulaire et à une phase plus lente d'élimination. Le diclofénac diffuse dans le liquide synovial où les concentrations maximales sont mesurées 2 à 4 heures après le pic plasmatique. Le diclofénac passe en faible quantité dans le lait maternel(7).

### II.3-3-Métabolisme :

Le diclofénac est métabolisé rapidement au niveau du foie.

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

### II.3-4Excrétion :

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

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

### II.4-Indications :

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

- Traitement symptomatique au long cours : des rhumatismes inflammatoires chroniques, notamment polyarthrite rhumatoïde, spondylarthrite ankylosante ou syndromes apparentés, tels que le syndrome de Fiessinger-Leroy-Reiter et rhumatisme psoriasique, de certaines arthroses douloureuses et invalidantes.
- Traitement symptomatique de courte durée des poussées aiguës de rhumatismes abarticulaires (épaules douloureuses aiguës, tendinites, bursites), arthrites microcristallines, arthroses, lombalgies, radiculalgies sévères.
- Traitement des dysménorrhées essentielles, après bilan étiologique(8).

## Anti –inflammatoire et Diclofénac sodique

---

**Chez l'enfant à partir de 16 kg (environ 4 ans) :**

-Rhumatismes inflammatoire infantiles.

### **II.5-Contre-indication :**

Ce médicament est contre indiqué dans les cas suivants :

- antécédent d'allergie ou d'asthme déclenché par la prise de diclofénac ou de substances d'activité proche telles que d'autres AINS.

- hypersensibilité à l'un des excipients.

- ulcère gastroduodéal en évolution.

- insuffisance hépatocellulaire sévère.

- insuffisance rénale sévère.

- enfant de moins de 35 kg (en raison du dosage inadapté de ce médicament).

En raison de la présence de lactose, ce médicament est contre-indiqué en cas de galactosémie congénitale, de syndrome de malabsorption du glucose et du galactose ou d'un déficit en lactase. (8)

### **Déconseillé :**

- Allaitement : les AINS passant dans le lait maternel, par mesure de précaution, il convient d'éviter de les administrer chez la femme qui allaite.

- Ce médicament est généralement déconseillé en association avec : les anticoagulants oraux,

-les autres AINS (y compris les salicylés à fortes doses),

-les héparines (voie parentérale),

-le lithium,

- le méthotrexate (utilisé à des doses supérieures à 15 mg/semaine),

-la ticlopidine.

### **II.6-Effets indésirable :**

- **Effets gastro-intestinaux :**

## Anti –inflammatoire et Diclofénac sodique

---

Peu fréquents : en début de traitement, nausées, vomissements, diarrhées, crampes abdominales, douleurs épigastriques, dyspepsie, anorexie, éructations.

Rares : ulcère gastroduodéal, perforation ou hémorragie digestive. Celles-ci sont d'autant plus fréquentes que la posologie utilisée est élevée.

Cas isolés : affections abdominales basses telles que colite hémorragique non spécifique, exacerbation de colite ulcéreuse. Ont été signalés des pancréatites, des cas de constipation.

- **Effets cutanés :**

Cas isolés : chute de cheveux, réactions de photosensibilisation.

Très rares : survenue de dermatoses bulleuses (Stevens-Johnson, syndrome de Lyell) et érythrodermie.

- **Réactions d'hypersensibilité :**

Dermatologiques : éruption cutanée, urticaire, eczéma.

Respiratoires : bronchospasme, pneumopathie d'hypersensibilité.

Autres : cas isolés de vascularité y compris purpura allergique, d'hypotension.

Générales : très rares réactions anaphylactiques/anaphylactoïdes, notamment chez les sujets présentant une allergie à l'aspirine.

- **Effets sur le Système Nerveux Central :**

Peu fréquents : céphalées, étourdissements ou vertiges.

Rarement : somnolence.

Cas isolés : convulsions, méningite aseptique. Ont été rapportés des troubles de type insomnie, irritabilité, asthénie, tremblements.

Cas isolés de troubles sensoriels : paresthésies, troubles visuels (flou visuel, diplopie), bourdonnements d'oreille.

- **Effets sur le rein :**

## Anti –inflammatoire et Diclofénac sodique

---

Rares œdèmes périphériques.

Cas isolés : insuffisance rénale aiguë, anomalies urinaires (hématurie, protéinurie), néphrites interstitielles, syndrome néphrotique, nécrose papillaire, hyperkaliémie par hyporéninisme.

- **Effets sur le foie :**

Peu fréquents : augmentation des transaminases sériques.

Rare hépatite avec ou sans ictère.

Cas isolés : hépatites fulminantes.

- **Effets sur le sang :**

Très rarement : leucopénie, agranulocytose, thrombopénie avec ou sans purpura, aplasie médullaire, anémie hémolytique(8).

## **Introduction :**

Les préparations rectales sont des préparations destinées à être administrées par voie rectale, en vue d'une action locale ou systémique, ou à des fins de diagnostic. La muqueuse rectale a un excellent pouvoir d'absorption mais la surface absorbante est limitée. Les principes actifs administrés par cette voie passent très rapidement dans la circulation sanguine par les veines hémorroïdales et aussi, mais en plus faible proportion, dans la circulation lymphatique.

La résorption par voie rectale est parfois plus rapide et plus importante que par voie buccale. Il faut en tenir compte pour la posologie. Elle est en outre peu constante et varie en fonction de la vacuité de l'intestin. Certains principes actifs ne sont pas absorbés par cette voie.

La voie rectale constitue une voie d'administration à action aussi étendue que les voies orales et parentérales.

## **I. Les formes galéniques destinées à la voie rectale : (9)**

On distingue :

- Les solutions, les émulsions et suspensions rectales.
- Les préparations rectales semi-solides.
- Les mousses rectales.
- Les capsules rectales.
- Les poudres et comprimés pour solutions ou suspensions rectales.
- Les tampons rectaux.
- Les suppositoires qu'on va détailler dans ce chapitre.

## II. Les suppositoires :

### 1. Définition :

Les suppositoires sont des préparations uni-doses solides. Leurs formes, volume et consistance sont adaptés à l'administration par voie rectale. Ils contiennent un ou plusieurs principes actifs dispersés ou dissous dans une base appropriée qui est, suivant le cas, soluble ou dispersible dans l'eau ou fond à la température du corps. Ils peuvent également contenir d'autres excipients tels que les agents diluants, absorbants, tensioactifs, lubrifiants, des conservateurs antimicrobiens et des colorants autorisés par l'autorité compétente. **(10)**

### 2. Mode d'action des suppositoires :

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

- **L'action mécanique:** elle est due à l'éveil d'un réflexe de défécation provoqué par la présence d'un corps étranger dans le rectum. Dans le cas des suppositoires à la glycérine, celle-ci par son hydrophilie attire de l'eau dans l'ampoule rectale et déclenche les mouvements péristaltiques et, ainsi, l'effet laxatif recherché.
- **Action locale :** peut être une action antihémorroïdale ou encore une action antiparasitaire, contre les oxyures par exemple.
- **Action systémique :** l'action systémique est la plus recherchée, le principe actif doit alors passer dans la circulation générale. **(10)**

## III. fabrication des suppositoires :

### • Traitement des principes actifs :

Ü Si le principe actif est soluble dans l'excipient, il n'ya pas de traitement particulier.

## Les suppositoires

---

Ü Si le principe actif est insoluble, il faut l'amener à un degré de ténuité convenable, d'une part pour qu'il ne se produise pas de sédimentation pendant la coulée dans les moules et, d'autre part, pour que la dissolution se fasse facilement dans le liquide aqueux du rectum. La granulométrie ne doit pas être trop fine pour ne pas provoquer la gélification de la masse.

Le broyage se fait en général à sec mais aussi parfois au sein de l'excipient fondu à l'aide d'un moulin colloïdale.

Ü Si le principe actif est insoluble dans l'excipient, mais très soluble dans l'eau, il peut être mis en solution aqueuse. Celle-ci est ensuite émulsionnée dans l'excipient fondu.

Il y'a des cas où le principe actif est adsorbé sur un support inerte pulvérulent avant d'être dispersé dans l'excipient. **(10)**

- **Traitement de l'excipient** : la méthode courante consiste à faire fondre l'excipient à la température la plus basse possible et à incorporer ensuite les principes actifs.

- **Préparation de la masse** : excipient fondu et principes actifs sont introduits dans un mélangeur en acier inoxydable dont la température est parfaitement réglée à 1°C près. Le mélange est assuré par mélangeur adapté aux constituants de la masse (agitateur rapide à hélice ou à turbine). Dans le cas des émulsions et des suspensions, l'homogénéité peut être améliorée par un passage à travers une filière ou même dans un moulin colloïdal. La dispersion faite, une agitation lente de toute la masse doit être assurée pendant toute la durée de la répartition dans les moules pour éviter toute sédimentation.

Lorsque les principes actifs sont très volatils, il faut envisager l'emploi de cuves hermétique. **(10)**

## Les suppositoires

---

• **Division de la masse (moulage des suppositoires) :** deux procédés sont utilisés :

Ü Moulage dans des moules métalliques, de moins en moins pratiqué.

Ü Moulage dans des moules-emballages en matière plastique.

• **Conditionnement des suppositoires :** il existe trois principales possibilités.

Ü Les moules emballage sont les plus répandus.

Ü Les plaques en matières plastiques assez rigides à demi-alvéoles préformés (acétate de cellulose, chlorure de polyvinyle non plastifié), les suppositoires sont placés entre deux plaques qui sont ensuite collées à chaud.

Ü Les films thermocollants non préformés. Les suppositoires sont pris entre deux feuilles dont les faces en regard sont enduites d'un revêtement thermocollant. Il peut s'agir de films d'aluminium revêtu d'une laque thermocollante ou de polyéthylène. (10)

• **Essais des suppositoires :**

Ü **Contrôle organoleptique :** les suppositoires doivent avoir un aspect homogène en surface et en profondeur. La surface doit être unie, lisse et brillante. Il ne doit pas y'avoir de fissurations dues à un refroidissement trop brutal ou à un démoulage prématuré ou trop tardif. Il ne doit pas y avoir d'efflorescence blanchâtre due a des mauvaises conditions de refroidissement ni de cristallisation des principes actifs en surface. La partie basale doit être bien plane si le raclage a été au bon moment au cours du refroidissement. L'examen en profondeur se fait après avoir coupé le suppositoire dans le sens de la longueur ou transversalement. On ne doit pas observer d'agglomération ou de sédimentation des principes actifs.

Ü **Essais physiques :** on doit vérifier les paramètres suivants :

- Ø Uniformité de masse.
- Ø Uniformité de teneur.
- Ø Contrôle de la dureté.
- Ø Essai de désagrégation.

## Les suppositoires

---

Ø Essai de dissolution.

Ø Temps de ramollissement des suppositoires.

**ÛEssais chimiques** : ce sont des essais d'identification et de dosage des principes actifs et éventuellement des adjuvants.

**ÛEssais physiologiques** : ils sont réalisés pour la mise au point d'une nouvelle formule. **(10)**

## **Introduction :**

La spectrométrie est une technique relativement récente qui doit son essor aux progrès de la mécanique quantique. Elle permet, entre autres, d'identifier une substance chimique et de déterminer la concentration d'un soluté dans une solution, par l'interaction des électrons des molécules du soluté (appelé chromophore) avec la lumière.

La spectrométrie UV s'utilise principalement dans deux cas :

- En laboratoire afin d'établir un tracé quantitatif d'un spectre d'absorption ou de réflexion en fonction de la longueur d'onde.
- En analyse industrielle soit pour déterminer la composition d'un échantillon, soit pour mesurer des paramètres (couleur, turbidité, ...).

## **I. Définition:**

La spectrophotométrie correspond à l'étude des variations de grandeurs photométriques spectrales ou de leur équivalent énergétique résultant de l'interaction du rayonnement avec une substance placée sur le faisceau. **(11)**

## **II. Les limites de la spectrométrie UV- visible et l'origine de l'absorption :**

Ce domaine spectral est divisé en trois plages de longueurs d'onde appelées proche UV (185-400 nm), visible (400-700 nm) et très proche infrarouge (700-1 100 nm). La plupart des spectromètres vont de 185 à 900 nm. La limite inférieure des appareils dépend à la fois de la nature des matériaux optiques utilisés et de la présence ou non sur le trajet optique de l'air ambiant, sachant que le dioxygène et la vapeur d'eau absorbent de manière intense en dessous de 190 nm. Quelques instruments, à condition d'opérer sous vide, peuvent atteindre 150 nm avec des échantillons pris à l'état gazeux. C'est le domaine de l'ultraviolet du vide.

L'absorption lumineuse a pour origine l'interaction des photons de la source lumineuse avec les ions ou molécules de l'échantillon. Ainsi lorsqu'une molécule isolée absorbe un photon de l'UV/Visible, l'énergie correspondante est captée par un ou plusieurs de ses électrons superficiels. **(11)**

### III. La loi de Beer Lambert :

L'analyse quantitative par la spectrométrie UV-VIS est très utilisée (beaucoup plus que l'analyse qualitative) car l'absorption est plus ou moins importante. Selon le nombre de groupements d'atomes placés sur le trajet de la lumière : des lois connues relient cette absorption à ce nombre dans certaines conditions opératoires. Ce sont les lois de **Lambert** et de **Beer**. (12)

#### 1. Loi de Lambert :

La proportion de lumière incidente absorbée par un milieu transparent est indépendante de l'intensité de la lumière (pourvu qu'il n'y ait pas d'autres changements physiques ou chimiques dans le milieu).

Ainsi, des milieux successifs d'égale épaisseur transmettent une égale proportion de l'énergie incidente.

La loi de Lambert s'exprime par :

$$T = I / I_0$$

$I_0$  = intensité de la lumière incidente

$I$  = intensité de la lumière transmise ( $I$  toujours inférieure à  $I_0$ )

$T$  = transmittance

Il est commun d'exprimer la transmittance par un pourcentage :

$$\% T = I / I_0$$

#### 2. Loi de Beer :

L'absorption de la lumière est directement proportionnelle à la fois à la concentration du milieu absorbant et à l'épaisseur de la cuve où se trouve le milieu. Une combinaison de ces deux lois (la loi de **Beer-Lambert**) donne la relation entre l'absorbance ( $A$ ) et la transmittance ( $T$ ) :

$$A = \log (I_0 / I) = \log (100 / T) = e c x$$

Avec :

$A$  = absorbance (sans unité).

## La spectroscopie UV-visible

---

$\epsilon$  = coefficient d'absorption molaire ou d'extinction ( $\text{dm}^3 \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ ).

$c$  = concentration molaire ( $\text{mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ ).

$x$  = longueur de la cuve (cm) ou trajet lumineux.

Il est important de noter que  $\epsilon$  est une fonction de la longueur d'onde et donc que la loi de **Beer-Lambert** est seulement vraie en lumière monochromatique. **(12)**

### IV. Les chromophores :

#### Définitions

Un chromophore est une fonction ou un groupe d'atomes qui modifient la fréquence de l'onde U.V. ainsi que l'intensité d'absorption ( $\epsilon$ ). Les quatre termes utilisés sont:

- Effet bathochrome : le chromophore diminue la fréquence d'absorption (augmente le  $\lambda_{\text{max}}$ ).
- Effet hypsochrome : le chromophore augmente la fréquence d'absorption (diminue le  $\lambda_{\text{max}}$ ).
- Effet hypochrome : le chromophore diminue l'intensité d'absorption : (diminue  $\epsilon$ ).
- Effet hyperchrome : le chromophore augmente l'intensité d'absorption : (augmente  $\epsilon$ ). **(11)**

### V. Les transitions électroniques :

Les composés de la chimie organique forment l'essentiel des études faites en UV/visible.

Les transitions observées ont pour origine les électrons des liaisons **s** ou **p** et les doublets non-liants des atomes tels H, C, N, O. Chaque fois qu'il en est possible, on indique pour toute bande d'absorption sa nature en relation avec les orbitales moléculaires (OM) concernées et le coefficient d'absorption molaire ( $\text{L} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ ) calculé au maximum de la bande d'absorption. **(11)**

## La spectroscopie UV-visible

---

### **Transition $\alpha \rightarrow \alpha^*$ :**

Elle apparaît dans le lointain UV car le saut d'un électron d'une OM liante  $\alpha$  dans une OM anti liante  $\alpha^*$  demande beaucoup d'énergie. C'est pourquoi les hydrocarbures saturés qui ne représentent que des liaisons de ce type, sont transparents dans le proche UV.

Exemple : hexane (à l'état gazeux):  $\lambda_{\max} = 135 \text{ nm}$  ( $\epsilon = 10\,000$ ).

### **Transition $n \rightarrow \alpha^*$ :**

Le saut d'un électron d'un doublet  $n$  des atomes O, N, S, Cl... Dans une OM(s) conduit à une transition d'intensité moyenne qui se situe vers 180 nm pour les alcools, vers 190 nm pour les éthers ou les dérivés halogénés et vers 220 nm pour les amines.

Exemples : méthanol :  $\lambda_{\max} = 183 \text{ nm}$  ( $\epsilon = 50$ ) ; éther:  $\lambda_{\max} = 190 \text{ nm}$  ( $\epsilon = 2\,000$ ).

Éthylamine :  $\lambda_{\max} = 210 \text{ nm}$  ( $\epsilon = 800$ ) ; chloro-1-butane  $\lambda_{\max} = 179 \text{ nm}$ .

### **Transition $\pi \rightarrow \pi^*$ :**

Les composés qui possèdent une double liaison éthylénique isolée conduisent à une forte bande d'absorption vers 170 nm, dont la position dépend de la présence de substituant hétéro atomiques.

Exemple : *éthylène* :  $\lambda_{\max} = 165 \text{ nm}$  ( $\epsilon = 16\,000$ ).**(11)**

## **VI. Instrumentation dans l'UV-VIS (Appareillage) :**

Un spectrophotomètre est conçu autour de trois modules : ceux de la source et du système dispersif (souvent conçu comme un monochromateur), qui constituent la partie optique et celui qui est responsable de la détection. L'ensemble est réuni dans un bâti unique.

Un compartiment échantillon est inséré sur le trajet optique après ou avant le système dispersif selon la conception du montage.**(11)**

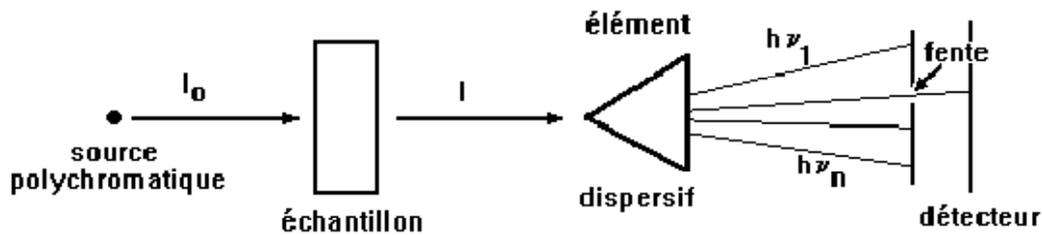


Figure 3 : schéma de l'appareillage de l'UV. (12)

### 1.Sources lumineuses :

On ne connaît pas de source lumineuse continue pouvant couvrir efficacement la totalité de la gamme spectrale concernée. C'est la raison pour laquelle beaucoup de spectromètres comportent deux lampes à usage de sources, l'une pour la partie du proche UV et l'autre pour la partie s'étendant vers le visible.

On les trouve généralement réunies.(11)

### 2.Systèmes dispersifs :

Appareils séquentiels : Les radiations émises par la source sont dispersées par un réseau plan ou concave qui fait partie d'un montage appelé monochromateur.

La longueur d'onde, ou plus exactement la largeur de la bande spectrale qui est fonction de la largeur de fente, varie graduellement au cours du temps par pivotement du réseau. Les meilleures résolutions sont obtenues avec des montages comportant des monochromateurs de grandes distances focales (0,2 à 0,5 m).(11)

**3.Cuve :** la cuve transparente connue parfois par le nom cellule, elle est typiquement de forme parallélépipédique, avec un trajet optique souvent de l'ordre de 1cm (correspond à la longueur (l) dans la loi de Beer Lambert).

Les cuves les plus utilisées sont en générale en silice fondue de haute qualité, ou en quartz, car elles sont transparentes dans les régions UV-visible et proche infrarouge, .les cuves en verre et en plastique sont aussi communes, bien que la plupart des plastiques absorbent dans l'UV-visible ce qui limite leur usage au

## La spectroscopie UV-visible

---

visible et infrarouge. Donc la cuve contenant la solution à étudier doit être transparente aux radiations sélectionnées par le monochromateur. **(13)**

**4.Détecteurs :** Le détecteur convertit en un signal électrique l'intensité de la radiation lumineuse qui l'atteint.

Sa sensibilité dépend de la longueur d'onde. On utilise soit un tube photomultiplicateur soit un semi-conducteur (détecteur à transfert de charge ou photodiode au silicium).**(12)**

### **Introduction :**

Le principe de la validation des procédures analytiques est aujourd'hui largement répondu dans tous les domaines d'activité où des mesures sont réalisées. Le champ d'application de la validation analytique s'étend à toute procédure d'analyse utilisée dans le contrôle de la matière première, le développement galénique, le contrôle en cours de fabrication, le contrôle des produits intermédiaires et finis et les essais de stabilité de tous les produits pharmaceutiques. Dans le domaine pharmaceutique, son exigence est avant tout une pratique réglementaire.

La validation est fondée sur une analyse statistique basée sur un certain nombre de critères aboutissant à des méthodes analytiques permettant de donner des résultats fiables, En se basant sur deux normes internationales ICH (International Conference on Harmonisation), Et le SFSTP, qu'on détaillera dans l'aspect réglementaire.

**I. Définition :** la validation d'une méthode est la procédure par laquelle on démontre, preuves expérimentales à l'appui, que les performances de la méthode permettent de répondre aux exigences de l'usage auquel elle est destinée. Il existe plusieurs degrés de validation ; suivant la nature de la méthode, ce à quoi elle est destinée. **(14)**

**II. But de la validation :** La validation des méthodes analytiques a pour principal objectif de s'assurer qu'une méthode analytique donnée donnera des résultats suffisamment fiables et reproductibles, compte tenu du but de l'analyse. Il faut donc définir correctement à la fois les conditions dans lesquelles la méthode sera utilisée et le but dans lequel elle sera employée. **(15)**

### III. Les critères de la validation :

#### IV. Tableau -2- les critères de la validation analytique(16)

type de test caractéristiques	dosage	impuretés (Quantitatif)	identification
exactitude	ü	ü	
Fidélité	ü	ü	
Spécificité	ü	ü	ü
Limite de détection		ü	ü
Limite de quantification		ü	
linéarité	ü	ü	
Intervalle de mesure	ü	ü	

#### III.1. Spécificité :

La spécificité est la propriété qui fait qu'une méthode d'analyse rend compte sans ambiguïté de la substance analysée en présence d'autres composantes normalement présentes. Ces dernières peuvent inclure des impuretés, des produits de dégradation, la matrice, etc. Si une méthode d'analyse est insuffisamment spécifique, cette déficience peut être compensée par la spécificité de l'une ou de plusieurs des autres analyses complémentaires. (17)

##### a. Principe actif :

- **Identification** : Pour une identification cela signifie simplement la garantie de l'identité de la substance à analyser.

## La validation analytique

---

- **Essai** :Lorsqu'il s'agit d'essai.la spécificité représentera la garantie que toutes les procédures d'analyse exécutés permettent une évaluation de la teneur en impuretés de la substance à analyser : par exemple

- essai de substances apparentées.

- métaux lourds.

- teneurs en solvant organique.

- **Dosage** :

Pour un dosage (teneur ou activité), la procédure analytique sera dite spécifique lorsqu'on aura la garantie que le signal mesuré provient seulement de la substance à analyser.

**b.produit fini** :

La spécificité représente ici la mesure du degré d'interférences provenant d'autres substances (principe actif, autres composants, substances apparentées, produits de dégradation) présentes dans la matrice complexe que peut représenter un produit fini. (18)

### III.2. Linéarité :

La linéarité d'une procédure d'analyse est sa capacité (à l'intérieur d'un certain intervalle) d'obtenir des résultats directement proportionnels à la concentration (quantité) en substance à examiner dans l'échantillon.

### III.3. Exactitude :

L'exactitude correspond au degré de concordance entre la valeur de la méthode obtenue et la valeur de référence ou la valeur considérée comme véritable par convention. L'exactitude est aussi désignée l'authenticité.

### III.4.Fidélité :

La fidélité de la procédure d'analyse exprime l'étroitesse de l'accord (degré de dispersion) entre une série de mesures provenant de multiples prises d'un même échantillon homogène dans des conditions prescrites.Pour prouver cette fidélité on valide deux autres critères qui sont :

Ø **La répétabilité** : est une expression de la précision de l'analyse lorsque celle-ci est reprise dans les mêmes conditions de réalisation, après un court intervalle de temps. La répétabilité est aussi désignée précision intra-analyse.

Ø **La reproductibilité** : correspond à la concordance entre laboratoires (travaux de collaboration visant généralement l'uniformisation de la méthodologie).(17)

### III.5. Sensibilité :

La sensibilité est la capacité de la méthode d'analyse d'enregistrer de faibles variations de la concentration. Variation minimale qu'il faut imposer à la grandeur X à déterminer (par exemple une concentration) pour obtenir une variation significative du signal mesuré Y. (17)

### III.6. Seuil de détection :

La limite de détection d'une méthode d'analyse individuelle correspond à la plus faible quantité de la substance analysée que la méthode permet de détecter, sans nécessairement fournir la valeur exacte. (17)

Le seuil de détection est exprimé soit en concentration, soit en quantité, et dérive de la plus petite quantité  $x$  qui puisse être détectée avec une certitude suffisante pour une procédure d'analyse. (17)

### III.7. Seuil de quantification :

C'est la plus petite quantité d'une substance à examiner pouvant être dosée dans les conditions expérimentales décrites avec une fidélité et une exactitude définies.(17)

## VI.Principaux référentiels :

Il existe plusieurs référentiels pour la validation d'une méthode analytique « selon le référentiel utilisé, un même terme peut cacher des définitions relativement différentes ».(19)

Les principaux référentiels sont :

- Les normes ISO (international standardization organisation) : la norme ISO 353471 et la norme ISO 5725(19)
- Les guidelines PIC/S(20).

## La validation analytique

---

- Les guidelines de l'EMEA (ICH Topic Q2) **(21)**.
- SFSTP (Société Française des Sciences Techniques et Pharmaceutiques) présentent les recommandations réglementaires communément admises et appliquées dans l'industrie pharmaceutique nationale et une démarche statistique pour la validation d'une procédure analytique. **(15)**

### **Introduction :**

L'objectif de notre travail est de mettre au point et de valider une nouvelle méthode de dosage spectrophotométrique du diclofénac de sodium dans des suppositoires qui serait simple, rapide et économique. Le protocole expérimental suivi a été inspiré des recommandations de la commission SFSTP pharma.

La démarche empruntée est divisée en deux parties :

- Ø Mise au point des conditions d'analyse
- Ø Validation analytique de la méthode (étude de la linéarité, de l'exactitude, de la fidélité et de la spécificité).

### **I-Matériels et méthodes :**

#### **I-1 Matériels :**

#### **Matières premières et réactifs :**

ü Principe actif : Diclofénac de sodium (Poly pharma, Italie), a été gracieusement fourni par Saidal.

ü Excipient : Glycéride hémi-synthétique solide AM (poly pharma, Italie), a été également fourni gracieusement par Saidal.

ü Hexane (Sigma Aldrich, Allemagne).

ü Hydroxyde de sodium NaOH (Sigma Aldrich, Allemagne).

ü Eau distillé.

#### **Appareillages et équipements**

ü Spectrophotomètre UV-visible (BIOMATE (3), Thermo Scientific) : l'analyse spectrophotométrique a été réalisée sur un spectrophotomètre à double faisceau en utilisant une cuve de 1 cm d'épaisseur en quartz.

ü Une balance analytique de précision (KERN ALT 220, Allemagne).

## Partie expérimentale

---

### Verrerie :

- Ü fioles jaugées : 50ml ,100ml et 1L.
- Ü erlenmeyers à col rodé.
- Ü pipettes : 5ml, 25ml et 50ml.
- Ü pro-pipette.
- Ü ampoule à décompter.

### I.2 Méthodes :

#### I.2.1. Préparation des solutions :

##### a) Solvant de dilution : solution de NaOH 0.05M.

- Dans une fiole jaugée de 1l, on fait dissoudre 2g de NaOH dans l'eau distillée puis on complète jusqu'au trait de jauge.

##### b) Solution stock de glycéride hémi-synthétique :

- Dans une fiole jaugée de 1l, on fait dissoudre 60g de glycéride hémi-synthétique solide dans l'hexane puis on complète jusqu'au trait de jauge.

##### c) Solution standard :

- Dans une fiole jaugée de 100ml, on a pesé exactement 60mg de Diclofénac sodique, on les a dissous dans 80ml de la solution de NaOH de 0.05ml puis on a fait une dilution (1/10) (5ml de cette solution dans 50ml de NaOH 0.05M).

NB : la solution standard a été préparée en double.

##### d) Solution d'échantillon :(solution de placebo chargé).

- Dans un erlenmeyer, on a pesé exactement 60mg de Diclofénac sodique auquel on a ajouté 50ml de NaOH (0.05M). On a agité pendant 5mn puis on a ajouté 25ml de la solution stock. Le contenu a été transféré dans une ampoule à décompter. Après séparation des deux phases on a soutiré la phase inférieure (la phase aqueuse contenant

## Partie expérimentale

---

le principe actif). On a fait une dilution de (1/10) (5ml de la phase aqueuse dans 50ml de la solution de NaOH 0.05M).

### e) Solution placebo :

- On a suivi les mêmes étapes que pour la solution échantillon mais sans ajout du principe actif.

### I.2.2. Mise au point des Conditions d'analyse :

#### a) Choix de la longueur d'onde :

Un balayage spectral a été réalisé dans le but de déterminer la longueur d'onde à laquelle le principe actif présente une absorbance maximale. Pour ce faire on a procédé comme suit :

- Dans une fiole de 100ml, On a pesé exactement 60mg de Diclofénac de sodium qu'on a dissout dans 80ml de la solution NaOH (0.05M) puis on a complété jusqu'au trait de jauge avec le même solvant.
- On a fait une dilution (1/10) (5ml de la solution préparée dans 50ml de la solution de NaOH 0.05M).
- On a procédé à une lecture à blanc en utilisant la solution de NaOH (0.05M).
- On a tracé une ligne de base entre 250 et 350nm.
- On a tracé un spectre d'absorption de Diclofénac.

#### b) Test de conformité du système :

L'intérêt de ce test est de s'assurer du bon travail de l'analyste pour un nombre de manipulations

- **Protocole :**

On a préparé deux solutions standards (100%) pour lesquelles on a fait 6 lectures pour chacune.

- **Étude statistique**

### **Coefficient de variation :**

Le coefficient de variation ou également nommé écart relatif, est une mesure de la dispersion relative, il se calcule comme le rapport entre l'écart-type et la moyenne.

$$CV = S.100/m$$

Avec :

**S** : l'écart-type.

**m** : la moyenne des valeurs obtenues.

Le coefficient de variation(CV) doit être inférieur ou égal à 2.0%

### **Facteur de similarité :**

$$F = A_1 * m_2 / A_2 * m_1$$

Avec :

$A_1$  : l'absorbance moyenne du standard 1.

$A_2$  : l'absorbance moyenne du standard 2.

$m_1$  : masse du standard 1.

$m_2$  : masse du standard 2.

Le facteur de similarité doit être proche de 1.

### **I.2.3. Validation analytique de la méthode de dosage :**

Selon les recommandations ICH et SFSTP les critères à étudier pour une méthode de dosage sont :

- La Linéarité ;
- L'Exactitude ;
- La Fidélité ;
- La Spécificité.

Les études de la linéarité, de l'exactitude et de la fidélité sont réalisées simultanément à partir du PA seul et de la forme pharmaceutique reconstituée au laboratoire.

## Partie expérimentale

---

**NB :** la forme pharmaceutique reconstituée est un mélange de tous les composants correspondant qualitativement et quantitativement à la forme pharmaceutique à étudier, excepté la substance à tester qui sera ajoutée en quantité variable suivant le critère étudié.

### **I.2.3.1. Etude de la linéarité:**

L'intervalle de concentration à valider est couvert par une série de 5 concentrations ( $k=5$ ), régulièrement espacées et positionnées, autour de 60, 80, 100, 120, 140% de la concentration théorique.

Pour chaque concentration, trois séries indépendantes sont réalisées ( $n=3$ ), puis analysées sur trois jours successifs, à raison d'une série par jour.

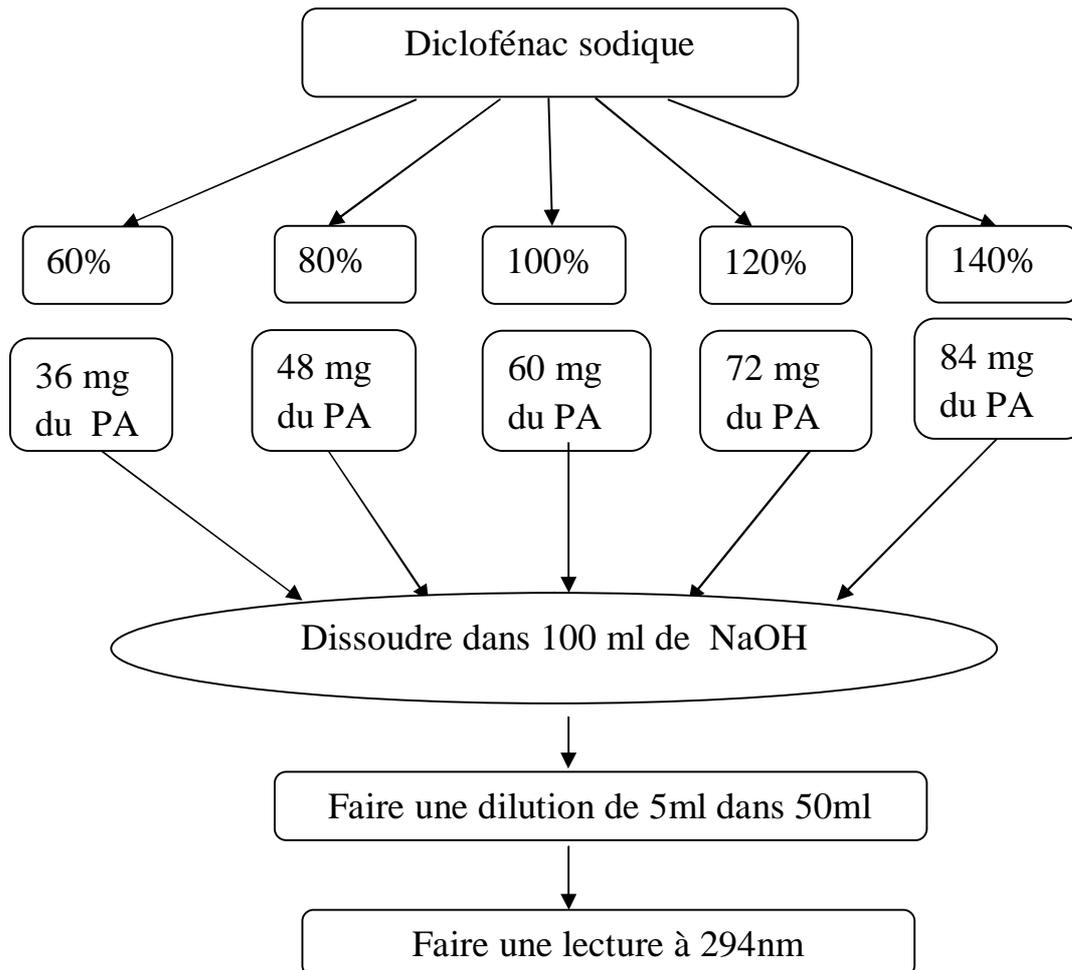
Pour chaque solution 3 lectures successives sont effectuées et c'est la moyenne qui est prise en considération.

## Partie expérimentale

### a. Protocole :

Ø Standard :  $k=5$ ,  $n=3$ .

Le schéma suivant regroupe les étapes du protocole :

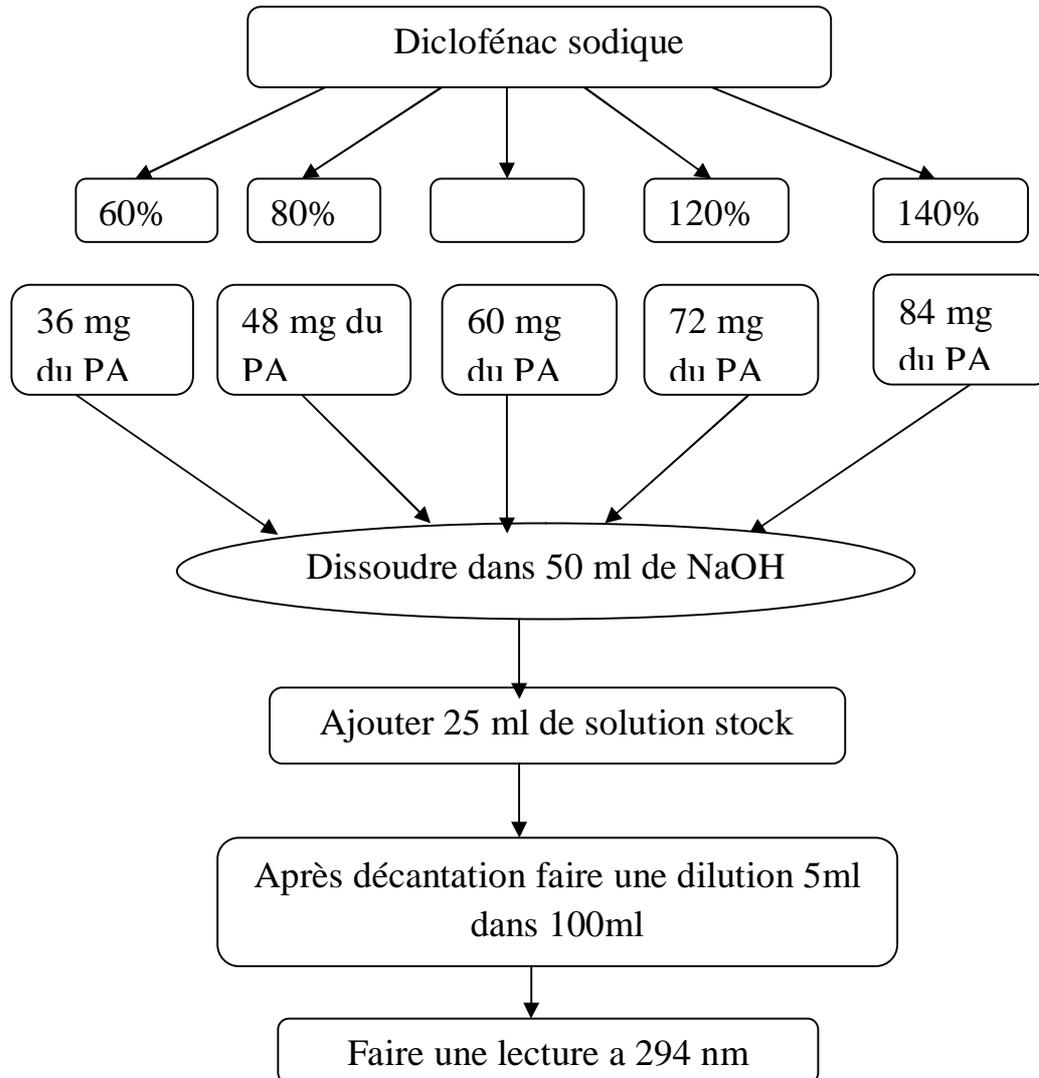


**Figure 4 : Schéma résumant le protocole expérimental de l'étude de la linéarité sur standard.**

## Partie expérimentale

Ø Échantillon : (placébo chargé)  $k=5$ ,  $n=3$ .

Le schéma suivant regroupe les étapes du protocole :

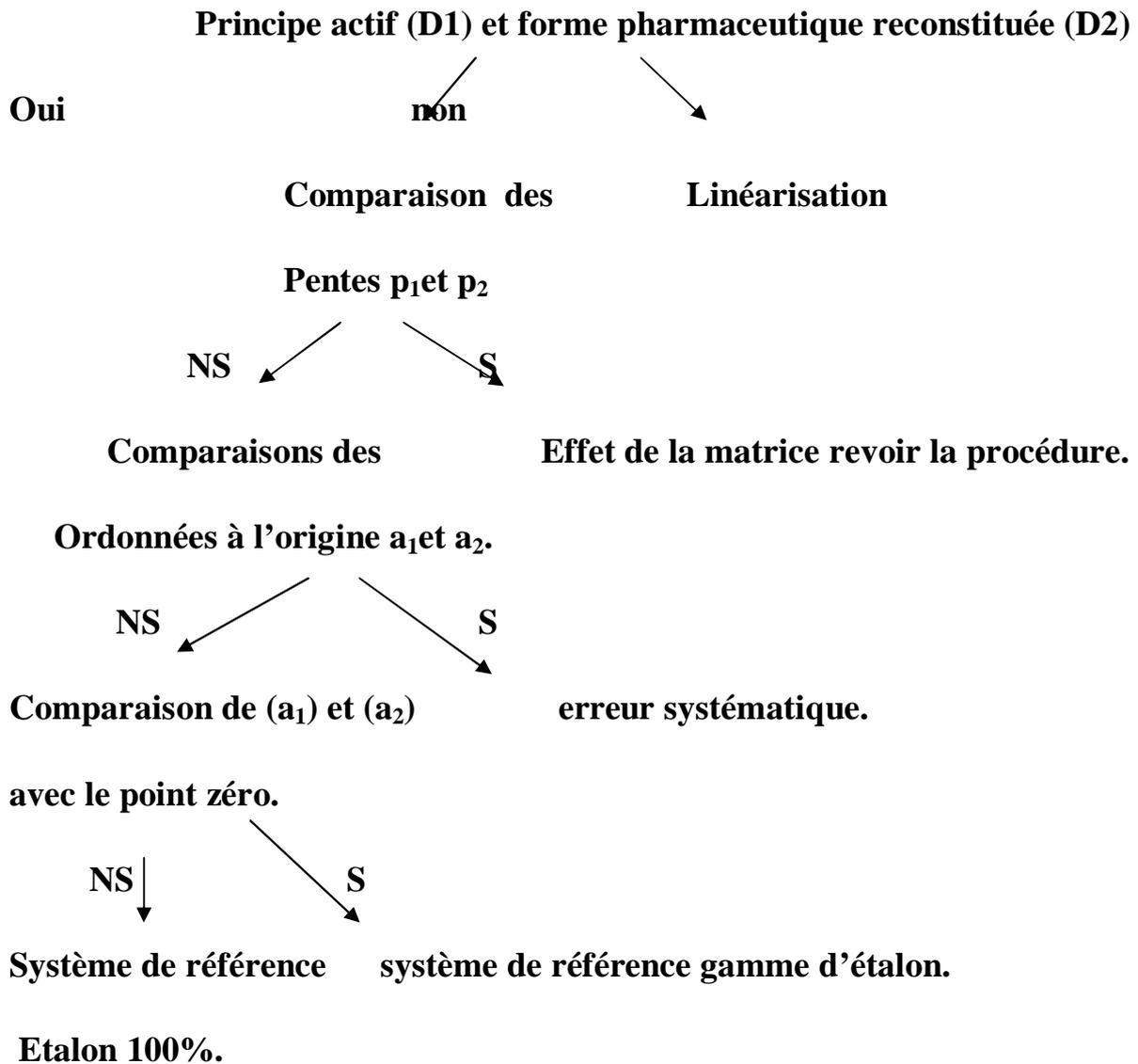


**Figure 5 : Schéma résumant le protocole expérimental de l'étude de la linéarité sur échantillon.**

**b. Étude statistique :**

La stratégie statistique de la linéarité est résumée dans la figure suivante :

**Vérification de la linéarité des gammes**



**Figure 6 : Stratégie statistique de la linéarité.**

## Partie expérimentale

---

- **Estimation d'une droite de régression linéaire :**

Elle est déterminée à partir des couples  $(x_{ij}, y_{ij})$ .

Soit  $Y=A_x+B$  l'équation de la droite de régression réelle inconnue.

B est la pente, A est l'ordonnée à l'origine. Les estimations recherchées a et b de A et B correspondent à une droite d'équation  $y=bx+a$ , qui est l'estimation de la droite réelle inconnue.

- **Calcul de la pente :**

L'estimation de b s'obtient en appliquant la méthode des moindres carrés : le but est de rendre minimal la somme des carrés des écarts  $(y_{ij}-y'_{ij})$  entre les valeurs expérimentales  $y_{ij}$  et les valeurs estimées  $y'_{ij}$ .

$$b = \frac{\sum_{j=1}^k \sum_{i=1}^{n_j} (x_{ij} - \bar{x})(y_{ij} - \bar{y})}{\sum_{j=1}^k \sum_{i=1}^{n_j} (x_{ij} - \bar{x})^2}$$

$x_{ij}$ : valeur brute indépendante

$y_{ij}$ : valeur brute dépendante

$\bar{x}$  : moyenne générale des valeurs  $x_{ij}$  des k groupes

$\bar{y}$  : moyenne générale des observations  $y_{ij}$  des k groupes

Soit  $b_1$  et  $b_2$  les coefficients de régression des droites  $D_1$  et  $D_2$ .

- **Calcul de l'ordonnée à l'origine(a)**

Selon la méthode des moindres carrés, la droite de régression linéaire passe par le point de coordonnées  $\bar{x}$  et  $\bar{y}$ , donc l'équation suivante est vérifiée :

$$a = \bar{y} - b \bar{x}$$

Soient  $a_1$  et  $a_2$  les ordonnées à l'origine des droites  $D_1$  et  $D_2$ .

## Partie expérimentale

---

- **Calcul du coefficient de corrélation r :**

Bien que les informations fournies par le coefficient de corrélation soient limitées, sa détermination est aisée, soient :

- $S_{x_{ij}}$  et  $S_{y_{ij}}$  les écarts types respectifs des variables  $x_{ij}$  et  $y_{ij}$ .

- $S_{x_{ij}y_{ij}}$  la covariance des variables  $x_{ij}$  et  $y_{ij}$ .

Calcul de la covariance :

$$S_{x_{ij}y_{ij}} = \sum_{j=1}^k * \sum_{i=1}^{n_j} (x_{ij} - \bar{x})(y_{ij} - \bar{y}) / (N - 1)$$

r est calculé comme suit

$$r = S_{x_{ij}y_{ij}} / S_{x_{ij}} * S_{y_{ij}}$$

Soient  $r_1$  et  $r_2$  les coefficients de corrélation respectifs des droites  $D_1$  et  $D_2$ .

- **Test de comparaison des ordonnées à l'origine avec 0 :**

On vérifie l'inégalité :

$$|a|/s_a < t_{(\alpha, N-2)}$$

$S_a$  est l'écart type de l'ordonnée à l'origine

$t_{(\alpha, N-2)}$  est lue dans la table de student.

- **Comparaison des pentes des droites D1 et D2 :**

La comparaison des pentes  $b_1$  et  $b_2$  s'effectue avec un test de student :

$$t = |b_1 - b_2| / \sqrt{S_2 b_1^2 + S_2 b_2^2}$$

Si  $t_{calculé} < t_{(\alpha; N_1 + N_2 - 4)}$  lu dans la table de student, on peut affirmer que les pentes ne sont pas significativement différentes au risque  $\alpha$ .

- **Comparaison des ordonnées à l'origine des droites D1 et D2**

La comparaison des ordonnées à l'origine s'effectue avec un test de student t :

$$t = |a_1 - a_2| / \sqrt{S^2_{a1} + S^2_{a2}}$$

Si  $t_{calculé} < t(\alpha ; N_1 + N_2 - 4)$  lu dans la table de student, on peut conclure que les ordonnées à l'origine des droites  $D_1$  et  $D_2$  ne sont pas significativement différentes au risque  $\alpha$ .

- **Changement de variable :**

L'étude statistique qui suit nécessite le changement de variables suivant :

$$\bar{X}_j = \sum_{i=1}^{n_j} x_{ij} / n_j$$

$$Y_{ij} = b \cdot (\bar{X} - x_{ij}) + y_i$$

- **Test d'homogénéité des variances :**

Le test de Cochran a été appliqué aux variances des  $Y_{ij}$  pour vérifier l'homogénéité des variances constitutives de l'erreur expérimentale.

Le critère utilisé est :

$$C = S^2_{\max} / \sum_{j=1}^k S_j^2$$

$S_j^2$  est la variance du groupe j,  $S^2_{\max}$  est la variance la plus élevée des k groupes.

Si l'inégalité suivante est vérifiée :  $C < C(\alpha ; k : n-1)$  l'ensemble des variances des différents groupes peut être considéré comme homogène au risque  $\alpha$ .

- **Test de l'existence d'une pente significative :**

Ce test consiste à comparer les variations dues à la régression et aux erreurs expérimentales et d'ajustement.

$$F_1 = S^2_1 / S^2_R > F(\alpha ; 1 : N-2)$$

## Partie expérimentale

Si  $F_1$  est significatif, on conclut à l'existence d'une pente, donc à une dépendance linéaire au seuil de probabilité considéré.

**Tableau3 : Test de l'existence d'une pente significative**

variations	DDL	Somme des carrés	variance	$F_c$
Variation totale	N-1	$\sum T^2 = \sum_{j=1}^k \sum_{i=1}^{n_j} (Y_{ij} - \bar{Y})^2$		$F_1 = S_I^2 / S_R^2$
Variation due à la régression	1	$\sum I^2 = b^2 \sum_{j=1}^k n_j (\bar{X}_j - \bar{X})^2$	$S_I^2 = \sum I^2$	
Variation résiduelle	N-2	$\sum R^2 = \sum T^2 - \sum I^2$	$S_R^2 = \sum R^2 / (N-2)$	

- **Test de validité de la droite de régression :**

Ce test permet de comparer les erreurs d'ajustement et expérimentales ( $S_E^2$ ) :

$$F_2 = S_L^2 / S_E^2 \quad (F ; k-2 : N-k).$$

Si  $F_2$  n'est pas significatif, l'ajustement est considéré valide au seuil de probabilité considéré.

**Tableau4 : Test de validité de la droite de régression**

variations	DDL	Somme des carrés	variance	$F_c$
Erreur expérimentale	N-k	$\sum E^2 = \sum_{j=1}^k \sum_{i=1}^{n_j} (Y_{ij} - \bar{y})^2$	$S_E^2 = \sum E^2 / N-k$	$F_2 = S_L^2 / S_E^2$
Erreur d'ajustement	k-2	$\sum L^2 = \sum R^2 - \sum E^2$	$S_L^2 = \sum L^2 / k-2$	

### 1.2.3.2. Etude de l'exactitude :

## Partie expérimentale

---

**a. Protocole :** un même protocole est exploité pour l'exactitude et la linéarité. Les résultats de cette dernière sont utilisés pour l'exactitude.

**b. Étude statistique :**

- **Système de référence considérée : étalon 100%**

Ce système de référence est considéré lorsque les ordonnées à l'origine des droites D1 et D2 ne sont pas significativement différentes de 0.

Soient  $x_{100}$  et  $y_{100}$  respectivement la pesée et l'observation correspondant à la solution de référence. Effectuer le changement de variable suivant :

$$Y_{ij} = y_{ij} \cdot x_{100} / x_{ij} \cdot y_{100}$$

Cette méthode permet d'évaluer l'exactitude dans les conditions de dosage routinières.

Les tests suivants s'effectuent quel que soit le système de référence considéré.

- **Vérification de l'homogénéité des variances liées :**

Effectuer le test de Cochran en considérant les valeurs  $y_{ij}$  pour vérifier l'homogénéité des variances des différents groupes  $j$ . Le critère à utiliser est

$$C = S^2_{\max} / \sum_{j=1}^k S^2_j$$

$S^2_j$  est la variance du groupe  $j$  ;  $S^2_{\max}$  est la variance la plus élevée des  $k$  groupe  $j$

Si l'inégalité suivante est vérifiée :  $C < C(\alpha ; k ; n-1)$ , l'ensemble des variances des différents groupes  $j$  peut être considéré comme homogène au risque  $\alpha$

- **Test de validité des moyennes**

Ce test consiste à comparer les erreurs inter-groupes et intra-groupes.

## Partie expérimentale

$$F_3 = S^2_C / S^2_E < F(\alpha; k-1; N-k)$$

Si  $F_3$  n'est pas significatif, on peut dire, au risque considéré que les variations entre les différents groupes sont dues aux erreurs expérimentales.

**Tableau 5 : test de validité des moyennes**

variations	DDL	Somme des carrés	Variances	F calculé
Variation totale	N-1	$\sum T^2 = \sum_{j=1}^k \sum_{i=1}^{n_j} Y_{ij} - \bar{Y})^2$	$S^2 = \sum T^2 / (N-1)$	$F_3 = S^2_C / S^2_E$
Variation intra-groupe	N-k	$\sum E^2 = \sum_{j=1}^k \sum_{i=1}^{n_j} Y_{ij} - \bar{Y}_j)^2$	$S^2 = \sum E^2 / (N-1)$	
Variation inter-groupe	k-1	$\sum C^2 = \sum T^2 - \sum E^2$	$S^2 = \sum C^2 / (k-1)$	

- **Estimation du recouvrement moyen :**

Après avoir vérifié le test précédent, il est possible de calculer la valeur du recouvrement moyen et son intervalle de confiance :

$$\bar{Y} = \sum_{j=1}^k \left( \frac{1}{kn_j} \right) \sum_{i=1}^{n_j} Y_{ij}$$

$$I_{Rm} = \bar{Y} \pm t_{(\alpha; N-1)} S_T / N$$

Avec  $t_{(\alpha; N-1)}$  lu dans la table de student

### I.2.3.3. Etude de la fidélité :

#### a. protocole :

La fidélité est étudiée à la valeur cible 60 µg/ml.

Sept pesées 100% de la forme pharmaceutique reconstituée ont été faites (k=7), sur trois jours successifs (n=3), à raison d'une série par jour.

### b. Étude statistique :

- **Transformation des données brutes en pourcentage de recouvrement :**

Système de référence considéré : étalon 100%

Le pourcentage de recouvrement :

$$Y_{ij} = X_{ij} * 100 / x_{ij}$$

Avec  $X_{ij}$  est la masse estimée.

$$X_{ij} = y_{ij} / b_1$$

$b_1$  est la pente de la droite  $D_1$ .

- **Calcul de la moyenne des groupes :**

$$m_j = \sum Y_{ij} / n_j.$$

$m_j$  : représente la moyenne des  $n_j$  répétitions à l'intérieur du groupe.

$\bar{m}$  : représente la moyenne des valeurs  $m_j$ .

- **Calcul de la variance de chaque groupe**

$S_j^2$  est donné par la relation suivante :

$$S_j^2 = \sum (Y_{ij} - m_j)^2 / n_j - 1$$

- **Calcul de la variance de répétabilité :**

$$S_r^2 = \sum (S_j^2) / k$$

avec  $k=3$

- **Calcul de la variance inter-groupe :**

$$S_g^2 = (\sum (m_j - \bar{m})^2 / k - 1) - (S_r^2 / n).$$

- **Calcul de la variance de reproductibilité :**

$$S_R^2 = S_r^2 + S_g^2.$$

Les CV doivent être inférieurs à 2% pour dire que la méthode est fidèle.

### I.2.3.4. Étude de la spécificité :

## Partie expérimentale

La spécificité est estimée lors de la comparaison de la droite obtenue avec la matrice reconstituée et celle obtenue pour le produit pur, Ceci tend à prouver qu'il n'y a pas d'interaction entre le milieu et le produit à quantifier.

### I.2.4. Analyses statistiques

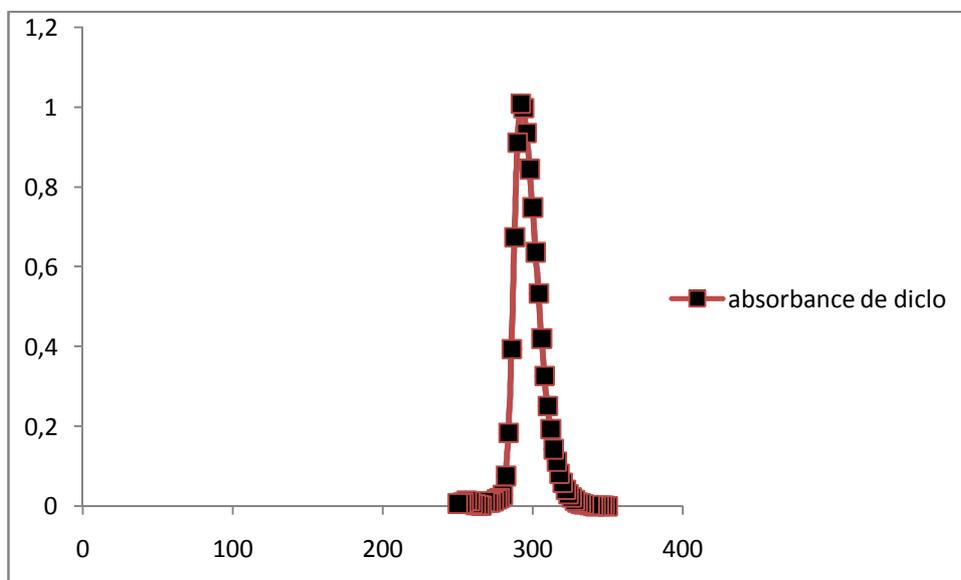
L'étude statistique de la validation analytique (linéarité, exactitude, fidélité) a été effectuée à l'aide du logiciel **STATGRAPHICS Centurion XVI**.

## II. Résultats et discussion :

### II.1. Mise au point des conditions d'analyse

#### II.1.1. Choix de la longueur d'onde:

Le schéma suivant représente le spectre d'absorption du Diclofénac sodique entre 250 et 350nm :



**Figure7 : Spectre d'absorption du Diclofénac sodique dans NaOH (0,05M)**

Le spectre montre une absorbance maximale à 294nm, donc il a été décidé de travailler à cette longueur d'onde.

#### II.1.2. Test de conformité du système :

## Partie expérimentale

### ü Standard 1 : $m_1=60.05\text{mg}$ .

Essai	1	2	3	4	5	6	Moyenne
100%	0.970	0.974	0.976	0.975	0.976	0.974	<b>0.974</b>

### ü Standard 2 : $m_2=60.08\text{mg}$ .

Essai	1	2	3	4	5	6	moyenne
100%	0.964	0.964	0.969	0.968	0.967	0.974	<b>0.967</b>

- **Calcul des CV**

<b>CV<sub>1</sub>%</b>	0,0043%
<b>CV<sub>2</sub>%</b>	0,0012%

Les  $CV_1$  et  $CV_2$  sont inférieurs à 2% cela signifie que notre système est conforme.

- **Calcul de facteur de similarité**

$$A_1 * m_2 / A_2 * m_1 = 0,992 \approx 1$$

Le facteur de similarité obtenu est proche de 1.

## II.2.validation de la méthode de dosage :

## Partie expérimentale

### II.2.1.linéarité :

#### Résultats du standard (principe actif seul) :

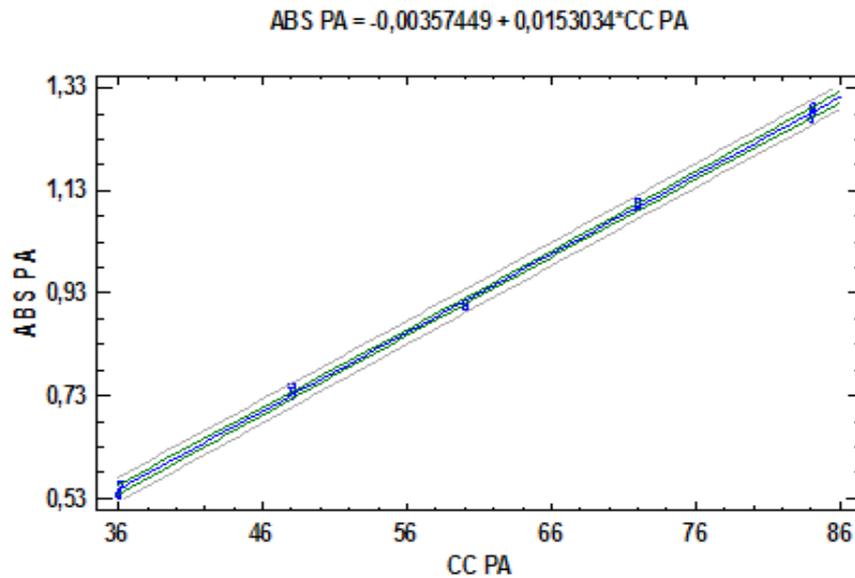
Les résultats obtenus sont regroupés dans le tableau suivant :

**Taleau6 :Résultats du standard (principe actif seul)**

%	jour	Echantillon	Masse (mg)	Conc (µg/ml)	Absorbance
60	1	1	36.05	36.05	0.54
	2	1	36.09	36.09	0.54
	3	1	36.18	36.18	0.56
80	1	2	48.01	48.01	0.73
	2	2	48.06	48.06	0.74
	3	2	48.02	48.02	0.75
100	1	3	60.05	60.05	0.91
	2	3	60.03	60.03	0.90
	3	3	59.99	59.99	0.91
120	1	4	72.01	72.01	1.10
	2	4	71.97	71.97	1.10
	3	4	72.04	72.04	1.11
140	1	5	84.04	84.04	1.28
	2	5	84.01	84.01	1.27
	3	5	84.14	84.14	1.29

À partir de ces résultats, la courbe d'étalonnage sur standard a été tracée :

## Partie expérimentale



**Figure 8: courbe d'étalonnage sur standard**

- Valeurs de la pente  $b_1$  et l'ordonnée à l'origine  $a_1$  :

	Estimation des moindres carrés	Erreur type	Probabilité
Ordonnée	-0,00357449	0,0096902	0.7182
Pente	0,0153034	0,000155307	0.000

**La droite de régression linéaire D1 a pour équation :**

$$Y = 0,0153034x - 0,00357449$$

- Coefficient de corrélation ( $r_1$ ) :

Coefficient	$r_1$
Valeur	<b>0.999331</b>

Il existe une relation relativement forte entre les variables.

## Partie expérimentale

- Comparaison de l'ordonné à l'origine ( $a_1$ ) avec zéro :

$t_{cal}$	-0,368877
$t_{(5\%, 14)}$	2.16

On a  $t_{cal} < t_{théorique}$ , donc l'ordonnée à l'origine de  $D_1$  n'est pas significativement différente de zéro.

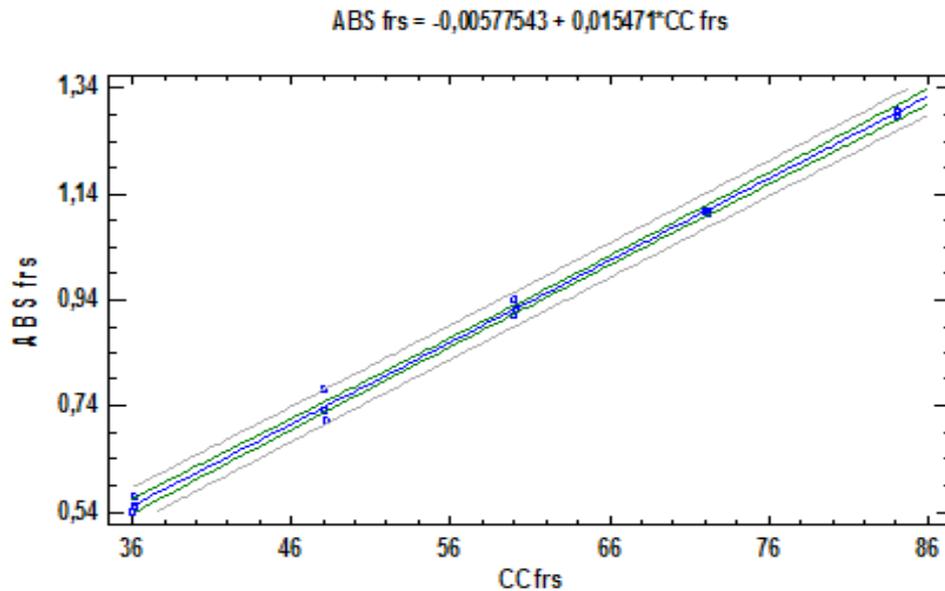
**Résultats del'échantillon (la forme reconstituée) :**

**Tableau7 :Résultats del'échantillon (la forme reconstituée) :**

%	Jour	Échantillon	Masse (mg)	Conc (µg/ml)	Absorbance
60	1	1	36.05	36.05	0.55
	2	1	36.02	36.02	0.54
	3	1	36.09	36.09	0.566
80	1	2	48.16	48.16	0.71
	2	2	48	48	0.77
	3	2	48	48	0.73
100	1	3	60.08	60.08	0.923
	2	3	60	60	0.912
	3	3	60.04	60.04	0.94
120	1	4	72.09	72.09	1.105
	2	4	72.09	72.09	1.109
	3	4	71.97	71.97	1.11
140	1	5	84.04	84.04	1.29
	2	5	84.08	84.08	1.299
	3	5	84.05	84.05	1.295

À partir de ces résultats, la courbe d'étalonnage sur échantillon a été tracée

## Partie expérimentale



**Figure 9 : courbe d'étalonnage sur placebo chargé**

- Valeurs de la pente ( $b_2$ ) et l'ordonnée à l'origine ( $a_2$ ) :

	Estimation des moindres carrés	Erreur type	probabilité
<b>Ordonnée</b>	-0.00577543	0.13882	0.6842
<b>pente</b>	0.015471	0.000222458	0.0000

**La droite de régression linéaire D2 a pour équation :**

$$Y = 0.015471x - 0.00577543$$

- **Calcul de coefficient de corrélation**

<b>Coefficient</b>	$r_2$
<b>Valeur</b>	0.9986

Il existe une relation relativement forte entre les variables.

## Partie expérimentale

---

- **Comparaison de l'ordonné à l'origine ( $a_2$ ) avec zéro :**

$t_{a_2}$	-0,416038
$t(5\% ; 14)$	2,16

On a  $t_{a_2} < t_{\text{théorique}}$ , donc l'ordonnée à l'origine de  $D_2$  n'est pas significativement différente de zéro.

- **Comparaison entre  $b_1$  et  $b_2$  les pentes respectivement de  $D_1$  et  $D_2$  :**

$t_{\text{cal}}$	0.61774895
$t(5\% ; 26)$	2,06

On a  $t_{\text{cal}} < t_{\text{théorique}}$ , donc les pentes  $b_1$  et  $b_2$  ne sont pas significativement différentes.

- **Comparaison entre  $a_1$  et  $a_2$  les ordonnées à l'origine respectivement de  $D_1$  et  $D_2$  :**

$t_{\text{cal}}$	0.13000576
$t(5\% , 26)$	2,06

$t_{\text{cal}} < t_{(5\% , 26)}$ , donc les ordonnées  $a_1$  et  $a_2$  ne sont pas significativement différentes.

## Partie expérimentale

- **Changement de variable :**

### 1. Standard :(principe actif seul).

On a calculé les nouvelles absorbances qui sont présentées dans le tableau suivant :

**Tableau 8 : Résultatssur standard après le changement de variables**

%	Jour	Echantillon	Masse (mg)	ABS après changement de variable
60	1	1	36.05	0.5408677
	2	1	36.09	0.536252257
	3	1	36.18	0.55887826
80	1	2	48.01	0.73030607
	2	2	48.06	0.7395409
	3	2	48.02	0.75015303
100	1	3	60.05	0.9095914
	2	3	60.03	0.90289747
	3	3	59.99	0.9095096
120	1	4	72.01	1.0969495
	2	4	71.97	1.10056163
	3	4	72.04	1.1104904
140	1	5	84.04	1.28035657
	2	5	84.01	1.27081567
	3	5	84.14	1.29282623

- **Test d'homogénéité des variances :**

Le test de Cochran est appliqué aux variances du groupe  $Y_{ij}$  pour vérifier l'homogénéité des variances constitutives de l'erreur expérimentale.

Pour le standard on a :

Groupe	Variance ( $s_j^2$ )
1	0.000142906
2	0.0000986335
3	0.0000147559
4	0.000049164
5	0.000121831
Somme	0.0004227291

## Partie expérimentale

### Calcul de C

$C_{cal}$	0,3344752
$C(5\% ;5,2)$	0,68

$C_{cal} < C(5\% ;5,2)$  donc l'ensemble des variances des différents groupes j peut être considéré comme homogène au risque 5%.

- **Test de l'existence d'une pente significative :**

Variation	DDL	Sommes des carrés	Variances	F calculé	$F_{(5\% ;1,13)}$
Variation due à la régression	1	1.00986	1.00986	10425,43	4,67
variation résiduelle	13	0.00125925	0,0000968651		
Variation totale	14	1.01112			

$F_{calculé} > F_{(5\% ;1,13)}$ , on conclut à l'existence d'une pente, donc à une dépendance linéaire au seuil de probabilité considéré.

- **Test de validité de la droite de régression:**

variations	DDL	Sommes des carrés	variances	$F_c$	$F_{(5\% ;3,10)}$
Erreur expérimentale	10	0,000869357	0,0000869357	1,4949449	3,71
Erreur d'ajustement	3	0,00038988	0.00012996		

$F_c < F_{(5\% ;3,10)}$  donc l'ajustement est considéré valide au seuil de probabilité considéré.

## Partie expérimentale

### 2. Echantillon (la forme reconstituée) :

Même pour la forme reconstituée on a calculé les nouvelles valeurs de l'absorbances qui sont regroupées dans le tableau ci-dessous :

**Tableau 9 : Résultats sur la forme reconstituée après changement de variable.**

%	Jour	Echantillon	Masse (mg)	Absorbance
60	1	1	36.05	0.55005105
	2	1	36.02	0.55005105
	3	1	36.09	0.56543221
80	1	2	48.16	0.70834924
	2	2	48	0.7708246
	3	2	48	0.7308246
100	1	3	60.08	0.92238116
	2	3	60	0.91261884
	3	3	60.04	0.94
120	1	4	72.09	1.10438116
	2	4	72.09	1.10838116
	3	4	71.97	1.11123768
140	1	5	84.04	1.29025837
	2	5	84.08	1.29863953
	3	5	84.05	1.29510366

#### • Test d'homogénéité des variances :

Groupe	Variance ( $s_j^2$ )
1	0.00007886
2	0.0001001385
3	0.00019258
4	0.0000118619
5	0.0000177
Somme	0.001302387

#### Calcul de C

$C_c$	0,5
-------	-----

## Partie expérimentale

$C_{\text{seuil}}$	0,68
--------------------	------

Le facteur de Cochran est inférieur à 0,68 ( $C_{\text{Seuil}}$ ).

L'inégalité est vérifiée donc l'ensemble des variances des différents groupes j peut être considéré comme homogène au risque 5%.

- **Test de l'existence d'une pente significative :**

Variation	DDL	Sommes des carrés	variances	F calculé	$F_{(5\% ; 1,13)}$
modèle	1	1.02697	1.02697	4839,769268	4,67
résidu	13	0.00275853	0.000212194		
Variation totale	14	1.02973			

$F_{\text{calculé}} > F_{(5\% ; 1,13)}$ , on conclut à l'existence d'une pente significatif, donc à une dépendance linéaire au seuil de probabilité considéré.

- **Test de validité de la droite de régression:**

variations	DDL	Sommes des carrés	variances	$F_c$	$F_{(5\% ; 3,10)}$
Erreur expérimentale	10	0,0026053	0,00026053	0,1959929	3,71
Erreur d'ajustement	3	0,0001531	0,000051062		

$F_c < F_{(5\% ; 3,10)}$  donc l'ajustement est considéré valide au seuil de probabilité de 5%.

**Conclusion :** la méthode est linéaire dans le domaine étudié (concentrations comprises entre 36 à 84  $\mu\text{g/ml}$ ).

### II.2.2. L'exactitude :

#### II.2.2.1.Principe actif

- **Changement de variable :**

Les résultats trouvés après changement de variable sont rassemblés dans le tableau suivant :

**Tableau 10 : Résultats de l'exactitude sur standard**

Echantillon	Masse (mg)	ABS	Masse retrouvée	%recouvrement
1	36,05	0,5408677	35,57640135	98,68627282
1	36,09	0,53625557	35,27501956	97,74181091
1	36,18	0,55887826	36,75330816	101,5845997
2	48,01	0,73030607	47,95532388	99,88611515
2	48,06	0,7395409	48,55877739	101,0378223
2	48,02	0,75015303	49,25223148	102,5660797
3	60,05	0,9095914	59,67079252	99,36851378
3	60,03	0,90289747	59,23337497	98,67295514
3	59,99	0,9095096	59,66544753	99,45898905
4	72,01	1,0969495	71,9137793	99,8663787
4	71,97	1,10056163	72,14981571	100,2498481
4	72,04	1,1104904	72,79861447	101,0530462
5	84,04	1,28035657	83,89858457	99,83172842
5	84,01	1,27081567	83,27513093	99,12526001
5	84,14	1,29282623	84,71341928	100,6815062

## Partie expérimentale

---

- **Test d'homogénéité des variances :**

On a calculé les variances des jours :

<b>GROUPE</b>	<b>S</b>	<b>Variances</b>
1	2,002470654	4,00988872
2	1,344384008	1,80736836
3	0,430084666	0,18497282
4	0,6055790	0,36672593
5	0,779222035	0,60718698

À partir de ces résultats on a déduit la valeur de C calculé :

<b>C calculé</b>	<b>C<sub>(0,05 ; 5 ; 2)</sub></b>
0,57	0,68

On a  $C_{\text{calculé}} < C_{\text{seuil}}$  dans la table de Cochran.

L'inégalité est vérifiée, l'ensemble des variances des différents groupes j peut être considéré comme homogène au risque 0,05.

## Partie expérimentale

---

- **Test de validité des moyennes pour le PA : ANOVA**

Variation	DDL	Sommes des carrés	Variances	$F_C$	$F_{(0,05 ; 4,10)}$
Variation totale	14	23,6358			
Variation intra-groupe	10	14,5295	1,45295	1,57	3,48
Variation inter groupe	4	9,10633	2,27658		

$F_C < F_{(0,05 ; 4,10)}$  on déduit que les variations des observations entre les différents groupes sont dues aux erreurs expérimentaux au risque 0,05.

- **Estimation du recouvrement moyen pour le PA :**

Les résultats sont regroupés dans le tableau suivant :

St	$t_{(0,05 ; 14)}$	Moyenne
1,29934	2,16	99,8733

À partir de ces résultats on trouve l'intervalle de confiance :

$$IC = [99,14 ; 100,6]$$

L'intervalle comprend le 100% donc la méthode est exacte.

## Partie expérimentale

### II.2.2.2. forme reconstituée :

- **Changement de variable :**

**Tableau 11 : Résultats de l'exactitude sur forme reconstituée**

Echantillon	Masse (mg)	ABS	% de recouvrement	Variances
1	36,05	0,5501	99,65	5,0784669
1	36,02	0,5501	97,938	
1	36,09	0,5654	102,4	
2	48,16	0,7083	96,066	8,3952506
2	48	0,7708	104,47	
2	48	0,7308	99,08	
3	60,08	0,9224	99,922	2,3613612
3	60	0,9126	98,871	
3	60,04	0,94	101,82	
4	72,09	1,1044	99,594	0,021925
4	72,09	1,1084	99,953	
4	71,97	1,1112	100,21	
5	84,04	1,2903	99,661	0,1046824
5	84,08	1,2986	100,31	
5	84,05	1,2951	100,03	

À partir de ces résultats on a déduit la valeur de C calculé :

C calculé	$C_{(0,05 ; 5 ; 2)}$
0,52622	0,68

On a  $C_{\text{calculé}} < C_{\text{seuil}}$  avec  $C_{\text{seuil}}$  lu dans la table de Cochran.

L'inégalité est vérifiée, l'ensemble des variances des différents groupes j peut être considéré comme homogène au risque 0,05.

## Partie expérimentale

- **Test de validité des moyennes pour la forme reconstituée : ANOVA**

Variation	DDL	Sommes des carrés	Variances	F calculé	$F_{(0,05 ; 4,10)}$
Variation totale	14	51,435			
Variation intra-groupe	10	51,2404	5,12404	0,01	3,48
Variation inter groupe	4	0,194659	0,0486647		

$F_{\text{calculé}} < F_{(0,05 ; 4,10)}$  on déduit que les variations des observations entre les différents groupes sont dues aux erreurs expérimentaux au risque 0,05.

- **Estimation du recouvrement moyen pour la forme reconstituée :**

St	$t_{(0,05 ; 4 : 10)}$	Moyenne
1,916	2,16	99,9982

À partir de ces résultats, on a calculé la valeur de l'intervalle de confiance :

$$IC = [98,93 ; 101,05]$$

Cet intervalle comprend le 100% donc notre méthode est exacte.

## Partie expérimentale

### II.2.3.Fidélité :

Les résultats trouvés sont regroupés dans les tableaux ci dessous :

Pour  $J_1$  :

**Tableau12 : Résultats de la première série de fidélité**

Échantillon 100%	Masse (mg)	Les absorbances	Masse estimée	% de recouvrement
1	59,9	0,968	62,5727	104,462
		0,966		
		0,968		
		0,967		
2	60	0,960	62,0555	103,426
		0,960		
		0,961		
		0,960		
3	60,03	0,976	63,089	105,09
		0,977		
		0,975		
		0,976		
4	60,15	0,971	62,895	104,565
		0,975		
		0,974		
		0,973		
5	59,9	1,000	64,64	107,91
		1,000		
		1,001		
		1,000		
6	59,93	0,994	64,2533	107,24
		0,994		
		0,992		
		0,993		
7	60,11	0,985	63,73	106,03
		0,986		
		0,987		
		0,986		

## Partie expérimentale

---

Pour J<sub>2</sub> :

**Tableau 13 : Résultats de la deuxième série de fidélité**

<b>Échantillon 100%</b>	<b>Masse (mg)</b>	<b>Les absorbances</b>	<b>Masse estimée</b>	<b>% de recouvrement</b>
1	59,92	0,984	63,73	106,36
		0,987		
		0,986		
		0,986		
2	60,17	0,965	62,44	103,77
		0,968		
		0,965		
		0,966		
3	60	0,974	63,089	105,15
		0,979		
		0,974		
		0,976		
4	60,07	0,984	63,60	105,88
		0,986		
		0,981		
		0,984		
5	59,93	0,978	63,34	105,70
		0,982		
		0,979		
		0,980		
6	60	0,989	64,05	106,76
		0,990		
		0,993		
		0,991		
7	59,97	0,984	63,67	106,17
		0,983		
		0,989		
		0,985		

## Partie expérimentale

Pour J<sub>3</sub> :

**Tableau14 : Résultats de la troisième série de fidélité**

Échantillon 100%	Masse (mg)	Les absorbances	Masse estimée	% de recouvrement
1	59,93	0,980	63,41	105,81
		0,979		
		0,983		
		0,981		
2	60	0,992	63,99	106,65
		0,989		
		0,989		
		0,990		
3	59,93	0,982	63,21	105 ,48
		0,977		
		0,974		
		0,978		
4	60,08	0,984	63,47	105,65
		0,979		
		0,982		
		0,982		
5	60,08	0,995	64,25	106,94
		0,993		
		0,995		
		0,994		
6	60,04	1,011	65,35	108,84
		1,011		
		1,010		
		1,011		
7	60,01	0,998	64,38	107,28
		0,995		
		0,996		
		0,996		

## Partie expérimentale

À partir des résultats des trois jours on a calculé les variances qui sont regroupés dans le tableau suivant :

	<b>Pourcentage de recouvrement</b>		
	<b>JOUR 1</b>	<b>JOUR 2</b>	<b>JOUR 3</b>
	104,462	106,36	105,81
	103,426	103,77	106,65
	105,09	105,15	105,48
	104,565	105,88	105,65
	107,91	105,70	106,94
	107,24	106,76	108,84
	106,03	106,17	107,28
<b>Moyenne</b>	105,53	105,68	106,66
<b>Variances</b>	2,595	0,7874	1,3236
<b>moyenne des moyennes</b>	105,95		

**Calcul des coefficients de variation (CV) :**

	<b>répétabilité</b>	<b>Inter-groupe</b>	<b>reproductibilité</b>
<b>S<sup>2</sup></b>	0,939	- 0,12465	0,939
<b>CV%</b>	<b>0,915</b>	<b>0</b>	<b>0,915</b>

La variation inter-groupes est négative ce qui veut dire qu'elle n'est pas significative vis-à-vis de la variance de répétabilité, elle sera donc remplacée par 0.

Les CV de répétabilité, de reproductibilité sont inférieurs à 2.0%, la méthode est donc fidèle.

### **II.2.4. Spécificité :**

D'après le résultat de la comparaison des deux pentes  $b_1$  et  $b_2$ . ( $t_{b_1, b_2} < 2.06$ ).

On déduit qu'il n'y a pas d'effet de matrice, donc notre méthode est spécifique.

## Partie expérimentale

---

**Conclusion : Les résultats de l'étude des différents critères de la validation nous conduisent à conclure que notre méthode est valide au seuil de probabilité 5%.**

### **Conclusion :**

L'acceptation d'une méthode analytique, quant à sa fiabilité, est généralement décidée sur la base du calcul des limites de confiance des mesures d'exactitude et l'estimation de sa fidélité au moyen du calcul des coefficients de variation.

Cette approche est, en fait, basée sur les outils statistiques (qui sont des outils de diagnostic indispensable pour caractériser une méthode et la valider) comme un moyen d'analyse et de prise de décision en même temps. La validation peut prendre différentes formes selon les besoins et domaines concernés. Les approches évoluent et s'améliorent avec le temps, mais les principes et outils restent fondamentalement similaires.

Notre méthode a été statistiquement validée en calculant l'intervalle de confiance (IC) pour l'exactitude et le coefficient de variation (CV) pour la fidélité. Ces derniers étaient respectivement : **[98,93 ; 101,05]** pour l'IC et **0,915** pour le CV.

La droite de régression est linéaire dans l'intervalle **36 $\mu$ g/ml à 84 $\mu$ g/ml**

## **Références bibliographique :**

- (1) Jacques Dangoumau, Nicholas Moore, Mathieu Molimard, Annie Fourrier-Reglat. Karin Latry, Françoise Haramburu. GhadaMiremont-Salame, Karine Titier. Pharmacologie générale, Edition 2000
- (2) Y. Zhang, SU. Giessen, C. Gal. La carbamazépine et le diclofénac élimination dans les usines de traitement des eaux usées et d'événements dans les plans d'eau: Chemosphere, 73, pp 1151-116, 2008
- (3) Pharmacopée européenne 6<sup>ème</sup> Edition.
- (4) P. JUNI, A. WS. RUTJES, and P. A. DIEPPE, Are selective COX 2 inhibitors superior to traditional non-steroidal anti-inflammatory drugs? Adequate analysis of the CLASS trial indicates that this may not be the case. BMJ.324(June): p. 1287. 2002.
- (5) G. Gilman. Diclofénac, Les bases Pharmacologiques de l'Utilisation des Médicaments, , Editor. 1998. p. 644.
- (6) Monographie du produit Pennsaid® laboratoire paladin Inc 6111, avenue royalemont, bureau 102Montréal, Quebec.date de préparation 14 avril 2009
- (7) Diclofénac, in Martindale. The Extra Pharmacopoeia 31. Edition1996, Royal Pharmaceutical Society: London. p. 36-37.
- (8) <http://santeaz.aufeminin.com/w/sante/m3407386/medicaments/diclofenac-sodique-rpg.html>
- (9) J-M.Aiache, S.Aiache, R.Renoux, Initiation à la connaissance du médicament. 4<sup>ème</sup> édition.
- (10) J-C chaumeil.D.Brossard. Pharmacie galénique, Bonnes pratiques de fabrication des médicaments A. le Hir,. 9<sup>ème</sup> édition.
- (11) Francis Rouessac, Annick Rouessac.Analyse chimique, méthodes et techniques instrumentales modernes 6eme édition
- (12) Géniedes procédés(centre spin) Ecole des mines de Saint.
- (13) Lavallaz Pierre, Délétroz Raphy.Spectrométrie

- (14) Jérôme VIAL. Définition de la validation de méthode et outils associés. Laboratoire Environnement et Chimie Analytique de l'ESPCI.
- (15) Wikipédia : [org/wiki/Validation](http://org/wiki/Validation) (encyclopédie libre).
- (16) les technologies de laboratoire, une démarche statistique de la validation analytique dans le domaine pharmaceutique.
- (17) le document Q2a du l'ICH ( international Conférence on Harmonisation).
- (18) Caporal-Gauthier, J., Nivet, JM., Algranti P., Guilloteau, M., Histe, M., Lallier, JJ., N' Guyen –Huu, JJ et Russoto, R. Guide de la validation analytique. Rapport de commission SFSTPI. Méthodologie. S.T.P. Pharma Pratique. 1992, 24,205-226.
- (19) Roussel J.M. Existe t-il un guide universel pour la validation des méthodes d'analyse ? STP Pharma Pratiques – vol 15 – N°4 – juil/août 2005.
- (20) Health Sciences Authority. Guidance notes on analytical method validation. GUIDE7MQA7012A7004. 2004
- (21) European Medicines Agency. ICH Q2 (R1) validation of analytical procedures: text and methodology. CPMP/ICH/381/95.1995

La **cyclo-oxygénase (COX)** est une enzyme qui permet la formation de prostaglandines à partir de l'acide arachidonique. Son action est inhibée par les anti-inflammatoires non stéroïdiens (AINS)

**Prostaglandines :** Ce sont des médiateurs chimiques qui possèdent divers effets physiologiques.

**Ordonnée à l'origine (Intercept):** endroit où la droite d'un graphique coupe l'axe des ordonnées. Désigné conventionnellement par la lettre "a".

**Pente :** angle que fait une droite sur un graphe par rapport à l'horizontale. Il est exprimé sous forme d'un rapport entre les valeurs de Y et les valeurs de X. Désigné conventionnellement par la lettre "b".

**Risque  $\alpha$  ou risque de première espèce :** probabilité de rejeter une hypothèse vraie à l'issue d'un test statistique. Ce risque est fixé avant de réaliser un test (habituellement 5 ou 1 %). On l'appelle aussi seuil ou niveau d'un test.

**Série :** ensemble de mesures consécutives effectuées sans interruption et dont les résultats sont obtenus à partir d'une phase unique de calibrage.

**Variance:** paramètre statistique chiffrant la dispersion des individus autour de la moyenne. C'est la somme des carrés des écarts à la moyenne de n observations divisée par le nombre de degrés de liberté. L'écart-type est la racine carrée de la variance.

**Domaine d'analyse :** intervalle de concentrations (ou autres quantités) d'un analyte pour lequel la technique est applicable sans modification. Son évaluation nécessite l'établissement des limites de linéarité et (éventuellement) de la limite de détection de la technique.

Synonyme : "domaine de mesurage, gamme de mesure, domaine d'application".

**Coefficient de corrélation :** quotient de la covariance de deux caractères par le produit de leurs écarts-types.

*Note :* il exprime la relation éventuelle entre deux variables réputées indépendantes. Sa valeur doit être uniquement testée par rapport à zéro en fonction d'un risque  $\alpha$  choisi. Il est habituellement sans intérêt dans les comparaisons de techniques.

**Coefficient de variation :** pour un caractère non négatif, rapport de l'écart-type à la moyenne.

*Note :* ce rapport peut être exprimé en pourcentage.

Le terme « écart-type relatif » est parfois utilisé à la place de « coefficient de variation », mais cet usage n'est pas recommandé.

**Corrélation** : liaison entre deux ou plusieurs variables aléatoires à l'intérieur d'une loi.

*Note* : la plupart des mesures statistiques de corrélation ne mesure que le degré de liaison linéaire.

**Degré de liberté, (ddl)** : en général, le nombre de termes de la somme moins le nombre de contraintes sur les termes de la somme.

**Ecart** : valeur moins sa valeur de référence.

**Ecart-type de la moyenne, s.e.m. ("Standard deviation of the mean")** : paramètre statistique indiquant la dispersion des valeurs au niveau de la moyenne d'une série de mesures.

**Erreur totale**: somme algébrique de l'erreur due à l'inexactitude et de l'erreur due à l'imprécision. Ces deux erreurs se compensent ou s'additionnent, définissant ainsi deux bornes de variation de l'erreur totale.

Logiciel stat-graphics :

