

الجمهورية الجزائرية الشعبية الديمقراطية

République Algérienne Démocratique et Populaire

وزارة التعليم العالي والبحث العلمي

Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche  
Scientifique



-----oOo-----

Université Mouloud Mammeri de Tizi-Ouzou

جامعة مولود معمري تيزي وزو

Faculté de médecine

كلية الطب

Département de Pharmacie

قسم الصيدلة

Numéro d'ordre :

## MEMOIRE DE FIN D'ETUDES

En vue de l'obtention du diplôme de docteur en pharmacie

Intitulé :

MISE AU POINT ET VALIDATION D'UNE METHODE DE  
DOSAGE DU PARACETAMOL DANS LES URINES PAR  
CHROMATOGRAPHIE LIQUIDE A HAUTE PERFORMANCE

Réalisé par :

-M<sup>elle</sup> : ARAB Kenza

-M<sup>elle</sup> : AICHOUCHE Sonia

-M<sup>elle</sup> : AMIR Lydia

-M<sup>elle</sup> : KHALI Lynda

Déposé le 05/10/2021

Devant le jury composé de :

Pr. M. MAMOU

MCAHU

UMMTO

Président

Dr. H. BEN SI SAID

MAHU

UMMTO

Promoteur

Dr. M. KOUROGHLI

Résidente

UMMTO

Co-promotrice

Dr. K. AKLI

Assistante

UMMTO

Examinatrice

Année universitaire : 2020 / 2021

## **Remerciements**

*Notre promoteur, **Dr Ben Si Saïd Hassen,***

*Nous avons eu le privilège de travailler sous votre supervision et d'apprendre de votre expérience et de votre savoir. Vous avez été à notre disposition depuis le début pour diriger ce travail avec vos conseils et vos instructions. Vous avez fait preuve de patience et de compréhension avec nous jusqu'à la fin, pour tout cela, nous vous en sommes infiniment reconnaissantes.*

*Notre co promotrice, **Dr. Kourogli Massiva,***

*Nous vous remercions pour votre dévouement à codiriger ce travail et pour tous vos conseils.*

*Professeur **Mamou M,** président de notre jury,*

*Nous tenons à vous exprimer nos vifs remerciements pour nous avoir fait l'honneur de présider notre jury afin d'évaluer notre mémoire et de vous être rendu disponible pour nous.*

*Docteur **Akli K,** assistante en chimie analytique,*

*Nous vous remercions d'avoir accepté de siéger au sein de notre jury afin d'examiner ce travail.*

*Nous tenons particulièrement à remercier **Dr. Akroum A,** résident en chimie analytique, pour le temps qu'il nous a consacré, malgré ses autres engagements, afin de répondre à nos questions et nous orienter.*

*Nous adressons également nos remerciements à toute l'équipe des résidents en chimie analytique de Tizi-Ouzou ainsi que tout le personnel du laboratoire de chimie analytique.*

# ***Dédicaces***

***Dieu merci !***

*Je dédie ce modeste travail qui est le fruit de plusieurs années d'études :*

***A mes très chers parents***

*Mes premiers supporteurs, ma plus grande force et mon support dans la vie. Vous êtes l'exemple du dévouement qui n'a jamais cessé de m'encourager, veiller sur moi et prier pour moi. Si je suis arrivée là aujourd'hui, c'est grâce à vous. Je suis très fière d'être votre fille et de pouvoir enfin réaliser ce que vous avez tant espéré et attendu de moi. Puisse dieu, le tout puissant, vous accorder santé, bonheur et longue vie afin que je puisse vous combler à mon tour.*

***A mes chers frères et sœurs***

*Vous êtes mes anges gardiens, vous m'avez toujours soutenue et vous me soutenez encore. Je vous souhaite un avenir radieux plein de réussite. Du fond du cœur, Merci.*

***A mes adorables neveux et nièces***

*Source de joie et de bonheur, ma sérotonine, que dieu vous protège et vous accorde la réussite dans vos études nchallah. Je vous adore.*

***A toi Ikken***

*A toutes ces années qu'on a passées ensemble, à la mère qui t'a enfanté et qui t'a offert à moi comme le plus beau des cadeaux, à ton père qui a fait de toi un homme merveilleux ainsi que tout le reste de ton adorable famille.*

***A mes chers amis***

*Un grand merci à Hiba, Joni, Cherifa, Djidji, Mely, Hassiba, Zineb, Lynda, Racha, Samir et Massi pour votre amitié et votre soutien moral.*

***A tous mes enseignants***

*Vous avez réussi à enrichir mes connaissances, me donner l'envie d'apprendre et me montrer les clés du succès.*

*Je vous remercie infiniment*

***KENZA***

## *Dédicaces*

*A mes parents que j'aime et j'admire plus que tout au monde, que dieu vous garde pour moi,*

*Mon papa, mon exemple dans la vie, merci pour ton amour inconditionnel et ton soutien quotidien dans tout ce que j'entreprends, merci pour tes longues attentes en bas du laboratoire de chimie analytique à chaque fois que j'avais une pratique à faire, j'espère que ces moments que tu as passés à attendre que je finisse mes séries n'ont pas été en vain et que tu en vois aujourd'hui le fruit à travers ce modeste travail et que tu en es fier. Je t'aime Papa.*

*Ma Maman, la personne la plus douce au monde, merci d'être toujours là pour moi. Ton amour intarissable, tes conseils, tes prières et tes directives à la maison font de moi une meilleure personne jour après jour. En guise de reconnaissance, je te dédie ce petit travail, qui j'espère, te rend fière. Je t'aime Maman.*

*A mon frère aîné Nadir et sa femme Lynda, je vous souhaite plein de bonheur tous les deux. A mes frères cadets Amine et Salim, je vous aime de tout mon cœur et vous souhaite tout ce qu'il y a de meilleur dans la vie.*

*Au meilleur Complice de l'univers, merci d'exister pour moi, merci pour ton soutien, et pour tous les moments de joie que tu me procures chaque jour que dieu fait. Je t'aime.*

*A la mémoire de mon cher oncle Farid qui avait tellement hâte de me voir enfin Docteur en pharmacie, j'aurais tant aimé que tu sois là khali mais hélas la maladie t'a emporté très tôt. Paix à ton âme.*

*Au Dr. Meziane Lisa, la meilleure pharmacienne qui soit, merci pour tes encouragements et ton aide. Puisse notre amitié durer à jamais. Vivement notre fameuse sortie à Namasté.*

*A ma sœur de pensées Mélie, merci d'être toujours à mon écoute. Je te souhaite amour et paix.*

*A madame Lamrous, vous m'avez donnée la chance de faire mon stage au sein de votre officine durant toutes ces années, je vous en serai toujours reconnaissante. Je tiens également à vous remercier pour votre bienveillance et votre générosité infinie.*

**Lydia**

# Dédicace

Je remercie le bon dieu, le tout puissant de m'avoir donnée la force  
d'accomplir ce travail

Je dédie ce mémoire

A Mes chers parents qui m'ont toujours comblée de leur amour,  
leur bonté et leur grande affection ;

A mon cher époux pour son encouragement et son amour ;

A mon frère Hamid et son épouse Ahlam ;

A mes deux sœurs Nadia et Mélyssa ;

A ma grande famille et à la mémoire de mon grand-père  
Slimane ainsi que ma grand-mère Sasia ;

A ma belle-famille notamment mes deux belle sœurs Fatima et  
Nissa ;

Et à tous mes amis.

*Aichouche Senia*

## *Dédicace*

### **A mes très chers parents,**

En témoignage de tant d'années de sacrifices, de patience, d'encouragements et de prières.  
Vous m'avez toujours apportée tout votre amour et tout votre soutien à chaque instant de ma  
vie.

Aucune dédicace ne saurait exprimer à sa juste valeur l'ampleur de l'affection et de  
l'admiration que j'éprouve pour vous.

Mon diplôme vous appartient.

Que dieu vous garde et vous accorde longue vie et bonne santé.

**A mes frères Hakim et Zin Eddine, à ma sœur Imen, son mari et leurs trois enfants,**  
Qui ont toujours été près de moi, et toujours offert de tendresse et d'affection. Puisse Allah,  
vous accorder une vie heureuse et un avenir prospère.

### **A mon fiancé**

Merci pour tes encouragements, ton soutien et ton aide.

### **A mes amis de fac et d'ailleurs**

Je n'oublierai jamais les bons moments que l'on a partagés. Merci pour toutes ces années  
passées ensemble.

### **A toute ma famille**

**A tous ceux qui me sont trop chers et que j'ai omis de citer.**

### **A tous mes maitres**

*Lynda*

# TABLE DES MATIERES

## Table des matières

---

Table des matières.....	i
Liste des abréviations.....	vi
Liste des figures.....	ix
Liste des tableaux.....	xi
Introduction.....	1
Objectifs.....	2

### Partie bibliographique

#### Chapitre I : Paracétamol

1. Historique.....	3
2. Propriétés.....	4
2.1. Physicochimiques.....	4
2.1.1. Aspect.....	4
2.1.2. Solubilité.....	4
2.2. Pharmacologiques.....	4
2.3. Pharmacocinétiques.....	5
2.4. Pharmacodynamiques.....	7
3. Formes pharmaceutiques et voies d'administration.....	7
3.1. Formes pharmaceutiques.....	7
3.2. Voies d'administration.....	7
4. Mécanisme d'action.....	8
5. Posologie et indications thérapeutiques.....	9
5.1. Posologie.....	9
5.2. Indications thérapeutiques.....	9
6. Effets indésirables.....	9
7. Interactions médicamenteuses.....	9
8. Contre-indications.....	10
9. Toxicité.....	10
9.1. Dose toxique.....	10
9.2. Toxicocinétique.....	10

## Table des matières

---

9.3. Intoxication aiguë.....	10
9.4. Intoxication chronique.....	11
<b>Chapitre II : Validation analytique</b>	
1. Généralités.....	12
1.1. Cycle de vie d'une méthode d'analyse.....	12
1.2. Aspect réglementaire et normatif de la validation analytique.....	13
2. Validation.....	13
2.1. Définition.....	13
2.2. Objectif de la validation.....	14
2.3. Différents types de procédures analytiques à valider.....	14
2.4. Critères de validation.....	15
2.4.1. Spécificité/sélectivité.....	16
2.4.2. Exactitude et justesse.....	16
2.4.3. Fidélité.....	16
2.4.3.1. Répétabilité.....	16
2.4.3.2. Fidélité intermédiaire.....	17
2.4.3.3. Reproductibilité.....	17
2.4.4. Fonction de réponse .....	17
2.4.5. Linéarité .....	18
2.4.6. Limite de détection .....	18
2.4.7. Limites de quantification.....	18
2.4.8. Profil d'exactitude.....	18
2.4.9. Intervalle de dosage.....	18
2.4.10. Intervalle de tolérance.....	18
2.4.11. Intervalle d'acceptabilité.....	19
2.4.12. Robustesse.....	19
2.5. Critères de choix de la validation.....	19
2.6. Choix du protocole de validation.....	19
2.7. Étapes de validation.....	21

## Table des matières

---

3. Étude statistique.....	22
3.1. Spécificité.....	22
3.2. Fonction de réponse.....	23
3.3. Alignement des observations.....	24
3.4. Prédications inverses.....	25
3.5. Calcul de la justesse et de la fidélité.....	26
3.5.1. Modèle.....	26
3.5.2. Justesse.....	28
3.5.3. Fidélité.....	28
3.6. Calcul de l'exactitude.....	28
3.6.1. Erreur totale et profil de l'erreur totale.....	29
3.7. Calcul de l'intervalle de tolérance.....	30
3.8. Profil d'exactitude et décision.....	31
3.8.1. Calcul du profil d'exactitude.....	31
3.8.2. Choix de la fonction de réponse.....	31
3.9. Linéarité.....	31
3.10. Limites de quantification.....	32

### Chapitre III : Suivi thérapeutique et dosage biologique des médicaments

1. Caractéristiques des médicaments nécessitant un dosage biologique.....	33
1.1. Analytiques.....	33
1.2. Pharmacocinétiques.....	33
1.3. Pharmacodynamiques.....	33
1.4. Cliniques.....	33
2. Nature du milieu biologique et mode de prélèvement de l'échantillon.....	34
3. Techniques d'extraction.....	34
3.1. Précipitation des protéines.....	34
3.2. Extraction liquide-liquide.....	34
3.3. Extraction liquide-solide.....	34
4. Techniques de dosage utilisées en bioanalyse.....	35

## Table des matières

---

5. Choix de la technique de dosage.....	35
6. Interprétation des résultats.....	36
7. Le cout du suivi thérapeutique.....	37
8. Procédure de validation.....	38
8.1. Effet matrice.....	39
8.1.1. Définition.....	39
8.1.2. Causes.....	39
8.1.3. Évaluation.....	39
8.1.3.1. Méthode d'addition post-extraction.....	40
8.1.3.2. Méthode d'infusion post-colonne.....	40
8.1.4. Stratégies pour éliminer/compenser l'effet matrice.....	41
8.1.5. Choix de l'étalon interne.....	41

### Partie pratique

1. Matériel et méthodes.....	42
1.1. Matériel.....	42
1.1.1. Appareillage.....	42
1.1.2. Verreries et autres.....	43
1.1.3. Matières premières.....	43
1.1.4. Réactifs.....	44
1.1.5. Matrice.....	44
1.2. Méthode.....	45
1.2.1. Méthodologie de la validation analytique.....	45
1.2.2. Choix du protocole de validation.....	45
1.2.3. Choix des paramètres de validation.....	46
1.2.3.1. Domaine d'application et les niveaux de concentration.....	46
1.2.3.2. Limites d'acceptabilité ( $\lambda$ ).....	46
1.2.3.3. Probabilité de confiance ( $\beta$ ).....	46
1.2.3.4. Risque d'erreur accepté ( $\alpha$ ).....	46

## Table des matières

---

1.2.4. Conditions expérimentales.....	46
1.2.4.1. Le choix du diluant.....	46
1.2.4.2. Préparation des solutions.....	47
1.2.4.2.1. Préparation du diluant.....	47
1.2.4.2.2. Préparation de l'étalon interne (caféine).....	47
1.2.4.2.3. Préparation de la matrice .....	47
1.2.4.2.4. Préparation de la phase mobile.....	47
1.2.4.2.5. Préparation des standards d'étalonnage.....	47
1.2.4.2.6. Préparation des standards de validation.....	48
1.2.5. Conditions chromatographiques.....	49
2. Résultats.....	50
2.1. Chromatogrammes obtenus du dosage simultané des deux principes actifs.....	50
2.1.1. Temps de rétention obtenus.....	50
2.1.2. Calcul de la résolution.....	50
2.2. Informations concernant les données brutes.....	52
2.3. Spécificité et effet matrice.....	52
2.3.1. Comparaison des chromatogrammes.....	52
2.3.2. Etude statistique.....	56
2.4. Fonction de réponse.....	58
2.4.1. 1er modèle : Droite : $y = ax + b$ .....	58
2.4.2. 2ème modèle : Droite passant par 0 : $y = ax$ (niveau 120%).....	60
2.4.3. 3ème modèle : Fonction Logarithmique : $\ln y/ye_i = f(\ln x/x_{e_i})$ .....	62
2.4.4. 4ème modèle : Changement de variables par la racine carrée : $\sqrt{y}/ye_i = f(\sqrt{x}/x_{e_i})$ .....	64
2.5. Profils d'exactitude obtenus.....	66
2.5.1. Paracétamol.....	66
2.6. Choix de la fonction de réponse.....	67
2.7. Alignement des observations.....	68
2.8. Prédiction inverses.....	70
2.9. Justesse.....	71

## Table des matières

---

2.10. Fidélité.....	71
2.11. Exactitude.....	72
2.12. Erreur totale et profil d'erreur totale.....	74
2.13. Intervalle de tolérance.....	75
2.14. Profil d'exactitude.....	75
2.15. Linéarité.....	76
2.16. Limites de quantification.....	77
3. Discussion.....	78
3.1. Résolution.....	78
3.2. Spécificité et effet matrice.....	78
3.2.1. Comparaison des chromatogrammes.....	78
3.2.2. Comparaison des deux pentes $a_1$ et $a_2$ , et des deux ordonnées à l'origine $b_1$ et $b_2$ .....	78
3.3. Choix de la fonction de réponse.....	79
3.4. Justesse.....	79
3.5. Fidélité.....	79
3.6. Erreur totale.....	79
3.7. Profil d'exactitude.....	79
3.8. Limites de quantification et intervalle de dosage.....	80
3.9. Linéarité.....	80
Conclusion.....	81
Références bibliographiques	
Annexes	
Résumé	
Abstract	

## Liste des abréviations

---

- **DCI** : Dénomination Commune Internationale
- **IUPAC** : International Union of Pure and Applied Chemistry
- **COX** : Cyclo-oxygénase
- **PGE2** : Prostaglandine E2
- **PGH2** : Prostaglandine H2
- **UDP-Glucoronyltransférase** : Uridine diphosphate Glucoronyltransférase
- **NAPQI** : N-acétyl-p-benzoquinone imine
- **SULT** : Sulfotransférase
- **CYP** : Cytochrome
- **pH** : Potentiel d'hydrogène
- **IDR** : Intradermoréaction
- **TAB** : Vaccin anti-typhoparatyphoïdique A et B
- **INR** : International Normalized Ratio
- **AINS** : Anti-Inflammatoire Non Stéroïdien
- **ISO** : International Organization of Standardization
- **ICH** : International Conference of Harmonization
- **FDA** : Food and Drug Administration
- **EMA** : European Medicines Agency
- **SFSTP** : Société Française des Sciences Techniques et Pharmaceutiques
- **STP** : Sciences et Techniques Pharmaceutiques
- **BPF** : Bonnes Pratiques de Fabrication
- **LLOQ** : Lower Limit Of Quantification
- **SE** : Standard d'Etalonnage

## Liste des abréviations

---

- **SV** : Standard de Validation
- **TDM** : Therapeutic drug monitoring
- **HPLC** : High Performance Liquid Chromatography
- **UV** : Ultra-Violet
- **RIA** : Radio ImmunoAssay
- **IRMA** : Immunoradiometric Assay
- **ELISA** : Enzyme-Linked Immunosorbent Assay
- **EIA** : Enzyme ImmunoAssay
- **Ag-Ac** : Antigène Anticorps
- **LC-MS** : Chromatographie Liquide-Spectrométrie de Masse
- **LC 2D** : Chromatographie Liquide deux Dimensions
- **MS** : Spectrométrie de Masse

## Liste des figures

---

<b>Figure 01</b> : Structure chimique du paracétamol.....	3
<b>Figure 02</b> : Représentation schématique de la pharmacocinétique du paracétamol.....	6
<b>Figure 03</b> : AM404 un métabolite du paracétamol.....	8
<b>Figure 04</b> : L'anandamide-un cannabinoïde.....	8
<b>Figure 05</b> : Cycle de vie d'une méthode analytique.....	12
<b>Figure 06</b> : Composantes croissantes de variabilité de répétabilité, de fidélité intermédiaire et de reproductibilité.....	17
<b>Figure 07</b> : Logigramme permettant de sélectionner un protocole de validation.....	20
<b>Figure 08</b> : Paramètre de performance d'une méthode d'analyse.....	29
<b>Figure 09</b> : Schéma général de la LC-MS-MS.....	35
<b>Figure 10</b> : Chromatogramme du Paracétamol et de la Caféine.....	50
<b>Figure 11</b> : Détermination des largeurs des pics à la base et des temps de rétention à partir du chromatogramme du standard de validation.....	51
<b>Figure 12</b> : Chromatogramme du diluant seul.....	52
<b>Figure 13</b> : Chromatogramme du diluant avec la matrice seule.....	53
<b>Figure 14</b> : Chromatogramme du standard d'étalonnage du paracétamol.....	53
<b>Figure 15</b> : Chromatogramme du standard de validation du paracétamol.....	53
<b>Figure 16</b> : Chromatogramme du standard d'étalonnage de la caféine.....	54
<b>Figure 17</b> : Chromatogramme du standard de validation de la caféine.....	54
<b>Figure 18</b> : Courbe d'étalonnage du Paracétamol obtenue avec la fonction $y = ax + b$ (série1).....	59
<b>Figure 19</b> : Courbe d'étalonnage du Paracétamol obtenue avec la fonction $y = ax + b$ (série2).....	59
<b>Figure 20</b> : Courbe d'étalonnage du Paracétamol obtenue avec la fonction $y = ax + b$ (série3).....	60

## Liste des figures

---

<b>Figure 21</b> : Courbe d'étalonnage du Paracétamol obtenue avec la fonction $y = ax$ (Série 1).....	61
<b>Figure 22</b> : Courbe d'étalonnage du Paracétamol obtenue avec la fonction $y = ax$ (Série 2).....	61
<b>Figure 23</b> : Courbe d'étalonnage du Paracétamol obtenue avec la fonction $y = ax$ (Série 3).....	62
<b>Figure 24</b> : Courbe d'étalonnage du Paracétamol obtenue avec la fonction $\ln y = f(\ln x)$ (Série1).....	63
<b>Figure 25</b> : Courbe d'étalonnage du Paracétamol obtenue avec la fonction $\ln y = f(\ln x)$ (Série2).....	63
<b>Figure 26</b> : Courbe d'étalonnage du Paracétamol obtenue avec la fonction $\ln y = f(\ln x)$ (Série3).....	64
<b>Figure 27</b> : Courbe d'étalonnage du Paracétamol obtenue avec la fonction $\sqrt{y} = f(\sqrt{x})$ (série1).....	65
<b>Figure 28</b> : Courbe d'étalonnage du Paracétamol obtenue avec la fonction $\sqrt{y} = f(\sqrt{x})$ (série2).....	65
<b>Figure 29</b> : Courbe d'étalonnage du Paracétamol obtenue avec la fonction $\sqrt{y} = f(\sqrt{x})$ (série3).....	66
<b>Figure 30</b> : Profil d'erreur totale du Paracétamol.....	74
<b>Figure 31</b> : Profil d'exactitude du Paracétamol ( $\beta = 95\%$ et $\lambda = 5\%$ ).....	75
<b>Figure 32</b> : Droite de linéarité entre la concentration prédite en fonction de la concentration introduite du Paracétamol.....	76

## Liste des tableaux

---

<b>Tableau I</b> : Propriétés physicochimiques du paracétamol.....	4
<b>Tableau II</b> : Stades cliniques de l'intoxication aiguë au paracétamol.....	11
<b>Tableau III</b> : Résumé des critères de validation et type d'analyse.....	15
<b>Tableau IV</b> : Tableau comparatif de l'exactitude et justesse selon SFSTP et ICH.....	16
<b>Tableau V</b> : Choix du nombre de standards d'étalonnage et de validation en fonction du protocole choisi.....	21
<b>Tableau VI</b> : Exemples de fonction de réponses.....	24
<b>Tableau VII</b> : Règles d'alignement pour différentes fonctions de réponse.....	25
<b>Tableau VIII</b> : Équations de prédiction inverse selon le type de la fonction de réponse.....	26
<b>Tableau IX</b> : Tableau comparatif des techniques chromatographiques et immunologiques..	36
<b>Tableau X</b> : Critères typiques d'évaluation du rapport coût-efficacité du TDM.....	38
<b>Tableau XI</b> : Appareillage utilisé.....	42
<b>Tableau XII</b> : Verreries et autres matériels utilisés.....	43
<b>Tableau XIII</b> : Matières premières utilisées.....	43
<b>Tableau XIV</b> : Réactifs utilisés.....	44
<b>Tableau XV</b> : Tableau présentant le protocole de la préparation des standards d'étalonnage...48	48
<b>Tableau XVI</b> : Tableau présentant le protocole de la préparation des standards de validation..49	49
<b>Tableau XVII</b> : Conditions chromatographiques de la méthode de dosage.....	49
<b>Tableau XVIII</b> : Temps de rétention et largeur du pic à la base des deux PA.....	51
<b>Tableau XIX</b> : Résultats de la superposition des chromatogrammes.....	55
<b>Tableau XX</b> : Résultats obtenus de l'étude de la spécificité et de l'effet matrice : standards d'étalonnage du paracétamol.....	56
<b>Tableau XXI</b> : Résultats obtenus de l'étude de la spécificité et de l'effet matrice : standards de validation du Paracétamol.....	57

## Liste des tableaux

---

<b>Tableau XXII :</b> Comparaison des deux pentes et des deux ordonnées à l'origine du Paracétamol seul et du Paracétamol dans la matrice.....	57
<b>Tableau XXIII :</b> Paramètres d'étalonnage obtenus pour le Paracétamol seul avec la fonction $y = ax + b$ .....	58
<b>Tableau XXIV :</b> Paramètres d'étalonnage obtenus pour le Paracétamol seul avec la fonction $y = ax$ .....	60
<b>Tableau XXV :</b> Paramètres d'étalonnage obtenus pour le Paracétamol seul avec la fonction $\ln y / y e_i = f(\ln x / x e_i)$ .....	62
<b>Tableau XXVI :</b> Résultats du Paracétamol obtenus avec la fonction $\sqrt{y} / y e_i = f(\sqrt{x} / x e_i)$ (PA seul).....	64
<b>Tableau XXVII :</b> Profils d'exactitude obtenus pour le Paracétamol.....	66
<b>Tableau XXVIII :</b> Tableau d'alignement des réponses observées avec les trois séries de validation pour le Paracétamol.....	69
<b>Tableau XXIX :</b> Rapports de concentrations calculées par prédiction inverse pour le Paracétamol.....	70
<b>Tableau XXX :</b> Justesse calculée pour chaque niveau de concentration des standards de validation pour le Paracétamol.....	71
<b>Tableau XXXI :</b> Fidélité calculée pour chaque niveau de concentration des standards de validation pour le Paracétamol.....	72
<b>Tableau XXXII :</b> Résultats du calcul de l'exactitude relative pour le Paracétamol.....	73
<b>Tableau XXXIII :</b> Calcul de l'erreur totale pour chaque niveau de concentration des standards de validation du Paracétamol.....	74
<b>Tableau XXXIV :</b> Limites de tolérance du Paracétamol.....	75
<b>Tableau XXXV :</b> Evaluation statistique de la linéarité du Paracétamol.....	76
<b>Tableau XXXVI :</b> Signification des résultats des deux pentes et des deux ordonnées à l'origine entre elles pour le Paracétamol.....	78

# INTRODUCTION

# Introduction

---

Le paracétamol est un antalgique et antipyrétique utilisé en première intention dans la prise en charge de la douleur et de la fièvre.

En pharmacie, il est délivré sans ordonnance, ce qui fait de lui l'un des médicaments les plus consommés dans le monde.

Cet usage majoré n'est cependant pas sans danger, ce qui rend son dosage dans les milieux biologiques notamment dans les urines par des méthodes bioanalytiques, de plus en plus intéressant.

La bioanalyse occupe actuellement une place importante dans le domaine de la chimie analytique que ce soit pour le dosage des médicaments dans les milieux biologiques en vue des suivis thérapeutiques, ou pour l'analyse de molécules biologiques.

Des méthodes de bioanalyse ont été développées et améliorées ces dernières décennies en tenant compte de la particularité des milieux biologiques, cependant, ces méthodes doivent faire l'objet d'une validation analytique qui attesterait de leur fiabilité et de la reproductibilité de leurs résultats avant leur utilisation en routine.

Le thème de notre mémoire porte sur la mise au point et la validation d'une méthode analytique qui va nous permettre de doser le paracétamol dans les urines par HPLC selon les directives de la commission de la société française des sciences et techniques pharmaceutiques (SFSTP) suivant un protocole de validation harmonisé, publié dans la revue STP Pharma pratique en janvier 2006 qui repose sur le profil d'exactitude comme outil de décision.

Après l'introduction générale, notre mémoire se répartit en deux grandes parties :

- ✓ Une partie bibliographique qui porte sur la littérature, divisée en trois chapitres :
  - Chapitre I : Paracétamol ;
  - Chapitre II : Validation analytique ;
  - Chapitre III : Suivi thérapeutique et dosage biologique des médicaments.
- ✓ Une partie pratique qui résume le protocole expérimental, le matériel utilisé ainsi que la méthode suivie pour la réalisation de notre étude, et ce, au sein du laboratoire de chimie analytique du département de pharmacie de la faculté de médecine de Tizi-Ouzou.

## Objectifs

---

L'Objectif principal de notre étude est de mettre au point et valider une méthode de dosage du Paracétamol dans les urines par chromatographie liquide à haute performance (HPLC) afin de l'utiliser en routine.

**PARTIE**  
**BIBLIOGRAPHIQUE**

# CHAPITRE I

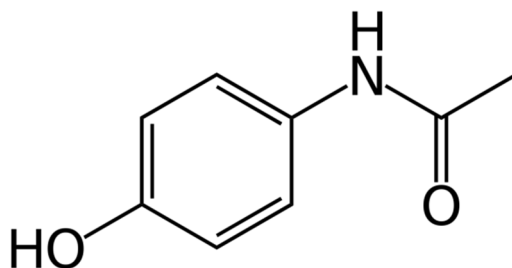
Par acétamol

Le paracétamol (ou *Acetaminophen*) est un antipyrétique et un antalgique de palier 1, largement prescrit et utilisé en automédication à travers le monde en raison de son excellent rapport bénéfice /risque et de son faible potentiel d'interactions médicamenteuses aux doses usuelles [1,2].

C'est un analgésique non morphinique. Il est indiqué pour traiter les douleurs d'intensité légère à modérée (de 1 à 3 sur une Echelle Visuelle Analogique (EVA) de la douleur), chroniques ou aiguës [3].

Le paracétamol a été synthétisé pour la première fois par *Morse*, en réduisant du *para-nitrophénol* en milieu acétique : c'est le *N-acétyl-para-nitrophénol*

Chimiquement, il s'agit de l'*hydroxy-l-acétamido-4-benzène* (abrégié NAPAP) [4].



**Figure 1** : Structure chimique du paracétamol [4].

## 1. Historique

En 1878, *Harmon Northrop Morse* synthétise une molécule appelée *acétylaminophénol*. Ce composé reconnu pour ses vertus antipyrétiques a été créé dans le but de substituer l'écorce de *Cinchona* très utilisée à l'époque, et qui devenait rare et chère [4].

Cependant, ce n'est que dans les années 1970 qu'ont été publiés les premiers rapports sur ses effets hépatotoxiques ainsi que les premiers cas de surdosage grave suivis de décès. Actuellement, le paracétamol s'impose comme chef de file des antalgiques-antipyrétiques. Sa consommation mondiale, tout d'abord concurrencée par l'aspirine, est largement supérieure de nos jours du fait de ses faibles effets indésirables à doses thérapeutiques et de son utilisation possible tout au long de grossesse [5].

## 2. Propriétés

### 2.1. Physicochimiques

#### 2.1.1. Aspect

Le paracétamol est une poudre cristalline blanche ou sensiblement blanche, inodore et de saveur amère [6].

#### 2.1.2. Solubilité

Le paracétamol est assez soluble dans l'eau, facilement soluble dans l'alcool et très peu soluble dans le chlorure de méthylène [6].

**Tableau I :** Propriétés physicochimiques du paracétamol [6].

DCI	Paracétamol
Formule chimique brute	$C_8H_9NO_2$
Nom chimique (IUPAC)	N-(4-hydroxyphényl) acétamide
Masse molaire	151,2 g/mol
Point de fusion	168 – 172 °C
Teneur	99,0 % à 101,0 %
Absorption dans l'ultra-violet (UV)	maximum d'absorption à 240 nm

### 2.2. Pharmacologiques

Le paracétamol est un antalgique de palier 1, selon la classification établie par l'organisation mondiale de la santé (OMS). Il possède aussi des propriétés antipyrétiques, mais contrairement à l'aspirine, il est dépourvu d'activité anti-inflammatoire [5].

#### - Action antalgique

Le paracétamol est un composé lipophile faiblement inhibiteur des cyclo-oxygénases qui traverserait facilement la barrière hémato-encéphalique. Son effet serait dû à une inhibition préférentielle de la COX au niveau central, et plus particulièrement d'une isoforme de COX-1 dénommée COX-3, mais son existence reste discutée [7].

**- Action antipyrétique**

De nombreuses études cliniques ont confirmé cette action antipyrétique. Une des hypothèses avancées pour expliquer ce mécanisme serait l'inhibition des cyclooxygénases, et plus particulièrement l'isoforme COX-2. En effet, l'augmentation de la concentration de la PGE2, dans le fluide cérébrospinal, suite à un agent pyrogène est diminuée lors de l'administration de paracétamol.

Cette hypothèse reste néanmoins controversée et la tendance actuelle des études tend à montrer un effet plutôt hypothermisant qu'antipyrétique [8].

**2.3. Pharmacocinétiques****❖ Absorption**

Par voie orale, le paracétamol est absorbé principalement au niveau de l'intestin grêle par diffusion passive avec une bonne biodisponibilité voisine de 80 %. Néanmoins, sa vitesse d'absorption est influencée par divers facteurs, ainsi elle peut être ralentie si la vidange gastrique est retardée notamment par le bol alimentaire ou une prise concomitante de médicaments ou en cas de régime alimentaire et de grossesse. [9]

**❖ Distribution**

Le paracétamol se distribue rapidement et uniformément dans la plupart des tissus et liquides et a un volume de distribution d'environ 0.9L/Kg.

Il traverse la barrière fœto-placentaire grâce à sa faible masse moléculaire et passe dans le lait. Toutefois, les quantités excrétées dans le lait sont inférieures à 2 % de la quantité ingérée, c'est pour cela que le paracétamol n'est pas déconseillé au cours de l'allaitement [10,11].

**❖ Métabolisme**

Le métabolisme du paracétamol a lieu principalement au niveau du foie et dépend essentiellement de la dose ingérée.

Chez l'adulte, aux doses thérapeutiques ; environs 90% de la fraction administrée subit une conjugaison par glucoronidation via l'UDP-glucoronyltransférase ( environ 40 à 67% ) et une sulfatation via le SULT1A1 et SULT1A3 ( environ 20 à 46% ) générant des métabolites hydrosolubles non toxiques excrétés dans les urines ; une proportion de 8 à 10 % sera quant à elle oxydée par le cytochrome P450 notamment l'isoforme CYP-2E1 et accessoirement les isoformes CYP-1A2 et CYP-3A4 donnant lieu à un intermédiaire électrophile hautement réactif et très toxique : le N-acétyl-p-benzo-quinone imine (NAPQI) [12].

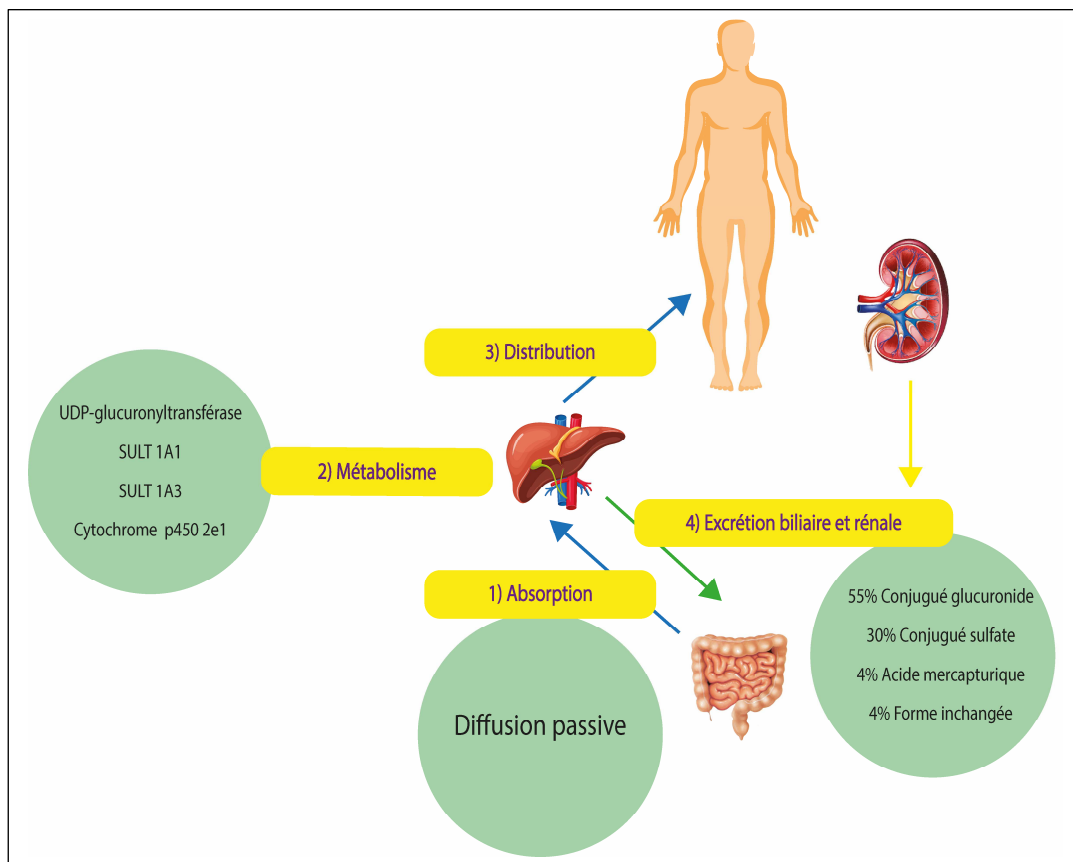
❖ **Elimination**

Chez le sujet sain, 85 à 95% de la dose thérapeutique est excrétée dans les urines dans les 24 heures suivant l'administration sous forme de métabolites ; et ce, selon différentes proportions. En effet ; environ 55 % sera excrété sous forme de conjugué glucuronide, 30 % sous forme de conjugué sulfate, 4% sous forme d'acide mercapturique, et enfin 4% sous forme de conjugué à la cystéine.

Une infime fraction d'environ 4% sera quant à elle excrétée sous forme de paracétamol inchangé.

La demi-vie plasmatique chez ce sujet varie de 1,9 à 2,5 heures et la clairance corporelle totale est de 4,5 à 5,5 ml / kg / min.

La demi-vie plasmatique est généralement normale chez les patients atteints d'une maladie hépatique chronique légère, mais elle est prolongée chez ceux atteints d'une maladie hépatique décompensée. Cette variabilité est due au fait que le métabolisme soit retardé lors des affections hépatiques [10,13].



**Figure 2** : Représentation schématique de la pharmacocinétique du paracétamol [14].

## **2.4. Pharmacodynamiques**

Malgré la caractérisation de la relation temps-concentration, une concentration plasmatique en un seul point fournit des informations limitées sur la relation entre la concentration et l'effet. C'est la concentration dans le compartiment de l'effet plutôt que dans le plasma qui est liée à l'effet.

Bien que la concentration dans le compartiment de l'effet puisse refléter la concentration plasmatique, cette concentration dans le compartiment d'effet est soumise à des délais ; la taille de l'organisme ; et la concentration maximale du compartiment d'effet est inférieure à la concentration plasmatique maximale après une dose [15].

## **3. Formes pharmaceutiques et voies d'administration**

### **3.1. Formes pharmaceutiques**

Le paracétamol seul est disponible sous de nombreuses formes galéniques : comprimé, suppositoire, sirop, poudre, lyophilisat, solution injectable, stick à avaler.

Il peut être associé à d'autres substances médicamenteuses, comme la caféine, la codéine et la poudre d'opium [16].

### **3.2. Voies d'administration**

Le paracétamol peut être administré principalement par :

- Voie orale qui est la plus courante des voies d'administration, car c'est la plus simple. Elle reste donc la voie de première intention, mais n'est pas toujours possible notamment chez les patients présentant des troubles de la déglutition, des troubles de la conscience ou des symptômes digestifs ;
- Voie intraveineuse qui permet même d'administrer d'autres traitements en même temps mais nécessite des patients avec un bon réseau veineux et le risque infectieux n'est pas négligeable ;
- Voie rectale qui est surtout utilisée en pédiatrie, mais récemment dans certaines études, elle est remise en cause du fait de la labilité des concentrations plasmatique.

Il peut être également administré par d'autres voies comme la voie intra-nasale, la voie sublinguale, la voie sous-cutanée et la voie intramusculaire [17].

#### 4. Mécanisme d'action

Plusieurs mécanismes ont été évoqués pour expliquer l'action du paracétamol, antalgique de palier I et antipyrétique. Les preuves actuelles indiquent une activité multisite dans le système nerveux central, impliquant [17,18] :

##### ❖ Inhibition de la synthèse des prostaglandines

Le paracétamol agit en inhibant au niveau central la production des prostaglandines, par le biais d'une action inhibitrice sur la prostaglandine H2 synthétase (PGHS) ; une enzyme responsable du métabolisme de l'acide arachidonique en PGH2 instable.

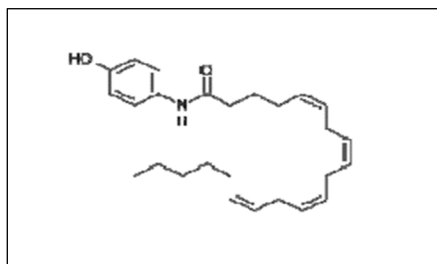
La PGHS comprend deux sites : un site cyclooxygénase (COX) et un site peroxydase (POX) sur lequel agit le paracétamol comme un cosubstrat réducteur [19].

##### ❖ Inhibition sélective de la COX-3

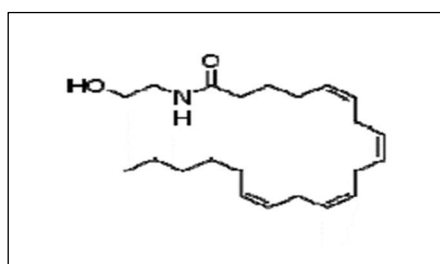
Le paracétamol inhibe les deux isoformes de la cyclo-oxygénase (COX) ; la COX-1 constitutive et la COX-2 inducible. En 2002, une variante de l'épissage de la COX-1, la COX-1b (appelée plus tard COX-3) a été clonée à partir du cortex cérébral canin. Il a été démontré que la COX-3 était sensible à l'inhibition par le paracétamol, mais sa signification chez l'homme est incertaine [20].

##### ❖ Une interaction avec les voies sérotoninergiques et cannabinoïdes

Les dernières études redéfinissent le paracétamol comme un précurseur métabolique à l'origine d'un dérivé lipidique actif, nommé AM404 (*l'acide gras N-arachidonolphénolamine amide*). Le mécanisme alors mis en jeu montre que le paracétamol, via l'AM404, activerait les récepteurs TRPV1 (*Transit Receptor Potential Vanilloid-1*) centraux et indirectement les récepteurs cannabinoïdes CB-1, il en résulte l'inhibition de l'absorption des cannabinoïdes endogènes (*Anandamide, Vanilloid*). Ceci renforce le mécanisme central d'atténuation de la douleur via les voies descendantes sérotoninergiques au niveau spinal [4,21].



**Figure 3:** AM404-un métabolite du paracétamol [4].



**Figure 4:** L'anandamide-un cannabinoïde [4].

## **5. Posologie et indications thérapeutiques**

### **5.1. Posologie**

Adulte et enfant ayant plus de 50 kg : 500 à 1 000 mg maximum par prise, une à trois fois par jour, sans dépasser 3 g par jour sans avis médical.

La dose maximale de 4 g par jour est à réserver dans les douleurs sévères de l'adulte et sur avis médical.

Enfant et nourrisson : 60 mg par kg par jour, à répartir en quatre prises, soit environ 15 mg par kg toutes les six heures sans dépasser quatre prises par jour [16].

La posologie maximale est de 80 mg/kg/jour chez l'enfant de moins de 38 kg selon les recommandations officielles françaises [14].

### **5.2. Indications thérapeutiques**

Le paracétamol est l'antalgique de choix prescrit par les médecins généralistes pour le traitement symptomatique des douleurs aiguës ou chroniques, d'intensité légère à modérée (céphalées, migraines, algies dentaires, arthrose, lombalgie aiguë ou chronique, douleurs postopératoires) et dans celui des états fébriles.

En cas de fièvre ou de douleur chez l'enfant, il est devenu le traitement de première intention [16].

L'Organisation Mondiale de la Santé recommande l'utilisation du paracétamol chez les enfants ayant une fièvre supérieure à 38,5°C [4].

## **6. Effets indésirables**

De rares cas d'hypersensibilité immédiate allergique au paracétamol avec IDR et TAB positifs et des troubles hématologiques voire neutropénie et thrombopénie ont été observés [22].

Un surdosage aigu peut conduire à une hépatotoxicité, voire une nécrose hépatique irréversible, néanmoins des effets indésirables hépatiques ont été rapportés également à des doses thérapeutiques [23].

## **7. Interactions médicamenteuses**

L'effet des anticoagulants oraux plus particulièrement la warfarine augmente en cas de leur prise simultanée avec le paracétamol à 4g/j pendant au moins quatre jours ; de ce fait le contrôle rapproché de l'INR avec une adaptation posologique éventuelle est très important pour prévenir le risque hémorragique [24].

Le paracétamol pourrait fausser le dosage de l'acide urique sanguin par la méthode à l'acide phosphotungstique ainsi que la glycémie par la méthode de la glucose oxydase-peroxydase [25].

L'association paracétamol - AINS est plus efficace sur la douleur que le paracétamol seul, quelle que soit sa voie d'administration, et elle réduit les besoins en morphine dans les suites d'interventions chirurgicales [14].

### **8. Contre-indications**

L'hypersensibilité au paracétamol et l'insuffisance hépatocellulaire sévère (allongement de la demi vie d'élimination) sont des contre-indications absolues [24].

### **9. Toxicité**

#### **9.1. Dose toxique**

Même si l'acétaminophène présente un bon profil de sécurité aux niveaux thérapeutiques, il peut provoquer une toxicité hépatique grave s'il est pris en grandes quantités [26].

#### **9.2. Toxicocinétique**

Le métabolisme se fait au niveau hépatique par glucuronidation et sulfuration ; en cas de surdosage, ces deux voies seront saturées et une très grande quantité d'acétaminophène est ensuite métabolisée par le cytochrome P450 en NAPQI ; une substance toxique qui est réduite à son tour par le glutathion en composés mercaptats et cystéines non toxiques qui sont ensuite excrétés par voie rénale.

Une surdose épuise les réserves de glutathion, et une fois qu'elles atteignent moins de 30 % de la normale, les niveaux de NAPQI augmentent et se lient aux macromolécules hépatiques provoquant une nécrose hépatique, ce phénomène est irréversible [26].

#### **9.3. Intoxication aigue**

L'intoxication aigue au paracétamol est due essentiellement soit à l'ingestion d'une dose unique supérieure ou égale à 1g/kg pour l'adulte et 150mg/kg pour l'enfant, soit à l'ingestion d'une dose unique supérieure à 4g avec un facteur de risque hépatique [27]

**Tableau II** : Stades cliniques de l'intoxication aiguë au paracétamol [28].

Stade I	0-24 heures, stade pré lésionnel, pauci symptomatique
Stade II	8-72 heures, hépatite aiguë toxique, altération biologique
Stade III	Du troisième au cinquième jour, paroxysme de l'atteinte hépatique, insuffisance hépato cellulaire aiguë, défaillance d'organe
Stade IV	De convalescence

#### 9.4. Intoxication chronique

La toxicité chronique du paracétamol au niveau hépatique pour des doses thérapeutiques et surtout supra-thérapeutique n'est pas totalement établie, cette toxicité reste sans doute très faible par rapport à la consommation généralisée de ce principe actif [29].

# CHAPITRE II

## Validation analytique

La validation d'une méthode d'analyse est une étape indispensable, permettant de garantir l'obtention d'un résultat aussi proche que possible de la valeur vraie de référence d'un échantillon [30].

**1. Généralités**

**1.1. Cycle de vie d'une méthode analytique**

Le protocole complet de validation peut se décomposer en 4 phases :

1. Une phase de sélection de la méthode d'analyse qui permet de définir les objectifs et les conditions opératoires initiales ;
2. Une phase de développement avec ou sans optimisation au moyen de plans d'expériences (optimisation robuste) ;
3. Une phase de validation globale avec des matériaux de référence connus ;
4. Une phase d'application en routine [31].

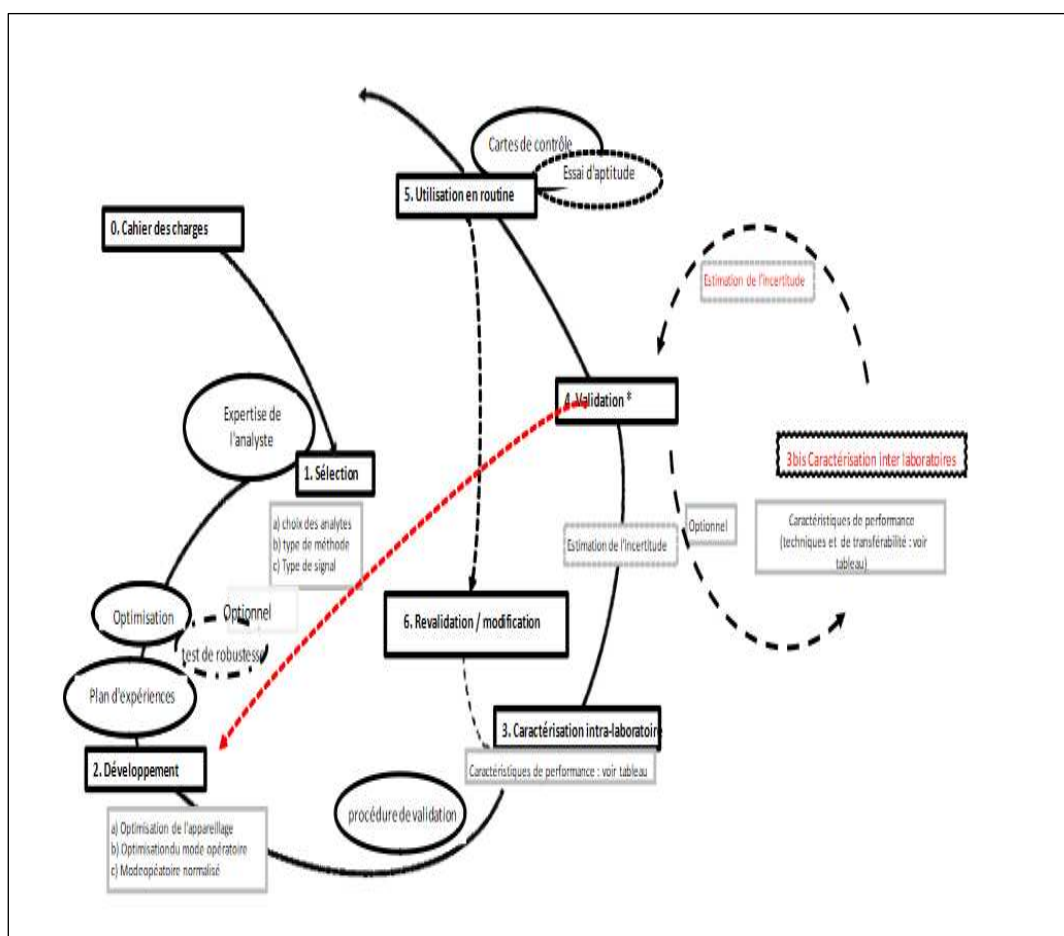


Figure 5 : Cycle de vie d'une méthode analytique [32].

**1.2. Aspect réglementaire et normatif de la validation analytique**

Les principaux référentiels du guide sont :

- Les documents ISO :
  - Les documents ISO 5725 (Afnor X06-041) : Application de la statistique – Exactitude (justesse et fidélité) des résultats et méthodes de mesure
  - Les document ISO 17025 : 2005 Exigences générales concernant la compétence des laboratoires d'étalonnages et d'essais
- Les documents ICH (Q2A & Q2B) :
  - ICH (Q2A): Text on validation of analytical procedures: Definitions and terminology
  - ICH (Q2B): Text on validation of analytical procedures: Methodology
- Les documents FDA (Guidance for Industry)
- La décision 2002/657/CEE (Sanco) de la Commission européenne
- Les documents des commissions SFSTP :
  - Le document SFSTP (1992)
  - Le document SFSTP (1997)
  - Une nouvelle commission SFSTP a rédigé un nouveau guide en 2003 et en 2006 afin de pallier aux faiblesses des précédents guides et assurer une harmonisation des démarches de la validation analytique :
    - Partie I : généralités, parues dans STP Pharma pratique en 2003 ;
    - Partie II : statistiques, parues dans STP Pharma pratique en 2006 ;
    - Partie III : exemples d'application parues dans STP Pharma pratique en 2006.
- Les articles relatifs à la Conférence de Washington (1990)
- L'Eurachem crée en 1989, est un réseau d'organismes européen travaillant dans le domaine de la chimie analytique. Ils participent notamment à la rédaction de guides concernant, les dosages en chimie, ainsi que les bonnes pratiques d'assurance qualité [32,33,34].

**2. Validation****2.1. Définition**

La validation analytique admet différentes définitions selon les divers documents :

- FDA : valider c'est d'établir à l'évidence, avec un degré de confiance élevée et sous une forme documentée, qu'un procédé déterminé permet d'obtenir un produit (ou service) qui atteint des spécifications définies à l'avance [35] ;

- BPF : la validation c'est l'établissement de la preuve, en conformité avec les principes de bonne pratique de fabrication ; que la mise en œuvre ou l'utilisation de tout processus, procédure, matériel, matière première, article de conditionnement ou produit, activité ou système permet réellement d'atteindre les résultats escomptés [36] ;
- Pour la norme ISO 17025 : elle définit la validation comme étant la confirmation par examen et fourniture de preuves réelles que les exigences particulièrement d'un usage projeté donné sont remplis [37].

## **2.2. Objectif de la validation**

La validation analytique a pour principal objectif de démontrer l'aptitude et la fiabilité d'une méthode vis-à-vis des exigences réglementaires et normatives en vigueur.

Elle permet de garantir que chaque mesure qui doit être réalisée en routine est comprise dans une limite d'acceptation appropriée au type de procédure analytique et au produit concerné. Il faut donc définir correctement à la fois les conditions et le but dans lesquels la méthode sera utilisée.

Les objectifs de la validation ne sont pas seulement d'obtenir une estimation de la justesse, du biais ou de la fidélité de la méthode, mais également d'évaluer le risque statistique lié à son utilisation, qui peut être exprimé par l'incertitude de mesure associée au résultat [38].

## **2.3. Différents types de procédures analytiques à valider**

- Procédure d'analyse quantitative : procédure d'analyse permettant de mesurer la quantité d'analyte présente dans l'échantillon pour laboratoire ;
- Procédure d'analyse de référence : procédure d'analyse reconnue par des experts (exemple : pharmacopée) ou prise comme référence par accord entre les parties, qui donne, ou est supposée donner, la valeur de référence acceptée de la grandeur de l'analyse à mesure ;
- Procédure d'analyse alternative : procédure d'analyse utilisée par le laboratoire à la place d'une procédure de référence. Elle permet d'analyser ou d'estimer, pour une catégorie de produits donnée, la même grandeur que celle qui est mesurée par la procédure de référence correspondante. Une procédure d'analyse alternative peut consister en une simplification de la procédure de référence [33].

## 2.4. Critères de validation

La validation analytique d'une méthode correspond à l'étude de plusieurs critères de validation, on cite notamment :

- Spécificité/sélectivité ;
- Exactitude et justesse ;
- Fidélité ;
- Linéarité ;
- Limite de détection ;
- Limite de quantification ;
- Fonction de réponse ;
- Intervalle de dosage ;
- Intervalle de tolérance ;
- Intervalle d'acceptabilité ;
- Robustesse [33].

**Tableau III** : Résumé des critères de validation et type d'analyse [39].

Type de procédure Caractéristique	Dosage	Impuretés		Identification	Dosage bioanalyse
		Quantitatif	Essais limites		
Justesse	✓	✓			✓
Fidélité Répétabilité	✓	✓			✓
Fidélité Fidélité intermédiaire	✓	✓			✓
Spécificité Sélectivité	✓	✓	✓		✓
Limite de détection		✓	✓	✓	✓
Limite de quantification		✓			✓
Linéarité	✓	✓			Fonction de réponse
Intervalle de réponse	✓	✓			✓
Robustesse	✓	✓	✓		✓

### 2.4.1. Spécificité/sélectivité

La spécificité d'une procédure analytique est sa capacité à établir de manière univoque l'existence de la substance à analyser en présence d'autres composants potentiellement présents [33].

### 2.4.2. Exactitude et justesse

**Tableau IV** : Tableau comparatif de l'exactitude et justesse selon SFSTP et ICH [40].

SFSTP 2003	ICH
<p><b>Justesse :</b> Étroitesse de l'accord entre la moyenne d'un nombre infini de valeurs mesurées répétées et une valeur de référence présents</p>	<p><b>L'exactitude (justesse) :</b> L'exactitude (ou justesse) sera déterminée par comparaison d'une valeur de concentration théorique avec la valeur expérimentale. En général exprimée sous forme de % de recouvrement. Cette évaluation devra être confirmée sur 9 préparations minimum (en général 3 préparations sur 3 niveaux) en recouvrant la gamme de validation.</p>
<p><b>Exactitude :</b> a) Étroitesse de l'accord entre une valeur mesurée et une valeur vraie du mesurande. b) Étroitesse de l'accord entre les valeurs mesurées qui sont attribuées au mesurande.</p>	

### 2.4.3. Fidélité

Étroitesse de l'accord entre les valeurs mesurées obtenues par des mesurages répétés du même objet ou d'objets similaires dans des conditions spécifiées.

Selon les conditions prescrites, on distingue : la répétabilité, la fidélité intermédiaire (intra-laboratoire) et la reproductibilité (inter-laboratoire) [32].

#### 2.4.3.1. Répétabilité

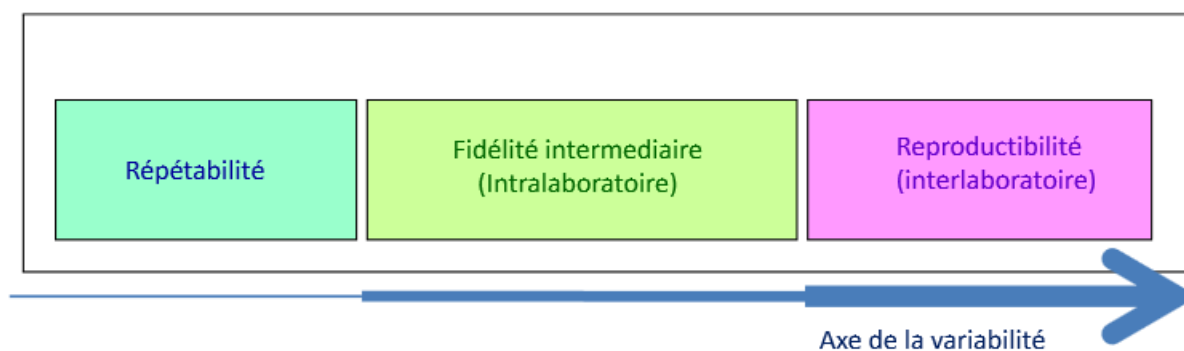
C'est l'étroitesse de l'accord, entre les résultats d'essais indépendants obtenus avec la même méthode, sur un même échantillon homogène, dans le même laboratoire, par le même opérateur utilisant le même matériel et dans un court intervalle de temps [41].

### 2.4.3.2. Fidélité intermédiaire

La fidélité intermédiaire (appelée reproductibilité intra-laboratoire en microbiologie des aliments) est estimée par la répétition des séries, afin de pouvoir quantifier la contribution de cette source d'erreur sur la variabilité totale (maximiser les sources de variations dans un même laboratoire, dont différents techniciens, pour effectuer les répétitions). Le nombre minimal de séries est de 3, quel que soit le nombre de niveaux étudiés [32].

### 2.4.3.3. Reproductibilité

La reproductibilité qui, à la différence de la répétabilité, considère les résultats obtenus avec une même méthode et sur un même échantillon homogène, mais dans des laboratoires différents et par différents opérateurs utilisant différents équipements. Des études collaboratives (encore appelées analyses inter-laboratoires ou circuits d'analyses) permettent d'évaluer cette reproductibilité. On donnera aussi parfois un sens restreint à cette notion de reproductibilité, en considérant par exemple, dans un même laboratoire, différents opérateurs utilisant le même matériel ... ou un même opérateur qui exécute la même analyse mais à des dates très éloignées les unes des autres [41].



**Figure 6 :** Composantes croissantes de variabilité de répétabilité, de fidélité intermédiaire et de reproductibilité [32].

### 2.4.4. Fonction de réponse

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 [42].

#### 2.4.5. Linéarité

Établissement qu'il existe une relation linéaire entre les quantités retrouvées (ou quantifiées) dans des échantillons et leurs valeurs de référence. La linéarité de la méthode ne doit pas être confondue avec la linéarité de la fonction de réponse de l'appareillage de mesure qui caractérise la seule réponse instrumentale lors de l'étalonnage et qui n'est pas indispensable pour obtenir une quantification exacte [40].

#### 2.4.6. Limite de détection

Valeur mesurée, obtenue par une procédure opératoire donnée, pour laquelle la probabilité de déclarer faussement l'absence d'un constituant dans un matériau est  $\beta$ , étant donnée la probabilité  $\alpha$  de déclarer faussement sa présence. La notation  $\beta$  utilisée dans cette définition représente un risque d'erreur (dit de seconde espèce) et ne doit pas être confondue avec la proportion  $\beta$  de la définition de l'intervalle de tolérance [40].

#### 2.4.7. Limites de quantification

Plus petite et/ou plus grande quantité de l'analyte dans un échantillon pouvant être dosée dans les conditions expérimentales décrites avec une exactitude définie. Elle correspond à la concentration la plus petite et/ou la plus grande du domaine de validité [33].

#### 2.4.8. Profil d'exactitude

Le profil d'exactitude comme outil de décision a été développé par une commission de la SFSTP (SFSTP 2003 et 2006), pour pallier aux faiblesses des guides de validation précédents. Il s'agit d'une combinaison, sous une forme graphique, d'un ou plusieurs intervalles de tolérance d'espérance  $\beta$  calculés à différents niveaux de concentration et d'un ou plusieurs intervalles d'acceptabilité [40].

#### 2.4.9. Intervalle de dosage

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 [43].

#### 2.4.10. Intervalle de tolérance

Intervalle qui contient en moyenne une proportion  $\beta$  définie de futurs mesurages obtenus selon un mode opératoire donné et pour une concentration donnée [40].

### 2.4.11. Intervalle d'acceptabilité

Spécification de la performance exigée pour la méthode, exprimée comme un écart acceptable autour de la valeur de référence. Les limites de l'intervalle sont fixées par le client ou par une obligation réglementaire, parfois en fonction du niveau de concentration. Elles sont notées  $\pm \lambda$  en valeurs absolues et dans l'unité du mesurande ou  $(1 \pm \lambda) \times 100$  en valeurs relatives [40]

### 2.4.12. Robustesse

La robustesse est la capacité de donner des résultats proches en présence de changements de conditions expérimentales susceptibles de se produire dans l'utilisation de la procédure.

Exemples de variation de conditions expérimentales dans les chromatographies en phase liquide :

- Variations du pH de la phase mobile ;
- Variations de la composition de la phase mobile ;
- Colonnes différentes (provenant de lots ou de fournisseurs différents) ;
- Température ;
- Débit [44].

## 2.5. Critères de choix de la validation

Chaque méthode d'analyse possède un certain nombre de propriétés caractéristiques, critères qui qualifient les performances de la méthode, on va les examiner et les hiérarchiser en fonction du problème posé, le premier objectif étant toujours d'obtenir une information pertinente au moindre coût.

On voit ainsi que le choix d'une méthode d'analyse constitue en tant que tel un problème analytique qu'il va falloir résoudre en empruntant la démarche de l'analyste, ce qui veut dire bien poser le problème au départ et le traduire en termes d'analyses qu'il faudra réaliser [41].

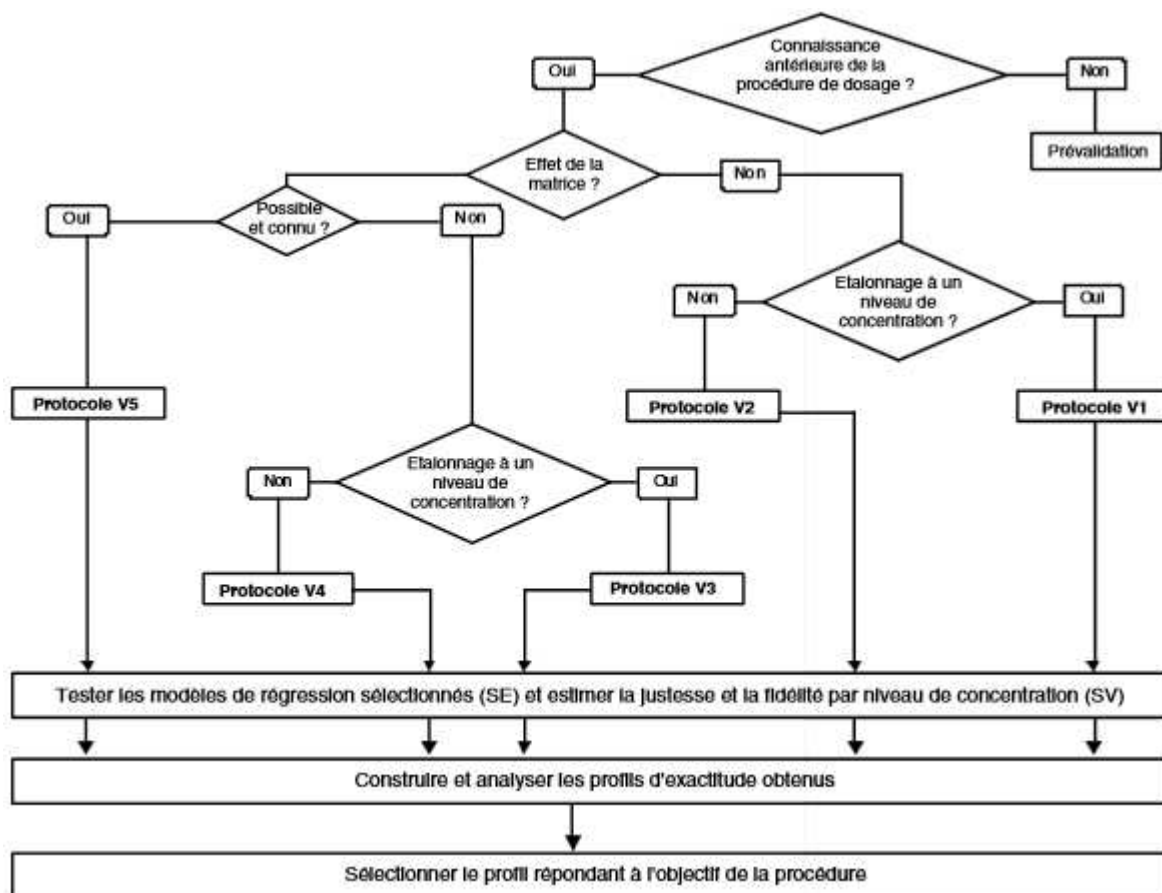
## 2.6. Choix du protocole de validation

L'ensemble des données de la phase de validation doit faire l'objet d'un rapport détaillé dans lequel tous les résultats obtenus doivent être documentés. Avant son exploitation en routine, la procédure d'analyse doit être complètement décrite sous forme d'un mode opératoire standardisé.

La validation d'une méthode d'analyse passe par différentes étapes qui visent à :

- Tester la normalité de la distribution des mesures ;
- Estimer les composantes de l'incertitude de mesure, fidélité, justesse, spécificité ;
- Définir des tests de contrôle de la non dégradation des performances de la méthode [40].

La figure 7 représente les démarches proposées dans le guide SFSTP 2003 pour sélectionner un protocole expérimental de validation en fonction des contraintes ou des spécificités liées à la procédure de dosage sous éprouve.



**Figure 7 :** Logigramme permettant de sélectionner un protocole de validation (SFSTP2003)  
SE : standard d'étalonnage SV : standard de validation [33].

Une phase de prévalidation est conseillée en absence d'informations pertinentes obtenues lors du développement ou d'une connaissance particulière de l'analyste sur les performances de la procédure.

En revanche, si ces informations sont disponibles, il est tout d'abord recommandé de s'interroger sur la présence ou l'absence d'un effet de la matrice, puis sur le niveau ou les niveaux de concentration qui seront utilisés en routine pour l'étalonnage. Selon les réponses, les protocoles seront préconisés.

Le tableau V représente les types de standards (SE et SV), les niveaux de concentration à utiliser et le nombre total d'essais à réaliser en fonction du protocole de validation choisi [33].

**Tableau V** : Choix du nombre de standards d'étalonnage et de validation en fonction du protocole choisi (SFSTP 2003) [33].

Standards	Niveaux de concentration	Protocole				
		V1	V2	V3	V4	V5
SE : Etalonnage Sans la matrice	<b>Bas</b>		2		2	
	<b>Médian</b>	2	2	2	2	
	<b>Haut</b>	2	2	2	2	
SE : Etalonnage avec matrice	<b>Bas</b>				2	2
	<b>Médian</b>			2	2	2
	<b>Haut</b>			2	2	2
	<b>Addit</b>					2
SV : Validation avec matrice	<b>Bas</b>	3	3	3	3	3
	<b>Médian</b>	3	3	3	3	3
	<b>Haut</b>	3	3	3	3	3
Nombre minimum de séries		3	3	3	3	3
Nombre total d'essais (min)		33	45	39	63	45

### 2.7. Étapes de la validation

Selon SFSTP 2003-2006, les différentes étapes des méthodes d'analyse utilisant le profil d'exactitude comme outil de décision sont :

1. Réalisation des expériences sur deux gammes :
  - Une gamme de standards d'étalonnage (échantillons de concentrations connues)
  - Une gamme de standards de validation (échantillons reconstitués dans la matrice) ;
2. Alignement des observations (si pour un niveau de concentration les quantités introduites ne sont pas identiques pour toutes les séries) ;
3. Sélection des limites d'acceptation en fonction des contraintes du secteur d'activité ;
4. Choix du modèle adéquat après génération de plusieurs modèles d'étalonnage ;
5. Calcul des concentrations en retour à partir du modèle sélectionné par prédiction inverse ;
6. Calcul de la justesse à chaque niveau de concentration ;
7. Calcul de la fidélité à chaque niveau de concentration ;

8. Calcul des intervalles de tolérance bilatéraux pour chaque niveau de concentration ;
9. Etablissement du profil d'exactitude ;
10. Interprétation et décision de la validité de la méthode ou non [40].

### 3. Étude statistique

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. Donc, elle a pour but de démontrer qu'elles correspondent à l'utilisation pour laquelle elles sont proposées [43].

#### 3.1. Spécificité

La spécificité de la méthode de dosage est étudiée de deux manières :

- Par comparaison des chromatogrammes obtenus à partir d'une solution de blanc, d'une solution de standard d'étalonnage, et d'une solution de standard de validation.

De plus, la superposition spectrale des pics de marqueur des chromatogrammes obtenus à partir des standards d'étalonnage et de validation est effectuée [38].

- Par Soit par la comparaison de la droite obtenue avec la matrice (forme reconstituée) avec celle obtenue à partir de la gamme standard. Ceci tend à démontrer l'absence d'effet matrice (absence d'interactions entre le milieu et la substance à quantifier) [45].

La comparaison de ces droites est basée sur le test t de student.

#### Test t de Student

$$t \text{ calculé} = \frac{|a_1 - a_2|}{\sqrt{\sigma_1^2 + \sigma_2^2}}$$

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

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

Avec :

- $a_1$  et  $a_2$  : pentes respectives des droites de régression D1 (obtenue à partir de la gamme standard) et D2 (obtenue à partir de la gamme placebo chargé).
- $\sigma_1^2$  et  $\sigma_2^2$  : variances respectives des pentes  $a_1$  et  $a_2$ .
- $\alpha$ : risque d'erreur accepté (5%).

-  $n_1$  et  $n_2$  : nombre d'échantillon réalisé pour la forme standard et la forme placebo chargé.

-  $n_1+n_2-4$  : degré de liberté (ddl).

Si les pentes sur standard et sur la forme reconstituée sont comparables, leur différence ne doit pas être différente de zéro. Ceci revient donc à comparer une valeur observée ( $a_1 - a_2$ ) à une valeur théorique (zéro) connaissant l'erreur totale (l'écart type) faite sur  $a_1$  et  $a_2$ .

La spécificité de la méthode est confirmée par :

- L'absence de pic au temps de rétention du pic de marqueur dans le chromatogramme obtenu avec le solvant de dilution ;

- Les temps de rétention du pic de marqueur pour le standard d'étalonnage et le standard de validation sont comparables [45].

### 3.2. Fonction de réponse

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

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

Avec  $\varepsilon$ , l'erreur résiduelle associée à la fonction de réponse. Cette fonction n'est pas nécessairement linéaire mais elle doit être strictement monotone (strictement croissante ou décroissante) sur l'intervalle de dosage envisagé.

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

Deux familles de fonctions se dégagent de cet ensemble : les fonctions dites linéaires en leurs paramètres et les fonctions non linéaires. Une fonction est dite linéaire si elle est une combinaison linéaire de ses paramètres. On peut noter que la fonction quadratique, bien que sa représentation graphique ne soit pas droite, est effectivement linéaire en ses paramètres.

Si ce n'est pas le cas, comme dans le cas des fonctions logistiques, la fonction est dite non linéaire en ses paramètres. La façon d'ajuster ces fonctions de réponse dépend de cette distinction [46].

La procédure SFSTP 2003-2006 propose d'appliquer le concept de « fitness-for purpose » pour choisir la fonction de réponse la mieux adaptée pour la courbe d'étalonnage, et ainsi avoir un

modèle d'étalonnage permettant de minimiser  $\varepsilon$  et donc de calculer les concentrations prédites les plus correctes possibles [47].

Le type de la méthode (méthode physicochimique, bioanalytique, immunodosage) est un critère de choix. Par exemple, dans le cas des méthodes bio-analytiques, la fonction quadratique pourra être recommandée.

Le Tableau VI illustre quelques exemples des différentes fonctions de réponse pouvant être envisagées lors de la validation d'une méthode analytique [46].

**Tableau VI** : Exemples de fonction de réponses [46].

Type	Equation	Paramètres	Linéarité
Droite passant par l'origine	$Y=\beta X$	$\beta$	OUI
Droite	$Y=\alpha+\beta X$	$\beta, \alpha$	OUI
Fonction quadratique	$Y=\alpha+\beta X+\gamma X^2$	$\beta, \alpha, \gamma$	OUI
Fonction logistique à 4 paramètres	$Y=\alpha + \frac{\delta-\alpha}{1+(X/\gamma)^\beta}$	$\beta, \alpha, \gamma, \sigma$	NON
Fonction logistique à 5 paramètres	$Y=\alpha + \frac{\delta-\alpha}{[1+(X/\gamma)^\beta]^\psi}$	$\beta, \alpha, \gamma, \sigma, \psi$	NON

### 3.3. Alignement des observations

Si, pour un niveau de concentration, les quantités introduites ne sont pas identiques pour toutes les séries (souvent pour de raisons de pesées qui doivent être indépendantes), il est indispensable de procéder à un alignement sur la concentration moyenne dès lors qu'un calcul de variance doit être effectué (estimation de la répétabilité et de la fidélité intermédiaire). Cela consiste à transformer les réponses observées ( $y_{ijk} \rightarrow y_{ijk,c}$ ) afin de les aligner sur cette concentration moyenne.

Cet alignement s'effectue par interpolation en ajoutant à la réponse observée la différence entre la valeur de la fonction de réponse considérée à la concentration moyenne et la valeur de cette fonction à la concentration introduite.

En validation, l'alignement s'applique aux réponses obtenues avec les échantillons de validation en utilisant les équations ou fonction de réponses obtenues avec les standards

d'étalonnage. Ainsi l'alignement des  $n_{ij}$  répétitions du niveau de concentration  $j$  de la série  $i$  s'effectue comme suit :

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

En résumé, le tableau VII représente les règles d'alignements pour les différentes fonctions de réponse [46].

**Tableau VII** : Règles d'alignement pour différentes fonctions de réponse [46].

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

### 3.4. Prédiction inverse

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

$$\hat{x} = z = f^{-1}(Y)$$

La fonction inverse est appelée équation de prédiction inverse et les valeurs  $Z$  ainsi obtenues sont appelées concentrations retrouvées.

Le tableau VIII fournit ces équations selon la fonction de réponse choisie [40].

Tableau VIII : Équations de prédiction inverse selon le type de la fonction de réponse [40].

Fonction de réponse	Fonction inverse de calcul de la concentration retrouvée
Droite passant par l'origine	$Z = \frac{Y}{\alpha_1}$
Droite	$Z = \frac{Y - \alpha_0}{\alpha_1}$
Fonction quadratique	$Z = \frac{-\alpha_1 + \sqrt{\alpha_1^2 - 4\alpha_2(\alpha_0 - Y)}}{2\alpha_2}$
Logistique à 4 paramètres	$Z = \frac{\alpha_2}{\left(\frac{\alpha_3 - \alpha_0}{Y - \alpha_0} - 1\right)^{\frac{1}{\alpha_1}}}$

### 3.5. Calcul de la justesse et de la fidélité [46]

#### 3.5.1. Modèle

La justesse d'une méthode analytique (par opposition à celle d'un résultat) exprime l'étroitesse de l'accord entre la moyenne (par opposition à celle d'une observation unique) des résultats d'essai avec la méthode et la valeur de référence acceptée, aussi appelée valeur conventionnellement vraie.

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

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

Où :

- $X_{ijk}$  est la  $k$ -ième concentration calculée du niveau  $j$  de la  $i$ -ème série ;
- $\mu_j$  est la moyenne des concentrations calculées du niveau de concentration  $j$  ;
- $\alpha_{ij}$  est au niveau  $j$  l'écart entre la moyenne de la  $i$ -ème série et la moyenne  $\mu_j$ ,  $\alpha_{ij}$  est considéré comme une variable aléatoire ayant une distribution normale de moyenne 0  $\sigma^2_{B,j}$  et de variance  $\sigma^2_{B,j}$  ;

-  $\varepsilon_{ijk}$  est l'erreur expérimentale, considérée comme une variable aléatoire ayant une distribution normale de moyenne 0 et de variance  $\sigma^2_{w,j}$ .

L'erreur expérimentale est supposée indépendante de la série.

Les variances  $\sigma^2_{B,j}$  et  $\sigma^2_{w,j}$  représentent les variances inter-série et intra-série respectivement. La méthode du maximum de vraisemblance restreint est utilisée pour estimer à chaque niveau de concentration j les paramètres  $\mu_j$ ,  $\sigma^2_{B,j}$  et  $\sigma^2_{w,j}$  du modèle.

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

$$MSM_j = \frac{1}{p-1} \sum_{i=1}^p n_j (x_{ij, calc} - x_{j, calc})^2$$

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

Où :

- MSM e MSE : maximum des vraisemblances pour chaque niveau de concentration j ;
- $x_{ij, calc}$  : moyenne de concentrations calculées du niveau j de la série i ;
- $x_{j, calc}$  : moyenne des concentrations calculées du j ;
- $x_{ijk, calc}$  : concentration calculée du niveau j de la série i répétition k ;
- n : nombre de répétitions ;
- p : nombre de séries.

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

Si :  $MSE_j < MSM_j$

Alors :  $\sigma^2_{w,j} = MSE_j$

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

### 3.5.2. Justesse

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

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

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

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

Où :

- $\mu_j$  : moyenne des concentrations calculées du niveau j ;
- $x_j$  : moyenne des concentrations introduites du niveau j.

### 3.5.3. Fidélité

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

$$\text{Répétabilité} : \hat{\sigma}^2 Re_j = \hat{\sigma}^2 w_j$$

$$\text{Fidélité intermédiaire} : \hat{\sigma}^2 ip_j = \hat{\sigma}^2 w_j + \hat{\sigma}^2_{Bj}$$

### 3.6. Calcul de l'exactitude

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

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

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

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

L'erreur maximale relative observée pour chaque modèle sur l'ensemble des séries montre l'impact du choix de la fonction de réponse sur l'exactitude des résultats [32,46].

### 3.6.1. Erreur totale et profil de l'erreur totale

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

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

⇕

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

⇕

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

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

C'est la caractéristique de performance majeure à étudier dans une approche globale.

L'erreur totale observée avec chaque modèle et pour chaque niveau de concentrations est étroitement liée avec les erreurs maximales observées correspondantes [46].

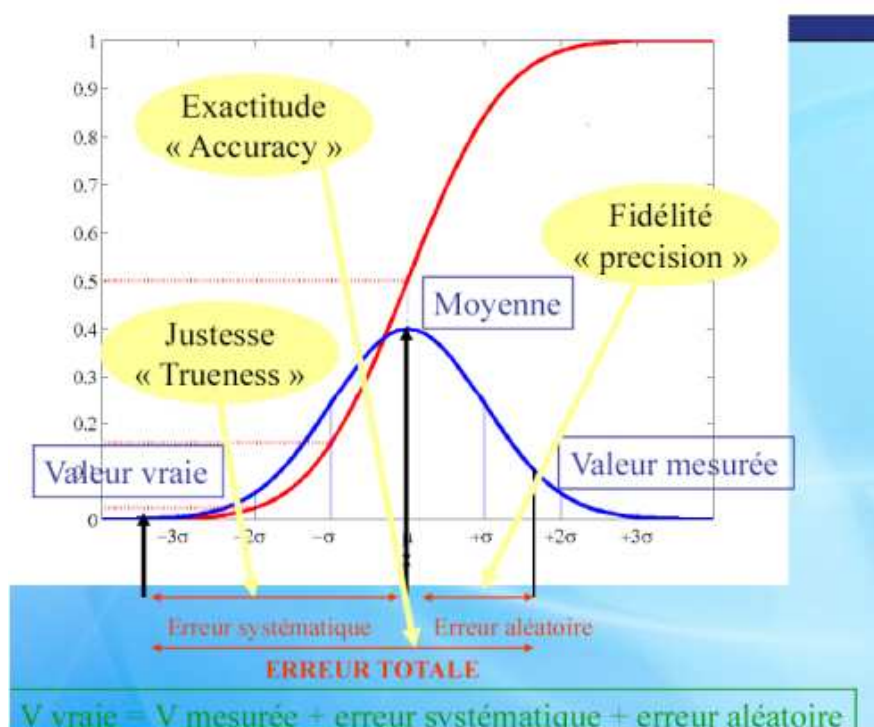


Figure 8 : Paramètre de performance d'une méthode d'analyse [43].

### 3.7. Calcul de l'intervalle de tolérance

Ce qui nous importe cependant en validation, ce n'est pas la validité des résultats obtenus que nous obtenions avec l'erreur totale, mais plutôt la garantie ou une représentation de ce que la même procédure analytique pourra donner comme résultats dans le futur, C'est le rôle de l'intervalle de tolérance. L'estimation des paramètres de justesse et fidélité  $\mu_j$ ,  $\hat{\sigma}_{B,j}^2$ ,  $\hat{\sigma}_{W,j}^2$ , et à chaque niveau de concentration j n'est pas une fin en soi, mais une étape indispensable pour calculer la proportion attendue de résultats qui se situent dans les limites d'acceptation prédéfinies  $[-\lambda, \lambda]$ , c'est-à-dire :

$$E_{\hat{\mu}_M, \hat{\sigma}_M} = \{ |X - \mu_T| < \lambda \mid \hat{\mu}_M, \hat{\sigma}_M \} \geq \beta$$

L'intervalle de tolérance sera calculé pour chaque niveau de concentration envisagé avec les standards de validation et pour chaque modèle mathématique. Pratiquement, l'intervalle de tolérance se calcule comme suit en valeur absolue :

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

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

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

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

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

Avec :

- $Q_t\left(v; \frac{1+\beta}{2}\right)$  est le quantile  $\beta$  de la distribution t de Student à v degrés de liberté ;
- n est le nombre de répétitions ;
- p est le nombre de séries.

Le même intervalle en échelle relative devient :

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

Deux termes sont contenus dans l'intervalle de tolérance : l'un étant la justesse et l'autre étant, à un facteur près, le coefficient de variation de fidélité intermédiaire. C'est la raison pour laquelle cet intervalle peut ainsi être considéré comme une expression de l'exactitude des résultats. Mais l'intervalle de tolérance intègre une dimension supplémentaire, celle de chance (ou risque) pour des résultats futurs, conditionnellement à des résultats passés. La méthode peut dès lors être considérée comme exacte au niveau de chance  $\beta$  pour le niveau de concentration en question, si l'intervalle de tolérance est inclus dans les limites  $[-\gamma, \gamma]$  définies a priori en fonction des objectifs de la méthode [46].

### 3.8. Profil d'exactitude [46]

#### 3.8.1. Calcul

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

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

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

#### 3.8.2. Choix de la fonction de réponse

L'utilisation de certaines fonctions ne permet pas à la procédure analytique d'atteindre ses objectifs vus que pour certaines concentrations, les limites de tolérance sortent des limites d'acceptation retenues. Par ailleurs, parmi les fonctions de réponse acceptables, on pourra remarquer que certaines fournissent les meilleurs résultats. On retiendra ces dernières.

### 3.9. Linéarité

La linéarité d'une procédure d'analyse est sa capacité à l'intérieur d'un certain intervalle de dosage d'obtenir des résultats directement proportionnels à la quantité (ex : concentration) en analyte dans l'échantillon. Rappelons que l'exigence de linéarité s'applique aux résultats (concentration calculée = f(concentration introduite)), pas aux réponses (signal = f(concentration introduite)). C'est un prérequis à l'estimation de la justesse. A l'inverse, l'existence d'une relation linéaire entre la concentration estimée et la concentration introduite n'implique pas que la méthode soit juste [46].

### 3.10. Limites de quantification

La limite de quantification d'une méthode est la concentration minimale qui peut être quantifiée à l'aide d'une méthode d'analyse avec une fiabilité définie [32].

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

Notons que si le modèle linéaire simple est choisi, alors les limites de quantification deviennent les valeurs de concentration extrêmes investiguées durant les expériences de validation [46].

# CHAPITRE III

Suivi thérapeutique et dosage  
biologique des médicaments

Le suivi thérapeutique pharmacologique consiste à mesurer la concentration sanguine d'un médicament afin de déterminer si une adaptation de posologie est nécessaire pour optimiser l'efficacité thérapeutique tout en minimisant le risque d'effets indésirables [48].

Garantir la haute qualité des méthodes bioanalytiques pour quantifier les médicaments et leurs métabolites est d'une importance critique. Pour pouvoir être utilisées ; ces méthodes doivent être caractérisées, validées, documentées afin d'assurer la fiabilité des données à l'appui des décisions réglementaires [49].

### 1. Caractéristiques des médicaments nécessitant un dosage biologique [50]

#### 1.1. Analytiques

Disponibilité d'une méthode de dosage appropriée à un cout supportable.

#### 1.2. Pharmacocinétiques

- Forte variabilité interindividuelle de la disposition du médicament dans l'organisme ;
- Paramètres pharmacocinétiques individuels peu visibles (variabilité intrinsèque ou facteurs confondants) ;
- Faible variabilité intra-individuelle de la disposition du médicament.

#### 1.3. Pharmacodynamiques

- Connaissances pharmacodynamiques adéquates sur le médicament ;
- Effet pharmacologique relié d'une manière consistante à la concentration sanguine ;
- Effet pharmacologique reproductible sur une période de temps étendue ;
- Une marge thérapeutique étroite
- Effets réversible en cas d'adaptation posologique.

#### 1.4. Cliniques

- Absence de marqueurs facilement mesurables pour le suivi (comme l'INR par exemple, marqueur adéquat pour l'anticoagulation orale) ;
- Intervalle thérapeutique établi et validé en clinique (concentration cible) ;
- Démonstration d'un meilleur suivi basé sur TDM plutôt que sur le seul jugement clinique ;
- Durée de la thérapie suffisante pour que les patients puissent bénéficier d'un programme de TDM.

Ces caractéristiques ne sont de loin pas toutes réunies pour les médicaments qu'il est possible de doser, et font même parfois défaut pour les médicaments qui sont actuellement l'objet d'un TDM régulier. De plus, les études contrôlées démontrant l'utilité clinique in fine de ces

dosages restent rares. On assiste toutefois à des développements significatifs dans ce domaine, qui autoriseront sans doute une utilisation plus rationnelle de cet outil.

### 2. Nature du milieu biologique et mode de prélèvement de l'échantillon

Tous les référentiels (FDA, Europe, ICH) préconisent de travailler sur des échantillons de plasma issu du sang global. Dans des cas particuliers et justifiés, des prélèvements urinaires peuvent être effectués [49].

### 3. Techniques d'extraction

Les matrices biologiques contiennent une multitude de composés endogènes (protéines dans le plasma, acides gras dans l'urine) souvent en concentrations bien plus fortes que les analytes ou leurs métabolites qui peuvent interférer avec les composés à doser, pour cela, diverses techniques de nettoyage des échantillons ont été développées [51].

#### 3.1. Précipitation des protéines

La précipitation des protéines est une technique qui rend la matrice sans interférences par dénaturation et précipitations de ces dernières, suivie généralement par une étape de centrifugation. L'acide trichloracétique et perchlorique sont les agents de précipitation les plus utilisés. En revanche, divers solvants organiques comme le méthanol, l'acétonitrile, l'acétone et l'éthanol sont largement utilisés pour éliminer les protéines plasmatiques et sont compatibles avec l'HPLC en tant que phase mobile [49,52].

#### 3.2. Extraction liquide-liquide

L'extraction liquide-liquide est basée sur le transfert de l'analyte de la phase aqueuse de l'échantillon vers la phase organique d'un solvant non miscible. Les solvants d'extraction appropriés jouent un rôle important dans cette étape. Elle a comme avantage l'élimination des substances ionisées et des sels non extractibles [49].

#### 3.3. Extraction liquide-solide

C'est une technique qui recueille une opinion très favorable, elle permet un nettoyage de l'échantillon et une préconcentration des analytes. L'extraction est basée sur un principe de partage entre une phase solide (cartouches, disques, microplaques) et une phase liquide (échantillon) par un procédé multi-étape (chargement, lavage(s), élution). La sélection de la phase solide sur des principes analogues à la chromatographie est l'étape clé. Elle conditionne la sélectivité, la capacité de charge, la faible consommation de solvants organiques et le bon taux de récupération [49].

Les techniques de changement de colonne et d'extraction liquide-liquide en ligne sont utiles pour la préparation automatisée des échantillons, leur enrichissement et leur analyse rapide. Des plaques hybrides de précipitation/SPE pour la déplétion sélective des phospholipides et des protéines précipitées sont maintenant disponibles et sont de plus en plus utilisées en raison de l'élimination très efficace des phospholipides des extraits par rapport à la précipitation des protéines [53].

### 4. Techniques de dosage utilisées en bioanalyse

De nombreux techniques analytiques sont utilisées, on cite :

- La chromatographie liquide à haute performance (HPLC) ;
- Chromatographie sur couche mince à haute performance (HPTLC) ;
- Méthodes spectrophotométriques-UV ;
- Techniques couplées tel que la chromatographie en phase gazeuse-chromatographie de masse, chromatographie liquide-résonance magnétique nucléaire et électrophorèse capillaire-spectrométrie de masse [54].

### 5. Choix de la technique de dosage

La chromatographie liquide-spectrométrie de masse-spectrométrie de masse (LC-MS-MS) est un outil qui peut être facilement appliquée pour le dosage de nombreux médicaments et produits pharmaceutiques. Elle est également utilisée pour l'analyse des impuretés et des produits de dégradation [54].

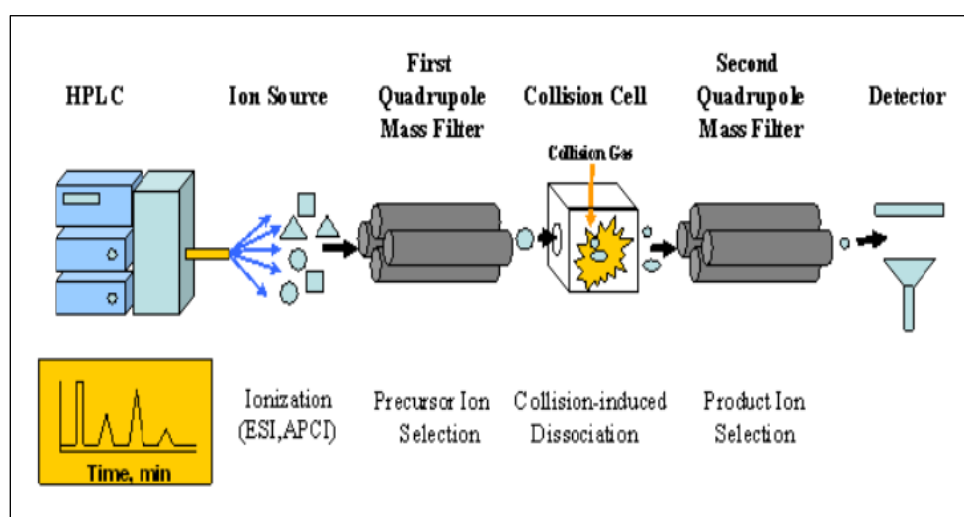


Figure 9 : Schéma général de la LC-MS-MS [49].

Malgré l'utilisation très large des techniques chromatographiques, les méthodes immunologiques (méthodes immuno-radiométriques (RIA, IRMA) et immuno-enzymatiques (ELISA, EIA) restent très utilisées pour certaines applications en bioanalyse supportant le développement de nouveaux composés [49].

**Tableau VIX :** Tableau comparatif des techniques chromatographiques et immunologiques [49].

	<b>CHROMATOGRAPHIE</b>	<b>IMMUNOANALYSE</b>
Principe	Propriétés physicochimiques de l'analyte	Réaction Ag-Ac
Réactifs	Bien caractérisés et disponibles	Unique et peu disponible
Analytes	Petites molécules	Petites et macromolécules
Traitement d'échantillon	OUI	NON
Etalon interne	OUI	NON
Fonction d'étalonnage	Linéaire	Non linéaire
Milieu réactionnel	Hydro-organiques	Aqueux
Durée du développement	Semaines	Mois (anticorps)
Précision inter-dosage	max 15% (ICH M <sub>10</sub> )	max 20% (ICH M <sub>10</sub> )
Domaine d'analyse	Important	Limité
Coût de l'équipement	Elevé	Peu élevé
Débit d'analyse	Bon	Excellent

### 6. Interprétation des résultats

Interpréter correctement une concentration du médicament implique de connaître la méthode utilisée. L'intervalle de référence étant souvent fonction de cette méthode. Pour le suivi d'un patient, il est important de conserver la même méthode analytique.

Après validation analytique du dosage, le praticien reçoit du laboratoire le résultat et les marges thérapeutiques correspondant à la méthode utilisée. Comme pour d'autres résultats de laboratoires spécialisés, une interprétation clinique se doit d'apporter une valeur ajoutée au praticien.

Le laboratoire des suivis thérapeutiques pharmacologiques ne peut pas se contenter de rendre un chiffre, c'est-à-dire une concentration sans interprétation. Cette dernière doit être fondée sur les données cliniques, le délai entre l'administration et le prélèvement, les zones thérapeutiques, la population à laquelle appartient le patient, ainsi que les performances et les limites des techniques analytiques employées.

Les données cliniques essentielles concernent l'indication pour laquelle le médicament est administré, les effets actuels du traitement, les pathologies associées ou l'état morbide et les données morphométriques essentielles, (taille, poids, sexe, âge) [55].

Dans le cas d'une intoxication au paracétamol et après la prise en charge thérapeutique, il faut surveiller :

- La tolérance du traitement par N-Acétyl-Cystéine : réactions anaphylactoïdes principalement pendant la dose de la charge, souvent liées à la vitesse d'administration ;
- Le bilan hépatique complet, taux de prothrombine, glycémie et créatininémie /12 [56].

### **7. Le cout du suivi thérapeutique**

Bien que la pratique du TDM soit largement répandue dans les pays développés, il y a lieu de se demander si ses bénéfices cliniques justifient véritablement les coûts engendrés. Cette vision correspond toutefois mal à la réalité reflétée par diverses études coût-efficacité réalisées ces dernières décennies.

La majorité de ces études se sont toutefois focalisées sur les aminoglycosides pour lesquels le TDM a clairement démontré un rapport coût-efficacité favorable. Au Centre hospitalier universitaire vaudois (CHUV), des surdités sévères étaient observées chez plus de 1% des prématurés avant l'implémentation d'une approche TDM, du fait notamment d'une surexposition aux aminoglycosides. Ces surdités, associées à des coûts médicaux et sociaux importants, sont maintenant évitées [50].

**Tableau X :** Critères typiques d'évaluation du rapport coût-efficacité du TDM [50].

Coût	Efficacité
<p><b>Structure</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- locaux et matériel de laboratoire ;</li> <li>- Personnel de laboratoire ;</li> <li>- Consultant impliqué dans l'interprétation ;</li> <li>- Système informatique ;</li> <li>- Frais administratif.</li> </ul> <p><b>Processus</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>-Prélèvement et données cliniques appropriées ;</li> <li>-Analyse chimique et validation ;</li> <li>-Interprétation du résultat et interprétation chimique ;</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Contrôle du processus morbide ;</li> <li>- Prévention d'effets indésirables ;</li> <li>- Temps de traitement ;</li> <li>- durée d'hospitalisation ;</li> <li>- Taux de mortalité.</li> </ul>

Une revue systématique récente de pharmaco-économie de l'Association internationale de TDM conclut que l'efficacité du TDM est fortement corrélée à la provision d'une interprétation pharmacocinétique qualifiée mais que l'on manque encore d'études sur de nombreuses classes de médicaments actuellement dosés. Les bénéfices encourageants observés en termes de réduction de morbidité et de mortalité imposent de combler ces lacunes et de développer la pratique du TDM de la façon la plus efficiente et cliniquement utile [50].

### 8. Procédure de validation

Les procédures de validation et les critères d'acceptation de l'analyse des échantillons ont été suivis conformément aux procédures opérationnelles standards de chaque laboratoire, qui étaient basées sur les directives acceptées au niveau international (FDA ou EMA) et les réglementations locales.

Les paramètres suivants ont été étudiés pendant la validation de la méthode pour toutes les méthodes : sélectivité matricielle inter-lots, linéarité, LLOQ, exactitude et précision intra-essai et inter-essai, effet de la matrice sur l'ionisation, intégrité de la dilution, transfert, stabilité

de la solution mère, stabilité du plasma (sur table, congélation-décongélation, stockage à long terme) et stabilité de l'extrait [53].

### 8.1. Effet matrice

Les effets de matrice sont une préoccupation majeure dans la bioanalyse car ils affectent de manière négative l'exactitude, la précision et la sensibilité d'une méthode. Par conséquent, la présence d'effets de matrice doit être soigneusement évaluée pendant le développement de la méthode afin d'obtenir des données analytiques fiables [57].

#### 8.1.1. Définition

L'effet matrice est défini comme l'effet de substances résiduelles de la matrice, co-éluées, sur l'ionisation de l'analyte d'intérêt. Les effets de matrice peuvent être observés comme une perte de réponse (suppression des ions) ou comme une augmentation de la réponse (augmentation des ions). Il dépend du type d'ionisation, du pré-traitement de l'échantillon et du type de matrice biologique (plasma, urine, salive) [51].

#### 8.1.2. Causes

Depuis que les effets de matrice ont été observés pour la première fois pour la spectrométrie de masse ESI dans les années 1990, plusieurs mécanismes ont été proposés.

Il s'agit notamment de composants de la matrice empêchant l'analyte d'accéder à la charge, entrant en compétition avec les analytes pour obtenir la charge, interférant avec la capacité de l'analyte à rester chargé dans la phase gazeuse, augmentant la tension de surface de la gouttelette ou augmentant la résistance électrique. Par conséquent, tout processus qui modifie l'efficacité de l'ionisation et qui se produit en phase liquide et en phase gazeuse, entraînera des effets de matrice. En outre, les composants de la matrice ou les additifs de la phase mobile qui agissent comme des réactifs d'appariement des ions réduisent généralement l'efficacité de l'ionisation et entraînent une faible réponse [57].

Dans l'urine, les interférences proviennent de composés hydrophiles et très souvent de sels inorganiques [51].

#### 8.1.3. Évaluation

L'évaluation des effets de matrice est explicitement suggérée dans les directives de la FDA américaine sur l'analyse bioanalytique. Il existe deux principaux protocoles pour évaluer l'effet de matrice [57].

### 8.1.3.1. Méthode d'addition post-extraction [57]

Dans cette méthode l'effet de matrice peut être évalué quantitativement en comparant la réponse de l'analyte dans la solution standard à celle d'un post-extraction dopé avec l'analyte à la même concentration. L'effet de matrice peut être calculé par la formule suivante :

$$\text{Effet matrice (EM)} = \frac{A-B}{A} 100$$

Où :

- A est la surface du pic d'un analyte dans une solution standard (dans des solvants purs) ;
- B est la surface du pic de l'analyte dans un échantillon, qui ne contient pas l'analyte et qui a subi une préparation d'échantillon et a ensuite été dopé avec l'analyte à la même concentration que la solution standard.

Si :

- EM ~0%, il n'y a pas d'effet de matrice ;
- EM > 0%, une suppression des ions se produit ;
- EM < 0%, une augmentation des ions se produit.

### 8.1.3.2. Méthode d'infusion post-colonne [57]

Le protocole de perfusion post-colonne est réalisé à l'aide d'un raccord en T intégré, d'une pompe à seringue et de pompes LC. Les phases mobiles sont délivrées par les pompes LC en utilisant un gradient ou un programme isocratique et une solution standard contenant les analytes est continuellement introduite dans la source d'ionisation par une pompe à seringue connectée au T-union.

Après l'injection d'un extrait d'échantillon vierge dans le système LC-MS, une chute ou une augmentation le long de la ligne de base "apparente" indique clairement la suppression ou l'augmentation de l'ionisation de l'analyte en raison de la présence de composants co-éluants. Si les régions de chute ou de montée ne se trouvent pas dans la fenêtre temporelle des analytes cibles, il n'y a pas d'effet matrice et cela n'influencera pas l'analyse.

L'infusion post-colonne peut également être utilisée pour optimiser le pH de la phase mobile ou la concentration de l'additif afin de favoriser la formation d'ions d'adduits alternatifs et de minimiser les effets de matrice sans modifier radicalement les conditions chromatographiques optimisées.

### 8.1.4. Stratégies pour éliminer/compenser l'effet matrice

Bien que les effets de matrice ne puissent pas être complètement évités pendant l'analyse LC-MS, ils peuvent être minimisés ou compensés en optimisant les procédures de préparation des échantillons et en manipulant les conditions LC et MS.

Lorsque la concentration de l'analyte cible est élevée, la réduction du volume d'injection et/ou la dilution de l'échantillon sont les moyens les plus simples de diminuer la quantité de composants co-éluant et de minimiser les effets de matrice.

La modification des conditions de la CL, comme l'utilisation d'un débit plus faible, d'un programme de gradient plus lent, d'une division post-colonne, d'une colonne à mode mixte, d'une micro ou nano CL et d'un système CL 2D, peut également réduire les effets de matrice [57].

### 8.1.5. Choix de l'étalon interne

Généralement, l'étalon interne est un composé de même série chimique que l'analyte, marqué par un isotope stable ( $^2\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$ ,  $^{15}\text{N}$ ). Il doit s'extraire dans les mêmes conditions et doit avoir un temps de rétention différent de l'analyte. Il est recommandé d'utiliser des analogues deutérés de l'analyte lorsque le système de détection est la spectrométrie de masse (SM) [51].

# PARTIE PRATIQUE

L'objectif du présent travail est de mettre au point et de valider une méthode de dosage d'un principe actif « Paracétamol » dans les urines par chromatographie liquide à haute performance.

Cette étude a été réalisée au sein du laboratoire de chimie analytique du département de pharmacie de Tizi Ouzou, et cela conformément au protocole de validation analytique décrit dans le guide de validation élaboré par une commission de la société française des sciences et techniques pharmaceutique (SFSTP), publié dans la revue STP Pharma Pratique en janvier 2006.

## 1. Matériel et méthodes

### 1.1. Matériel

#### 1.1.1. Appareillage

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

Désignation		Spécification	Usage
<b>HPLC (SHIMADZU LC20)</b>	Pompe	Lc20 at	Dosage (Obtention des chromatogrammes)
	Injecteur automatique	SIL 20 A	
	Contrôleur	CBM-20	
	Compartiment de la colonne	CTO-20 A	
	Colonne	C18 (25cm)	
	Détecteur	Spectrophotomètre UV visible	
	Logiciel d'exploitation	LC-solution	
<b>Distillateur</b>		Nuve	Eau distillée
<b>Sonicateur</b>		Advantage-LAB	Solubilisation
<b>Balances analytiques</b>		KERN	Pesée
		METLER TOLEDO	
<b>pH-mètre</b>		METLER TOLEDO	Préparation du tampon
<b>Etuve</b>		MEMMERT	Séchage

## 1.1.2. Verreries et autres

Tableau XII : Verreries et autre matériel utilisés.

Verreries	Autres
<ul style="list-style-type: none"> <li>- Fioles jaugées : 20 ml, 25 ml, 50 ml, 100 ml, 2000 ml avec erreur de <math>\pm 2\%</math> ;</li> <li>- Bêchers ;</li> <li>- Pipettes graduées : 2ml, 10 ml avec erreur de <math>\pm 2\%</math> ;</li> <li>- Erlen Meyer ;</li> <li>- Entonneurs ;</li> <li>- Verre de montre ;</li> <li>- Vials.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Micropipettes ;</li> <li>- Spatules ;</li> <li>- Pissettes à eau ;</li> <li>- Poires ;</li> <li>- Papier aluminium ;</li> <li>- compte-goutte ;</li> <li>- Embouts.</li> </ul>




## 1.1.3. Matières premières

Tableau XIII : Matières premières utilisées dans le présent travail.

Matières premières		Provenance
<b>Principes actifs</b>	Paracétamol	Fourni gracieusement par le laboratoire pharmaceutique Biopharm industrie
	Caféine	Fourni gracieusement par le laboratoire pharmaceutique Biopharm industrie

## 1.1.4. Réactifs

Tableau XIV : Réactifs utilisés dans le présent travail.

Réactifs	Provenance	Données physicochimiques	Précautions
Méthanol	HONEYWELL Riedel-de- Hae'n™.	Formule brute : CH <sub>4</sub> O N° CAS : 67-56-1 Mr : 32,04 g/mol $\rho$ : 0,79 g.cm <sup>-3</sup>	
Ethanol	BIOCHEM Chemopharma.	Formule brute : C <sub>2</sub> H <sub>5</sub> OH N° CAS : 64-17-5 Mr : 46,06 g/mol $\rho$ : 0,78 g.cm <sup>-3</sup>	
Acide phosphorique	HONEYWELL <i>Fluka</i> ™	Formule brute : H <sub>3</sub> PO <sub>4</sub> N° CAS : 766-38-2 Mr : 97,994 g/mol $\rho$ : 1,88 g. cm <sup>-3</sup>	
Dihydrogénophosphate de sodium	SIGMA- ALDRICH.	Formule brute : NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> N° CAS : 7558-80-7 Mr : 119,97 g/mol $\rho$ : 0,5-1,2 g.cm <sup>-3</sup>	
Eau distillée	Préparée avec le distillateur LAB-TECH	Formule brute : H <sub>2</sub> O N° CAS : 7732-18-5 Mr : 18 g/mol $\rho$ : 1 g.cm <sup>-3</sup>	

## 1.1.5. Matrice

La matrice utilisée dans le présent travail est une matrice biologique exempte du paracétamol, Lyphochek BioRad®, utilisée pour les contrôles urinaires des automates biochimiques.

## 1.2. Méthodes

### 1.2.1. Méthodologie de la validation analytique

Il existe de nombreux documents officiels décrivant les critères de validation à tester, mais ils ne proposent pas de protocole expérimental et se limitent le plus souvent aux concepts généraux.

C'est pourquoi deux commissions SFSTP ont élaboré successivement des guides de validation (en 1992 pour les analyses des spécialités pharmaceutiques et en 1997 pour les analyses en milieu biologique) dans le but d'aider concrètement à appliquer les recommandations réglementaires. Si ces premiers guides ont largement contribué à faire appliquer et progresser les validations analytiques, ils présentent toutefois des faiblesses quant aux conclusions des tests réalisés et quant à l'aide à la prise de décision au regard de limites d'acceptation définies pour l'usage d'une procédure analytique.

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

Elle a pour but de :

- Identifier les critères de validation ;
- S'approprier les outils statistiques permettant de les étudier ;
- Connaître les demandes des référentiels au regard de la validation et du transfert analytique ;
- Être en mesure d'en comprendre les exigences et les objectifs.

### 1.2.2. Choix du protocole de validation

Selon le logigramme de la figure 7 qui permet de sélectionner un protocole de validation et le tableau V et compte tenu de l'absence de l'effet matrice, le protocole adopté dans notre pratique est le modèle V2 en utilisant 5 niveaux de concentration pour les standards d'étalonnages ainsi que les standards de validation.

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.

### **1.2.3. Choix des paramètres de validation**

#### **1.2.3.1. Domaine d'application et les niveaux de concentration**

Le choix des niveaux de concentration pour le dosage d'une substance chimique dans une matrice biologique (dans notre cas les urines) dépend de la fraction de cette dernière éliminée sous forme inchangée, en prenant éventuellement en compte la diurèse ainsi que la dose initiale administrée.

Dans le cas du paracétamol, une fraction d'environ 5 % de la dose initiale administrée par voie orale sera éliminée dans les urines sous forme inchangée. En prenant en compte une diurèse de 24 heures de 2 litres en moyenne.

Dans notre présent travail, nous avons pris en compte une dose ingérée de 3 grammes, en optant pour des niveaux de concentration selon les fractions éliminées à partir d'une dose de paracétamol de 1 g jusqu'à une dose de 5 g.

#### **1.2.3.2. Limites d'acceptabilité ( $\lambda$ )**

En bioanalyse  $\lambda = \pm 15\%$  ce qui signifie que pour une fraction de 5% de paracétamol éliminé sous forme inchangé dans les urines à partir d'une dose de 3 g après 24 heures c'est-à-dire 75mg/l, le résultat sera compris entre 63.75 mg et 86.25 mg.

#### **1.2.3.3. Probabilité de confiance ( $\beta$ )**

Notre objectif est que la proportion des futures mesures comprises dans les limites d'acceptation fixées à priori soit de 85% ( $\beta = 85\%$ )

#### **1.2.3.4. Risque d'erreur accepté ( $\alpha$ )**

$\alpha = 15\%$

### **1.2.4. Conditions expérimentales**

#### **1.2.4.1. Le 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.

### 1.2.4.2. Préparation des solutions

#### 1.2.4.2.1. Préparation du diluant

Nous avons préparé 2 litres de diluant  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  à raison de 0.01N comme suit :

- Dissoudre 2.4 g de  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  dans 02 litres d'eau distillée
- Ajuster le pH à 3.4 en ajoutant une solution d'acide phosphorique  $\text{H}_3\text{PO}_4$

#### 1.2.4.2.2. Préparation de l'étalon interne (caféine)

La solution de caféine a été préparée comme suit :

- Peser 15 mg de caféine dans une fiole de 100 ml
- Ajouter le diluant  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  jusqu'au trait de jauge puis mettre dans le sonicateur

#### 1.2.4.2.3. Préparation de la matrice

La matrice se présente sous forme de lyophilisat que nous avons reconstitué comme suit :

- Ajouter 10 ml d'eau distillée dans chaque flacon
- Bien agiter jusqu'à dissolution complète
- Verser le contenu des deux flacons dans un bécher et bien mélanger
- QSP = 18 ml

#### 1.2.4.2.4. Préparation de la phase mobile

La phase mobile est un mélange de 75% de  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  (à 0.01N) et 25% de méthanol.

Nous en avons préparé 500 ml comme suit :

- Mélanger 375ml de  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  et 125ml de méthanol dans une fiole de 500ml
- Dégazer à l'aide d'un sonicateur puis verser dans le réservoir de la phase mobile

#### 1.2.4.2.5. Préparation des standards d'étalonnage

Durant trois jours successifs, 5 niveaux de concentration ont été préparés à raison de deux répétitions par niveau.

Tableau XV : Tableau présentant le protocole de la préparation des standards d'étalonnage.

Niveaux	10%		8%		6%		4%		2%	
Répétitions	1	2	1	2	1	2	1	2	1	2
Dilutions	0.125 mg/ml		0.100 mg/ml		0.075 mg/ml		0.050 mg/ml		0.025 mg/ml	
Protocole	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Peser 25 mg de paracétamol pour chaque répétition dans une fiole de 20 ml (solution mère)</li> <li>-Ajouter le diluant jusqu'au trait de jauge et mettre dans le sonicateur</li> <li>- A l'aide d'une pipette jaugée, prélever de ces solutions mères les volumes (2ml, 1.6ml, 1.2ml, 0.8ml et 0.4ml) qui correspondent successivement aux dilutions (0.125mg/ml, 0.100mg/ml, 0.075 mg/ml, 0.050mg/ml et 0.025mg/ml) dans des fioles de 20 ml</li> <li>- Ajouter pour chaque dilution un volume fixe de caféine (2 ml)</li> <li>- Compléter jusqu'au trait de jauge avec le diluant puis mettre dans le sonicateur</li> <li>- Agiter par retournement puis remplir les vials</li> </ul>									
Solutions à préparer	<b>SE = 5x2x3 = 30 solutions de standards d'étalonnage</b>									

#### 1.2.4.2.6. Préparation des standards de validation

Au cours de trois jours successifs, 5 niveaux de concentration ont été préparés à raison de trois répétitions par niveau.

**Tableau XVI :** Tableau présentant le protocole de la préparation des standards de validation.

Niveaux	10%			8%			6%			4%			2%		
Répétitions	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3
Dilutions	0.125 mg/ml			0.100 mg/ml			0.075 mg/ml			0.050 mg/ml			0.025 mg/ml		
Protocole	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Peser 25 mg de paracétamol pour chaque répétition dans une fiole de 20 ml (solution mère)</li> <li>- Ajouter 6 ml de la matrice (lyophilisat d'urine reconstitué)</li> <li>- Compléter avec le diluant jusqu'au trait de jauge puis mettre dans le sonicateur</li> <li>- A l'aide d'une pipette jaugée, prélever de ces solutions mères les volumes (2ml, 1.6ml, 1.2ml, 0.8ml et 0.4ml) qui correspondent successivement aux dilutions (0.125mg/ml, 0.100mg/ml, 0.075 mg/ml, 0.050mg/ml et 0.025mg/ml) dans des fioles de 20 ml</li> <li>- Ajouter un volume fixe de caféine (2 ml) dans chaque dilution</li> <li>- Compléter jusqu'au trait de jauge avec le diluant puis mettre dans le sonicateur</li> <li>- Agiter par retournement puis remplir les vials</li> </ul>														
Solutions à préparer	<b>SV = 5x3x3 = 45 solutions de standards de validation</b>														

### 1.2.5. Conditions chromatographiques

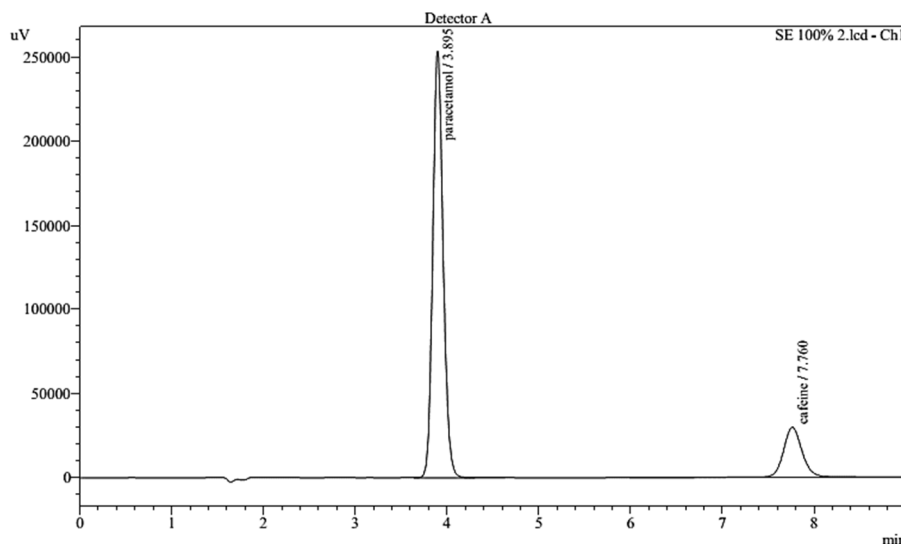
**Tableau XVII :** Conditions chromatographiques de la méthode de dosage.

<b>Colonne</b>	Longueur	15 cm
	Diamètre	4,6 mm
	Taille des particules	5 µm
	Phase stationnaire	Gel de silice greffée (C18)
<b>Détection</b>	Spectrophotomètre UV-Visible : longueur d'onde $\lambda = 220\text{nm}$	
<b>Volume D'injection</b>	20 µl	
<b>Temps d'analyse</b>	7,5 min	
<b>Débit</b>	1 ml / min	
<b>Température</b>	Ambiante	
<b>Phase mobile</b>	NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> / MeOH : 375/125 (V/V)	

## 2. Résultats

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

### 2.1. Chromatogrammes obtenus du dosage simultané des deux principes actifs



**Figure 10 :** Chromatogramme du Paracétamol et de la Caféine (Etalon interne).

#### 2.1.1. Temps de rétention obtenus

Le temps de rétention moyen du paracétamol = 3,89 min.

Le temps de rétention moyen de la caféine = 7,76 min.

#### 2.1.2. Calcul de la résolution

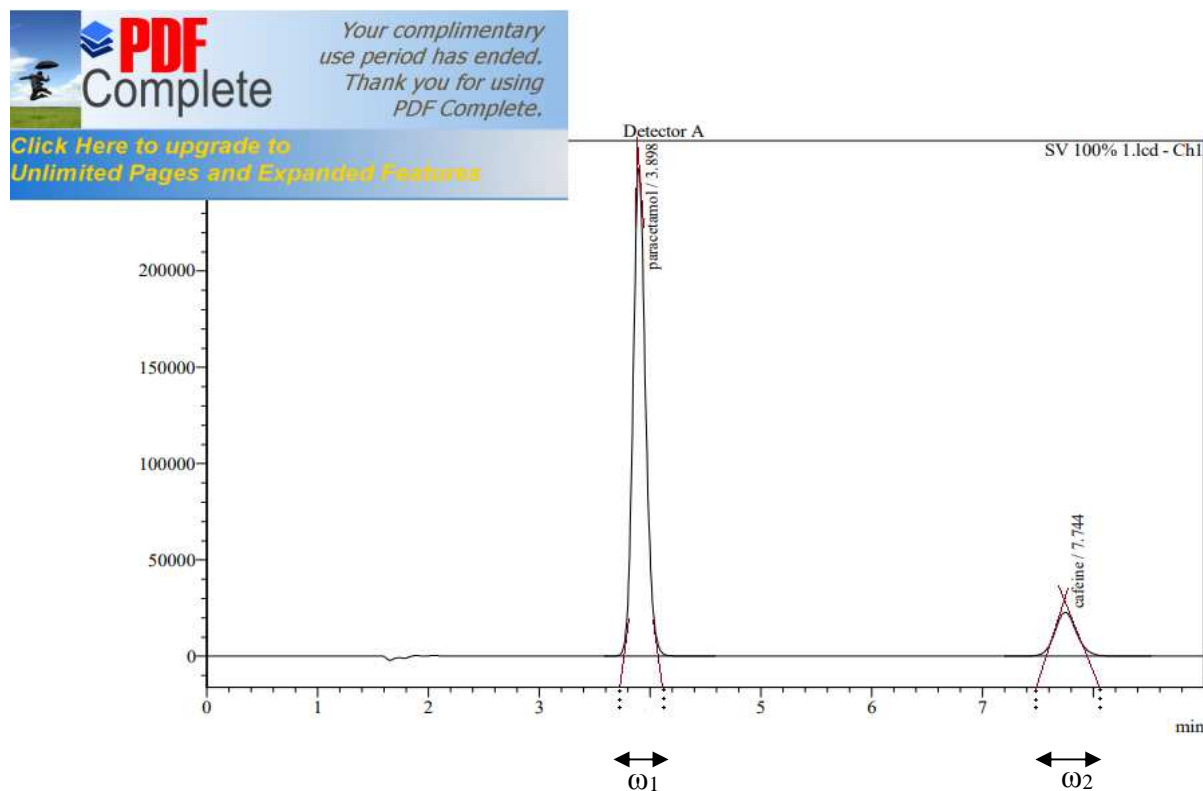
$$R_S = 2 \frac{t_{r2} - t_{r1}}{\omega_1 + \omega_2}$$

Avec :

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

$\omega_1$  et  $\omega_2$  : largeur du pic à la base du paracétamol et de la caféine respectivement, déterminées, comme l'illustre la figure (11) ci-dessous, par l'intersection des tangentes aux points d'inflexion des pics avec la ligne de base.

On a déterminé ces paramètres à partir du chromatogramme du standard de validation du niveau 100%.



**Figure 11 :** Détermination des largeurs des pics à la base et des temps de rétention à partir du chromatogramme du standard de validation.

Les résultats obtenus sont résumés dans le tableau suivant :

**Tableau XVIII :** Temps de rétention et largeur du pic 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

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

## 2.2. Informations concernant les données brutes

✓ Les concentrations présentées sont les concentrations finales injectées, le niveau **0,075 mg/ml** correspond à la dissolution d'une quantité équivalente à la fraction du Paracétamol éliminé sous forme inchangée par 24h (en considérant une diurèse moyenne de **2l/24heurs**, une élimination dans les urines de **5%** sous forme inchangée et une concentration plasmatique moyenne (dose administrée) de **3g/24h**) (voir protocole de préparation des standards).

✓ Les résultats sont représentés sous forme du rapport entre les concentrations et les airs de pic du Paracétamol et ceux de la Caféine (Etalon interne).

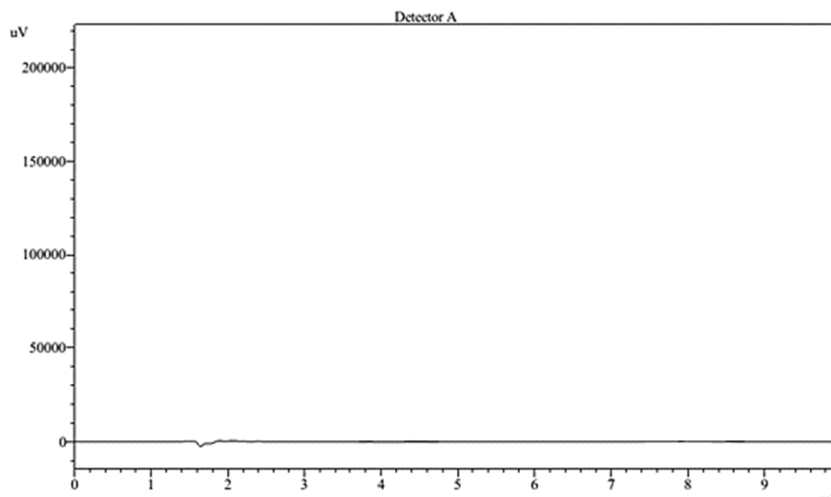
✓ La concentration moyenne de la Caféine introduite est de **0,015 mg/ml**.

## 2.3. Spécificité et effet matrice

### 2.3.1. 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 ainsi que celui des solutions de la matrice seule et du diluant seul.

Elle est illustrée dans les figures suivantes :



**Figure 12** : Chromatogramme du diluant seul.

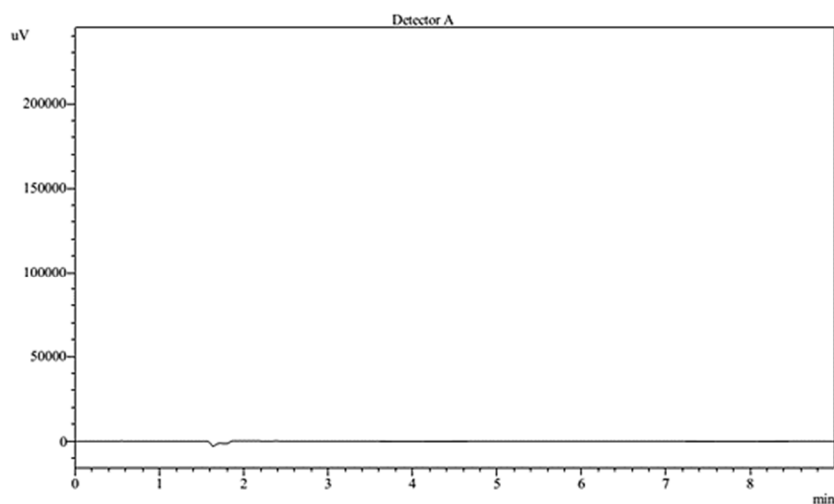


Figure 13 : Chromatogramme du diluant avec la matrice seule.

✓ Pour le paracétamol

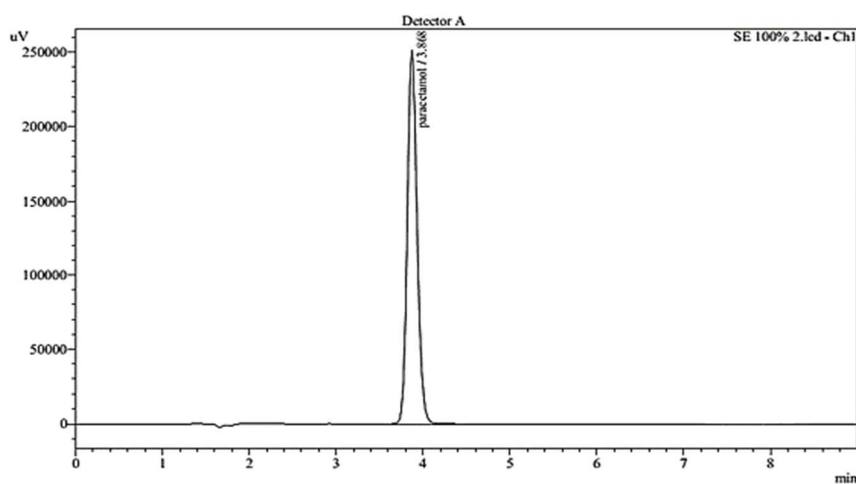


Figure 14 : Chromatogramme du standard d'étalonnage du paracétamol.

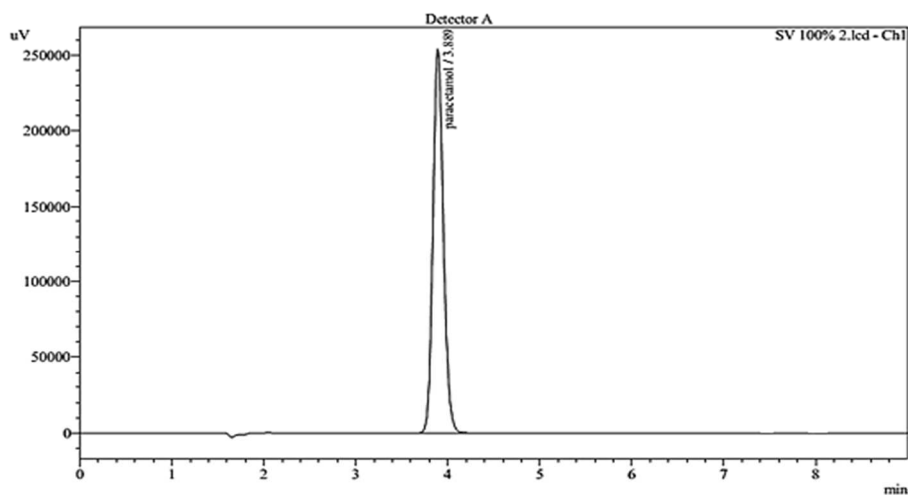


Figure 15 : Chromatogramme du standard de validation du paracétamol.

✓ Pour la caféine

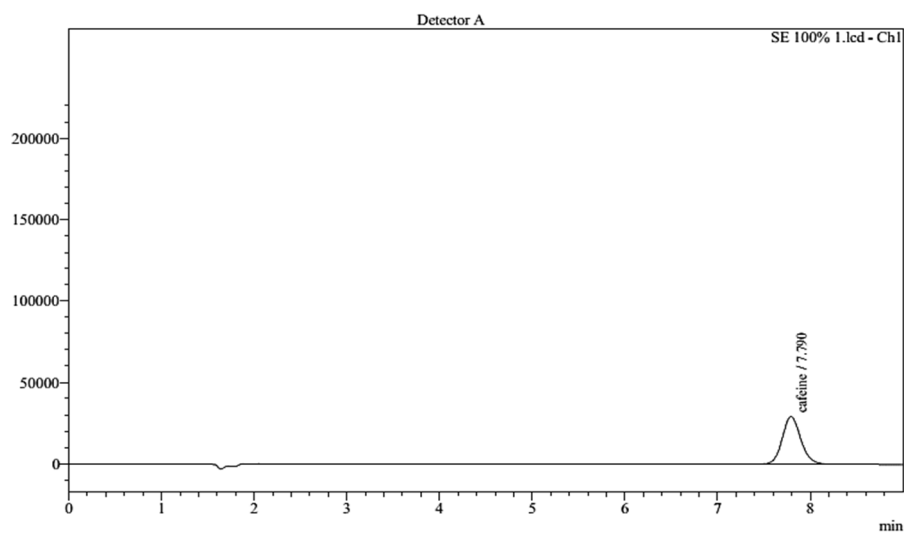


Figure 16 : Chromatogramme du standard d'étalonnage de la caféine.

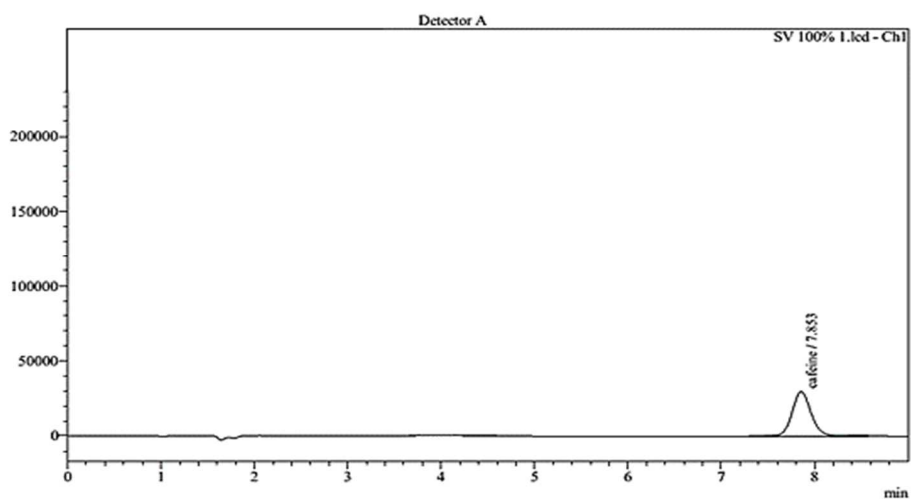


Figure 17 : Chromatogramme du standard de validation de la caféine.

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

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

Solutions	Temps de rétention		Superposition
Diluant seul	Absence		
Matrice seule			
Standard d'étalonnage	Paracétamol	3,868 min	Pas de superposition
	Caféine	7,790 min	
Standard de validation	Paracétamol	3,889 min	
	Caféine	7,853 min	

## 2.3.2. Etude statistique

L'étude statistique de la spécificité et d'effet matrice est réalisée sur les standards d'étalonnage avec le Paracétamol seul et les standards de validation avec la matrice urinaire reconstituée et les résultats sont résumés dans les tableaux suivants :

**Tableau XX** : Résultats obtenus de l'étude de la spécificité et de l'effet matrice : standards d'étalonnage du paracétamol.

<i>Niveaux</i>	<i>1<sup>ère</sup> répétition de chaque série</i>	<i>Rapport des concentrations (Xi)</i>	<i>Rapport des Aires de pic (Yi)</i>	<i>Réponses calculées (Y*i)</i>	<i>(Yi-Y*i)<sup>2</sup></i>	<i>(Xi-X')<sup>2</sup></i>
0,025mg/ml	1	1,662	1,298	1,24	0,0034	11,10
	2	1,664	1,323	1,24	0,0068	11,09
	3	1,669	1,302	1,25	0,0032	11,05
0,050mg/ml	1	3,324	2,515	2,46	0,0028	2,79
	2	3,327	2,523	2,46	0,0035	2,78
	3	3,336	2,415	2,47	0,0030	2,75
0,075mg/ml	1	4,987	3,636	3,68	0,0023	0,00
	2	4,991	3,597	3,69	0,0080	0,00
	3	5,004	3,514	3,70	0,0331	0,00
0,100mg/ml	1	6,649	4,831	4,91	0,0056	2,74
	2	6,654	4,898	4,91	0,0001	2,76
	3	6,672	4,677	4,92	0,0600	2,82
0,125mg/ml	1	8,311	6,231	6,13	0,0108	11,00
	2	8,318	6,340	6,13	0,0432	11,05
	3	8,340	6,230	6,15	0,0067	11,20
<b><i>Pente</i></b>			<b>0,735</b>			
<b><i>Ordonnée à l'origine</i></b>			<b>0,018</b>			
<b><i>Erreur pente</i></b>			<b>0,013</b>			
<b><i>Erreur ordonnée à l'origine</i></b>			<b>0,074</b>			

**Tableau XXI :** Résultats obtenus de l'étude de la spécificité et de l'effet matrice : standards de validation du Paracétamol.

Niveaux	1 <sup>ère</sup> répétition de chaque série	Rapport des concentrations (Xi)	Rapport des Aires de pic (Yi)	Réponses calculées (Y*i)	(Yi - Y*i) <sup>2</sup>	(Xi - X') <sup>2</sup>
0,025mg/ml	1	1,662	1,297	1,33	0,0010	11,10
	2	1,663	1,312	1,33	0,0003	11,09
	3	1,671	1,418	1,34	0,0068	11,04
0,050mg/ml	1	3,318	2,524	2,53	0,0001	2,81
	2	3,326	2,517	2,54	0,0004	2,78
	3	3,343	2,625	2,55	0,0057	2,72
0,075mg/ml	1	4,977	3,660	3,74	0,0060	0,00
	2	4,989	3,673	3,75	0,0054	0,00
	3	5,014	3,840	3,76	0,0057	0,00
0,100mg/ml	1	6,636	4,842	4,94	0,0103	2,70
	2	6,652	4,835	4,95	0,0143	2,75
	3	6,685	5,086	4,98	0,0115	2,86
0,125mg/ml	1	8,295	6,143	6,15	0,0000	10,90
	2	8,315	6,178	6,16	0,0002	11,03
	3	8,357	6,293	6,19	0,0099	11,31
<b>Pente</b>			<b>0,727</b>			
<b>Ordonnée à l'origine</b>			<b>0,121</b>			
<b>Erreur pente</b>			<b>0,008</b>			
<b>Erreur ordonnée à l'origine</b>			<b>0,047</b>			

**Tableau XXII :** Comparaison des deux pentes et des deux ordonnées à l'origine du Paracétamol seul et du Paracétamol dans la matrice.

Comparaison des deux pentes des deux droites de régression	<i>t</i> calculé	<b>0,53</b>	<b>Différence non significative</b>
	<i>t</i> <sup>°</sup> ( $\alpha$ ; 26)	<b>2,06</b>	
	Condition	<b>t calculé &lt; t<sup>°</sup>(<math>\alpha</math> ; 26)</b>	
Comparaison des ordonnées à l'origine des deux droites de régression	<i>t</i> calculé	<b>1,18</b>	<b>Différence non significative</b>
	<i>t</i> <sup>°</sup> ( $\alpha$ ; 26)	<b>2,06</b>	
	Condition	<b>t calculé &lt; t<sup>°</sup>(<math>\alpha</math> ; 26)</b>	

## 2.4. Fonction de réponse

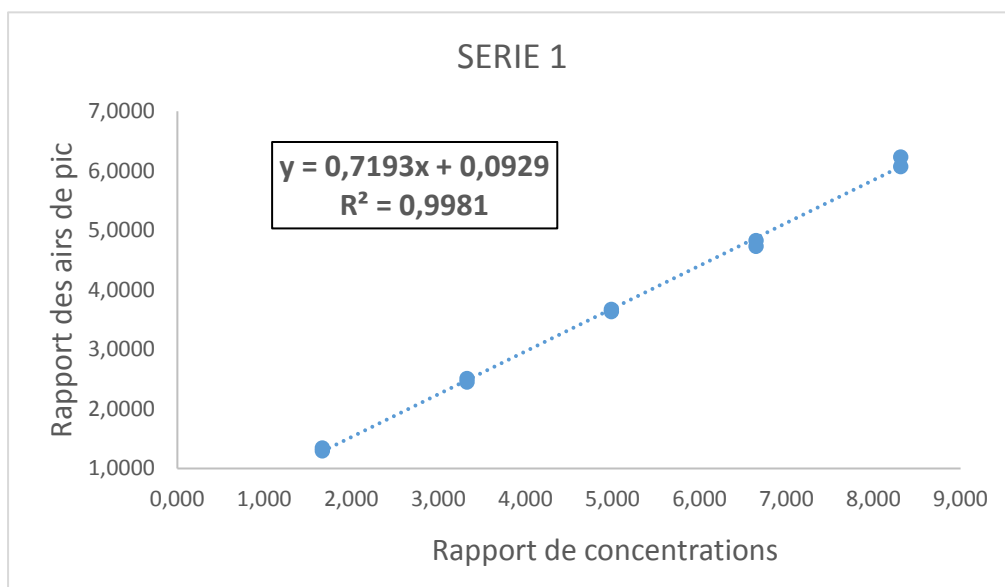
Les tableaux suivants regroupent les résultats des calculs statistiques pour quatre modèles d'étalonnage suivis par leurs courbes correspondantes à chaque série.

### 2.4.1. 1<sup>er</sup> modèle : Droite : $y = ax + b$

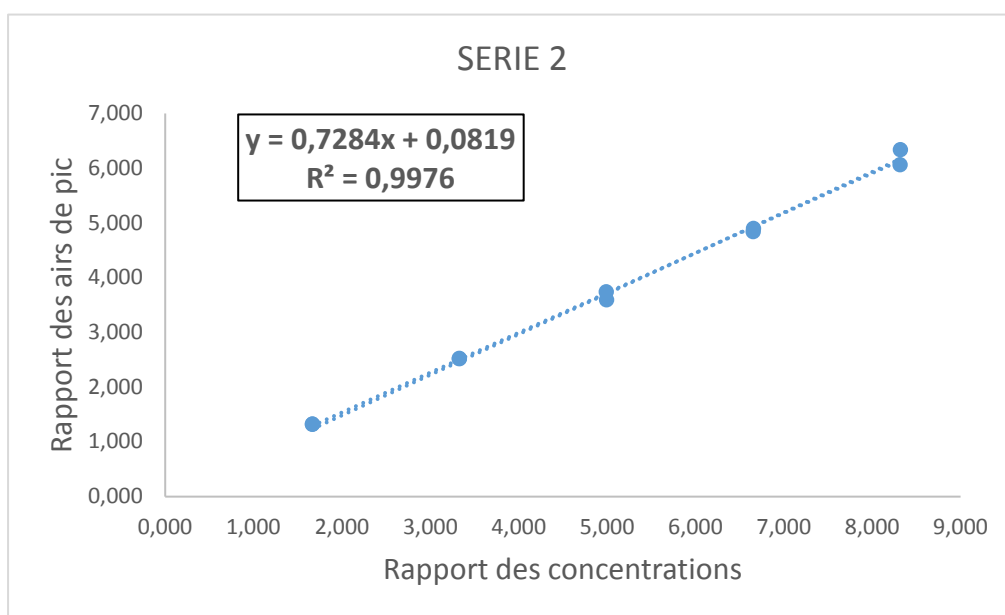
**Tableau XXIII** : Paramètres d'étalonnage obtenus pour le Paracétamol seul avec la fonction

$$y = ax + b.$$

Niveaux	Répétitions	Séries (Jours)									
		1		2		3					
		$X_i/X_{ei}$	$Y_i Y_{ei}$	$X_i/X_{ei}$	$Y_i Y_{ei}$	$X_i/X_{ei}$	$Y_i Y_{ei}$				
0,025 mg/ml	1	1,662	1,2985	1,664	1,323	1,668	1,272				
	2	1,662	1,3483	1,663	1,319	1,669	1,302				
0,050 mg/ml	1	3,324	2,5149	3,327	2,523	3,336	2,415				
	2	3,324	2,4544	3,327	2,515	3,336	2,455				
0,075 mg/ml	1	4,987	3,6358	4,991	3,597	5,004	3,514				
	2	4,987	3,6746	4,989	3,743	5,008	3,698				
0,100 mg/ml	1	6,649	4,8307	6,654	4,898	6,672	4,677				
	2	6,649	4,7335	6,652	4,842	6,677	4,819				
0,125 mg/ml	1	8,311	6,2312	8,318	6,340	8,340	6,230				
	2	8,311	6,0738	8,315	6,066	8,347	6,078				
<b>Pente</b>		<b>0,7193</b>		<b>Pente</b>		<b>0,7284</b>		<b>Pente</b>		<b>0,7219</b>	
<b>Ordonnée à l'origine</b>		<b>0,0929</b>		<b>Ordonnée à l'origine</b>		<b>0,0819</b>		<b>Ordonnée à l'origine</b>		<b>0,0325</b>	



**Figure 18 :** Courbe d'étalonnage du Paracétamol obtenue avec la fonction  $y = ax + b$  (série 1).



**Figure 19 :** Courbe d'étalonnage du Paracétamol obtenue avec la fonction  $y = ax + b$  (Série 2).

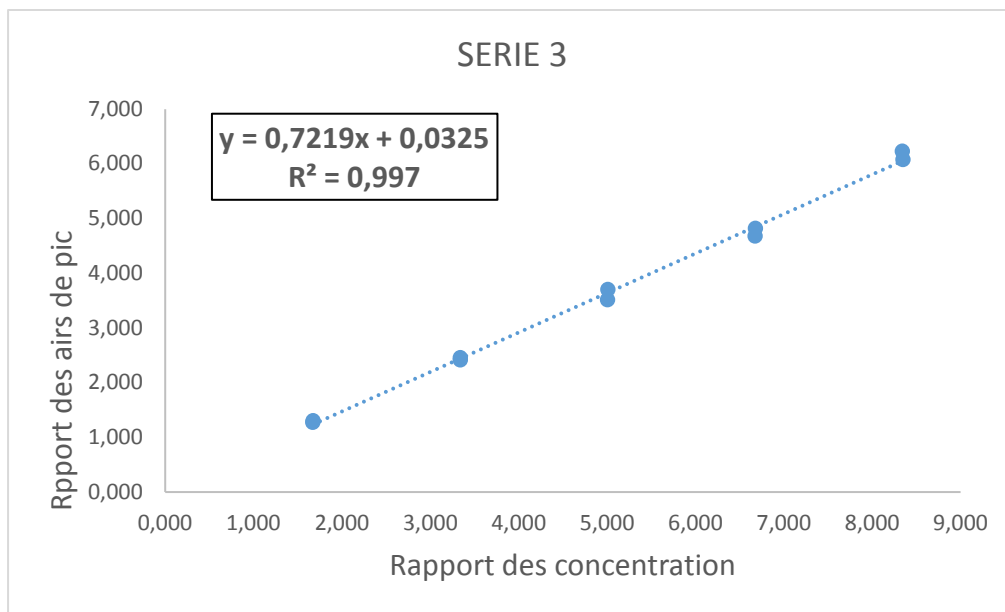
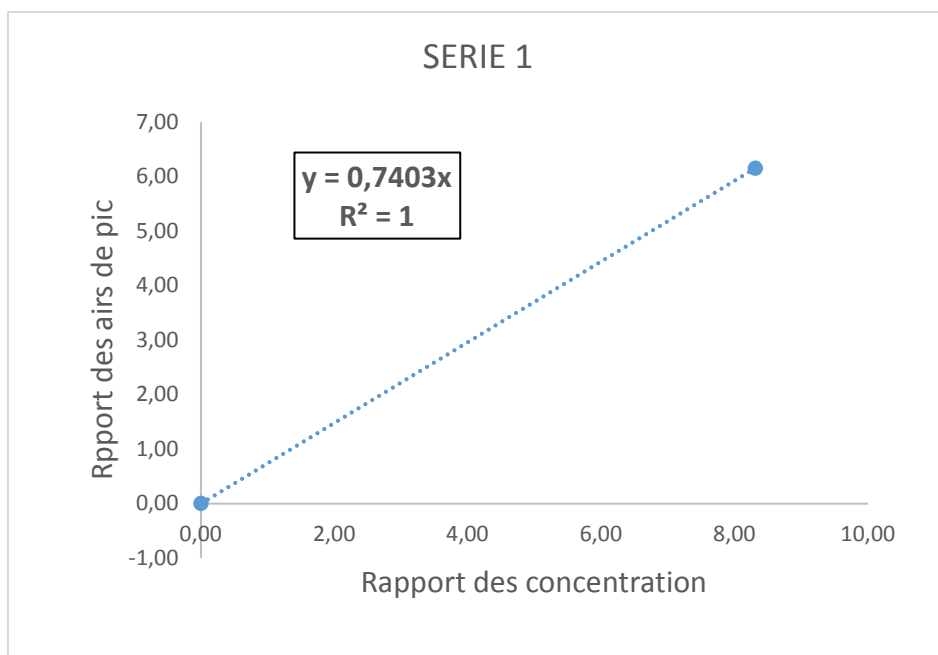


Figure 20 : Courbe d'étalonnage du Paracétamol obtenue avec la fonction  $y = ax + b$  (Série 3).

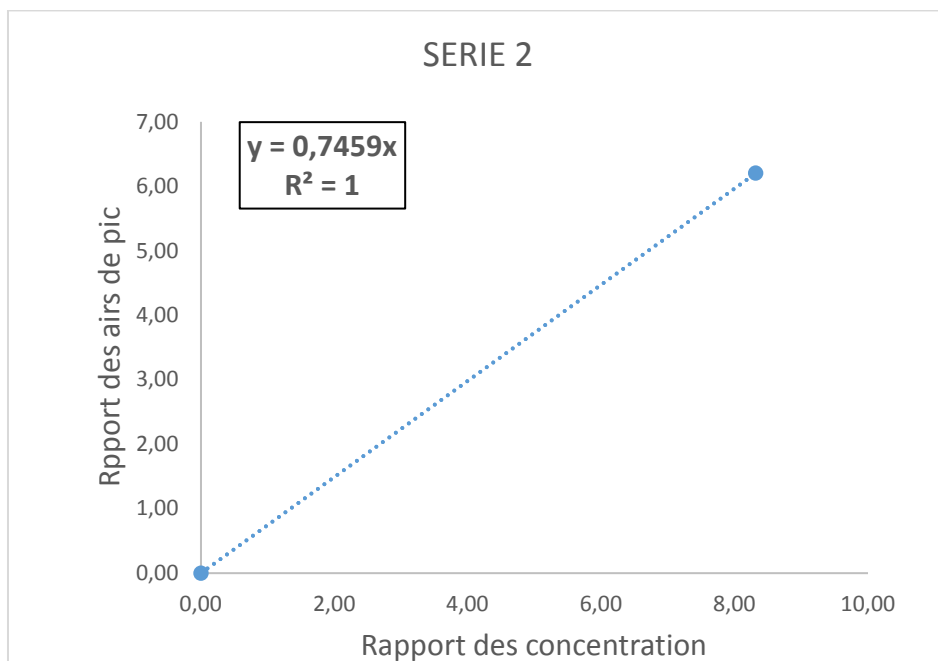
#### 2.4.2. 2<sup>ème</sup> modèle : Droite passant par 0 : $y = ax$ (niveau 120%)

Tableau XXIV : Paramètres d'étalonnage obtenus pour le Paracétamol seul avec la fonction  $y = ax$ .

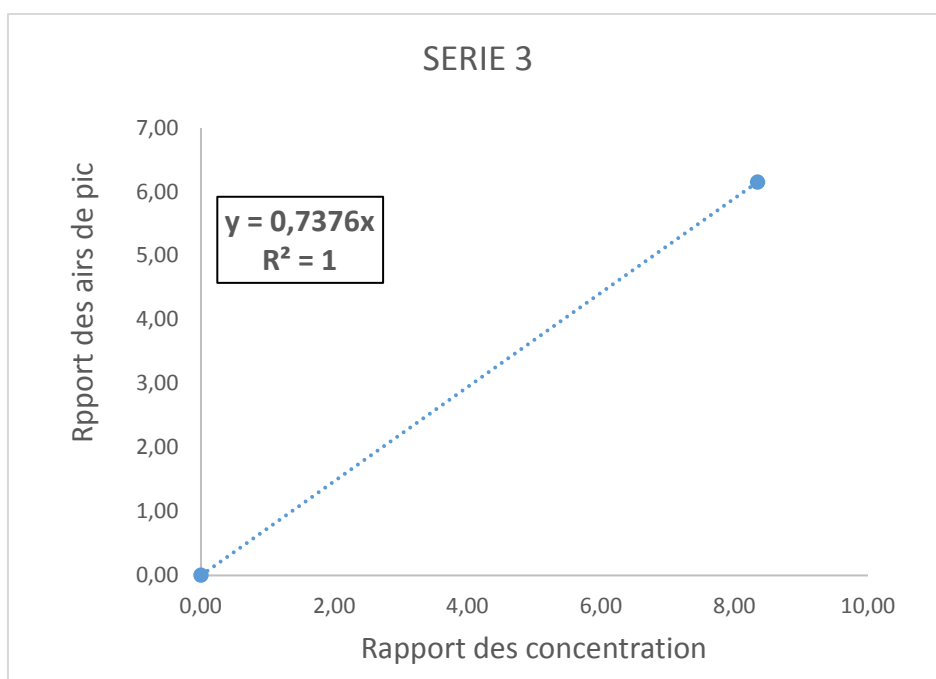
Niveaux	Répétitions	Séries (Jours)									
		1		2		3					
		$X_i/X_{ei}$	$Y_i/Y_{ei}$	$X_i/X_{ei}$	$Y_i/Y_{ei}$	$X_i/X_{ei}$	$Y_i/Y_{ei}$				
0,125 mg/ml	1	8,311	6,231	8,318	6,340	8,340	6,230				
	2	8,311	6,074	8,315	6,066	8,347	6,078				
Pente		0,740		Pente		0,746		Pente		0,738	
Ordonnée à l'origine		0		Ordonnée à l'origine		0		Ordonnée à l'origine		0	



**Figure 21** : Courbe d'étalonnage du Paracétamol obtenue avec la fonction  $y = ax$  (Série 1).



**Figure 22** : Courbe d'étalonnage du Paracétamol obtenue avec la fonction  $y = ax$  (Série 2).

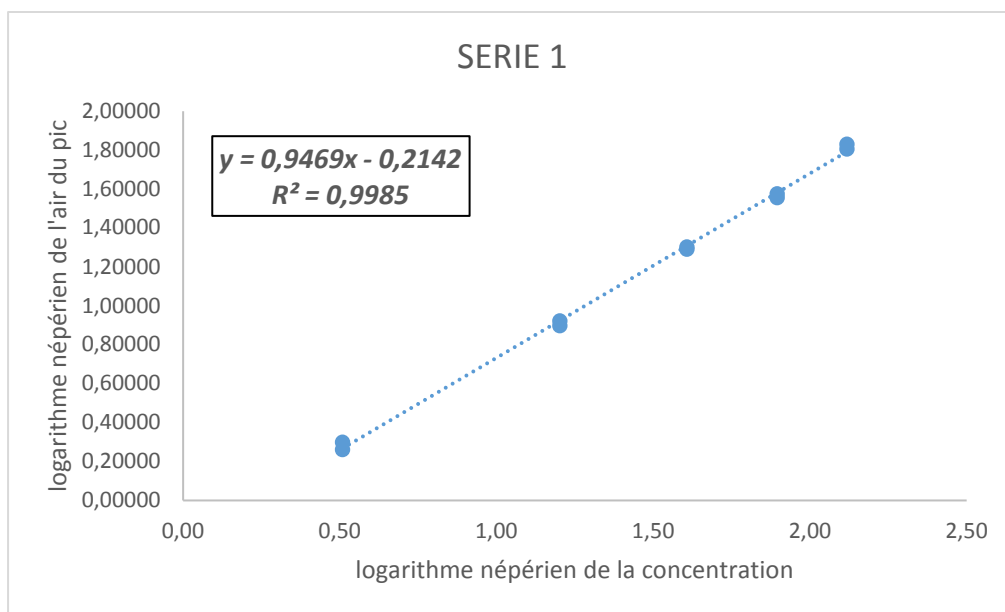


**Figure 23 :** Courbe d'étalonnage du Paracétamol obtenue avec la fonction  $y = ax$  (Série 3).

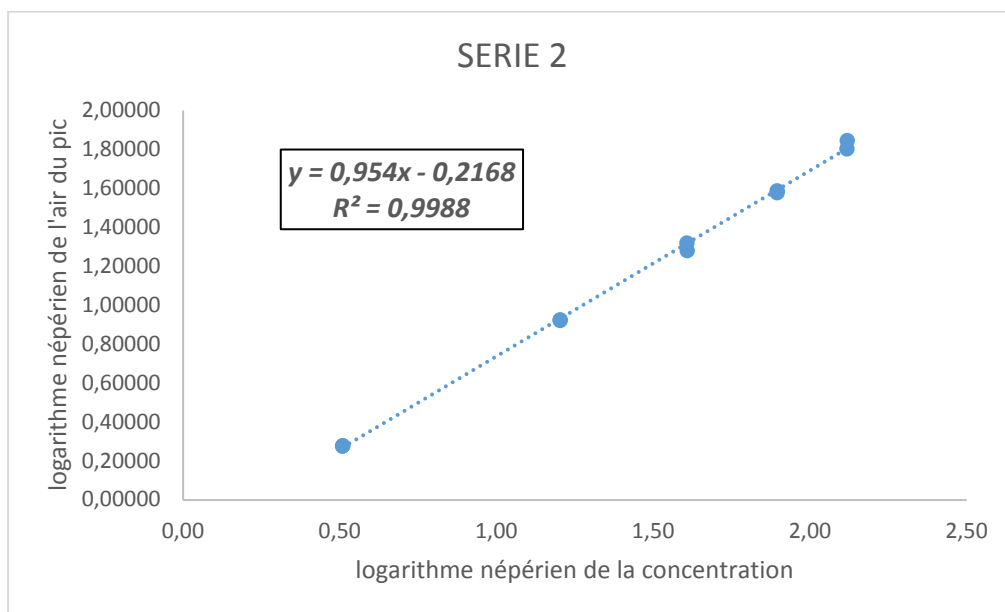
### 2.4.3. 3<sup>ème</sup> modèle : Fonction Logarithmique : $\ln y/y_{ei} = f(\ln x/x_{ei})$

**Tableau XXV :** Paramètres d'étalonnage obtenus pour le Paracétamol seul avec la fonction  $\ln y/y_{ei} = f(\ln x/x_{ei})$ .

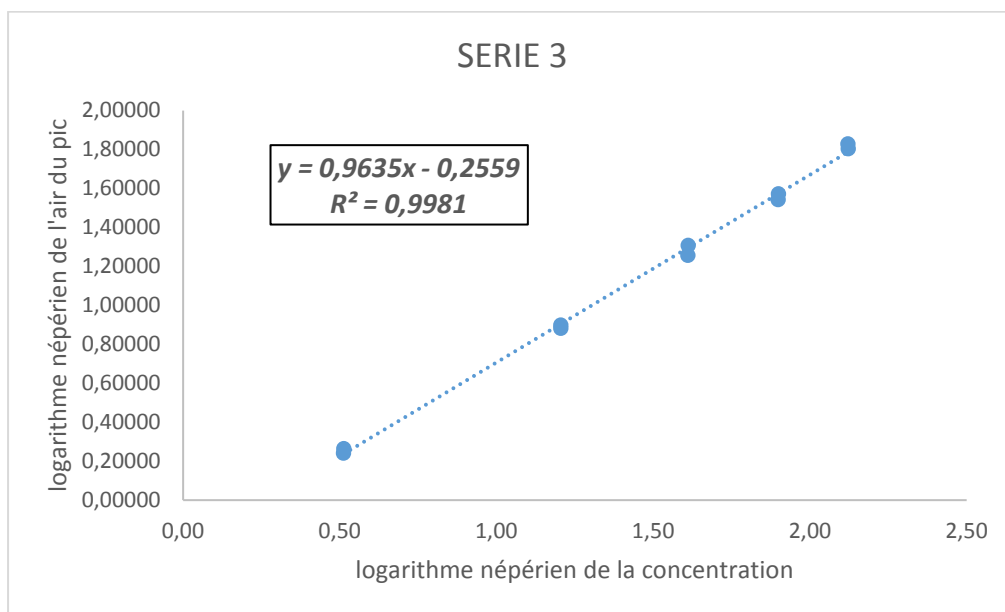
Niveaux	Répétitions	Séries (Jours)					
		1		2		3	
		$\ln(X_i/X_{ei})$	$\ln(Y_i/Y_{ei})$	$\ln(X_i/X_{ei})$	$\ln(Y_i/Y_{ei})$	$\ln(X_i/X_{ei})$	$\ln(Y_i/Y_{ei})$
0,025 mg/ml	1	0,51	0,26119	0,51	0,28025	0,51	0,24087
	2	0,51	0,29883	0,51	0,27664	0,51	0,26374
0,050 mg/ml	1	1,20	0,92223	1,20	0,92543	1,20	0,88181
	2	1,20	0,89788	1,20	0,92220	1,20	0,89829
0,075 mg/ml	1	1,61	1,29083	1,61	1,28006	1,61	1,25679
	2	1,61	1,30146	1,61	1,31986	1,61	1,30776
0,100 mg/ml	1	1,89	1,57499	1,90	1,58884	1,90	1,54270
	2	1,89	1,55467	1,89	1,57739	1,90	1,57257
0,125 mg/ml	1	2,12	1,82957	2,12	1,84684	2,12	1,82944
	2	2,12	1,80398	2,12	1,80264	2,12	1,80471
<b>Pente</b>		<b>0,9469</b>	<b>Pente</b>	<b>0,9540</b>	<b>Pente</b>	<b>0,9635</b>	
<b>Ordonnée à l'origine</b>		<b>-0,2142</b>	<b>Ordonnée à l'origine</b>	<b>-0,2168</b>	<b>Ordonnée à l'origine</b>	<b>-0,2559</b>	



**Figure 24 :** Courbe d'étalonnage du Paracétamol obtenue avec la fonction  $\ln y = f(\ln x)$  (Série 1).



**Figure 25 :** Courbe d'étalonnage du Paracétamol obtenue avec la fonction  $\ln y = f(\ln x)$  (Série 2).

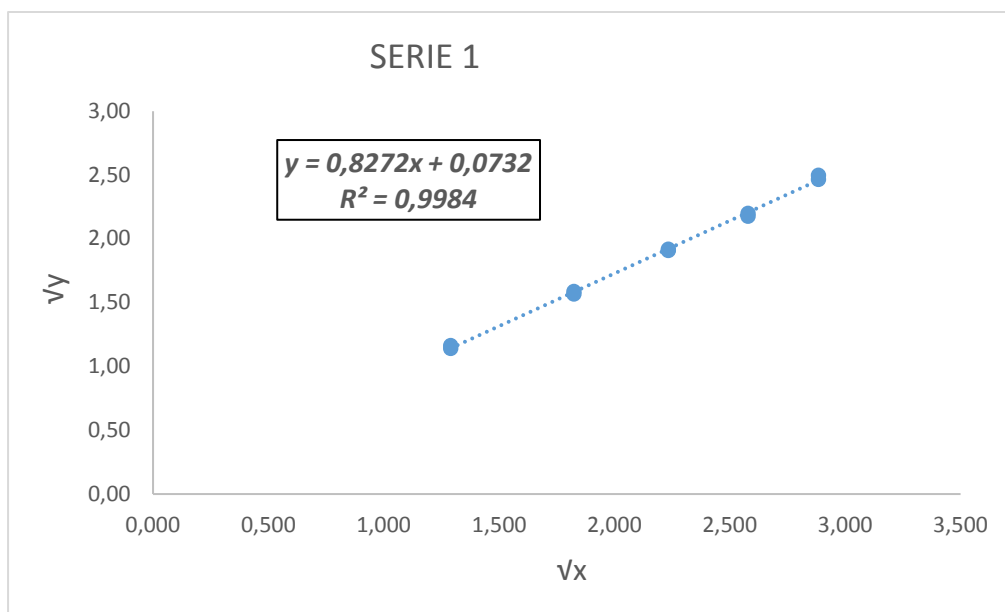


**Figure 26 :** Courbe d'étalonnage du Paracétamol obtenue avec la fonction  $\ln y = f(\ln x)$  (Série 3).

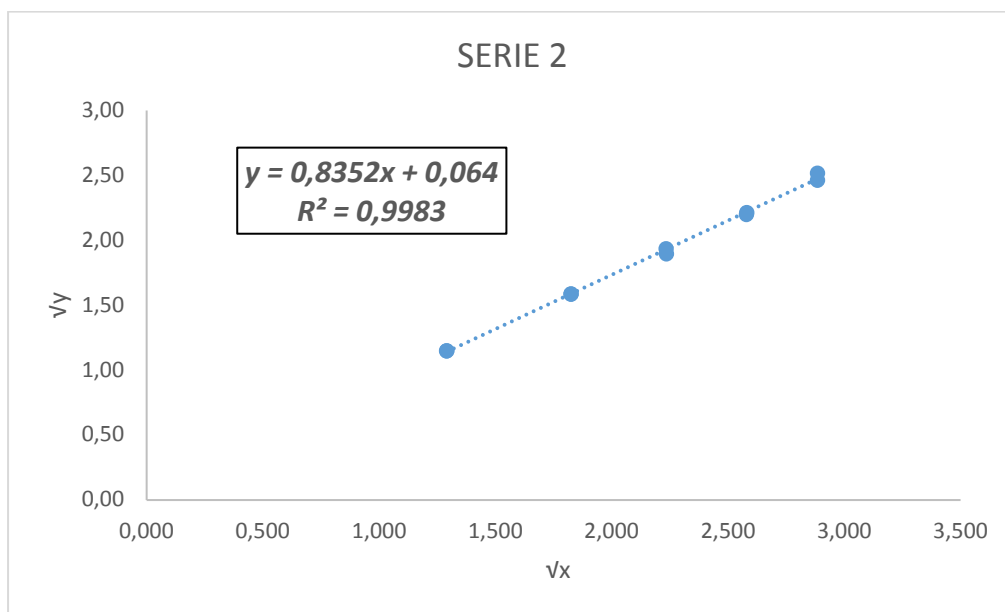
#### 2.4.4. 4<sup>ème</sup> modèle : Changement de variables par la racine carrée : $\sqrt{y/y_{ei}} = f(\sqrt{x/x_{ei}})$

**Tableau XXVI :** Résultats du Paracétamol obtenus avec la fonction  $\sqrt{y/y_{ei}} = f(\sqrt{x/x_{ei}})$  (PA seul).

Niveaux	Répétitions	Séries (Jours)					
		1		2		3	
		$\sqrt{x/x_{ei}}$	$\sqrt{y/y_{ei}}$	$\sqrt{x/x_{ei}}$	$\sqrt{y/y_{ei}}$	$\sqrt{x/x_{ei}}$	$\sqrt{y/y_{ei}}$
0,025 mg/ml	1	1,289	1,14	1,290	1,15	1,292	1,13
	2	1,289	1,16	1,290	1,15	1,292	1,14
0,050 mg/ml	1	1,823	1,59	1,824	1,59	1,826	1,55
	2	1,823	1,57	1,824	1,59	1,826	1,57
0,075 mg/ml	1	2,233	1,91	2,234	1,90	2,237	1,87
	2	2,233	1,92	2,234	1,93	2,238	1,92
0,100 mg/ml	1	2,579	2,20	2,580	2,21	2,583	2,16
	2	2,579	2,18	2,579	2,20	2,584	2,20
0,125 mg/ml	1	2,883	2,50	2,884	2,52	2,888	2,50
	2	2,883	2,46	2,883	2,46	2,889	2,47
		<b>Pente</b>	<b>0,8272</b>	<b>Pente</b>	<b>0,8352</b>	<b>Pente</b>	<b>0,8352</b>
		<b>Ordonnée à l'origine</b>	<b>0,0732</b>	<b>Ordonnée à l'origine</b>	<b>0,0640</b>	<b>Ordonnée à l'origine</b>	<b>0,0421</b>



**Figure 27 :** Courbe d'étalonnage du Paracétamol obtenue avec la fonction  $\sqrt{y} = f(\sqrt{x})$  (Série 1).



**Figure 28 :** Courbe d'étalonnage du Paracétamol obtenue avec la fonction  $\sqrt{y} = f(\sqrt{x})$  (Série 2).

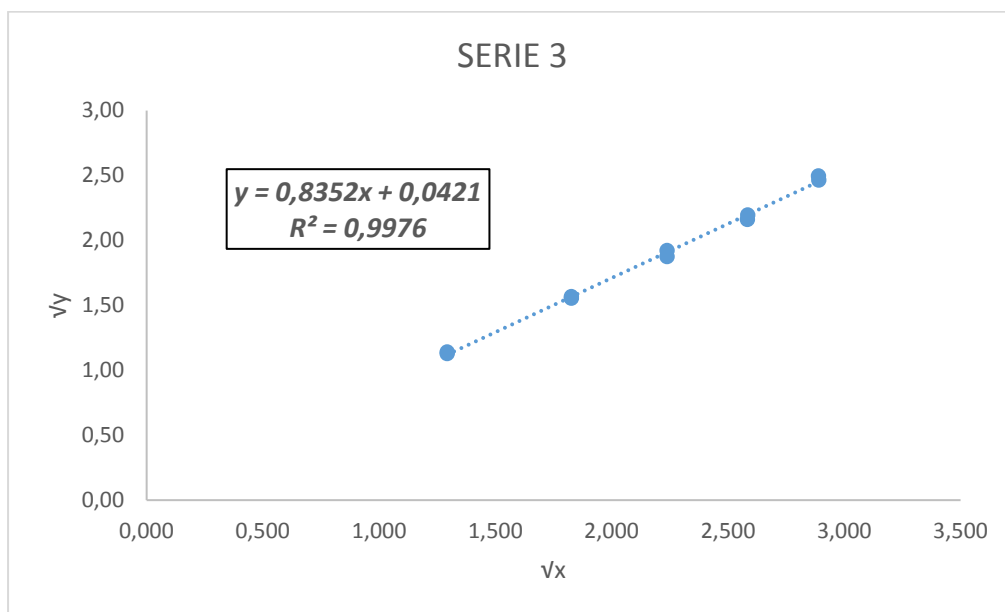


Figure 29 : Courbe d'étalonnage du Paracétamol obtenue avec la fonction  $\sqrt{y} = f(\sqrt{x})$  (Série 3).

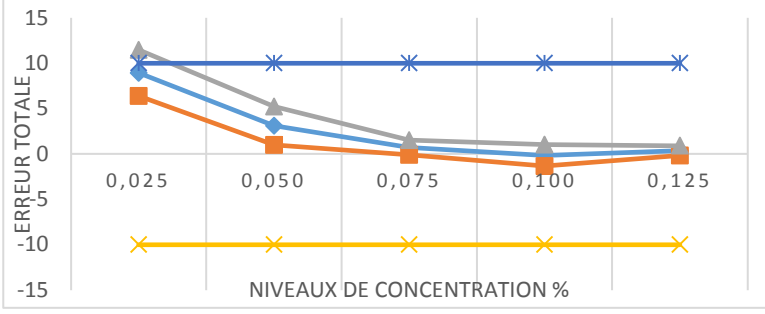
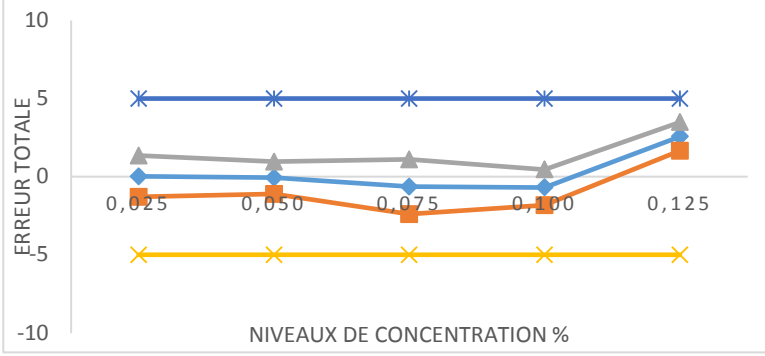
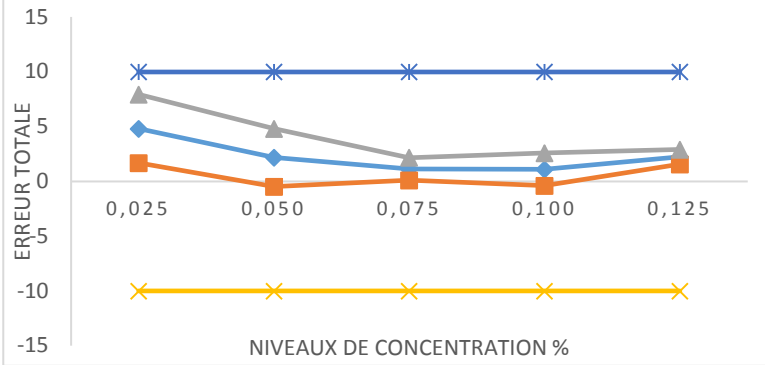
2.5. Profils d'exactitude obtenus

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

2.5.1. Paracétamol

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

Fonction de réponse	Profils d'exactitude	Intervalle de dosage (mg/ml)	Paramètres de validation
$y = ax + b$		[0,025 – 0,125]	$\lambda = \pm 10\%$ $\beta = 90\%$

$y = ax$		<p>[0,035 – 0,125]</p>	<p><math>\lambda = \pm 10\%</math> <math>\beta = 90\%</math></p>
$\ln y = f(\ln x)$		<p>[0,025 – 0,125]</p>	<p><math>\lambda = \pm 5\%</math> <math>\beta = 95\%</math></p>
$\sqrt{y} = f(\sqrt{x})$		<p>[0,025 – 0,125]</p>	<p><math>\lambda = \pm 10\%</math> <math>\beta = 90\%</math></p>

### 2.6. 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 haute ;
- ✓ Une simplicité d'utilisation et de transformation lors du calcul des concentrations.

Pour cela on a choisi :

- La fonction Logarithmique :  $\ln(y/y_{ei}) = f(\ln(x/x_{ei}))$  : un étalonnage sans matrice, en raison de son intervalle de tolérance qui paraît plus étroit que les autres modèles, en plus

du fait qu'il est construit avec 5 niveaux d'étalonnage contrairement au modèle utilisant la fonction  $y = ax$  avec un seul niveau passant par 0.

Le calcul des différents critères de validation est détaillé pour les fonctions choisies, sachant que la même démarche est suivie pour les autres modèles d'étalonnage.

### **2.7. 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 :



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

Niveaux	Répétitions	Séries (Jours)									Moyenne des PE( rapport )
		1			2			3			
		Masse introduite (rapport)	Réponses instrumentales (rapport)	Réponses alignées (rapport)	Masse introduite ( rapport )	Réponses instrumentales (rapport)	Réponses alignées (rapport)	Masse introduite ( rapport )	Réponses instrumentales (rapport)	Réponses alignées (rapport)	
0,025mg/ml	1	0,51	0,25988	0,26353	0,51	0,27121	0,27260	0,51	0,34891	0,34545	0,51
	2	0,51	0,26671	0,26772	0,51	0,25304	0,25596	0,52	0,37345	0,36769	
	3	0,51	0,27439	0,27540	0,51	0,27541	0,27718	0,51	0,33305	0,33036	
0,050mg/ml	1	1,20	0,92593	0,92959	1,20	0,92308	0,92447	1,21	0,96510	0,96164	1,20
	2	1,20	0,92206	0,92307	1,20	0,92497	0,92789	1,21	0,93506	0,92930	
	3	1,20	0,91938	0,92038	1,20	0,92398	0,92576	1,21	0,96791	0,96521	
0,075mg/ml	1	1,60	1,29739	1,30104	1,61	1,30088	1,30227	1,61	1,34542	1,34196	1,61
	2	1,61	1,29481	1,29582	1,61	1,29830	1,30121	1,61	1,35094	1,34517	
	3	1,61	1,31057	1,31158	1,61	1,30068	1,30246	1,61	1,34442	1,34173	
0,100mg/ml	1	1,89	1,57724	1,58090	1,89	1,57588	1,57727	1,90	1,62654	1,62308	1,90
	2	1,90	1,57091	1,57192	1,89	1,57190	1,57482	1,90	1,64432	1,63856	
	3	1,90	1,57067	1,57168	1,89	1,57100	1,57277	1,90	1,64474	1,64204	
0,125mg/ml	1	2,12	1,81533	1,81899	2,12	1,82100	1,82239	2,12	1,83948	1,83602	2,12
	2	2,12	1,81098	1,81199	2,12	1,81258	1,81550	2,13	1,84058	1,83481	
	3	2,12	1,81812	1,81913	2,12	1,81570	1,81748	2,12	1,83834	1,83565	
<b>Pente</b>		<b>0,9469</b>			<b>0,9540</b>			<b>0,9635</b>			
<b>Ord. à l'origine</b>		<b>-0,2142</b>			<b>-0,2168</b>			<b>-0,2559</b>			

## 2.8. Prédications inverses

Les concentrations prédites à partir des réponses alignées sont représentées pour chaque prise d'essai dans le tableau suivant :

**Tableau XXIX** : Rapports de concentrations calculées par prédiction inverse pour le Paracétamol.

Niveaux	Moyenne des concentrations prédites (mg/ml)	Répétitions	Série 1		Série 2		Série 3	
			Réponses alignées (Rapport)	Prédictions inverses (Rapport)	Réponses alignées (Rapport)	Prédictions inverses (Rapport)	Réponses alignées (Rapport)	Prédictions inverses (Rapport)
0,025mg/ml	0,025	1	0,264	1,656	0,273	1,656	0,345	1,656
		2	0,268	1,664	0,256	1,664	0,368	1,664
		3	0,275	1,677	0,277	1,677	0,330	1,677
0,050mg/ml	0,050	1	0,930	3,347	0,924	3,347	0,962	3,347
		2	0,923	3,324	0,928	3,324	0,929	3,324
		3	0,920	3,314	0,926	3,314	0,965	3,314
0,075mg/ml	0,075	1	1,301	4,955	1,302	4,955	1,342	4,955
		2	1,296	4,927	1,301	4,927	1,345	4,927
		3	1,312	5,010	1,302	5,010	1,342	5,010
0,100mg/ml	0,100	1	1,581	6,658	1,577	6,658	1,623	6,658
		2	1,572	6,595	1,575	6,595	1,639	6,595
		3	1,572	6,594	1,573	6,594	1,642	6,594
0,125mg/ml	0,129	1	1,819	8,562	1,822	8,562	1,836	8,562
		2	1,812	8,499	1,815	8,499	1,835	8,499
		3	1,819	8,563	1,817	8,563	1,836	8,563

## 2.9. 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.

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

<i>Niveau de concentration (mg/ml)</i>	0,025	0,050	0,075	0,100	0,125
<i>Moyenne des Concentrations introduites (mg/ml)</i>	0,025	0,050	0,075	0,100	0,125
<i>Moyenne des Concentrations calculées (mg/ml)</i>	0,025	0,050	0,075	0,100	0,129
<i>Biais absolu</i>	0,000	0,000	0,000	-0,001	0,003
<i>Biais relatif (%)</i>	0,020	-0,071	-0,643	-0,684	2,576
<i>Taux de recouvrement (%)</i>	100,020	99,929	99,357	99,316	102,576

## 2.10. Fidélité

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

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

<i>Niveaux de Concentrations</i>	<i>0,025</i>	<i>0,050</i>	<i>0,075</i>	<i>0,100</i>	<i>0,125</i>
<b>Concentration moyenne retrouvé (Rapport)</b>	1,666	3,328	4,964	6,616	8,541
<b>SCE résiduelle</b>	0,001	0,002	0,011	0,008	0,008
<b>SCE totale</b>	0,001	0,002	0,011	0,008	0,008
<b>SCE inter-séries</b>	0	0	0	0	0
<b>Ecart type de répétabilité</b>	0,011	0,017	0,042	0,037	0,037
<b>Ecart type inter-séries</b>	0	0	0	0	0
<b>Ecart type de fidélité intermédiaire</b>	0,011	0,017	0,042	0,037	0,037
<b>CV de répétabilité</b>	<i>0,636</i>	<i>0,500</i>	<i>0,849</i>	<i>0,556</i>	<i>0,430</i>
<b>CV de fidélité intermédiaire</b>	<i>0,636</i>	<i>0,500</i>	<i>0,849</i>	<i>0,556</i>	<i>0,430</i>

### 2.11. 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 :

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

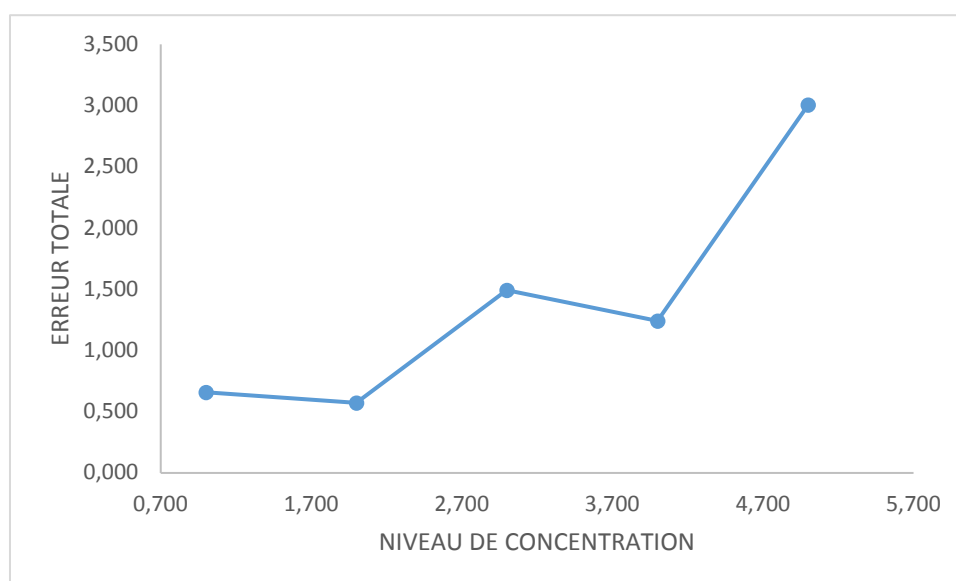
Niveaux %	Répétitions	Séries (Jour)								
		1			2			3		
		Concentration introduite (Rapport)	Concentration prédite (Rapport)	Exactitude relative (%)	Concentration introduite (Rapport)	Concentration prédite (Rapport)	Exactitude relative (%)	Concentration introduite (Rapport)	Concentration prédite (Rapport)	Exactitude relative (%)
0,025 mg/ml	1	1,66	1,656	<b>0,160</b>	1,66	1,656	<b>0,401</b>	1,67	1,656	<b>0,910</b>
	2	1,66	1,664	<b>-0,002</b>	1,66	1,664	<b>-0,202</b>	1,68	1,664	<b>0,705</b>
	3	1,66	1,677	<b>-0,810</b>	1,66	1,677	<b>-0,889</b>	1,67	1,677	<b>-0,427</b>
0,050 mg/ml	1	3,32	3,347	<b>-0,864</b>	3,33	3,347	<b>-0,627</b>	3,34	3,347	<b>-0,123</b>
	2	3,33	3,324	<b>0,100</b>	3,32	3,324	<b>-0,100</b>	3,35	3,324	<b>0,807</b>
	3	3,33	3,314	<b>0,384</b>	3,32	3,314	<b>0,304</b>	3,34	3,314	<b>0,772</b>
0,075 mg/ml	1	4,98	4,955	<b>0,449</b>	4,99	4,955	<b>0,690</b>	5,01	4,955	<b>1,200</b>
	2	4,99	4,927	<b>1,288</b>	4,98	4,927	<b>1,086</b>	5,03	4,927	<b>2,004</b>
	3	4,99	5,010	<b>-0,384</b>	4,99	5,010	<b>-0,464</b>	5,01	5,010	<b>0,001</b>
0,100 mg/ml	1	6,64	6,658	<b>-0,339</b>	6,65	6,658	<b>-0,100</b>	6,69	6,658	<b>0,406</b>
	2	6,65	6,595	<b>0,892</b>	6,64	6,595	<b>0,691</b>	6,70	6,595	<b>1,605</b>
	3	6,65	6,594	<b>0,918</b>	6,65	6,594	<b>0,837</b>	6,68	6,594	<b>1,308</b>
0,125 mg/ml	1	8,29	8,562	<b>-3,121</b>	8,31	8,562	<b>-2,889</b>	8,36	8,562	<b>-2,396</b>
	2	8,32	8,499	<b>-2,129</b>	8,30	8,499	<b>-2,324</b>	8,38	8,499	<b>-1,437</b>
	3	8,32	8,563	<b>-2,864</b>	8,31	8,563	<b>-2,941</b>	8,35	8,563	<b>-2,489</b>

### 2.12. 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 le tableau suivant :

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

<i>Moyenne des concentrations théoriques (mg/ml)</i>	<b>0,025</b>	<b>0,050</b>	<b>0,075</b>	<b>0,100</b>	<b>0,125</b>
<i>Biais relatif (%)</i>	0,020	-0,071	-0,643	-0,684	2,576
<i>Biais relatif en valeur absolue</i>	0,020	0,071	0,643	0,684	2,576
<i>Coefficient de variation de fidélité intermédiaire (%)</i>	0,636	0,500	0,849	0,556	0,430
<b>ERREUR TOTALE (%)</b>	<b>0,656</b>	<b>0,571</b>	<b>1,492</b>	<b>1,240</b>	<b>3,007</b>



**Figure 30** : Profil d'erreur totale du Paracétamol.

### 2.13. Intervalle de tolérance

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

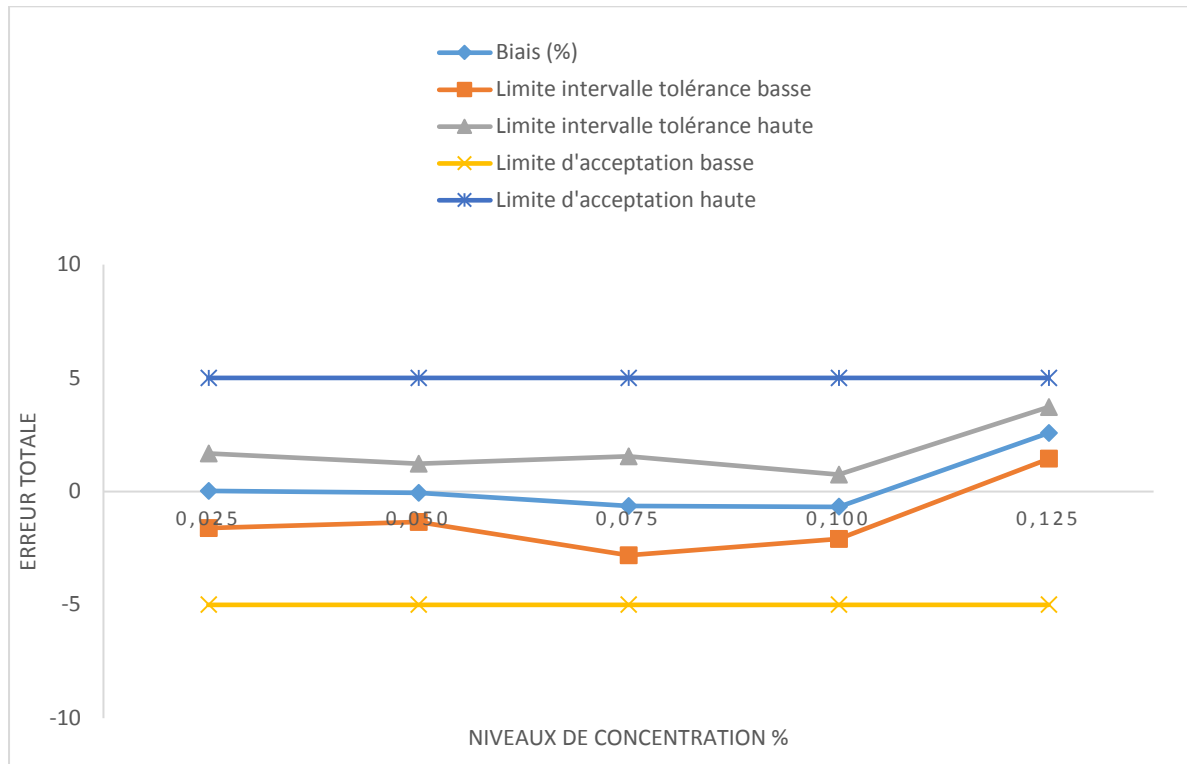
**Tableau XXIV : Limites de tolérance du Paracétamol.**

Niveau de concentration (mg/ml)	0,025	0,050	0,075	0,100	0,125
Limite intervalle tolérance basse (%)	-1,30	-1,11	-2,40	-1,83	1,66
Limite intervalle tolérance haute (%)	1,34	0,97	1,11	0,46	3,49

### 2.14. Profil d'exactitude

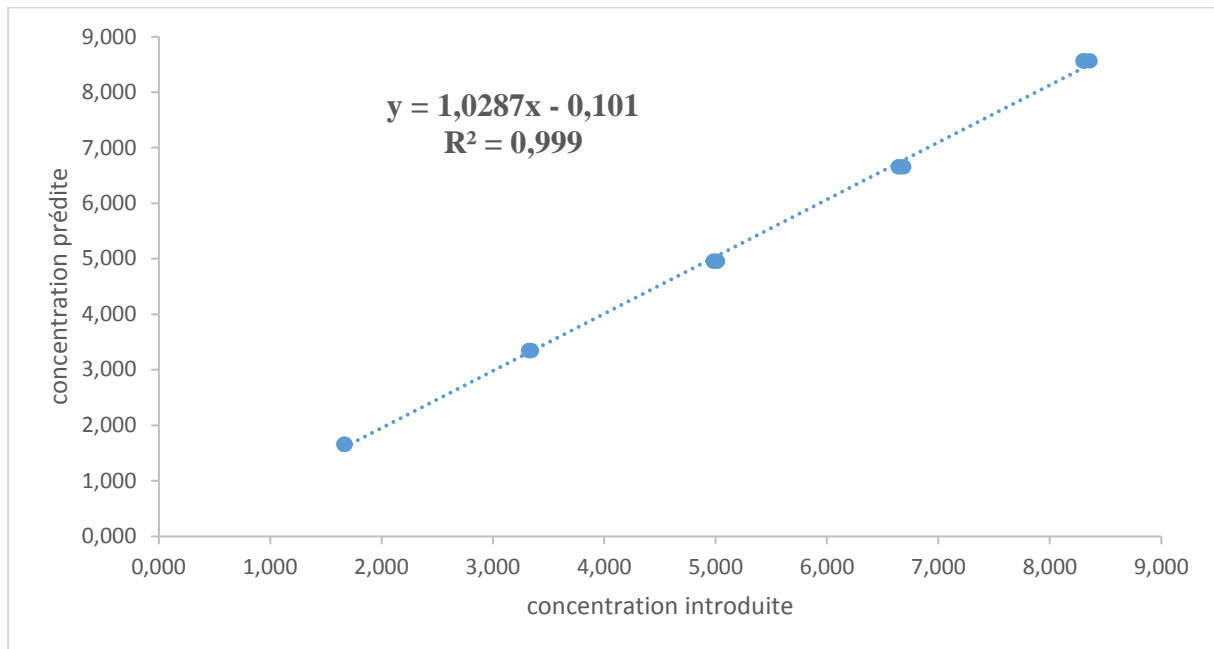
Après le calcul des critères de validation on collecte toutes les données obtenues pour tracer le profil d'exactitude qui réunit le biais relatif, les deux bornes de l'intervalle de tolérance et celles de l'intervalle d'acceptabilité, tous dans une courbe qui donne l'exactitude (%) en fonction des niveaux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

Le profil d'exactitude obtenu en utilisant la fonction choisie sont représentés ci-dessous :



**Figure 31 : Profil d'exactitude du Paracétamol ( $\beta = 95\%$  et  $\lambda = 5\%$ ).**

## 2.15. Linéarité



**Figure 32 :** 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 et l'ordonnée à l'origine avec 0.

**Tableau XXXV :** Evaluation statistique de la linéarité du Paracétamol.

<i>Pente</i>	<b>1,0040</b>		
<i>Ordonnée à l'origine</i>	<b>0,4663</b>		
<i>Erreur pente</i>	<b>0,0108</b>		
<i>Erreur ordonnée à l'origine</i>	<b>0,5451</b>		
Comparaison de la pente avec 0	t calculé	<b>114,46</b>	Différence significative
	$t^\circ(\alpha ; 13)$	<b>2,16</b>	
	Condition	$t \text{ calculé} < t^\circ(\alpha ; 13)$	
Comparaison de l'ordonnées à l'origine avec 0	t calculé	<b>2,04</b>	Différence non significative
	$t^\circ(\alpha ; 13)$	<b>2,16</b>	
	Condition	$t \text{ calculé} < t^\circ(\alpha ; 13)$	

### 2.16. 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 on constate qu'il n'y a pas ses points d'intersections donc la méthode analytique mise au point est valide sur l'ensemble des concentrations évaluées.

- ✓ Les limites de quantification sont : **[0,025 ; 0,125] mg/ml** correspondant à une concentration plasmatique théorique de **[1 ; 5] g/2l** suivant le protocole de dosage établi (en considérant une diurèse moyenne de **2l/24heurs** et une élimination dans les urines de **5%** sous forme inchangée).

### 3. Discussion

#### 3.1. Résolution

La résolution calculée est égale à **7,692**, elle est largement supérieure à 1,5 signifiant une très bonne séparation entre le Paracétamol et la caféine, ce qui justifie l'utilisation de ce dernier comme étalon interne.

#### 3.2. 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 :

##### 3.2.1. Comparaison des chromatogrammes

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

- ✓ L'absence des pics aux temps de rétention du Paracétamol dans les chromatogrammes obtenus à partir des solutions de la matrice et du diluant seuls ;
- ✓ Les temps de rétention correspondants au Paracétamol obtenus sur les chromatogrammes du standard d'étalonnage et du standard de validation d'un même niveau de concentration sont comparables.

##### 3.2.2. 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 XXXV, 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 qui suit :

**Tableau XXXVI :** 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**.

### 3.3. Choix de la fonction de réponse

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  $\ln(Y_i/Y_{ei}) = \ln(X_i/X_{ei})$  : **un étalonnage sans matrice**, ce qui nous a permis de le choisir comme le modèle le plus convenable pour le dosage du Paracétamol dans les urines en utilisant un étalon interne.

#### ❖ Remarque

Il ne faut pas oublier de calculer les concentrations à chaque fois par transformation inverse du logarithme népérien ( $\ln$ ) des résultats obtenus et aussi de multiplier fois la concentration de l'étalon interne (Caféine).

### 3.4. 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 en tenant compte que les biais relatifs de ce dernier sont inférieurs à 3 % confirmant la justesse de notre méthode.

### 3.5. 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%, le degré de dispersion des concentrations prédites obtenues est assez étroit pour tous les niveaux, la méthode est donc **fidèle**.

### 3.6. Erreur totale

Selon le profil d'erreur totale élucidé dans la figure (30), on peut conclure que tous les niveaux de concentration du Paracétamol dans les urines sont inclus dans l'intervalle de validité, vu qu'il présente des erreurs totales relatives acceptables ne dépassant pas les limites d'acceptabilité prédéfinies 15% avec une erreur maximale de 3%.

### 3.7. Profil d'exactitude

En se référant au profil d'exactitude élucidé dans la figure (31), on considère que la méthode utilisée dans ce présent travail est **valide** sur l'intervalle de dosage où le profil d'exactitude est

compris dans les limites d'acceptation, et dans ce cas elle est valide sur l'ensemble des concentrations évaluées.

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.

### **3.8. Limites de quantification et intervalle de dosage**

La méthode est considérée valide dans l'intervalle **[0,025 ; 0,125] mg/ml** correspondant à une dose de **[1 ; 5] g/jour** suivant le protocole de dosage établi (en considérant une diurèse moyenne de **2l/24 heures** et une élimination dans les urines de **5%** sous forme inchangée).

### **3.9. Linéarité**

La linéarité a été évaluée à partir de cinq niveaux de concentration (0,025, 0,050, 0,075, 0,100, 0,125 mg/ml) avec trois répétitions indépendantes pour chaque niveau de concentration.

La droite de régression linéaire obtenue est sous forme  $y = 1,0287x - 0,101$ , où 1,0287 représente la pente de la droite et 0,101 l'ordonnée à l'origine, avec un coefficient de détermination  $R^2$  de 0,999, signifiant ainsi que la variabilité totale de la concentration prédite est expliquée à 99,9% 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. 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, illustrée par le tableau XXXV, a confirmé que la pente est statistiquement différente de 0 et que l'ordonnée à l'origine est comparable statistiquement avec 0 ce qui prouve la validité de la régression et de la linéarité.

# CONCLUSION

## Conclusion

---

La validation d'une méthode bioanalytique constitue une étape importante dans son cycle de vie, car non seulement elle permet de répondre aux exigences réglementaires, mais permet aussi à l'analyste de l'évaluer et d'apprécier le risque statistique lié à son usage futur.

Le guide de validation proposé par la Société Française des Sciences et Techniques Pharmaceutiques (SFSTP) comporte quelques inconvénients, notamment la nécessité d'avoir de bonnes connaissances en statistique. De plus, les méthodes bioanalytiques répondent à des exigences particulières définies par l'agence européenne des médicaments (EMA).

L'objectif de notre étude a été de mettre au point et de valider une méthode de dosage du paracétamol dans les urines par Chromatographie Liquide à Haute Performance (HPLC) en utilisant le profil d'exactitude comme outil de décision, afin d'aider concrètement les laboratoires à l'appliquer en routine pour le suivi thérapeutique du paracétamol en toute fiabilité.

Les résultats obtenus ont répondu à toutes les exigences et performances élaborées dans cette approche harmonisée, notre méthode est spécifique, linéaire et exacte dans l'intervalle de dosage [0,025 ; 0,125] mg/ml avec la probabilité  $\beta=95\%$  et limite d'acceptabilité  $\lambda=5\%$ .

Nous souhaitons que ce travail soit un bon élan de départ pour faire bondir le domaine de la bioanalyse pour le suivi thérapeutique des médicaments, en s'appuyant sur la démarche harmonisée basée sur le profil d'exactitude.

**REFERENCES**  
**BIBLIOGRAPHIQUES**

## Références bibliographiques

---

- [1] Gougain M, Alain M, Boussageon R, Pichering G, Gueyffier F. Effet antalgique aigu du paracétamol en soins primaires : des preuves incomplètes. Service de pharmacologie et toxicologie,UMR 5558, faculté RTH Laennec,8 rue Guillaume Paradin, 69376 Lyon Cedex 08, France. 2018.
- [2] Kuntheavy-Roseline I. Y at-il un rationnel à combiner le paracétamol et un AINS? : Université; 2007.
- [3] Collin C. Le surdosage en paracétamol consécutif à une algie dentaire enquête épidémiologique et revue de littérature. Université de Lorraine faculté d'odontologie. France. 2012.
- [4] Driad Y. Stabilité du paracétamol: application à un sachet produit en industrie pharmaceutique: UHP-Université Henri Poincaré; 2009.
- [5] El Abbouni A. Prise en charge des intoxications au paracétamol : Etude rétrospective sur cinq ans dans le service des urgences adultes du CHU de Nancy. Université de Lorraine faculté de médecine de Nancy.France.2012.
- [6] Pharmacopée Européenne 2008.6ème édition.
- [7] Olive G. Traitement analgésique/antipyrétique: ibuprofène ou paracétamol? Mise au point. Therapies. 2006;61(2):151-60.
- [8] Kerckhove N. Implication des canaux Cav3. 2 dans l'effet antalgique du paracétamol et dans la douleur inflammatoire: Université d'Auvergne-Clermont-Ferrand I; 2013.
- [9] Raffa RB, Pergolizzi JV, Taylor R, Decker JF, Patrick JT. Acetaminophen (paracetamol) Oral Absorption and Clinical Influences. Pain in Practice. 2014. 14(7). 668-677.
- [10] Forrest JA, Clement JA, Prescott LF. Clinical Pharmacokinetics of Paracetamol. Clinical Pharmacokinetics. 1982 ; 7(2) : 93-107.
- [11] Centre de Référence sur les Agents Tératogènes. Hopital Armand Trousseau. Mis à jour le 18 juillet 2019. Disponible sur le site : [www.lecrat.fr](http://www.lecrat.fr)
- [12] Hadengue MSAIA. Paracétamol: toxicité hépatique aux doses thérapeutiques et populations à risque. Rev Med Suisse. 2007;3:32629.

## Références bibliographiques

---

- [13] Claridge LC, Eksten B, Smith A, Shah T, Holt AP. Acute Liver Failure After Administration of Paracetamol at the Maximum Recommended Daily Dose in Adults. *Bmj*. 2010 ; 341.
- [14] Collège national de Pharmacologie Médicale, disponible sur : <https://pharmacomedicale.org/medicaments/par-specialites/item/paracetamol#:~:text=Traitement%20symptomatique%20de%20la%20douleur,la%20classification%20de%20l'OMS>
- [15] Gibb IA, Anderson B. Paracetamol (acetaminophen) pharmacodynamics: interpreting the plasma concentration. *Archives of disease in childhood*. 2008;93(3):241-7.
- [16] Malbos D. Ibuprofen and paracetamol, promoting proper use. *Actualites Pharmaceutiques*. 2020;59(598):20-2.
- [17] Ducouso-Kuntzler S. Tolérance et efficacité du paracétamol par voie sous-cutanée chez des patients en soins palliatifs: étude observationnelle: Université de Lorraine; 2017.
- [18] Oscier C, Milner Q. Peri-operative use of paracetamol. *Anaesthesia*. 2009;64(1):65-72.
- [19] Anderson BJ. Paracetamol (Acetaminophen): mechanisms of action. *Pediatric Anesthesia*. 2008;18(10):915-21.
- [20] Langhendries J-P. Utilisation du paracétamol (acétaminophène) en néonatalogie:(re) découverte d'un ancien principe actif. *Archives de Pédiatrie*. 2015;22(10):1064-71.
- [21] Dalmann R. Etude du mécanisme antalgique du Paracétamol; région cérébrale et mécanisme mis en jeu: Clermont-Ferrand 1; 2015.
- [22] Bergeret A, Bérard F, Nicolas IF, Nosbun A, Hacard H, Jaulent C. Hypersensibilité immédiate allergique au paracétamol. *Revue française d'Allergologie* 2019 ; 59(7) :463-5.
- [23] Capriz F, Chapiro S, David L, Flocciad M, Guillaumée C, Morelf V, et al... Consensus multi disciplinaire d'experts en douleur et gériatrie: utilisation des antalgiques dans la prise en charge de la douleur de la personne âgée (hors anesthésie), *douleurs* 2017 /18 ;234-47.
- [24] Talbert M, Willoquet G, Gervais R. Analgésie\_Rhumatologie. *Guide pharmaco Clinique*. 4ème ed : Le Moniteur des pharmaciens.2015.p.160.

## Références bibliographiques

---

- [25] Bidault M. Prise en charge des intoxications au paracétamol: étude rétrospective sur trois ans dans le service des urgences adultes du CHU de Limoges: Thèse pour le diplôme d'état de Docteur en Médecine]. Université de Limoges ...; 2011.
- [26] Agrawal S, Khazaeni B. Acetaminophen toxicity. Statpearls [internet]. 2021.
- [27] Saccomano SJ. Acute acetaminophen toxicity in adults. Nursing2020 Critical Care. 2019;14(5):10-7.
- [28] Ramlawi M, Marti C, Sarasin F. Intoxication aiguë au paracétamol. Rev Med Suisse 2013 ; 9 : 1478-82.
- [29] Le Garrec S, Burnat P, Gentes P. Le paracétamol. Lyon pharmaceutique. 1994;45(4):227-42.
- [30] Disponible sur le site : <https://www.phytocontrol.com/actualites/les-criteres-de-validation-dune-methode-danalyse/>
- [31] Bouvier J c. validation globale d'une méthode d'analyse quantitative à partir de son profil d'exactitude. Laboratoire du Syndicat Général des Vignerons de la Champagne.
- [32] Guide de validation des méthodes d'analyses. Anses/pr3/07version a.28octobre2015.
- [33] Hubert P, Nguyen-Huu J-J, Boulanger B, Chapuzet E, Chiap P, Cohen N, et al. Harmonization of strategies for the validation of quantitative analytical procedures: a SFSTP proposal—part I. Journal of pharmaceutical and biomedical analysis. 2004;36(3):579-86.
- [34] International Conference of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use. Disponible sur: [www.ich.org](http://www.ich.org)
- [35] Code of Federal Regulations – Parts 210 and 211. FDA. 2 janvier 2004.
- [36] La réglementation des médicaments dans l'Union Européenne (4). Bonnes Pratiques de Fabrication. Médicament à usage humains et médicament vétérinaire ed1998.
- [37] NF EN ISO 17025 (2005) Prescriptions générales concernant la compétence des laboratoires d'étalonnage et d'essais, ISO, Genève.

## Références bibliographiques

---

- [38] Pinguet I. Validation analytique : Application de la procédure SFSTP 2003-2006 au domaine de la phytothérapie. Université de Bordeaux UFR des sciences pharmaceutiques.2015.
- [39] VIAL J. Définition de la validation de méthodes et outils associés. Journée de formation scientifique en spectrométrie atomique. Paris. 2006 : 6.
- [40] Feinberg M, Laurentie M. Validation des méthodes d'analyse quantitative par le profil d'exactitude. Numero special du cahier des techniques de l'Inra. 2010.
- [41] Ducause C, Baillet-Guffroy A, X.Bui T.Choix et Validation Méthode.AgroParisTech.
- [42] Bouklouze A, Cherrah Y. Validation des procédures analytiques selon la nouvelle approche basée sur l'erreur total (profil d'exactitude). Les technologies de Laboratoire. 2009;4(14).
- [43] Kaouni H.Etude comparative de la validation d'une méthode de dosage d'Amlodipine besilate dans une spécialité pharmaceutique par hplc/uv démarche classique vs nouvelle démarche.Université Mohammed V.Rabat.
- [44] Longtin J. Vérification et Validation des Méthodes Analytiques. Laboratoire de Santé Publique du Québec : 12.
- [45] Sahraoui N, Mimoun N. Validation analytique d'une méthode de dosage du Diclofénac de sodium dans les suppositoires de 100 mg par HPLC. Université Mouloud Mammeri. Tizi ouzou. 2016.
- [46] Hubert P, Nguyen-Huu J-J, Boulanger B, Chapuzet E, et al. Harmonization of strategies for the validation of quantitative analytical procedures: statistics- Part II. 2006.
- [47] Rozet E, Hubert C, Ceccato A, Dewé W, Ziemons E, Moonen F, et al. Using tolerance intervals in pre-study validation of analytical methods to predict in-study results: The fit-for-future-purpose concept. Journal of Chromatography A. 2007;1158(1-2):126-37.
- [48] Couderc S, Picard N. Le suivi thérapeutique pharmacologique. Actualités Pharmaceutiques. 2017;56(570):47-50.
- [49] Nicolas A, Nancy F, PU-PH honoraire, Université de lorraine. Bioéquivalence -Enjeux et Defis.Congrès International du Laboratoire National du Contrôle des Médicaments.Tunis.5-6 avril.

## Références bibliographiques

---

- [50] Widmer N, Csajka C, Werner D, Grouzmann E, Decosterd LA, Eap CB, et al. Principles of therapeutic drug monitoring. *Revue medicale suisse*. 2008;4(165):1644-8.
- [51] Nicolas O, Farenc C, Bressolle F, editors. Stratégie de validation de méthodes de dosage en bioanalyse en vue d'études pharmacocinétiques et toxicologiques. *Annales de toxicologie analytique*; 2004: EDP Sciences.
- [52] Deshpande MM, Kasture VS, Mohan M, Chavan MJ. Bioanalytical Method Development and Validation: A. *Recent Advances in Analytical Chemistry*. 2019:97.
- [53] Heinig K, Miya K, Kamei T, Guerini E, Fraier D, Yu L, et al. Bioanalysis of alectinib and metabolite M4 in human plasma, cross-validation and impact on PK assessment. *Bioanalysis*. 2016;8(14):1465-79.
- [54] Deshpande MM. Analytical, Bioanalytical, Stability-Indicating Methods: Key Part of Regulatory Submissions. *Analytical Chemistry-Advancement, Perspectives and Applications*: IntechOpen; 2020.
- [55] Abdessadek M, Magoul R, Amarti A, El Ouezzani S, Khabbal Y, editors. Personnalisation posologique des médicaments Quel apport du suivi thérapeutique pharmacologique? *Annales de Biologie Clinique*; 2014.
- [56] Villoing B. Intoxication au paracétamol. *Urgences on ligne*. 23 février 2019.
- [57] Zhou W, Yang S, Wang PG. Matrix effects and application of matrix effect factor. *Future Science*; 2017.
- [58] Marion S. Validation par HPLC de méthode de prélèvement et d'analyse pour la recherche de trace de principe en amont de la fabrication industrielle de forme sèches. *Faculté des sciences pharmaceutiques et biologique de Lille*. 2011.
- [59] Bensakhria A. *Chromatographie Liquide Haute Performance (HPLC)*. Analytical Toxicology. 2016.
- [60] Colomb F. HPLC Principe et appareillage. *Biotechnologie & Biologie et Physiopathologie humaine*. Académie de Rouen. 2010.
- [61] Ladram A, Camus G. *La chromatographie. Manipulations en laboratoire*. 2012.

## Références bibliographiques

---

[62] Brière T. Cours de chromatographie liquide. Département de chimie, université de la Réunion.

[63] Bennani M.N. Techniques d'Analyses chromatographiques. Laboratoire de Chimie-Biologie Appliquée à l'Environnement. Equipe de Matériaux et Catalyse Appliqués. Université Moulay-Ismaïl. Faculté des Sciences Maknes. Département de Chimie.

[64] Efficacité des colonnes de chromatographie, disponible sur : [www.lachimie.fr](http://www.lachimie.fr)

# ANNEXES

La chromatographie liquide à haute performance est la technique de séparation la plus utilisée. Cette popularité est due à sa sensibilité, sa facilité d'adaptation à des analyses quantitatives précises, au fait qu'elle permet la séparation d'espèces non volatiles ou fragiles au point de vue thermique, et par-dessus tout, à son intérêt primordial dans l'industrie, ainsi que dans de nombreux domaines scientifiques et institutionnelles. Elle permet par exemple l'analyse de composés aussi variés que les acides aminés, les protéines, les acides nucléiques, les hydrocarbures, les hydrates de carbone, les pesticides, les antibiotiques, les stéroïdes, ainsi que de nombreuses substances inorganiques [58].

### 1. Principe

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

La phase mobile poussée par une pompe sous haute pression, parcourt le système chromatographique.

Le mélange à analyser est injecté puis transporté au travers du système chromatographique.

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 un pic. L'ensemble des pics enregistrés est appelé chromatogramme [58].

### 2. Appareillage

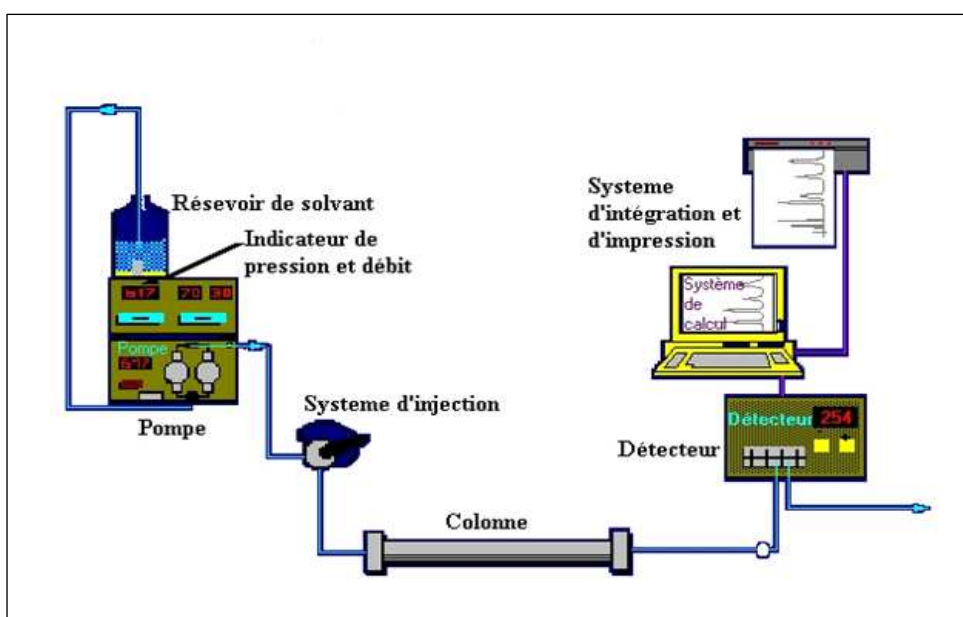


Figure : Schéma illustrant le principe d'une chaîne d'HPLC [58].

---

Une chaîne HPLC comporte plusieurs modules spécialisés :

- Un réservoir de solvant ;
- Une pompe, un injecteur ;
- Un détecteur ;
- Un système d'exploitation des données ;
- Une colonne qui représente le cœur d'un appareil HPLC.

Ces différents modules sont reliés entre eux par l'intermédiaire de canalisations de très faible diamètre (0.1mm) pour assurer la circulation de la phase mobile. Elles peuvent être en acier inoxydable ou en polyether-etherketone (PEEK), un polymère souple et coloré qui résiste aux solvants usuels, même sous des pressions élevées (350 bars) [58].

### **2.1. Réservoirs de phase mobile (éluant)**

Une chaîne HPLC est équipée d'un ou plusieurs réservoirs contenant chacun un certain volume de solvant. On y adjoint souvent des dispositifs qui permettent d'éliminer les poussières et les gaz dissous des solvants.

En effet, la présence, dans les solvants, des gaz ambiants ( $N_2$ ,  $O_2$ ,  $CO_2$ ...), dissous en quantité non négligeable, peut perturber les séparations par modification de la compressibilité des éluants et formation des bulles. En outre le dioxygène abrège la vie des colonnes et est gênant pour les détecteurs photométriques ultraviolet (UV) et électrochimiques. Il est donc préférable de dégazer les solvants, soit avec les ultrasons soit par barbotage d'hélium, soit par diffusion en les faisant passer dans un long tube de petit diamètre en polymère perméable au gaz.

Le système contient souvent un ensemble de filtres permettant d'éliminer les poussières et les solides dispersés dans le solvant afin d'empêcher que ces particules n'endommagent la pompe et le système d'injection ou ne bouche la colonne [58].

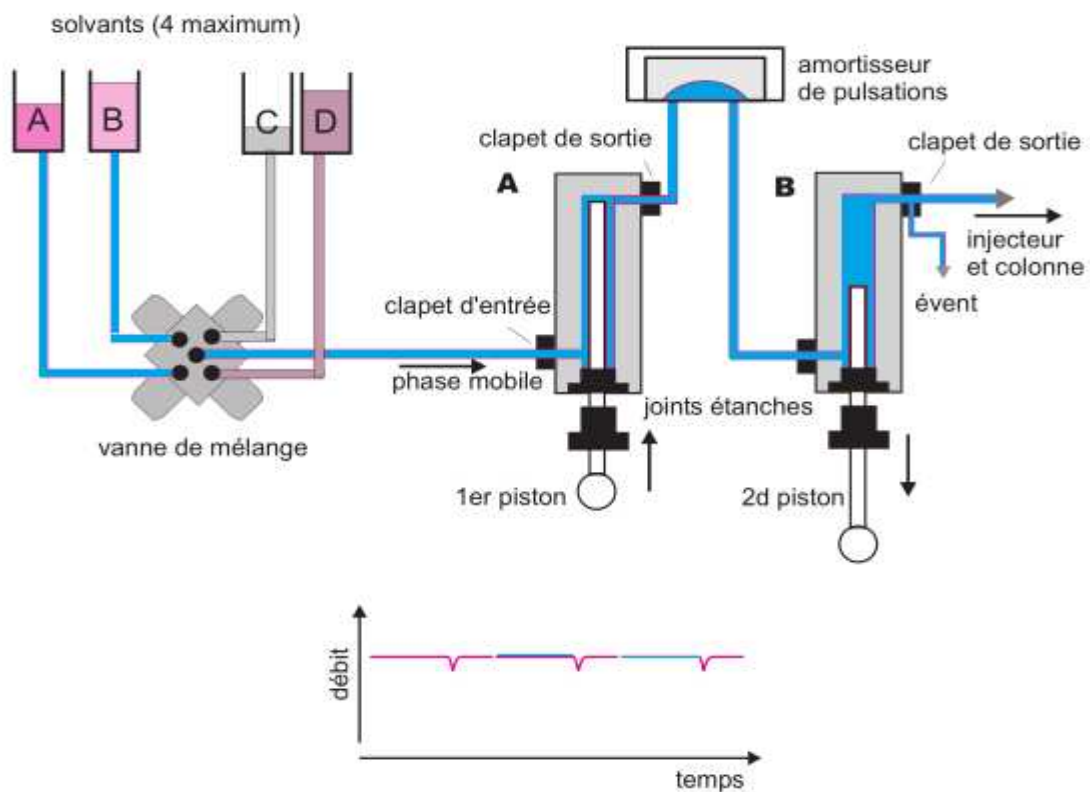
### **2.2. Système de pompage**

Toute installation de HPLC comporte au moins une pompe pour forcer le passage de la phase mobile à travers la colonne dont le remplissage est très compact. Il en résulte une pression importante au niveau de l'injecteur qui peut atteindre et même dépasser 40MPa (400 bars) selon le débit imposé à la phase mobile, sa viscosité ainsi que selon la nature de la phase stationnaire.

Suivant leur conception, les chromatographes comportent une ou plusieurs pompes. Associées à une chambre de mélange située en amont et en aval, elles permettent de délivrer un éluant de composition fixe (mode isocratique) ou au contraire de composition variable en cours d'analyse (mode gradient d'élution).

En HPLC, le système de pompage doit répondre à des exigences rigoureuses :

- Atteindre des pressions d'au moins 420 bars ;
- Être exempt d'impulsion ;
- Imposer des débits allons de 0.1 à 10 ml/min ;
- Contrôler le débit et sa reproductibilité ;
- Résister à la corrosion et aux solvants [58].



**Figure :** Principe de fonctionnement d'une pompe à deux têtes en série [59].

### 2.3. Injecteur

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

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

Des tubes en acier inoxydable, en Teflon, en PEEK ou en silice fondue permettent de relier la ou les pompes à l'injecteur chromatographique. Il y a plusieurs types d'injecteurs :

- Boucle d'injection : permet la répétabilité du volume d'injection ;
- Injecteur seringue ;
- Extraction sur phase solide en ligne [59].

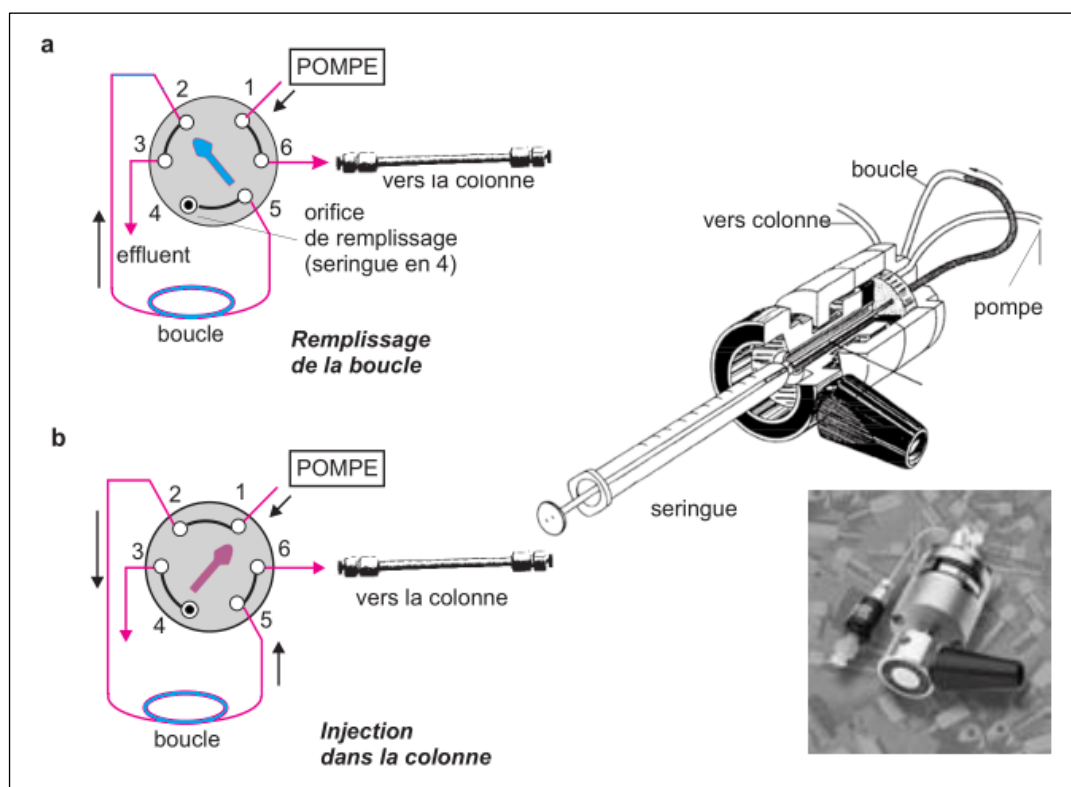


Figure : Injecteur avec une boucle [59].

## 2.4. Colonne

En mode analytique, les colonnes en inox ont généralement un diamètre interne de 4,6mm. La longueur est de 5, 10, 15, ou 25cm. Le remplissage (en silice, silice greffée ou particules polymériques) a une granulométrie de 3, 5, ou 10 $\mu$ m. Le diamètre interne d'une colonne est usuellement de 4 ou 4,6 mm, mais si des substances pures doivent être collectées en fin de chromatogramme, des colonnes de gros diamètre seront nécessaires [60].

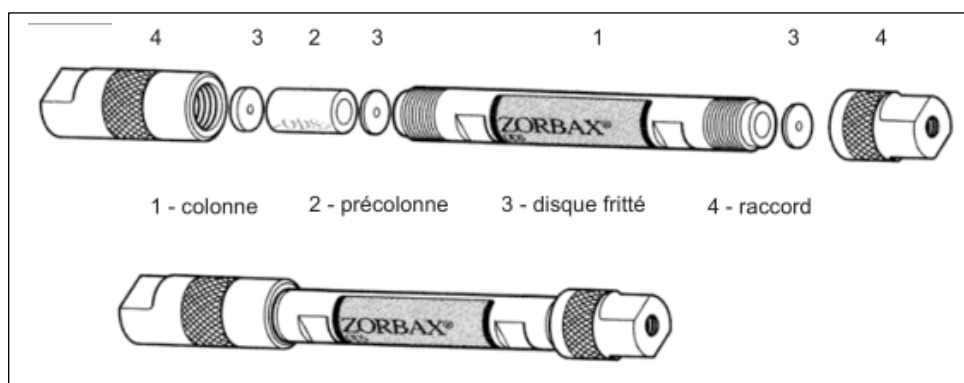


Figure : Modèle d'une colonne standard avec précolonne [59].

## 2.5. Phase stationnaire [61]

Il existe deux possibilités : soit la phase stationnaire est polaire (on parle de HPLC en phase normale), soit elle est apolaire (on parle de HPLC en phase inverse).

### 2.5.1. En phase normale

Les colonnes sont souvent constituées de fines particules (augmentation de la surface de contact) de gel de silice, qui portent des fonctions silanols polaires (-OH). Ce matériau a cependant un inconvénient : il se dégrade avec le temps, ce qui impacte la reproductibilité des résultats.

### 2.5.2. En phase inverse

On utilise souvent de fines particules de gel de silice mais sur lesquelles on a greffé, sur les groupements -OH, des chaînes apolaires (alkyles en C<sub>4</sub>, C<sub>6</sub>, C<sub>8</sub>, C<sub>18</sub>, Phényl, Cyano, etc.). Outre le fait que cela rend le support apolaire, cela permet également de le stabiliser dans le temps. En fonction des chaînes greffées, on obtient des colonnes plus ou moins hydrophobes que l'on choisira selon la nature des molécules à séparer.

**Tableau :** Caractéristiques d'une HPLC en phase normale et en phase inverse [61].

	HPLC en phase normale	HPLC en phase inverse
<b>Phase stationnaire</b>	Polaire	Apolaire
<b>Phase mobile (mode gradient)</b>	Gradient de plus en plus polaire	Gradient de plus en plus apolaire
<b>Elution des composés</b>	Les plus polaires sont élués en dernier	Les plus apolaires sont élués en dernier

## 2.6. Phase mobile [61]

Comme solvant polaire, on utilise le plus souvent l'eau. Les solvants apolaires sont beaucoup plus nombreux et seront choisis en fonction des molécules à séparer. Ils sont plus ou moins apolaires selon les cas. L'hydrophilie/hydrophobicité recherchée est obtenue par un mélange de ces différents solvants dans des proportions choisies. La phase mobile peut être binaire (eau + un solvant organique) ou ternaire (eau + deux solvants organiques). La colonne peut être éluée avec un mélange qui ne varie pas au cours du temps (on parle de mode isocratique) ou au

contraire qui varie au cours du temps (mode gradient), en modifiant les proportions relatives des solvants polaire et apolaire.

## 2.7. Détecteur [62]

Il existe de nombreux types de détecteurs mais tous doivent avoir un certain nombre de caractéristiques pour pouvoir être utilisés :

- Réponse proportionnelle à la concentration de la substance détectée ;
- Sensibilité élevée : c'est la pente de la droite : réponse = f (Concentration), plus cette pente sera élevée et plus le détecteur sera sensible à de faibles variations de concentration ;
- Inertie la plus faible possible : le détecteur doit avoir une réponse rapide et réagir instantanément aux variations de la concentration. Il doit également avoir un volume mort aussi petit que possible ;
- Grande stabilité du signal : ligne de base horizontale (dérive minimale) et la moins bruitée possible.

Pour qu'un pic soit exploitable, on considère généralement que son rapport signal / bruit doit être au moins de trois.

Le bruit se traduit par des oscillations plus ou moins marquées autour de la ligne de base, ce bruit de fond aléatoire provient de diverses causes : variation de température, de la pression, instabilité électronique, etc...

Par ailleurs on doit avoir une ligne de base aussi proche que possible de l'horizontale c'est la dérive de la ligne de base.

### 2.7.1. Détecteur par spectroscopie UV-Visible

Il mesure l'absorbance absolue d'un solvant + soluté ou la différence d'absorbance entre le solvant et le solvant + soluté (en présence d'une cellule de référence) à longueur d'ondes fixe de 254 ou 280 nm ou à longueur d'ondes variable entre 190 et 800 nm ou à longueurs d'ondes multiples comme les réseaux de diodes.

Ce type de détection U.V est le plus répandu, il présente de nombreux avantages :

- Très forte sensibilité : on peut détecter des analytes jusqu'à des concentrations de l'ordre de 8-10 mol/l ;
- Grande sélectivité : on peut, en choisissant bien sa longueur d'onde, ne détecter que le

produit qu'on veut analyser ce qui simplifie le chromatogramme en supprimant les pics indésirables ;

- Les détecteurs pouvant mesurer l'absorbance à quatre longueurs d'ondes simultanément ou ceux à réseau de diodes traçant le spectre permettent de s'assurer de l'homogénéité d'un pic et ainsi se rendre compte d'une possible co-élution simultanée de deux composés différents non résolus ;
- Renseignements spectraux sur les substances par le spectre UV (réseau de diodes) ;
- Peu sensible aux variations de débit et de température ;
- Utilisation et entretien facile ;
- peut être utilisé en mode gradient d'élution.

L'inconvénient principal est que pour pouvoir être détectée, la substance doit posséder des groupements chromophores (doubles liaisons par exemple).

### **2.7.2. Détection monochromatique**

La détection ne se fait alors que pour une seule longueur d'onde.

Le modèle de base est composé de :

- Une source monochromatique (lampe au deutérium ou au mercure) ;
- Monochromateur isolant une bande étroite (10 nm) ou une raie (raie à 254 nm du mercure par exemple) ;
- D'une cellule de circulation de volume faible (5 ml) avec un trajet optique de 1 mm à 1 cm ;
- D'un analyseur optique (photo multiplicateur ou photodiode).

### **2.7.3. Détection polychromatique**

Les détecteurs plus perfectionnés permettent d'acquérir simultanément le spectre à plusieurs longueurs d'ondes ou de changer de longueur d'onde en cours d'analyse.

On peut aussi, grâce à un réseau de diodes, mesurer l'absorbance simultanément dans tout un domaine du spectre, on obtient ainsi le spectre UV de l'analyte, ce qui permet son identification.

Dans la pratique les spectres sont stockés en mémoire et sont visualisables par la suite à l'aide d'un logiciel approprié. On obtient un «spectro-chromatogramme» en trois dimension » : tr, A,  $\lambda$ .

#### 2.7.4. Détecteur fluorométrique

Certaines substances sont fluorescentes, c'est à dire qu'elles réémettent sous forme de lumière une partie de l'énergie qu'elles reçoivent d'une source lumineuse excitatrice. On observe la lumière réémise dans une direction perpendiculaire à celle de la source excitatrice, l'intensité lumineuse est proportionnelle à la concentration de la substance si cette concentration est suffisamment faible.

Ce type de détecteur est très sensible (100 à 1000 fois plus que le détecteur U.V) et est très sélectif. On peut étendre son champ d'application en transformant par une réaction appropriée une substance non fluorescente en une autre qui le sera. Environ 15% des composés chimiques sont naturellement fluorescent ce qui restreint quelque peu son utilisation. Ce type de détecteur est utilisable en mode gradient.

#### 2.7.5. Détecteur réfractométrique

Il mesure la variation de l'indice de réfraction entre l'éluant pur et l'éluant en sortie de colonne. La présence d'un analyte modifie l'indice de réfraction et le composé peut être détecté. Il est pratiquement universel mais très peu sensible, il est plus sensible aux variations de températures. Il est inutilisable en mode gradient sauf si les solvants utilisés ont des indices de réfraction très proches. Les pics obtenus peuvent être positifs ou négatifs selon que l'indice de réfraction augmente ou diminue.

Il existe d'autres types de détecteurs : Conductimétriques , infra-rouge, light scattering, électrochimiques, RMN et spectrométrie de masse.

#### 2.8. Intégrateur- enregistreur

Il s'agit en fait d'un petit ordinateur qui récupère toutes les données issues des détecteurs, trace les chromatogrammes, intègre la surface des pics et enfin, il imprime un rapport d'analyse donnant les temps de rétention et les surfaces de chaque pic.

On peut le programmer pour qu'il fasse seul les divers calculs conduisant aux concentrations à partir de chromatogrammes étalon et des chromatogrammes des mélanges analysés. Lorsque les pics sont mal séparés on peut par approximation gaussienne déduire la surface des pics individuels et donc évaluer tout de même les concentrations. Ce type d'appareil évolue constamment pour devenir plus performants [62].

### 3. Domaines d'application de l'HPLC

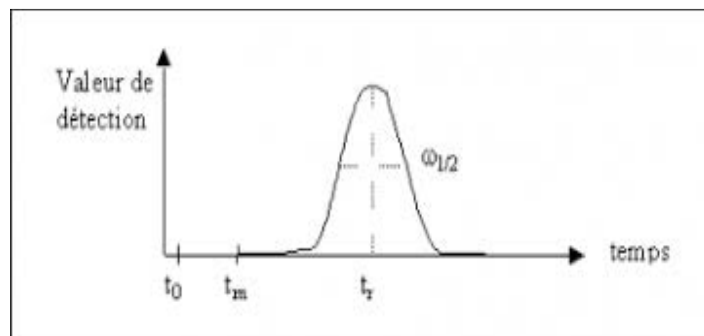
Grace à ses grandes performances, l'HPLC est largement utilisée dans divers domaines, notamment en :

- Industrie chimique ;
- Agro-alimentaires ;
- Environnement ;
- Pharmacie ;
- Biochimie [63].

### 4. Applications de la chromatographie

#### 4.1. Information apportée par un chromatographe [60]

##### 4.1.1. Notion du temps



**Figure :** Représentation des différentes notions de temps d'un pic chromatographique [60].

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

### 4.1.2. Notion de concentration

Le coefficient de partage K :

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

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

Ce coefficient est fonction de 3 types d'affinités :

- Celle entre le soluté et la phase mobile ;
- Celle entre le soluté et la phase stationnaire ;
- Celle entre les phases mobile et stationnaire.

Le facteur de capacité  $K'$  est le rapport de la quantité d'un soluté dans la phase stationnaire et dans la phase mobile.

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

$V_s$  : volume de la phase stationnaire

$V_m$  : volume de la phase mobile ou volume mort

$K'$  est aussi le rapport du temps passé par un soluté dans la phase stationnaire sur le temps passé par ce même soluté dans la phase mobile.

## 4.2. Analyse qualitative

### 4.2.1. Notion d'efficacité ou performance d'une colonne

La largeur d'un pic est caractéristique de l'efficacité de la séparation. Plus le pic est fin plus la chromatographie est efficace [58].

L'efficacité d'une colonne de chromatographie peut s'exprimer par le nombre N de plateaux théoriques qu'elle possède. Plus le nombre de plateaux est élevé, plus la colonne est efficace.

On définit également la hauteur équivalente de plateaux théoriques (HEPT) :  $H = L/N$

Avec la longueur de la colonne. Plus la hauteur de plateau H est faible, plus la colonne est efficace.

Plusieurs relations dans le cas de pics symétriques (gaussien) permettant de calculer le nombre de plateaux théoriques en fonction des grandeurs de rétention utilisées [64] :

$$N = 16 (tr / \omega)^2 = 5.54 (tr / \delta)^2$$

Il existe de nombreux facteurs qui peuvent entraîner l'élargissement des pics, entre autres :

. **La diffusion turbulente** : l'élargissement est expliqué par le fait qu'il existe différents chemins parcourus par les molécules d'un soluté. La longueur des chemins n'étant pas la même, elles ne mettent pas toutes le même temps pour traverser la colonne, le pic s'élargit. Ce phénomène est fonction des particules et de régularité du remplissage.

. **La résistance au transfert de masse** : l'élargissement est expliqué par l'accumulation de phase mobile dans les anfractuosités du support. Les molécules qui y diffusent vont moins vite que celle qui n'y diffusent pas.

. **La diffusion longitudinale** : ce phénomène diminue quand la vitesse de la phase mobile augmente. Dans la pratique cette diffusion est négligeable en HPLC.

En conclusion l'efficacité calculée d'une chromatographie, représentée par la HEPT, est fonction de la vitesse de la phase mobile donc de débit, et de la qualité (régularité, remplissage) de la phase stationnaire [58].

#### 4.2.2. Qualité de la séparation [58]

Une bonne séparation se traduira par une séparation distincte des pics correspondant à chacun des produits. On peut l'apprécier statistiquement en calculant certaines notions à savoir la sélectivité et la résolution.

##### 4.2.2.1. Sélectivité $\alpha$

Pour calculer ce facteur, on doit tout d'abord définir un premier paramètre, le facteur de capacité  $k'$  :  $k' = (t_r - t_0) / t_0$

Le facteur de la sélectivité  $\alpha$ , qui mesure l'aptitude de la colonne à séparer les composés 1 et 2 est égale à :  $\alpha = k'_2 / k'_1$

Les valeurs de  $\alpha$  sont en général comprises entre 1.05 et 2. Si la colonne est efficace (N élevé), des valeurs supérieures ne sont pas nécessaires.

##### 4.2.2.2. Résolution R

Le but de la chromatographie est bien évidemment de séparer les composés. L'efficacité de cette séparation est appréciée par le paramètre appelé résolution R :

$$R = 2(t_2 - t_1) / (\omega_2 + \omega_1)$$

Deux composés sont séparés si la différence de leurs temps de rétention est supérieure ou égale à la somme des demi-largeurs des pics ( $R >$  ou  $=$  à 1). En fait, étant données la forme des pics

(des gaussiennes) pour  $R=1$  il y a 2% de recouvrement des composés. Une séparation totale nécessiterait  $R > \text{ou} = \text{à } 1,5$ .

En combinant les différentes équations précédentes, on peut exprimer la résolution sous la forme :

$$R = 1/4\sqrt{N} [ (\alpha - 1) / \alpha ] [ k' / (1+k') ]$$

Cette relation comporte trois termes : l'efficacité  $N$ , la sélectivité  $\alpha$ , le facteur de capacité  $k'$ .

On peut jouer sur ces trois termes pour réaliser une séparation de deux composés :

- En utilisant des colonnes plus performantes ( $N$  élevé) et plus longues ;
- En prenant des solvants peu éluant ( $k'$  élevé) mais il ne sert à rien d'aller au-delà de  $k'=10$  ; ceci augmente la durée des analyses ;
- En choisissant avec discernement une colonne et un solvant appropriés, c'est-à-dire en jouant sur la sélectivité (c'est le point le plus important et c'est là qu'intervient l'expérience de l'utilisateur).

### 4.3. Analyse quantitative [62]

La surface d'un pic est proportionnelle à la quantité injectée de l'analyte correspondant. On doit au préalable s'assurer que cette condition indispensable est bien remplie. Le détecteur ne donne une réponse linéaire que pour une certaine gamme de concentrations, on doit donc impérativement se placer dans cette zone de réponse linéaire et mettre au point les dilutions nécessaires de l'échantillon et des étalons pour qu'il en soit ainsi.

On a alors :

$$A = K_m \cdot M$$

Avec :

$A$  : aire de pic.

$M$  : masse de composé injectée.

$K_m$  : coefficient de réponse massique du détecteur dans les conditions utilisées.

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

$$A = K_c \cdot C$$

Avec :

A : air du pic.

C : concentration du composé injectée.

Kc : le coefficient de réponse du détecteur.

## TABLE DE STUDENT

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

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

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

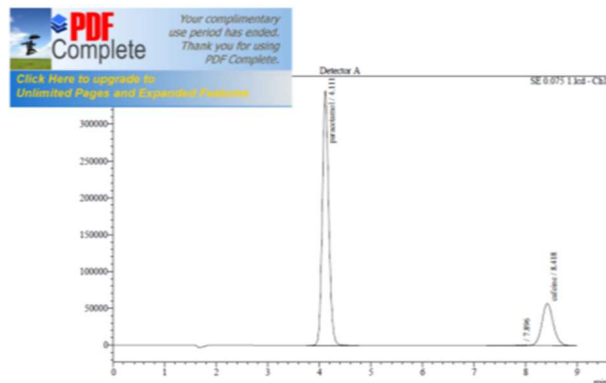
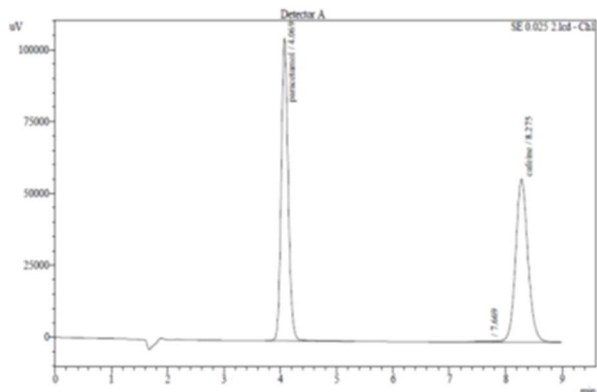
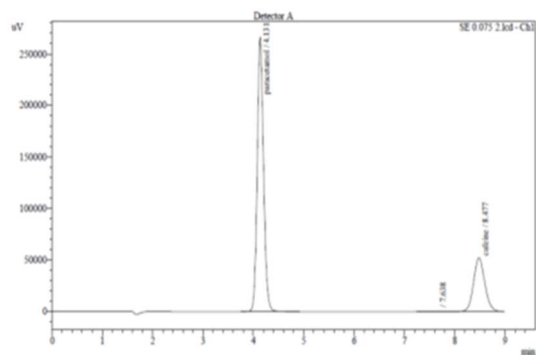
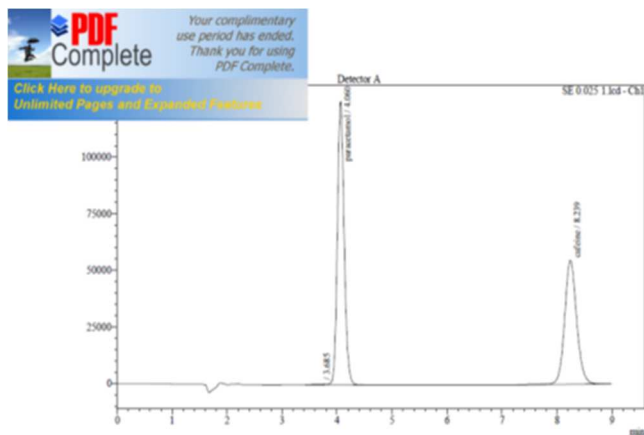


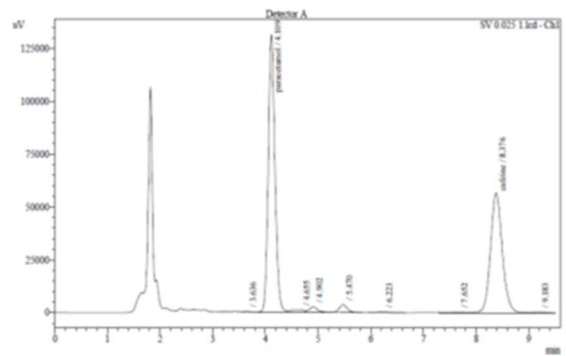
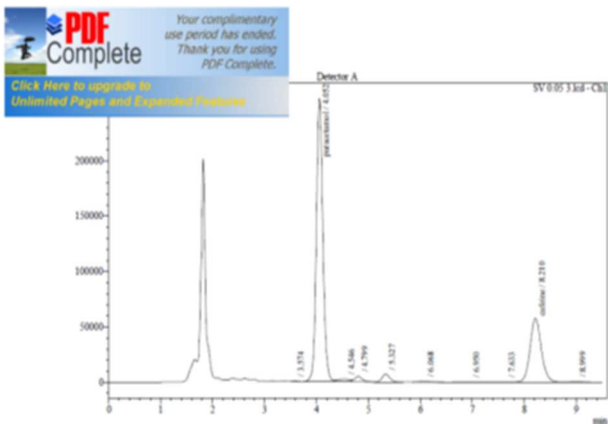
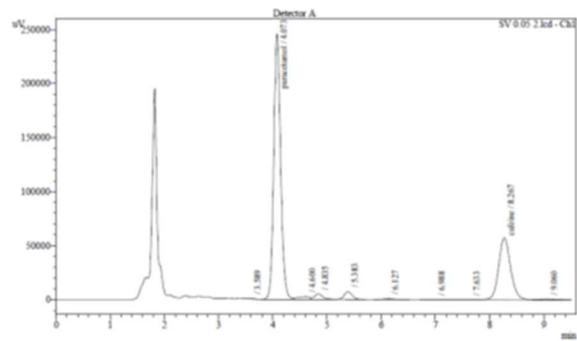
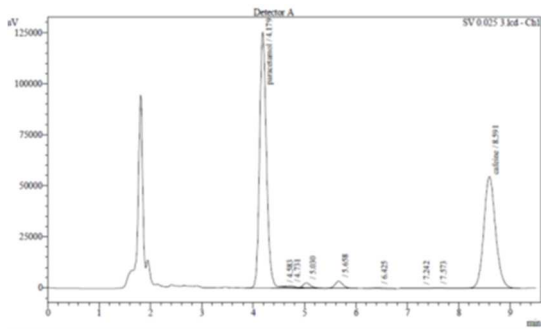
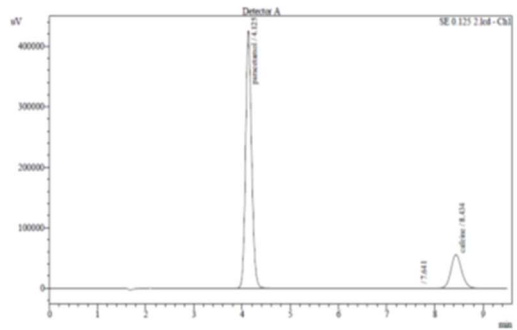
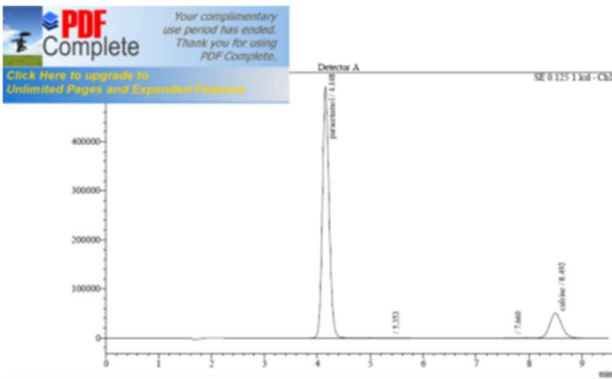
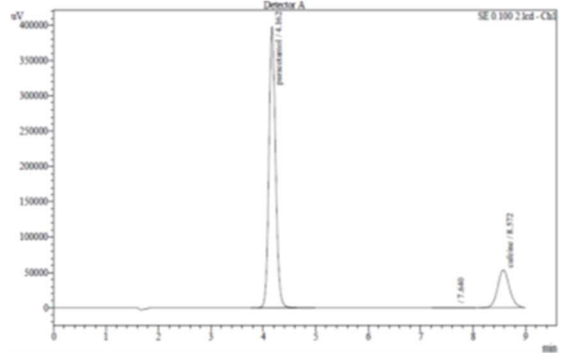
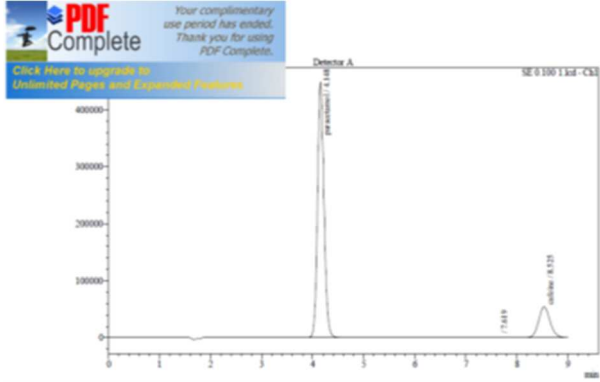
Jour 01 : Série 01

Sample Information

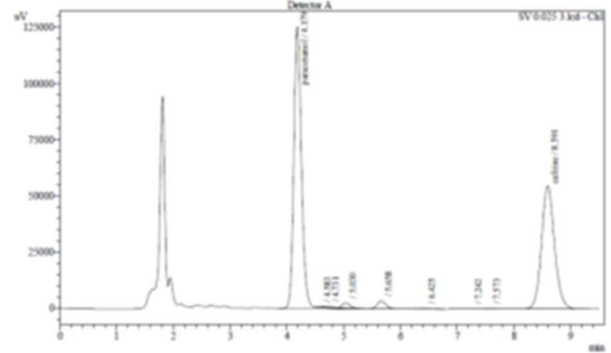
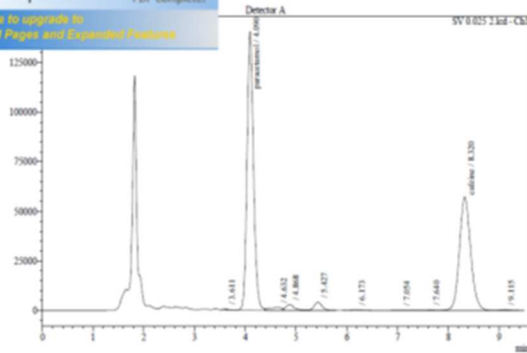
Acquired by : Admin  
 Sample Name : SE 0.05 1  
 Sample ID : SE  
 Tray# : 1L  
 Vial# : 3  
 Injection Volume : 20 uL  
 Data Filename : SE 0.05 1.lcd  
 Method Filename: paracetamol-urine.lcm  
 Batch Filename : BATCH  
 SERIE 01 FINALE.lcb Report  
 Filename : Default.lcr  
 Date Acquired :  
 20/06/2021  
 Data Processed :  
 20/06/2021

Summary (Concentration)

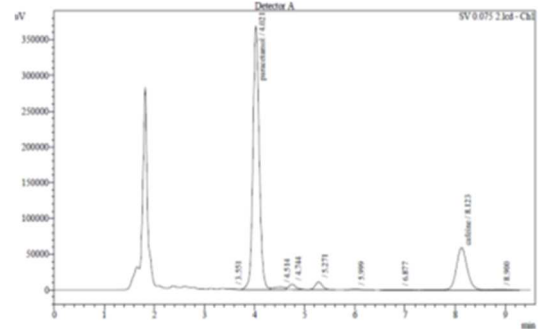
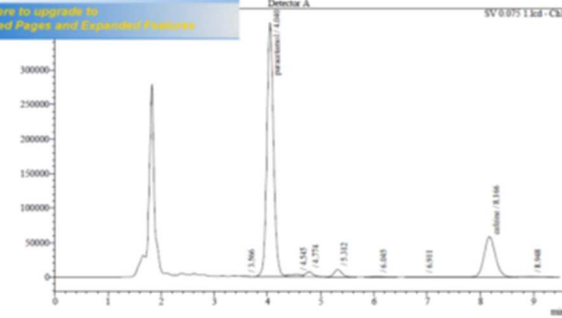




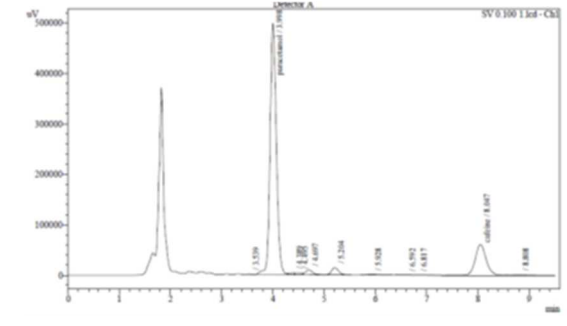
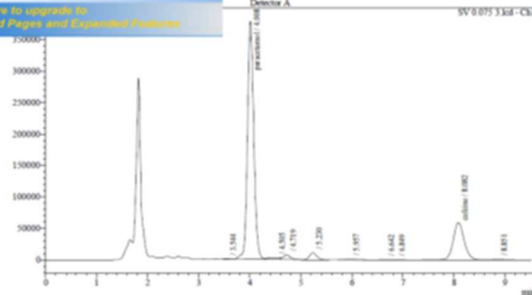
**PDF Complete**  
 Your complimentary use period has ended. Thank you for using PDF Complete.  
[Click Here to upgrade to Unlimited Pages and Expanded Features](#)



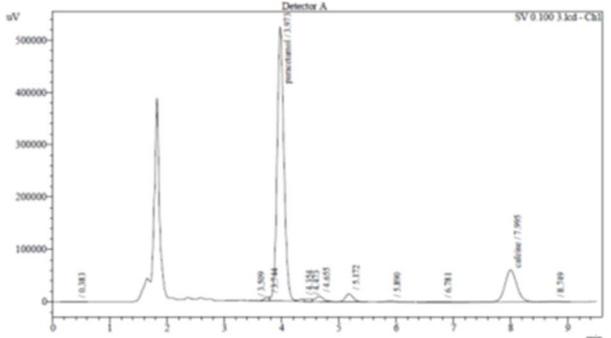
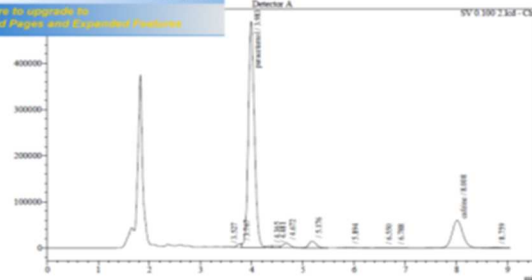
**PDF Complete**  
 Your complimentary use period has ended. Thank you for using PDF Complete.  
[Click Here to upgrade to Unlimited Pages and Expanded Features](#)

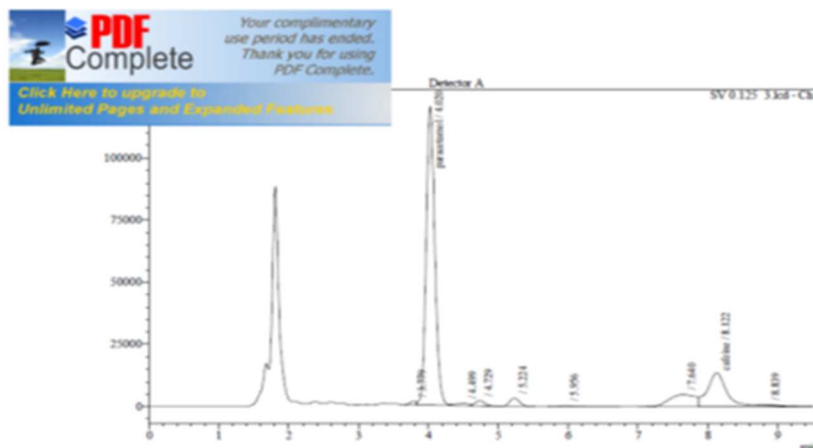
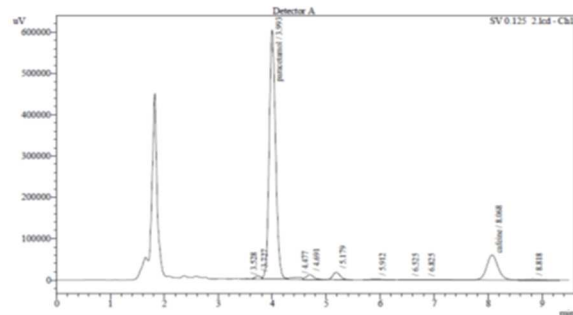
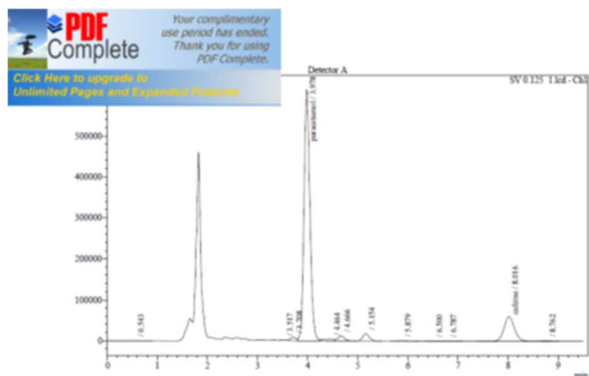


**PDF Complete**  
 Your complimentary use period has ended. Thank you for using PDF Complete.  
[Click Here to upgrade to Unlimited Pages and Expanded Features](#)



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





<< Detector A >>

Title	Sample Name	Sample ID	paracetamol	caféine
SE 0.05 1.lcd	SE 0.05 1	SE	2153652	846598
SE 0.05 2.lcd	SE 0.05 2	SE	1611927	839728
SE 0.025 1.lcd	SE 0.025 1	SE	1062938	838604
SE 0.025 2.lcd	SE 0.025 2	SE	898354	864635
SE 0.075 1.lcd	SE 0.075 1	SE	2996794	884248
SE 0.075 2.lcd	SE 0.075 2	SE	2315708	812515
SE 0.100 1.lcd	SE 0.100 1	SE	3938045	845215
SE 0.100 2.lcd	SE 0.100 2	SE	3508701	825748
SE 0.125 1.lcd	SE 0.125 1	SE	4498605	802187
SE 0.125 2.lcd	SE 0.125 2	SE	3723295	867049
SV 0.05 1.lcd	SV 0.05 1	SV	2197750	869202
SV 0.05 2.lcd	SV 0.05 2	SV	2150217	868366
SV 0.05 3.lcd	SV 0.05 3	SV	2216474	866068
SV 0.025 1.lcd	SV 0.025 1	SV	1159101	876719
SV 0.025 2.lcd	SV 0.025 2	SV	1236424	876766
SV 0.025 3.lcd	SV 0.025 3	SV	1171061	872041
SV 0.075 1.lcd	SV 0.075 1	SV	3184342	878455
SV 0.075 2.lcd	SV 0.075 2	SV	3172651	879358
SV 0.075 3.lcd	SV 0.075 3	SV	3226656	880490
SV 0.100 1.lcd	SV 0.100 1	SV	4229892	892695
SV 0.100 2.lcd	SV 0.100 2	SV	4075694	870899
SV 0.100 3.lcd	SV 0.100 3	SV	4319970	881983
SV 0.125 1.lcd	SV 0.125 1	SV	5040499	880627
SV 0.125 2.lcd	SV 0.125 2	SV	4980576	884290
SV 0.125 3.lcd	SV 0.125 3	SV	1028039	266205
Average			2803895	838828
%RSD			47.489	14.495
Maximum			5040499	892695
Minimum			898354	266205
Standard Deviation			1331551	121587

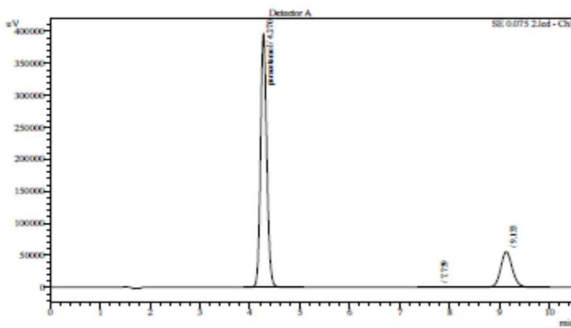
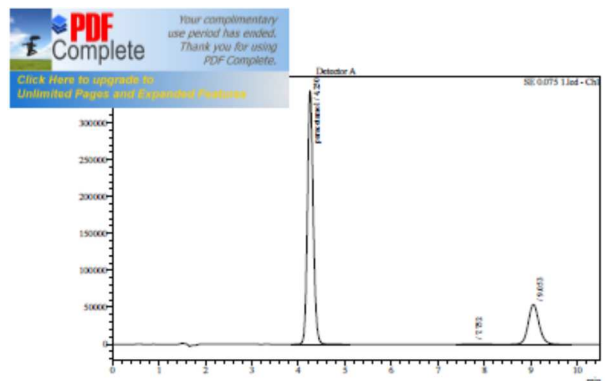
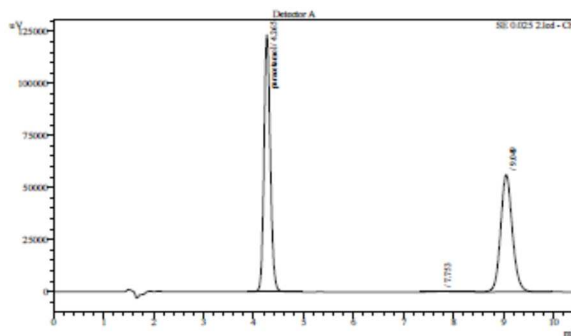
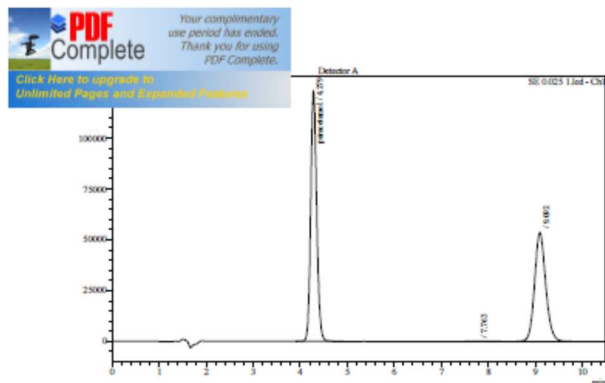
**PDF Complete**  
 Your complimentary use period has ended.  
 Thank you for using PDF Complete.  
[Click Here to upgrade to Unlimited Pages and Expanded Features](#)

**Jour 02: Série 02**

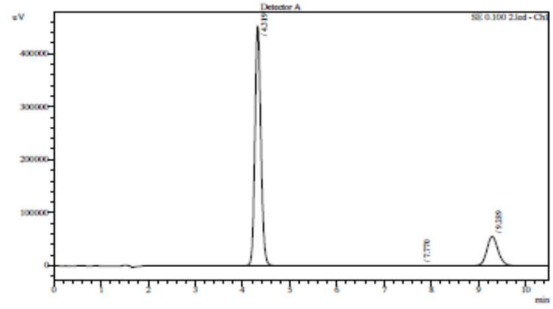
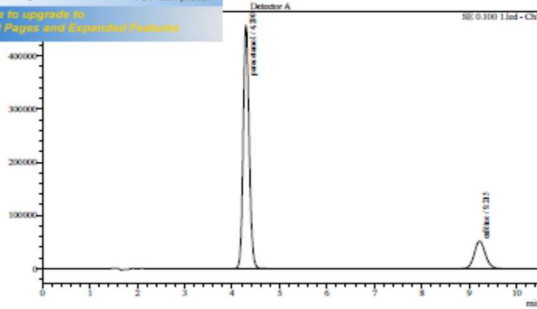
Sample Information

Acquired by : Admin  
 Sample Name : SE 0.05 1  
 Sample ID : SE  
 Tray# : 1L  
 Vial# : 3  
 Injection Volume : 20 uL  
 Data Filename : SE 0.05 1.lcd  
 Method Filename : paracetamol-urine.lcm  
 Batch Filename : BATCH  
 SERIE 01 FINALE.lcb Report  
 Filename : Default.lcr  
 Date Acquired :  
 23/06/2021  
 Data Processed :  
 23/06/2021

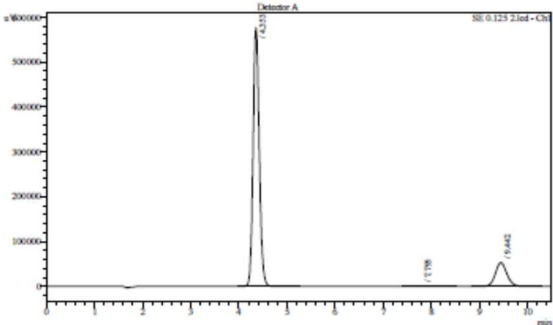
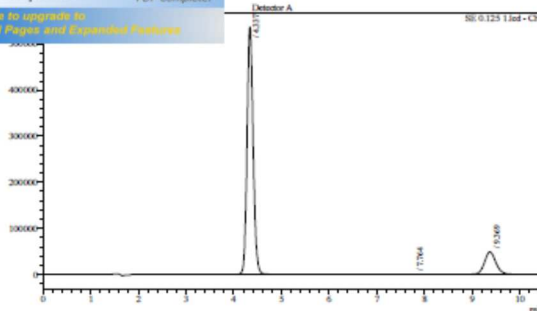
Summary (Concentration)



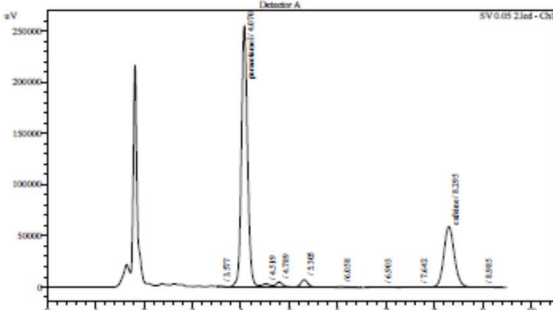
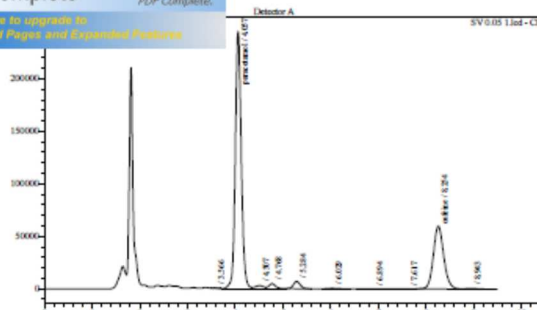
**PDF Complete**  
 Your complimentary use period has ended. Thank you for using PDF Complete.  
[Click Here to upgrade to Unlimited Pages and Expanded Features](#)



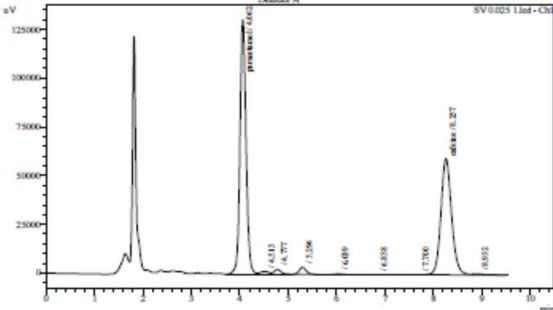
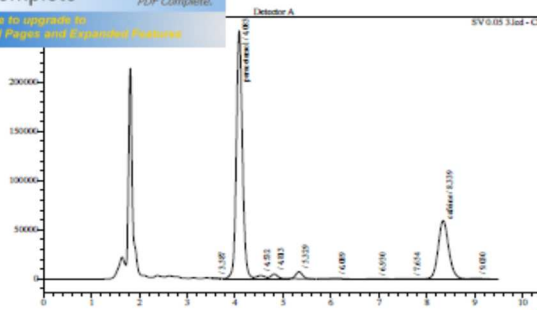
**PDF Complete**  
 Your complimentary use period has ended. Thank you for using PDF Complete.  
[Click Here to upgrade to Unlimited Pages and Expanded Features](#)

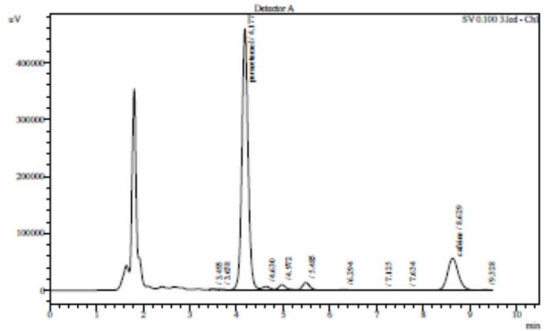
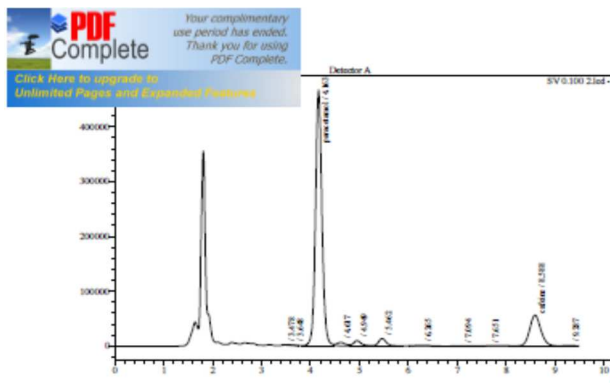
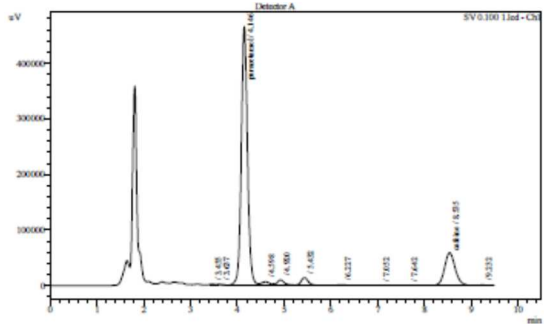
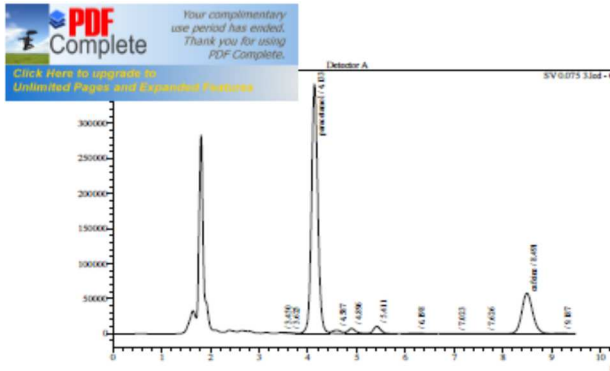
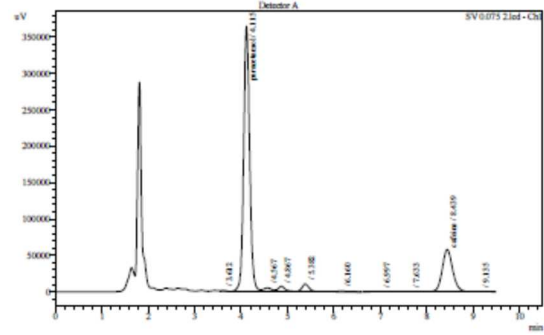
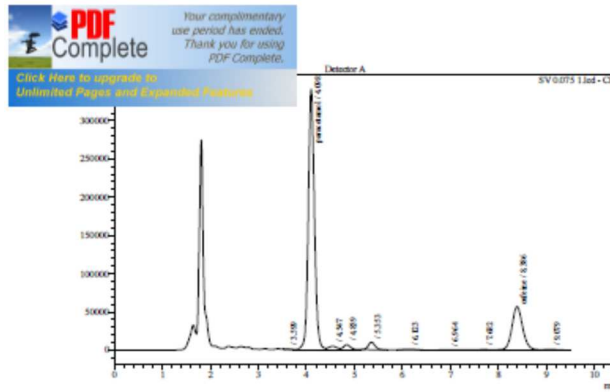
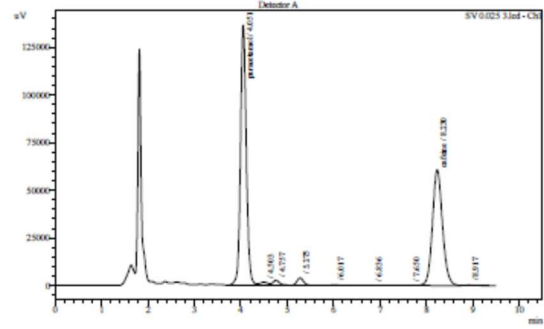
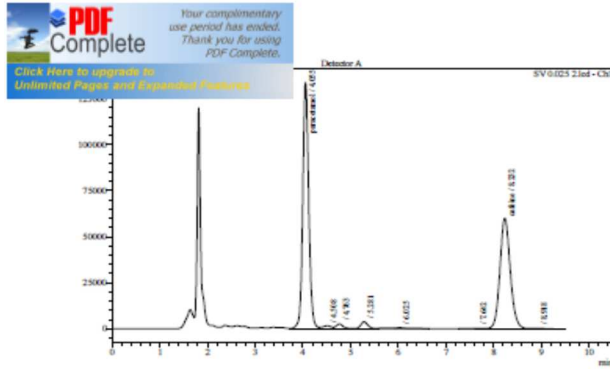


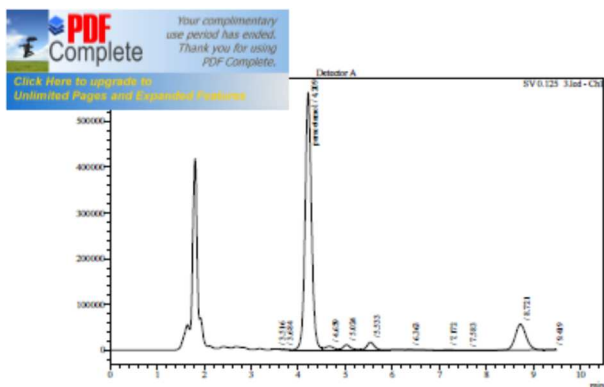
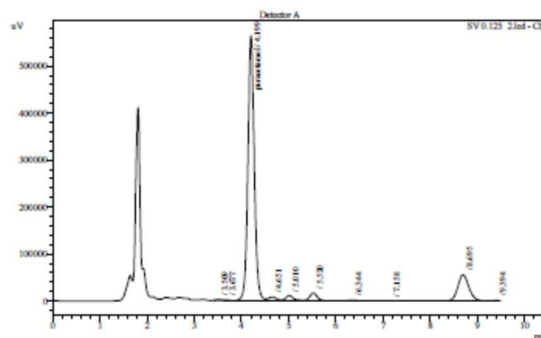
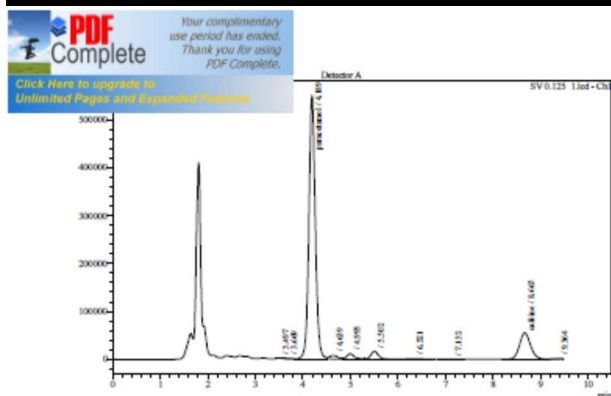
**PDF Complete**  
 Your complimentary use period has ended. Thank you for using PDF Complete.  
[Click Here to upgrade to Unlimited Pages and Expanded Features](#)



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







<< Detector A >>

Title	Sample Name	Sample ID	PARACETAMOL	CAFEINE
SE 0.05 1.lcd	SE 0.05 1	SE	2059837	868740
SE 0.05 2.lcd	SE 0.05 2	SE	2061482	925168
SE 0.025 1.lcd	SE 0.025 1	SE	1083908	0
SE 0.025 2.lcd	SE 0.025 2	SE	1078084	0
SE 0.075 1.lcd	SE 0.075 1	SE	2966205	0
SE 0.075 2.lcd	SE 0.075 2	SE	3442962	0
SE 0.100 1.lcd	SE 0.100 1	SE	3993045	847467
SE 0.100 2.lcd	SE 0.100 2	SE	0	0
SE 0.125 1.lcd	SE 0.125 1	SE	0	0
SE 0.125 2.lcd	SE 0.125 2	SE	0	0
SV 0.05 1.lcd	SV 0.05 1	SV	2114983	907435
SV 0.05 2.lcd	SV 0.05 2	SV	2227471	908875
SV 0.05 3.lcd	SV 0.05 3	SV	2211094	914150
SV 0.025 1.lcd	SV 0.025 1	SV	1127996	917304
SV 0.025 2.lcd	SV 0.025 2	SV	1150120	910353
SV 0.025 3.lcd	SV 0.025 3	SV	1175384	917499
SV 0.075 1.lcd	SV 0.075 1	SV	3013187	885025
SV 0.075 2.lcd	SV 0.075 2	SV	3247594	907603
SV 0.075 3.lcd	SV 0.075 3	SV	3201001	910586
SV 0.100 1.lcd	SV 0.100 1	SV	4229881	928868
SV 0.100 2.lcd	SV 0.100 2	SV	4268461	891743
SV 0.100 3.lcd	SV 0.100 3	SV	4240224	897848
SV 0.125 1.lcd	SV 0.125 1	SV	5132457	884576
SV 0.125 2.lcd	SV 0.125 2	SV	5286722	0
SV 0.125 3.lcd	SV 0.125 3	SV	5304137	0
Average			2937102	901452
%RSD			48.340	2.383
Maximum			5304137	928868
Minimum			1078084	847467
Standard Deviation			1419785	21482

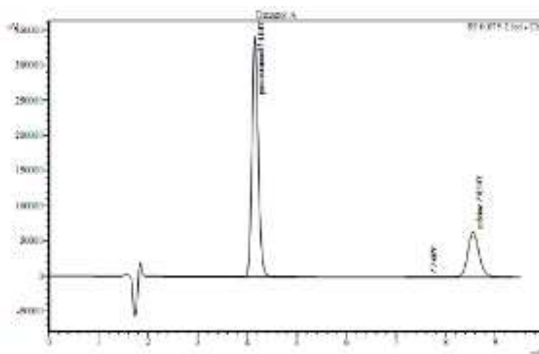
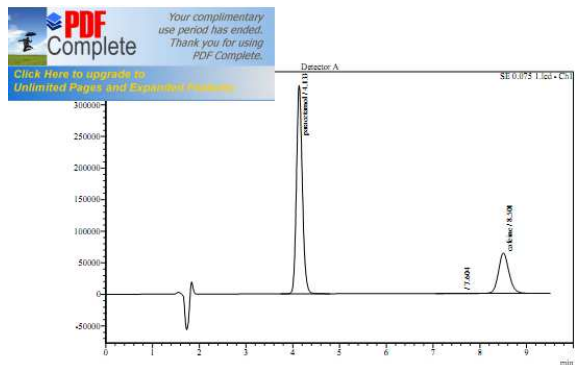
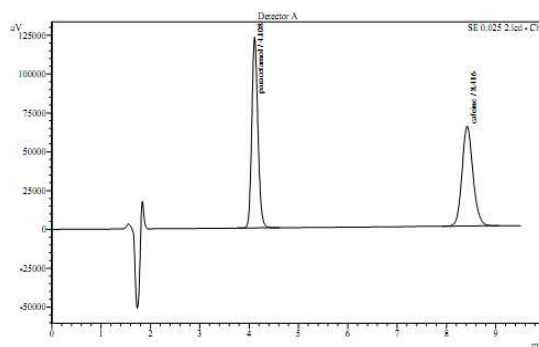
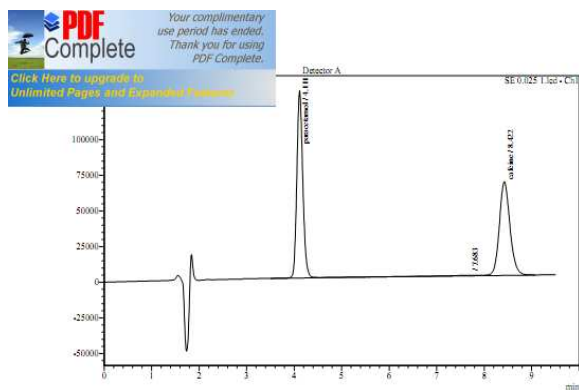


Jour 03: Série 03

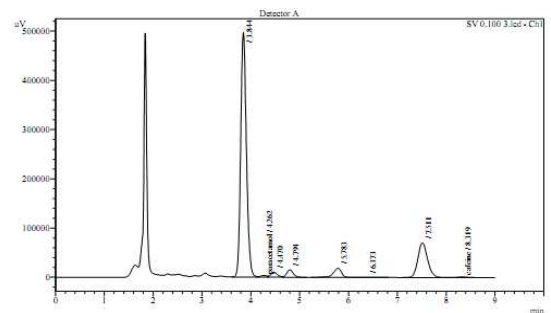
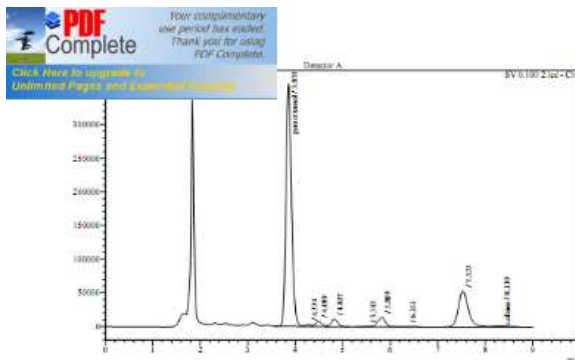
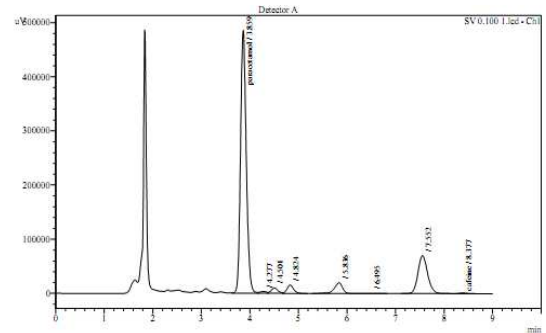
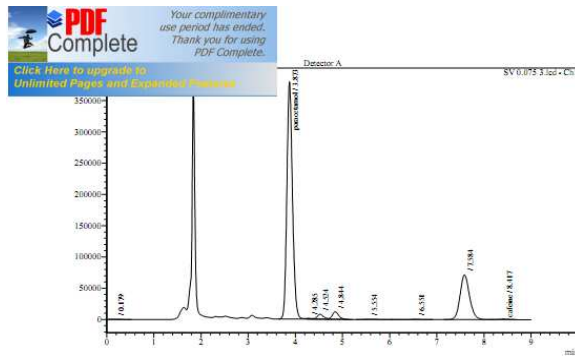
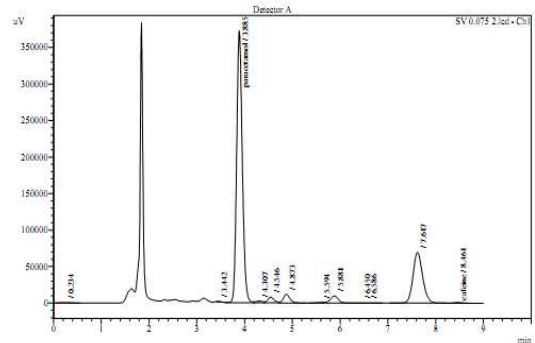
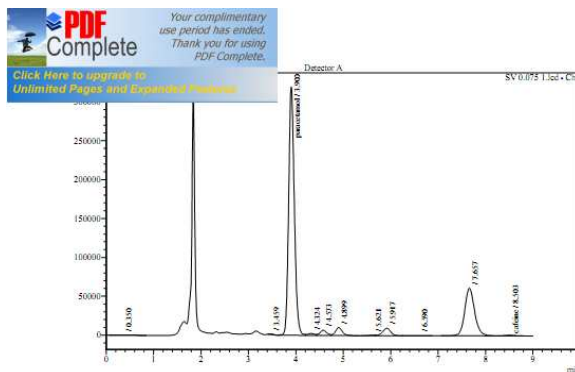
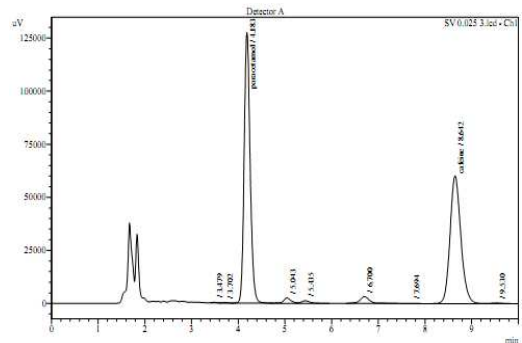
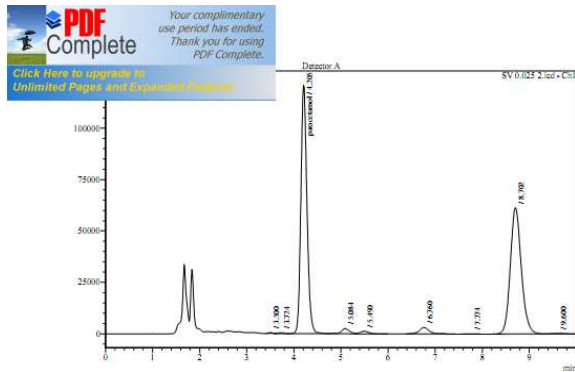
Sample Information

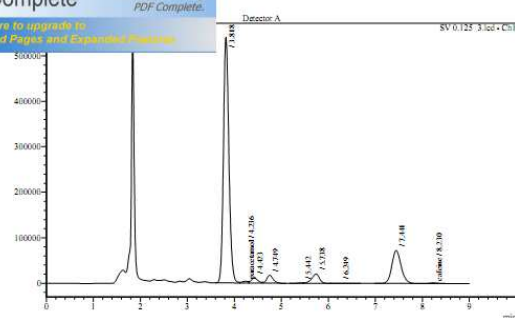
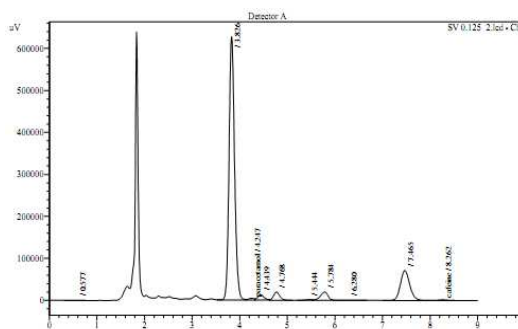
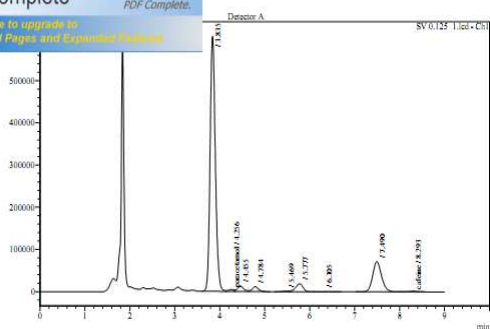
Acquired by : Admin  
 Sample Name : SE 0.05 1  
 Sample ID : SE  
 Tray# : 1L  
 Vail# : 3  
 Injection Volume : 20 uL  
 Data Filename : SE 0.05 1.lcd  
 Method Filename : paracetamol-urine.lcm  
 Batch Filename : BATCH  
 SERIE 01 FINALE.lcbReport  
 Filename :  
 Default.lcr  
 Date Acquired :  
 24/06/2021  
 Data Processed :  
 24/06/2021

Summary(Concentration









<< Detector A >>

Title	Sample Name	Sample ID	paracetamol	caffeine
SE 0.05 1.led	SE 0.05 1	SE	1966826	999992
SE 0.05 2.led	SE 0.05 2	SE	2006929	991553
SE 0.025 1.led	SE 0.025 1	SE	1143163	1022988
SE 0.025 2.led	SE 0.025 2	SE	1059126	990705
SE 0.075 1.led	SE 0.075 1	SE	2891246	1007959
SE 0.075 2.led	SE 0.075 2	SE	3008690	1015709
SE 0.100 1.led	SE 0.100 1	SE	3824513	990808
SE 0.100 2.led	SE 0.100 2	SE	3968253	1009094
SE 0.125 1.led	SE 0.125 1	SE	4709068	0
SE 0.125 2.led	SE 0.125 2	SE	5018407	0
SV 0.05 1.led	SV 0.05 1	SV	2043256	15624
SV 0.05 2.led	SV 0.05 2	SV	2080860	0
SV 0.05 3.led	SV 0.05 3	SV	1947383	10018
SV 0.025 1.led	SV 0.025 1	SV	1055926	1352
SV 0.025 2.led	SV 0.025 2	SV	1085254	0
SV 0.025 3.led	SV 0.025 3	SV	1137861	970739
SV 0.075 1.led	SV 0.075 1	SV	2635385	14887
SV 0.075 2.led	SV 0.075 2	SV	3048073	12946
SV 0.075 3.led	SV 0.075 3	SV	3125866	12153
SV 0.100 1.led	SV 0.100 1	SV	3955374	17117
SV 0.100 2.led	SV 0.100 2	SV	2923440	9507
SV 0.100 3.led	SV 0.100 3	SV	28655	18806
SV 0.125 1.led	SV 0.125 1	SV	33928	19913
SV 0.125 2.led	SV 0.125 2	SV	34624	22531
SV 0.125 3.led	SV 0.125 3	SV	28801	20269
Average			2190436	436889
%RSD			66.945	114.397
Maximum			5018407	1022988
Minimum			28655	1352
Standard Deviation			1466385	499787

## Résumé

---

La bioanalyse en vue des suivis thérapeutiques et la quantification des médicaments dans les milieux biologiques est un concept qui prend de plus en plus d'ampleur ces dernières décennies. Pour se faire, des méthodes bioanalytiques sont optimisées et développées constamment.

Afin de garantir leur qualité, ces méthodes doivent être validées et documentées, et ce, en se basant sur un ensemble de tests statistiques qui démontreraient l'exactitude, la fidélité et la reproductibilité des résultats obtenus pour pouvoir ensuite, les utiliser en routine.

Notre présent travail est dédié à la mise au point et la validation d'une méthode de dosage du paracétamol dans une matrice biologique qui est les urines par Chromatographie Liquide à Haute Performance (HPLC), suivant la démarche harmonisée basée sur l'application du profil d'exactitude fondé sur la notion d'erreur totale (biais + écart type), comme outil de décision, établie par la Société Française des Sciences et Techniques Pharmaceutiques (SFSTP) parue dans la revue STP Pharma Pratique en janvier 2006.

Au cours de notre manipulation au laboratoire, nous avons réalisé une gamme de standards d'étalonnage et une gamme de standards de validation dont les données nous ont permis de faire une étude statistique, à savoir le calcul des critères de validation et l'élaboration du profil d'exactitude.

En effet les résultats auxquels nous sommes arrivées en suivant notre protocole expérimental, prouvent que toutes les exigences spécifiques élaborées par cette commission sont remplies et que notre méthode est considérée valide dans l'intervalle de dosage prédéfini [0,025 ; 0,125] mg/ml correspondant à une dose de [1 ; 5] g/jour, en prenant en compte une diurèse moyenne de 2l/24h et une élimination urinaire de paracétamol inchangé équivalente à 5%, ce qui la rend apte à être appliquée en routine ultérieurement.

**Mots clés :** Paracétamol, matrice, urines, HPLC, bioanalyse, validation analytique, profil d'exactitude, suivi thérapeutique.

## Abstract

---

Bioanalysis for therapeutic monitoring and quantification of drugs in biological samples is a concept that has been gaining momentum over the past decades. For this purpose, bioanalytical methods are constantly being optimized and developed.

In order to guarantee their quality, these methods must be validated and documented, based on a set of statistical tests that would demonstrate the accuracy, fidelity and reproducibility of the results obtained, in order to be able to use them in routine.

Our present work is dedicated to the development and validation of a method for the determination of paracetamol in a biological matrix which is urine by High Performance Liquid Chromatography (HPLC), following the harmonized approach based on the application of the accuracy profile based on the concept of total error (bias + standard deviation), as a decision tool, established by the French Society of Pharmaceutical Sciences and Techniques (SFSTP) published in the journal STP Pharma Pratique in January 2006.

During our practice in the laboratory, we realized a range of calibration standards and a range of validation standards whose data allowed us to make a statistical study, namely the calculation of the validation criteria and the development of the accuracy profile.

In fact, the results we obtained by following our experimental protocol prove that all the specific requirements elaborated by this commission are fulfilled and that our method is considered valid in the predefined dosage interval [0.025; 0.125] mg/ml corresponding to a dose of [1; 5] g per day, taking into account an average diuresis of 2l/24h and a urinary elimination of unchanged paracetamol equivalent to 5%, which makes it suitable to be applied routinely in the future

**Key words:** Paracetamol, matrix, urine, HPLC, bioanalysis, analytical validation, accuracy profile, therapeutic monitoring