

الجمهورية الجزائرية الشعبية الديمقراطية

République Algérienne Démocratique et Populaire



-----oOo-----

وزارة التعليم العالي والبحث العلمي

Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique

-----oOo-----

Université Mouloud MAMMERY Tizi-Ouzou  
Faculté de médecine  
Département de Pharmacie

جامعة مولود معمري تيزي وزو  
كلية الطب  
قسم الصيدلة

Numéro d'ordre :

## MEMOIRE DE FIN D'ETUDES

EN VUE DE L'OBTENTION DU DIPLOME DE DOCTEUR  
EN PHARMACIE

Intitulé :

**MISE AU POINT ET VALIDATION D'UNE METHODE DE DOSAGE DU PIROXICAM  
DANS DES COMPRIMES DE 20 mg PAR CHROMATOGRAPHIE LIQUIDE A HAUTE  
PERFORMANCE**

Réalisé par :

ALLACHE MBAREK    CHABANE M<sup>ed</sup> AMINE    CHEBALLAH MEHDI

Présenté et soutenu publiquement le 28/10/2020

Devant le jury composé de :

BEN SI SAID Hassan	MAHU	UMMTO	Président
MAMOU Marzouk	MCA	UMMTO	Promoteur
ABDENNOURI Abdelhamid	Résident	UMMTO	Co-promoteur
TIGHRINE Abderrahmane	MAB	Université de Bouira	Examineur
BOURSOUTI Mourad	AHU	CHU	Examineur

Année universitaire 2019/2020

## **REMERCIEMENTS**

### **A NOTRE PROMOTEUR, PROFESSEUR MAMOU MARZOUK**

Nous sommes très honoré de vous avoir comme encadreur de notre étude. Nous vous remercions pour la gentillesse et la spontanéité avec lesquelles vous avez bien voulu diriger ce travail.

Nous avons eu le grand plaisir de travailler sous votre direction, et avons trouvé auprès de vous le conseiller et le guide qui nous a reçu en toute circonstance avec sympathie, sourire et bienveillance. Votre compétence professionnelle incontestable ainsi que vos qualités humaines vous valent l'admiration et le respect de tous. Vous êtes et vous serez pour nous l'exemple de rigueur et de droiture dans l'exercice de la profession.

Veillez, cher Professeur, trouver dans ce modeste travail l'expression de notre haute considération, de notre sincère reconnaissance et de notre profond respect.

### **A NOTRE CO-PROMOTEUR, DOCTEUR ABDENOURI**

Nous tenons à remercier énormément Docteur A.ABDENOURI résident en chimie analytique au niveau du CHU Tizi – Ouzou /UMMTO pour sa disponibilité, ses conseils précieux tout au long de ce travail ainsi que pour sa grande patience. Nous n'oublierons pas votre gentillesse et soutien, votre caractère très accueillant qui nous a permis de surmonter les difficultés rencontrées.

### **AUX PRESIDENT ET MEMBRES DE JURY**

C'est pour nous un grand honneur de vous voir siéger dans notre jury. Nous vous sommes très reconnaissants de l'amabilité avec laquelle vous avez accepté de juger notre travail.

Veillez trouver, dans ce travail le témoignage de notre grande reconnaissance et de notre profond respect.

Nous voudrions aussi remercier **Dr A.AKROUM, Dr R.BRAHIMI, et Dr K.AKLI**, résidents en Chimie Analytique pour leur aide et leurs encouragements afin de mener à bien ce travail.

Nous remercions enfin tous ceux qui, d'une manière ou d'une autre, ont contribué à la réussite de ce travail et qui n'ont pas pu être cités ici.

## DEDICACES

C'est avec la plus grande émotion et la plus grande joie que je dédie ce modeste travail :

### **A MES CHERS PARENTS**

*Aucune dédicace ne saurait exprimer mon respect, mon amour éternel et ma considération pour les sacrifices que vous avez consenti pour mon instruction et mon bien-être. Je vous remercie pour tout le soutien et l'amour que vous me portez depuis mon enfance et j'espère que votre bénédiction m'accompagne toujours.*

*Que ce modeste travail soit l'exaucement de vos vœux tant formulés, le fruit de vos innombrables sacrifices, bien que je ne vous en acquitterai jamais assez. Puisse Dieu, le Très Haut, vous accorder santé, bonheur et longue vie et faire en sorte que jamais je ne vous déçoive.*

### **A LA MEMOIRE DE MA CHERE NANA OUIZA**

*Une deuxième maman qui m'a toujours poussé et motivé dans mes études. Tu attendais ce jour avec impatience mais hélas, tu nous as quitté très tôt, j'aurais tant aimé que tu sois présente. J'espère que du monde qui est sien maintenant, tu apprécies cet humble geste comme preuve de reconnaissance envers toi. Que Dieu t'accueille en son vaste paradis.*

### **A MES CHERES ET ADORABLES SŒURS**

*Nounou, la douce, au cœur si grand, Toutou, l'adorable, ce lien si fort qui nous unit, Mélina, l'unique, la seule personne au monde capable de vous aimer, de vous protéger et de vous énerver en même temps, Sonia, l'aimable, ma sœur de cœur.*

*En témoignage de mon affection fraternelle, de ma profonde tendresse et reconnaissance, je vous souhaite une vie pleine de bonheur et de succès et que Dieu, le tout puissant, vous protège et vous garde.*

### **A MES CHERS PETITS NEVEUX**

*Mimou, Anes et Cylian, votre joie et votre gaité me comblent de bonheur. Puisse Dieu vous garder, éclairer votre route et vous aider à réaliser à votre tour vos vœux les plus chers.*

### **A MON BEAU FRERE**

*Yacine, un grand merci pour ton soutien, encouragement, gentillesse. Je te souhaite pleines de bonnes choses.*

### **A MES CHERS ONCLES, TANTES, A MES CHERS COUSINS ET COUSINES**

*Veillez trouver dans ce travail l'expression de mon respect le plus profond et mon affection la plus sincère en particulier yemma Djoudja. A la mémoire de dada Mourad, djeddi Messaoud, lhadj Merzouk que Dieu garde leurs âmes dans son vaste paradis.*

### **A MES AMIS DE TOUJOURS**

*Amine, Mustapha, Ouzien, Mehdi, Ghanou, Adel, Zizou, Amokrane, Ahmad, Bilal, Juba, ... « Il y a les amis, il y a la famille et puis il y a les amis qui deviennent une famille. » En souvenir de notre sincère et profonde amitié et des moments agréables que nous avons passé ensemble, j'espère de tout mon cœur que notre amitié durera éternellement.*

### **A TOI MEEL**

*Une spéciale dédicace à cette personne qui compte vraiment pour moi et pour qui je porte beaucoup de tendresse et de respect.*

*A mes chers trinômes Amine, Mehdi, ensemble dès le départ jusqu'à la fin, malgré les difficultés rencontrées nous avons pu mener ce travail à terme.*

*A toutes les personnes qui ont participé à l'élaboration de ce travail et à tous ceux que j'ai omis de citer.*

**Mbarek**

# *Dédicaces*

C'est avec joie et profonde gratitude que je dédie ce modeste travail :

*A mes chers parents*

*Nulle dédicace ne saurait traduire tout l'amour, le respect, le dévouement et l'estime que j'ai pour vous. Rien au monde ne vaut les sacrifices et tous les efforts consentis pour mon éducation et ma formation, vous êtes tout simplement le pilier de ma vie. Je vous rends hommage par ce modeste travail en guise de ma reconnaissance éternelle et de mon infini amour en espérant avoir répondu aux espoirs que vous avez fondé en moi. Puisse Dieu, le très Haut, vous accorde santé, bonté et longue vie.*

*A mes deux frères*

*Ce travail est aussi le vôtre. Je vous souhaite une vie pleine de bonheur et de succès et que Dieu, le tout puissant, vous protège et vous garde.*

*A la mémoire de mes grands-parents paternels*

*Partis si tôt, je vous dédie cet évènement marquant de ma vie. J'aurais tant aimé que vous soyez présents. Que dieu vous accueille dans son vaste paradis.*

*A mes grands-parents maternels*

*Vos encouragements et votre omniprésence m'ont été d'une grande aide durant mon cursus. Je tiens à vous témoigner ma reconnaissance et l'expression de mes sincères sentiments et de mon éternelle gratitude. Que dieu vous garde.*

*A mon oncle Mounir*

*Toujours disponible et d'un grand soutien durant mes études, je tiens à te dédier à toi aussi ce travail, trouve ici l'expression de mes sentiments de respect et de reconnaissance.*

*A la famille Chabane&Sehad.*

*A mes trinômes Mbarek et Mehdi*

*Ensemble nous avons pu mener ce travail à terme. Nous avons passé des moments de joie et de bonheur mais aussi de doute. Quel que soit la difficulté rencontrée, on a su la surmonter et triompher. Notre amitié est éternelle.*

*A tous mes amis qui n'ont jamais cessé de me soutenir.*

*A tous ceux qui me sont chers.*

*Amine*

*Je dédie ce modestes travail à :*

*A mes chers parents **DJAMILA** et **YOUCEF**,  
Aucun mot, aucune dédicace ne saurait être assez éloquent pour exprimer ce que vous mérites  
pour tous les sacrifices que vous n'avez cessé de me donner depuis ma naissance.  
Si je suis arrivée là, c'est bien grâce à vous. Que dieu vous donne longue vie et vous protège  
pour moi.*

*A mon très cher frère **Massinissa** et mes adorables sœurs **Lamia, Ouahiba, Sarah et Kamilia**,  
à qui je souhaite un avenir radieux plein de réussite.*

*A mon adorable nièce **Iman** que dieu la protège.*

*A la mémoire de mes chers grands-parents paternels que dieu accueille leurs âmes dans son  
paradis inshallah.*

*A toute ma famille.*

*A tous mes amis avec qui j'ai partagé d'inoubliables moments. Je vous souhaite une vie  
pleine de joie, de bonheur, et de réussite.*

*Sans oublié mon trinôme de travail, mes meilleurs amis **Amine** et **Mbarek** lesquels j'ai  
partagé le pire et le meilleur durant mes années, ensemble nous avons pu mener ce travail à  
terme.*

*A mes enseignants qui m'ont formé tout au long de mon cursus scolaire et universitaire.*

*A toute personne ayant contribué de prêt ou de loin à  
l'élaboration de ce travail.*

*A tous ceux qui me sont chers.*

**Mehdi**

# TABLE DES MATIERES

---

Table des matières .....	i
Liste des abréviations .....	v
Liste des figures .....	vii
Liste des tableaux .....	viii
Introduction .....	1
Objectifs .....	3

## Partie théorique

### Chapitre I : Piroxicam

1. Propriétés physico-chimiques .....	4
1.1. Aspect .....	4
1.2. Solubilité.....	4
2. Propriétés pharmacologiques .....	5
2.1. Propriétés pharmacocinétiques .....	5
2.1.1. Absorption.....	5
2.1.2. Distribution .....	5
2.1.3. Métabolisme-Elimination .....	5
2.2. Propriétés pharmacodynamiques .....	6
2.3. Mécanisme d'action.....	6
3. Indications thérapeutiques .....	7
4. Toxicité : .....	7
4.1. En phase préclinique.....	7
4.1.1. Toxicité aiguë.....	7
4.1.2. Toxicité subaiguë et toxicité chronique .....	7
4.2. En phase clinique.....	8

### Chapitre II : Validation analytique

1. Définition .....	9
2. But de la validation .....	9
3. Procédures analytiques à valider .....	9
4. Aspect réglementaire et normatif .....	10
4.1. Documents ISO 17025.....	10
4.2. Documents ICH .....	10
4.3. Documents de la FDA (guidance for industry) .....	10
4.4. Documents des commissions SFSTP .....	10

## TABLE DES MATIERES

---

5. Cycle de vie d'une méthode d'analyse.....	11
5.1. Sélection de la méthode.....	12
5.2. Mise au point et pré-validation de la méthode.....	12
5.3. Validation de la méthode.....	13
5.4. Estimation de l'incertitude et vérification e l'aptitude.....	13
5.5. Utilisation en routine.....	14
5.6. Revalidation.....	14
6. Critères de validation analytique.....	14
6.1. Spécificité/sélectivité.....	15
6.2. Exactitude.....	16
6.3. Linéarité.....	16
6.4. Fidélité.....	16
6.5. Justesse.....	17
6.6. Sensibilité.....	17
6.7. Limite de détection.....	17
6.8. Limite de quantification.....	17
6.9. Robustesse.....	17
6.10. Stabilité des solutions.....	18
7. Critères de choix de la validation analytique.....	18
8. Etapes de la validation.....	20
9. Etude statistique de la validation analytique.....	20
9.1. Spécificité.....	20
9.1.1. Protocole.....	20
9.1.2. Etude statistique.....	21
9.2. Fonction de réponse.....	25
9.3. Alignement des observations.....	26
9.4. Prédiction inverse.....	27
9.5. Calcul de la justesse et de la fidélité.....	28
9.5.1. Modèle.....	28
9.5.2. Justesse.....	29
9.5.3. Fidélité.....	30
9.6. Calcul de l'exactitude.....	30
9.6.1. Erreur totale et profil de l'erreur totale.....	31
9.7. Calcul de l'intervalle de tolérance.....	32

# TABLE DES MATIERES

---

9.8. Profil d'exactitude et décision .....	33
9.8.1. Calcul du profil d'exactitude .....	33
9.8.2. Choix de la fonction de réponse.....	33
10. Linéarité .....	34
11. Limites de quantification supérieures et inférieures .....	34

## Partie pratique

1. Matériel et méthodes .....	35
1.1. Matériel.....	35
1.1.1. Matières premières.....	35
1.1.2. Réactifs .....	36
1.1.3. Appareillages et équipements .....	37
1.1.4. Verreries et autres .....	37
1.2. Méthodes .....	38
1.2.1. Méthodologie de la validation analytique.....	38
1.2.1.1. Choix du protocole de validation .....	38
1.2.1.2. Choix des paramètres de validation .....	39
1.2.1.3. Choix de diluant .....	39
1.2.1.4. Choix de dilution.....	39
1.2.2. Préparation des solutions .....	39
1.2.2.1. Diluant : HCl méthanolique (40%V/V) 0.05 M.....	39
1.2.2.2. Préparations des solutions standards .....	39
A. Solutions standards du Piroxicam.....	39
B. Préparation de la solution placebo .....	40
C. Solutions des standards d'étalonnage .....	40
D. Solutions des standards de validation .....	41
1.2.2.3. Préparation de la phase mobile.....	41
1.2.2.4. Préparation de la feuille de calcul .....	42
1.3. Conditions chromatographiques .....	42
2. Résultats .....	43
2.1. Données brutes.....	43
2.2. Spécificité .....	44
2.3. Fonction de réponse .....	47
2.4. Alignement des observations .....	57

# TABLE DES MATIERES

---

2.5. Prédications inverses .....	59
2.6. Justesse.....	61
2.7. Fidélité .....	61
2.8. Exactitude .....	64
2.9. Erreur total et intervalle de tolérance.....	65
2.10. Profil d'exactitude.....	65
2.11. Linéarité .....	66
2.12. Limites de quantification et intervalle de dosage .....	67
3. Discussion .....	68
3.1. Spécificité .....	68
3.2. Choix de la fonction de réponse .....	69
3.3. Critères de performance de la fonction de réponse choisie .....	69
3.3.1. Justesse.....	69
3.2.2. Fidélité .....	69
3.4. Critères de décision sur la validité de la méthode .....	70
3.4.1. Erreur totale .....	70
3.4.2. Profil d'exactitude.....	70
3.4.3. Limites de quantification et intervalle de dosage .....	70
3.4.4. Linéarité .....	70
Conclusion.....	72
Perspectives.....	73
Références bibliographiques	
Annexes	
Résumé	
Abstract	

## LISTE DES ABREVIATIONS

---

AINS	:	Anti-Inflammatoire Non Stéroïdien
BCS II	:	Biopharmaceutics Classification System
CEI	:	Commission Electronique Internationale
COFRAC	:	Comité Français d'Accréditation
COX	:	Cyclo-oxygénase
CV	:	Coefficient de variation
CYP2C9	:	Cytochrome2C9
Ddl	:	Degré de Liberté
DL50	:	Dose létale médiane
DMF	:	Diméthylformamide
DMSO	:	Diméthylsulfoxyde
EN	:	European Norm
EPF	:	Erythème pigmenté fixe
FDA	:	Food and Drug Administration
HCl	:	Acide Chlorohydrique
HPLC	:	High Performance Liquid Chromatography
ICH	:	International Conference of Harmonization
ISO	:	International Organization for Standardization
IUPAC	:	International Union of Pure and Applied Chemistry
LD	:	Limite de Détection
LQ	:	Limite de Quantification
M	:	Masse Molaire
ml	:	millimètre.
mg	:	milligramme.
NF	:	Norme Française
PA	:	Principe Actif

## LISTE DES ABREVIATIONS

---

PE	:	Prise d'Essai
pH	:	Potentiel Hydrogène
SE	:	Standard d'Etalonnage.
SFSTP	:	Société Française des Sciences et Techniques Pharmaceutiques
STP	:	Sciences et Techniques Pharmaceutiques
SV	:	Standard de Validation
UV-visible	:	Ultraviolet-Visible
V2	:	Volume 2

## LISTE DES FIGURES

---

Figure 01 : Structure chimique développée du piroxicam .....	4
Figure 02 : Représentation schématique du mécanisme de l'inflammation et de l'action du Piroxicam .....	6
Figure 03 : La réglementation en vigueur concernant la validation des méthodes analytiques	11
Figure 04 : Cycle de vie d'une méthode d'analyse. ....	11
Figure 05 : Logigramme permettant de sélectionner un protocole de validation.....	23
Figure 06 : Représentation schématique des composantes de l'erreur .....	31
Figure 07 : Chromatogramme de la gamme standard d'étalonnage.....	44
Figure 08 : Chromatogramme de la gamme standard de validation .....	45
Figure 09 : Courbe de spécificité obtenue avec la fonction $y=ax+b$ .....	46
Figure 10 : Courbes d'étalonnages obtenues avec la fonction $y=ax+b$ .....	48
Figure 11 : Courbes d'étalonnages obtenues avec la fonction $y=ax$ .....	50
Figure 12 : Courbes d'étalonnages obtenues avec la fonction $\sqrt{y}=f(\sqrt{x})$ .....	52
Figure 13 : Courbes d'étalonnages obtenues avec la fonction $\ln [y=f(\ln x)]$ .....	54
Figure 14 : Courbes du profil d'exactitude obtenues avec les différentes fonctions .....	56
Figure 15 : Tracé du profil d'exactitude pour la fonction $y=ax+b$ .....	65
Figure 16 : Courbe de linéarité obtenue avec la fonction $y=ax+b$ .....	66

## LISTE DES TABLEAUX

---

Tableau I : Propriétés physico-chimiques du Piroxicam.....	5
Tableau II : Dose létale médiane (DL50) du piroxicam par voie orale et intrapéritonéale.....	7
Tableau III : Critères de la validation en fonction du type d'analyse .....	15
Tableau IV : Caractéristiques de performance à déterminer pour les méthodes qualitatives et les méthodes quantitatives.....	19
Tableau V : Choix du nombre de standards d'étalonnage et de validation en fonction du protocole choisi .....	24
Tableau VI : Exemples de fonction de réponses .....	25
Tableau VII : Règles d'alignement pour différentes fonctions de réponses .....	26
Tableau VIII : Calcul des prédictions inverses pour différentes fonctions de réponses .....	27
Tableau VIX : Calcul des prédictions inverses pour la droite ayant subi une transformation logarithmique ou racine carrée .....	29
Tableau X : Matières premières utilisées .....	35
Tableau XI : Réactifs utilisés .....	36
Tableau XII : Appareillages utilisés.....	37
Tableau XIII : Verreries et autres matériels utilisés.....	37
Tableau XIV : Tableau présentant les masses théoriques des niveaux de concentration des principes actifs.....	40
Tableau XV : Tableau présentant le protocole de la préparation des solutions des standards d'étalonnages.....	40
Tableau XVI : tableau présentant le protocole de la préparation des solutions des standards de validation.....	41
Tableau XVII : Conditions chromatographiques de la méthode de dosage.....	42
Tableau XVIII : Données brutes des standards d'étalonnage .....	43
Tableau XIX : Données brutes des standards de validation.....	43
Tableau XX : Résultats obtenus sur la gamme SE.....	44
Tableau XXI : Résultats obtenus sur la gamme SV .....	45

## LISTE DES TABLEAUX

---

Tableau XXII : Comparaison des pentes et des ordonnées à l'origine des SE et SV .....	46
Tableau XXIII : Résultats obtenus pour la fonction $y = ax + b$ .....	47
Tableau XXIV : Résultats obtenus pour la fonction $y = ax$ .....	49
Tableau XXV : Résultats obtenus pour la fonction $\sqrt{y} = f(\sqrt{x})$ .....	51
Tableau XXVI : Résultats obtenus pour la fonction $\ln [y = f(\ln x)]$ .....	53
Tableau XXVII : Alignement des réponses observées avec les trois séries des SV .....	58
Tableau XXVIII : Prédications inverses obtenues avec les SV .....	60
Tableau XXIX : Justesse calculée pour chaque niveau de concentration des standards de validation .....	61
Tableau XXX : Calcul des $MSE_j$ , $MSM_j$ .....	62
Tableau XXXI : Calcul des CV de répétabilité et de fidélité-intermédiaire .....	63
Tableau XXXII : résultats de calcul de l'exactitude .....	64
Tableau XXXIII : Calcul de l'erreur totale et des intervalles de tolérances inférieurs et supérieurs .....	65
Tableau XXIV : Masses prédites en fonction des masses introduites .....	66
Tableau XXXV : Signification des résultats des deux pentes et des deux ordonnées à l'origine entre elles .....	68

# INTRODUCTION

---

Les médicaments sont des substances chimiques ou naturelles, utilisés pour le traitement ou la prévention des maladies. Chaque médicament renferme des principes actifs responsables de l'effet thérapeutique, des conservateurs et des excipients assurant la conservation et l'absorption des principes actifs au niveau des cellules cibles. Le Piroxicam, sujet de cette étude est un médicament appartenant au groupe des anti-inflammatoires, il est prescrit généralement pour le traitement des états inflammatoires chez les patients souffrant de rhumatisme.

Pour garantir qu'un médicament restera sûr et efficace pendant toute sa durée de validité, le contexte industriel impose aux entreprises pharmaceutiques de démontrer que l'ensemble des procédés et des méthodes utilisés pour l'élaboration d'un produit de santé conduit effectivement au résultat attendu. Les laboratoires pharmaceutiques sont tenus de prouver que les méthodes d'analyses employées sont valides.

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

Actuellement, de nouvelles tendances et de nouveaux concepts scientifiques apparaissent afin de faire évoluer la validation des méthodes analytiques, avec notamment l'apparition de l'utilisation du profil d'exactitude comme outil de décision. Ces nouveaux outils et concepts ont pour la plupart comme objectif commun de remettre les résultats obtenus au centre de la notion de validation analytique. Les anciennes procédures de validation, plus orientées vers la qualité de l'analyse statistique, ne tiennent pas suffisamment compte du produit concerné, de ses spécificités, et de la qualité des résultats qui seront finalement obtenus avec la méthode analytique validée.

La problématique posée est de savoir si l'application du protocole SFSTP 2006 nous permettra d'obtenir des résultats qui répondront à toutes les exigences et performances spécifiques élaborées dans cette approche harmonisée.

# INTRODUCTION

---

Dans notre étude nous nous sommes particulièrement intéressés à la mise au point et la validation de la méthode de dosage (en appliquant le protocole SFSTP 2006) par HPLC du piroxicam dans des comprimés de 20 mg.

Afin de répondre clairement à la problématique posée et de valider la méthode du dosage du piroxicam par HPLC, notre travail est réparti en deux (02) parties.

La première partie concerne une revue de la littérature ou partie théorique, elle est subdivisée en deux (02) chapitres :

- Chapitre I : Piroxicam ;
- Chapitre II : Validation analytique.

La seconde partie de ce manuscrit est réservée à la partie expérimentale, nous présenterons dans un premier temps le matériel et les méthodes du travail, puis nous exposerons nos résultats suivis des discussions et enfin nous terminerons avec une conclusion quant à la validité de la méthode de dosage du piroxicam dans les comprimés de 20 mg.

## OBJECTIFS

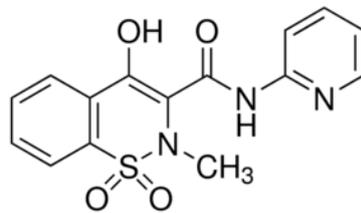
---

L'objectif principal de notre étude est de mettre au point et valider une méthode de dosage du Piroxicam dans des comprimés de 20 mg par chromatographie liquide haute performance (HPLC).

Le piroxicam est un anti-inflammatoire non stéroïdien (AINS) de la famille des oxicams structurellement apparenté à la classe de l'acide énoïque du 4-hydroxy-1,2-benzothiazine carboxamide.

C'est un dérivé du 1,2-benzothiazine 1,1-dioxyde. L'importance du 1,2-benzothiazine provient du fait que, depuis le moment de sa première synthèse par Braun en 1923, des milliers de ses dérivés ont été synthétisés et trouvés biologiquement actifs comme analgésiques, antipyrétiques, hypoglycémiques, anti-hypertensifs, anti-inflammatoires... etc.

Le Piroxicam est actuellement l'un des AINS les plus largement utilisés pour le traitement des états inflammatoires chez les patients souffrant de rhumatisme [1].



**Figure 1 : Structure chimique développée du piroxicam [2].**

## 1. Propriétés physico-chimiques

### 1.1. Aspect

Le piroxicam est une poudre cristalline blanche ou peu jaune. C'est un composé qui présente le phénomène de polymorphisme [3].

### 1.2. Solubilité

Le piroxicam est un médicament AINS de classe BCS II présentant un problème de solubilité prévalent [3] ;

- A température ambiante, le piroxicam est insoluble dans l'eau et le cyclohexane ;
- Il est peu soluble dans l'éther isopropylique et le toluène et légèrement plus soluble dans les alcools aliphatiques à courtes chaînes ;
- Il est soluble dans certains solvants polaires : DMF, DMSO, Chloroforme et à moindre degré le dioxanne, l'acétate et l'acétate d'éthyle.

Tableau I : Propriétés physico-chimiques du Piroxicam [2].

DCI	Piroxicam
Formule chimique brute	C <sub>15</sub> H <sub>13</sub> N <sub>3</sub> O <sub>4</sub> S
Nom chimique (IUPAC)	(4-hydroxy-2-méthyl-N-(2-pyridyl) -2,3 dihydro benzo(e)-1,2-thiazin 4one-1,1-dioxide).
Masse molaire	331,4 g/mol
Perte à la dessiccation	Max 0,5%
pKa	6,3 il possède les propriétés des acides faibles
Point de fusion	198 – 220°C
Teneur	98 – 101 % (substance desséchée)

## 2. Propriétés pharmacologiques

### 2.1. Propriétés pharmacocinétiques [4]

La pharmacocinétique du piroxicam est linéaire.

#### 2.1.1. Absorption

- Par voie orale, le piroxicam est rapidement absorbé (demi-vie de résorption = 50 minutes).
- L'alimentation retarde légèrement la vitesse d'absorption.

#### 2.1.2. Distribution

- La demi-vie d'élimination est d'environ 50 heures.
- La fixation aux protéines plasmatiques est importante (99%).
- Le piroxicam traverse rapidement la membrane synoviale et sa liaison aux protéines synoviales est la même que sa liaison aux protéines plasmatiques.
- Une étude préliminaire a montré que le piroxicam traverse le lait maternel (1 à 3% du taux plasmatique).

#### 2.1.3. Métabolisme-Elimination

- Le piroxicam est éliminé lentement, il est presque totalement métabolisé.
- Moins de 5% de la dose ingérée sont éliminés inchangés dans les urines et les fèces.
- Le piroxicam est métabolisé principalement par le cytochrome P450 CYP2C9 dans le foie. Une des voies métaboliques importantes est l'hydroxylation du noyau pyridine de la chaîne latérale du piroxicam suivie d'une glycu-conjugaison et d'élimination urinaire.

## 2.2. Propriétés pharmacodynamiques

Les anti-inflammatoires non stéroïdiens du groupe oxicams possèdent les propriétés suivantes [4] :

- Activité antalgique ;
- Activité antipyrétique ;
- Activité anti-inflammatoire ;
- Inhibition des fonctions plaquettaires.

L'ensemble de ces propriétés est lié à une inhibition de la synthèse des prostaglandines.

## 2.3. Mécanisme d'action

Par leur action inhibitrice de la COX, tous les AINS inhibent la transformation de l'acide arachidonique en prostaglandines ou thromboxanes.

Le piroxicam agit en inhibant l'action des COX (COX1 et COX2), entraînant une baisse de la production des prostaglandines ce qui entraîne une diminution des effets de l'inflammation comme le montre la figure suivante [1].

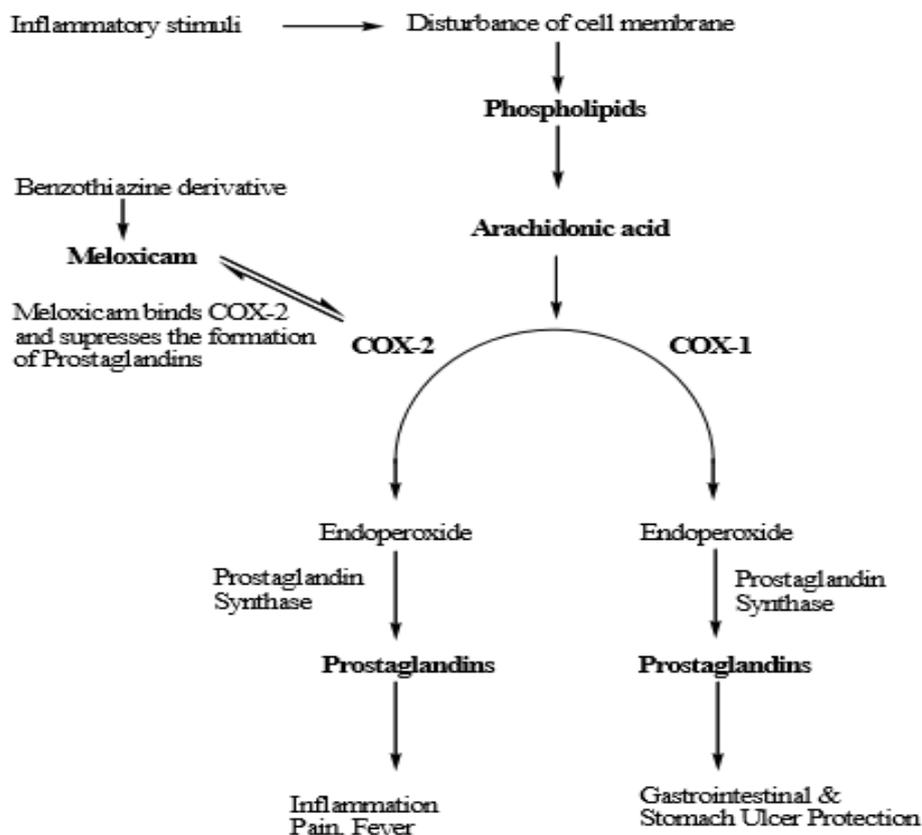


Figure 2 : Représentation schématique du mécanisme de l'inflammation et de l'action du Piroxicam [1].

### 3. Indications thérapeutiques [5]

- ❖ Traitement symptomatique au long cours :
  - Rhumatismes inflammatoires chroniques ;
  - Certaines arthroses.
- ❖ Traitement de courte durée :
  - Poussées de rhumatisme abarticulaire ;
  - Arthrites microcristallines ;
  - Lombalgies, cervicalgies et radiculalgies sévères.

## 4. Toxicité

### 4.1. En phase préclinique

#### 4.1.1. Toxicité aiguë [6]

**Tableau II : Dose létale médiane (DL50) du piroxicam par voie orale et intra-péritonéale [6].**

Espèces	Sexe	DL50 (IC95%) en mg/kg	
		Orale	Intra-péritonéale
Souris	M	360 (321 – 404)	360 (305 – 425)
	F	≈ 360	-
Rat	M	270 (231 – 316)	220 (197 – 241)

- L'autopsie de ces animaux a révélé des adhérences viscérales marquées ainsi qu'une érosion de l'estomac et des intestins.
- Chez le chien, l'administration de doses de 5, 25, 50, 400 et 700 mg/kg a provoqué des vomissements répétés, une anorexie chronique ainsi que de la diarrhée. L'autopsie des animaux ayant reçu la dose de 5 mg/kg a fait apparaître une érosion ainsi qu'une hémorragie des muqueuses.

#### 4.1.2. Toxicité subaiguë et toxicité chronique [6]

- Dans le cadre d'une étude de 18 mois menée chez le rat, l'administration de doses orales quotidiennes de 0,3, 1,0 et 3,0 mg/kg a provoqué une nécrose des papilles rénales, une hausse de l'azote uréique du sang et des lésions gastro-intestinales nécrotiques. La dose de 8 mg/kg a produit une augmentation de la mortalité.

- L'administration orale de doses du piroxicam de 1,0 mg/kg/jour pendant 373 jours consécutifs chez le beagle a causé des signes de toxicité gastro-intestinale et rénale.

#### **4.2. En phase clinique**

- Une ulcération gastrique et une toxicité hépatorénale induites par le piroxicam sont médiées par la peroxydation lipidique [7].
- Erythème pigmenté fixe (EPF) est la seule manifestation cutanée presque exclusivement iatrogène. Parmi les médicaments incriminés, on note les AINS et particulièrement le piroxicam. Il s'agit d'une toxidermie habituellement bénigne mais des formes étendues peuvent être observées et simuler au maximum un syndrome de Lyell [8].
- Pancréatite aiguë secondaire au piroxicam (Exceptionnelle) [9].

La validation des méthodes analytiques constitue une des étapes cruciales et indispensables à l'obtention de médicaments de qualité, efficaces et sûrs. En effet, il s'agit d'un des principaux outils de l'assurance qualité permettant de construire la qualité du produit et d'en conserver les caractéristiques depuis la conception jusqu'à la fin de la commercialisation.

De la notion essentielle de la qualité découle la nécessité de validation qui permet de réduire fortement le risque d'apparition de non-conformité et de maîtriser la non-qualité [10].

### 1. Définition

Selon la norme ISO 17025 : la validation est : « La confirmation par examen et apport de preuves objectives du fait que les exigences particulières en vue d'une utilisation prévue déterminée sont remplies » [11].

Selon la FDA : « Valider une méthode consiste à démontrer, avec un degré de confiance élevé et sous une forme documentée, que la méthode permet d'obtenir un résultat analytique qui atteint les spécifications à l'avance » [12].

### 2. But de la validation [13]

- Démontrer l'aptitude et la fiabilité d'une méthode vis-à-vis des exigences réglementaires et normatives en vigueur.
- 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.
- Obtenir une estimation de la justesse, du biais ou de la fidélité de la méthode.
- Evaluer le risque statistique lié à son utilisation, qui peut être exprimé par l'incertitude de mesure associée au résultat.

### 3. Procédures analytiques à valider

Toutes les procédures analytiques doivent être validées.

Selon les normes NF-EN-ISO / CEI : le laboratoire doit valider :

- Les méthodes conçues, développées par le laboratoire.
- Les méthodes normalisées employées en dehors de leur domaine d'application prévu ainsi que les applications ou modifications de méthodes normalisées.

Les procédures analytiques de la Pharmacopée Européenne et de la Pharmacopée Américaine doivent être considérées comme validées [14].

#### 4. Aspect réglementaire et normatif [15]

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

##### 4.1. Documents ISO 17025

« Exigences générales concernant la compétence des laboratoires d'étalonnages et d'essais » et **ISO 5725** « exactitude (justesse et fidélité) » des résultats et méthodes de mesure.

##### 4.2. Documents ICH

- ICH Q2A: text on validation of analytical procedures «definitions and terminology» 1995.
- ICH Q2B: text on validation of analytical procedures «methodology» 1997.
- ICH Q2 (R1) validation of analytical procedures: text and methodology (2005).

##### 4.3. Documents de la FDA (guidance for industry)

Validation of Bioanalytical Method (2001).

##### 4.4. Documents des commissions SFSTP

- ✓ SFSTP « Guide de validation, rapport d'une commission SFSTP » :
  - Méthodologie (1992) ;
  - Exemples d'application (1992).
- ✓ SFSTP « dosage dans les milieux biologiques par des méthodes chromatographiques» (1997) ;
- ✓ SFSTP « validation des procédures analytiques : harmonisation des démarches » :
  - 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 :
    - Parus dans STP Pharma Pratique en 2006 ;
    - Parus dans Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis en 2008.

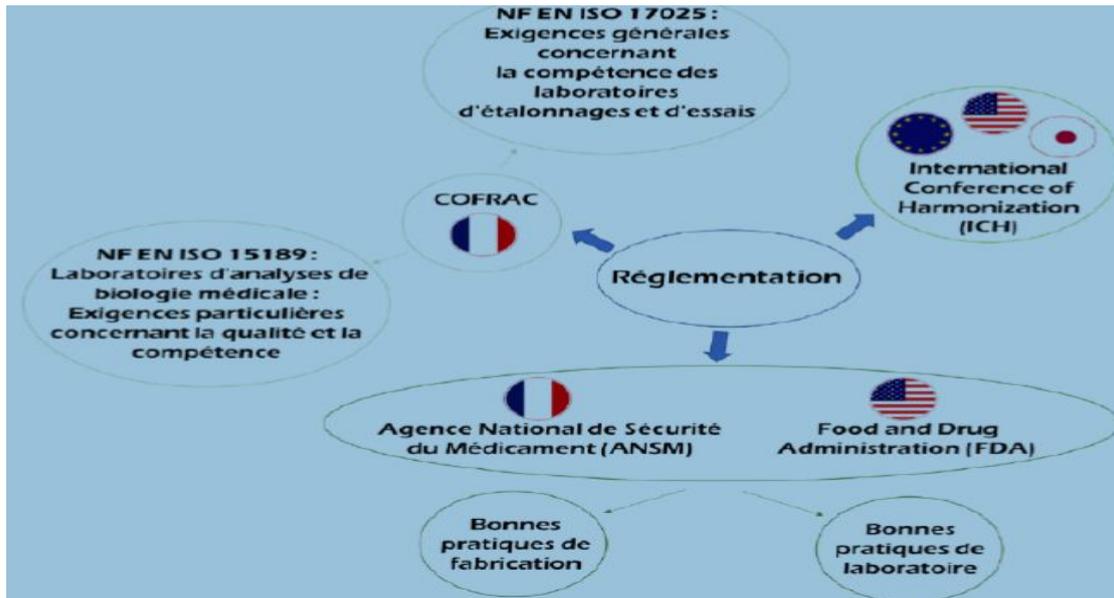
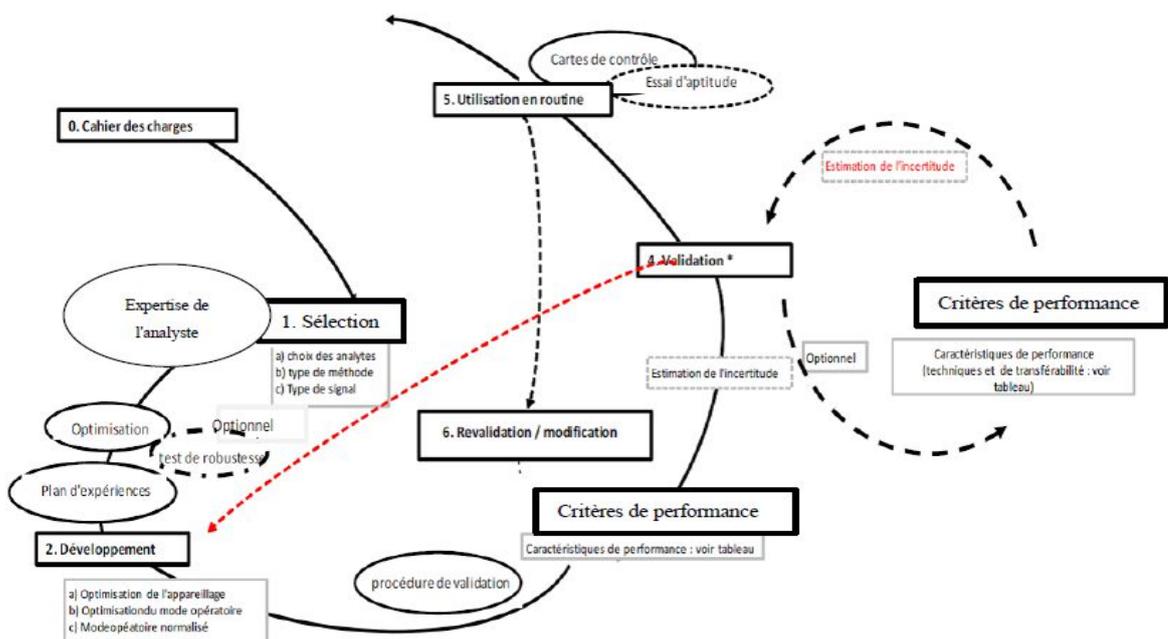


Figure 03 : La réglementation en vigueur concernant la validation des méthodes analytiques [16].

5. Cycle de vie d'une méthode d'analyse

Le cycle de vie d'une méthode est un concept souligné dans la norme ISO 17025 dont la finalité est l'alignement de manière globale de la variabilité de la méthode avec les exigences sur le produit à tester en améliorant la fiabilité de la méthode par la compréhension, la réduction et le contrôle des sources de variabilité [17,18].

La vie d'une méthode d'analyse est un processus évolutif qui suit différentes étapes pouvant être représentées par un cycle montré dans la figure ci-dessous :



**Figure 04 : Cycle de vie d'une méthode d'analyse [14].**

Les principales étapes de ce cycle sont les suivantes :

### **5.1. Sélection de la méthode**

Cette première étape va permettre de définir les objectifs de la méthode et les conditions opératoires initiales.

L'analyste va choisir parmi les diverses méthodes physico-chimiques possibles, la méthode la plus pertinente pour permettre le dosage de l'analyte à déterminer.

La norme ISO 17025 précise que :

« Le laboratoire doit utiliser des méthodes d'essai et/ou d'étalonnage, y compris des méthodes d'échantillonnage, qui répondent aux besoins du client et qui conviennent aux essais et/ou étalonnages qu'il effectue, de préférence les méthodes publiées comme normes internationales, régionales ou nationales ».

Ce texte précise qu'il est préférable d'utiliser des méthodes officielles, lorsque cela est possible. Cependant, l'utilisation de méthodes développées par le laboratoire est acceptée.

Dans ce deuxième cas, le développement de la méthode doit être confié à du personnel qualifié, avec des ressources adéquates, et la démarche de développement ainsi que les résultats obtenus doivent être correctement renseignés [17].

### **5.2. Mise au point et pré-validation de la méthode**

Il s'agit d'une étape de développement de la méthode sélectionnée, afin d'optimiser les différents paramètres du protocole opératoire pour les adapter à la matrice des échantillons qui seront dosés ainsi qu'aux conditions opératoires d'utilisation de la méthode.

Il est important, lors de cette étape de développement, de suivre un cheminement précis et non pas de simplement réaliser des expériences aléatoires, afin de maîtriser la programmation des essais et les délais.

En tenant compte de cette remarque, l'analyste peut utiliser des plans d'expériences, qui vont permettre d'optimiser le nombre d'expériences à réaliser pour trouver les valeurs optimales des variables susceptibles d'influencer le paramètre à optimiser.

Au terme de cette seconde étape, l'analyste devrait avoir recueilli des informations de base sur les performances de la procédure analytique, concernant la pertinence du modèle de régression utilisé pour établir la fonction de réponse, la variabilité des résultats, la limite de quantification et l'intervalle de dosage.

Ces pré-requis vont ainsi constituer une base pour l'étape suivante, qui est la phase de validation proprement dite [17].

### 5.3. Validation de la méthode

L'étape de validation intervient après le développement d'une nouvelle procédure d'analyse. En effet, les performances de la méthode vont évoluer tout au long du cycle de vie, et plus particulièrement au cours des deux premières étapes. Ainsi, la fiabilité du résultat analytique fourni par la méthode doit être améliorée lors de ces premières phases, pour tendre vers une confiance accrue qui sera attestée durant cette troisième étape de validation.

On distingue deux types de validation :

- **La validation inter-laboratoire**, concerne principalement les méthodes analytiques destinées à être utilisées par plusieurs laboratoires, ou bien dont les résultats vont servir lors d'échanges commerciaux. Ainsi, ce type de validation se rencontre rarement dans l'industrie pharmaceutique où les méthodes sont utilisées en interne, et très fréquemment dans l'industrie agro-alimentaire. En effet, il faut impérativement réaliser une validation inter laboratoire pour des méthodes destinées à mesurer la conformité d'une denrée lors d'un échange commercial.

Ce type de validation permet en outre de calculer les limites de reproductibilité de la méthode.

- **La validation intra-laboratoire**, est une validation interne concernant l'ensemble des méthodes analytiques développées par un laboratoire. Le sujet d'étude de cette thèse se limite exclusivement à ce type de validation [17].

### 5.4. Estimation de l'incertitude et vérification de l'aptitude

L'estimation de l'incertitude de mesure, tout comme la validation analytique, est une exigence de la norme **ISO 17025** qui indique que :

« Les laboratoires d'essais doivent aussi posséder et appliquer des procédures pour estimer l'incertitude de mesure ».

Cette incertitude permet d'estimer la capacité de mesure de la méthode, et l'adéquation des résultats qu'elle fournit avec les exigences qui lui sont liées. En ce sens, l'estimation de l'incertitude de mesure et la vérification de l'aptitude de la méthode rejoignent le concept de « fitness-for-purpose ».

L'estimation de l'incertitude de mesure et la validation analytique de la méthode sont des concepts interdépendants et le protocole développé par la commission SFSTP et publié en 2003-2006 lors de la démarche d'harmonisation des validations analytiques permet de les combiner.

Ainsi, l'utilisation du profil d'exactitude comme outil de décision illustre comment l'incertitude peut être obtenue à partir des résultats de validation. Le calcul de l'intervalle de tolérance selon la méthode développée par MEE (1984) permet de démontrer clairement le « fitness-for-purpose » de la méthode [17].

### **5.5. Utilisation en routine**

L'objectif d'une méthode analytique n'est pas sa validation, mais bien son utilisation en routine pour l'analyse d'échantillons de valeur vraie inconnue. Le passage en routine de la méthode s'inscrit dans le cadre d'un système de contrôle de la qualité qui a pour objectifs de valider les résultats obtenus sur des échantillons inconnus, et de contrôler les performances de la méthode analytique au fil du temps [17].

### **5.6. Revalidation**

Au cours de l'utilisation en routine de la méthode analytique, certaines améliorations peuvent être apportées à la méthode. Ces modifications vont alors conduire à une procédure plus ou moins complète de revalidation. Un test simple devra être effectué pour déterminer l'impact de ces modifications. En règle générale, une modification de réglage est considérée comme mineure, tandis qu'une modification affectant le principe de la méthode est considérée comme majeure. Dans ce dernier cas, une procédure de validation complète devra de nouveau être appliquée [17].

## **6. Critères de validation analytique**

Les principaux critères de validation sont ceux couramment utilisés dans les laboratoires d'analyse et dont la nécessité de l'étude a fait l'objet d'un large consensus. Ces critères sont [19] :

- Spécificité-sélectivité ;
- Linéarité ;
- Fidélité (Répétabilité et fidélité intermédiaire) ;
- Justesse ;
- Exactitude ;
- Sensibilité ;
- Robustesse ;
- Limite de détection ;
- Limite de quantification.

Tableau III : Critères de la validation en fonction du type d'analyse [11].

Type de tests caractéristiques	Dosage	Impuretés		Identification	Dosage bio-analyse
		Qualitatif	Essais limites		
Justesse	✓	✓			✓
Fidélité Répétabilité	✓	✓			✓
Fidélité Fidélité intermédiaire	✓	✓			✓
Spécificité Sélectivité	✓	✓	✓	✓	✓
Limite de détection		✓	✓		✓
Limite de quantification		✓			✓
Linéarité	✓	✓			Fonction de réponse
Gamme	✓	✓			✓
Robustesse	✓	✓	✓		✓

### 6.1. Spécificité/sélectivité

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

Une procédure d'analyse est dite « spécifique » lorsqu'elle permet de garantir que le signal mesuré provient seulement de la substance à analyser ou qu'elle permet de mesurer quantitativement un paramètre physicochimique ou un groupement fonctionnel d'une ou de plusieurs substance(s) dans l'échantillon [19].

Dans le cas des méthodes séparatives, on parle plutôt de sélectivité qui est la capacité à différencier et quantifier l'analyte cible en présence d'interférents dans l'échantillon, telles que les techniques chromatographiques, qui sont plutôt sélectives (notion relative) que

spécifiques (notion absolue) [11]. Le degré de sélectivité de la procédure de dosage dépend d'ailleurs de la qualité de la séparation chromatographique et de la sélectivité intrinsèque du mode de détection [19].

### 6.2. Exactitude

L'exactitude exprime l'étroitesse de l'accord entre le résultat d'essai et la valeur de référence acceptée, aussi appelée « valeur conventionnellement vraie ». L'étroitesse de l'accord ainsi observée est la résultante de la somme des erreurs systématiques et aléatoires, en d'autres termes l'erreur totale liée au résultat. Par conséquent, l'exactitude est l'expression de la somme de la justesse et de la fidélité [19].

### 6.3. Linéarité

La linéarité d'une procédure d'analyse est sa capacité à l'intérieur d'un certain intervalle de dosage d'obtenir des résultats directement proportionnels à la quantité (exemple : concentration) en analyte dans l'échantillon. L'exigence de linéarité s'applique aux résultats [concentration calculée = f(concentration introduite)], pas aux réponses [signal = f(concentration introduite)] [19].

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 » [19].

### 6.4. Fidélité

La fidélité de la procédure d'analyse exprime l'étroitesse de l'accord (degré de dispersion, coefficient de variation) entre une série de mesures provenant de multiples prises d'un même échantillon homogène (résultats d'essais indépendants) dans des conditions prescrites.

La fidélité fournit une indication sur les erreurs liées au hasard. Elle peut être évaluée à trois niveaux : la répétabilité, la fidélité intermédiaire (intra-laboratoire) et la reproductibilité (inter-laboratoire). La définition de ces derniers est donnée ci-dessous [20] :

- ❖ **Répétabilité** : conditions où les résultats d'essai indépendants sont obtenus par la même méthode sur des échantillons d'essai identiques dans le même laboratoire, par le même opérateur, utilisant le même équipement et pendant un court intervalle de temps;
- ❖ **Fidélité intermédiaire** : conditions où les résultats d'essai indépendants sont obtenus par la même méthode sur des échantillons d'essai identiques dans le même laboratoire,

avec différents opérateurs et utilisant des équipements différents et pendant un intervalle de temps donné ;

- ❖ **Reproductibilité** : conditions où les résultats d'essai sont obtenus par la même méthode sur des échantillons d'essais identiques dans différents laboratoires, avec différents opérateurs et utilisant des équipements différents.

### 6.5. Justesse

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

La mesure de la justesse est généralement exprimée en termes de recouvrement et de biais absolu ou relatif (erreur systématique) [20].

### 6.6. Sensibilité

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

Une procédure est dite « sensible » si une faible variation de la concentration ou de la quantité d'analyte entraîne une variation significative de la réponse [19].

### 6.7. Limite de détection

La limite de détection d'une procédure d'analyse est la plus petite quantité de l'analyte dans un échantillon pouvant être détectée, mais non quantifiée comme une valeur exacte dans les conditions expérimentales décrites de la procédure [19].

### 6.8. Limite de quantification

La limite de quantification est la plus petite quantité de l'analyte dans un échantillon pouvant être dosée dans les conditions expérimentales décrites avec une exactitude définie [19].

### 6.9. Robustesse

La robustesse d'une méthode d'analyse est une mesure de sa capacité à supporter sans conséquences de petites variations apportées délibérément aux paramètres de la méthode; elle donne une idée de la fiabilité de la méthode aux conditions normales d'utilisation [21].

En fonction du nombre de paramètres à tester, on établit un plan d'expérience à 4, 8 ou 16 essais et on recherche les effets significatifs ou non selon la technique habituelle au traitement des plans d'expérience [22].

### 6.10. Stabilité des solutions

Il s'agit de montrer que les solutions, témoins et essais, ne se dégradent pas pendant la durée des analyses. Donc si les résultats obtenus sont non conformes, cela permettra d'éliminer l'hypothèse d'une attente trop importante avant de l'analyser.

- ❖ Ces deux derniers paramètres, robustesse et stabilité des solutions, ne sont pas obligatoires pour valider une méthode analytique cependant ils apportent des informations importantes et utiles.
- ❖ L'intérêt est de définir les variations admissibles de chacun des paramètres opératoires susceptibles de modifier les résultats d'analyse. Le guide ICH déclare que cette étude doit être faite lors de développement de la méthode et non lors de la validation [23].

## 7. Critères de choix de la validation analytique

Il existe divers critères de validation dont le choix dépend de la méthode d'analyse, qu'elle soit qualitative ou quantitative ; ces derniers ne sont obligatoirement pas décrits en totalité pour chaque méthode mais également l'absence de l'un d'eux doit être justifiée et témoignée dans le rapport de caractérisation et de validation d'une méthode d'analyse [24].

Ces critères sont examinés et hiérarchisés 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'analyse(s) qu'il faudra réaliser [25].

**Tableau IV : Caractéristiques de performance à déterminer pour les méthodes qualitatives et les méthodes quantitatives.**

Etape du processus de validation	Caractéristiques	Performance à déterminer en fonction du type de méthode		
		Qualitative	Quantitative	
<b>Caractérisation Intra-laboratoire</b>	Spécificité	X	X	
	Sensibilité	X	(x)	
	Fonction d'étalonnage/efficacité	(x)	X	
	Fidélité	Répétabilité	(x)	X
		Fidélité intermédiaire	X	X
	Justesse	Sans objet	X	
	Exactitude (justesse +fidélité) <sub>3</sub>	Sans objet	X	
	Linéarité	Sans objet	X	
	Limite de	Quantification	Sans objet	X
		Détection	X	(x)
Domaine de validité	X	X		
<b>Caractérisation Inter-laboratoire</b>	Reproductibilité	X	X	
	Répétabilité	(x)	X	
	LD	(x)	Sans objet	
	LQ	Sans objet	(x)	
	Spécificité	X	Sans objet	
	Sensibilité	X	Sans objet	
	Autres caractéristiques non techniques à définir selon les points critiques est le cahier des charges (délai, rapidité, efficacité, coût...etc.)	X	X	

Sans objet : caractéristique non pertinente.

(x) : les caractéristiques inscrites entre parenthèses sont recommandées.

Les caractéristiques listées dans le tableau IV en amont sont au minimum requises pour une caractérisation complète de la méthode. Toutefois, selon les référentiels applicables au domaine concerné, d'autres caractéristiques pourront être exigées (ex : robustesse, exactitude relative...) [24].

### 8. Etapes de la validation [26]

Les 10 étapes pour valider une méthode avec le profil d'exactitude sont les suivantes :

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

### 9. Etude statistique de la validation analytique

La validation de techniques analytiques repose sur l'étude et la validation de plusieurs critères qui sont : spécificité, linéarité, exactitude, fidélité, limite de quantification et de détection. Cette méthodologie est basée sur les critères décrits dans le guide élaboré par la SFSTP et ICH Q2(R1). Ces derniers reposent sur l'utilisation du profil d'exactitude, qui intègre de façon statistiquement correcte dans un seul graphique l'ensemble des éléments essentiels de la validation. Cette démarche permet de simplifier l'approche de la validation d'une procédure analytique tout en contrôlant le risque associé à son utilisation [20].

#### 9.1. Spécificité

##### 9.1.1. Protocole

Cas de matière première : on s'assure que le signal n'est pas modifié par l'ajout volontaire de produits de structure chimique proche.

Cas de produit fini : on s'assure que l'ensemble des substances autres que la substance à doser ne donne aucun signal comparable à celui de la substance à doser.

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

- Une solution placebo ;
- Une solution standard à 100% (par rapport à la concentration théorique) ;
- Une solution échantillon à 100% (par rapport à la concentration théorique).

- Le signal donné à partir de la solution placebo doit être normalement nul.
- Les signaux obtenus par les deux solutions standards 100% et échantillon 100% doivent être comparables [27].

### 9.1.2. Etude statistique

La spécificité peut être démontrée de deux façons :

- Soit en comparant les chromatogrammes obtenus à partir des quatre solutions préparées : les chromatogrammes obtenus à partir de la solution standard 100% et l'échantillon 100% doivent renfermer des pics au même temps de rétention et avec des surfaces comparables et les chromatogrammes obtenus à partir du diluant et de la solution placebo ne doivent pas présenter un pic au même temps de rétention que l'analyte.
- Soit par la comparaison de la droite obtenue avec les standards de validation (présence de la matrice) avec celle obtenue à partir des standards d'étalonnage.

La comparaison des droites est basée sur le test t de Student selon une stratégie statistique qui permet la recherche d'effet matrice et/ou de l'erreur systématique en vérifiant la spécificité de la méthode pour le dosage du principe actif seul et aussi pour la forme reconstituée [20].

#### Test t de Student

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

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

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

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

Si  $t_{calculé} < t^\circ$  : 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) ;
- $\sigma_{a_1}^2$  et  $\sigma_{a_2}^2$  : 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).

Après avoir vérifié la spécificité de la méthode d'analyse on opère sur deux ensembles d'échantillons :

- ❖ **Standards d'étalonnage (SE)** : peuvent être réalisés sans la matrice (si on a démontré l'absence d'effet matrice) ou avec la matrice, utilisés pour évaluer les différentes fonctions de réponse  $y = f(x)$  afin d'effectuer les prédictions inverses.
- ❖ **Standards de validation (SV)** : doivent toujours être réalisés avec la matrice, utilisés dans le but de déterminer l'erreur totale à chaque niveau de concentration, calculer l'intervalle de tolérance et tracer le profil d'exactitude et déterminer les limites inférieure et supérieure de quantification (intervalle de dosage) [27].

En ce qui concerne la préparation des SE et SV, celle-ci dépend du protocole de validation choisi. Le logigramme de la figure 05 suivante, présente la démarche proposée dans le guide SFSTP 2003 pour sélectionner un protocole expérimental de validation en fonction des contraintes ou des spécificités liées à la procédure de dosage sous épreuve [19].

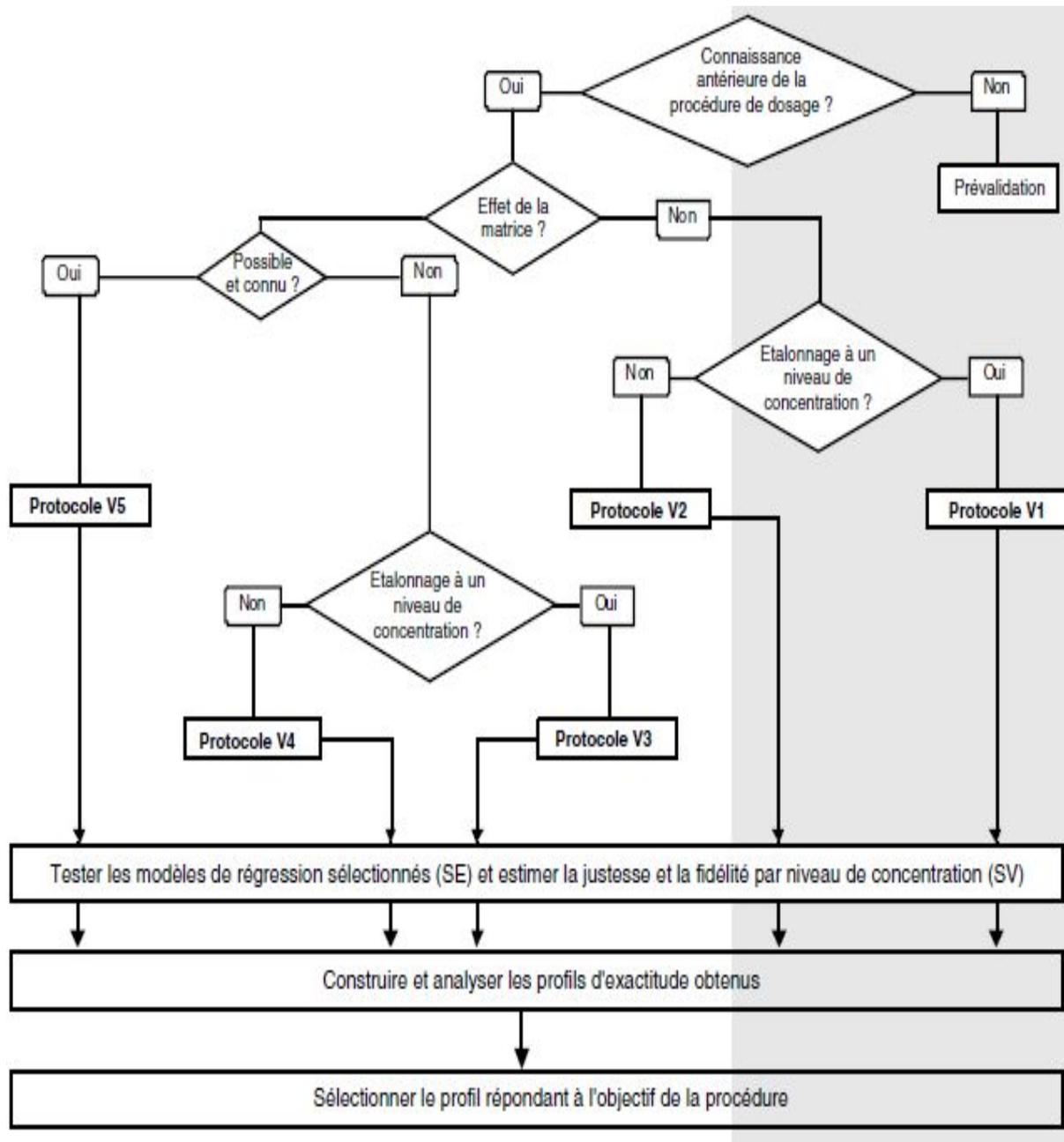


Figure 05 : Logigramme permettant de sélectionner un protocole de validation [19].

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

**Tableau V : Choix du nombre des standards d'étalonnage et de validation en fonction du protocole choisi [19].**

Standards	Niv de conc	Protocole				
		V1	V2	V3	V4	V5
SE. Etalonnage sans la matrice	Bas		<b>2</b>		<b>2</b>	
	Médian	<b>2</b>	<b>2<sup>(2)</sup></b>	<b>2</b>	<b>2<sup>(2)</sup></b>	
	Haut	<b>2<sup>(1)</sup></b>	<b>2</b>	<b>2<sup>(1)</sup></b>	<b>2</b>	
SE. Etalonnage avec la matrice	Bas				<b>2</b>	<b>2</b>
	Médian			<b>2</b>	<b>2<sup>(2)</sup></b>	<b>2<sup>(2)</sup></b>
	Haut			<b>2<sup>(2)</sup></b>	<b>2</b>	<b>2</b>
	Addit					<b>2<sup>(3)</sup></b>
SV. Validation avec la matrice	Bas	<b>3</b>	<b>3</b>	<b>3</b>	<b>3</b>	<b>3</b>
	Médian	<b>3</b>	<b>3</b>	<b>3</b>	<b>3</b>	<b>3</b>
	Haut	<b>3</b>	<b>3</b>	<b>3</b>	<b>3</b>	<b>3</b>
Nbre minimum séries		<b>3</b>	<b>3</b>	<b>3</b>	<b>3</b>	<b>3</b>
Nbre total essais (min)		<b>33</b>	<b>45</b>	<b>39</b>	<b>63</b>	<b>45</b>

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

### 9.2. Fonction de réponse

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

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

$\varepsilon$  : l'erreur associée à la fonction de réponse.

$f$  : appelée communément erreur résiduelle.

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

Différentes fonctions de réponse peuvent être envisagées lors de la validation de la méthode, comme illustré au tableau suivant. Le choix dépend du type de méthode (méthode physicochimique, bio-analytique, immuno-dosage) [20].

**Tableau VI : Exemples des fonctions de réponse [20].**

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

Très vraisemblablement, la plupart des méthodes physicochimiques auront recours à la droite (passant par 0 ou non). Pour les méthodes bio-analytiques, la fonction quadratique pourra être envisagée dans certains cas.

Dans le cas d'un immuno-dosage, le choix se portera sur les fonctions logistiques à 4 ou 5 paramètres [20].

**9.3. Alignement des observations**

Si, pour un niveau de concentration, les quantités introduites ne sont pas identiques pour toutes les séries (souvent pour des 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 : [20]

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

En résumé, pour les différentes fonctions de réponse :

**Tableau VII : Règles d'alignement pour différentes fonctions de réponses [20].**

Fonction de réponse	Règle 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	$y_{ijk,c} = y_{ijk} + (\hat{\delta}_i - \hat{\alpha}_i) \left[ \frac{1}{1 + \left(\frac{\hat{\gamma}_i}{\bar{x}_{ij}}\right)^{\hat{\beta}_i}} - \frac{1}{1 + \left(\frac{\hat{\gamma}_i}{x_{ijk}}\right)^{\hat{\beta}_i}} \right]$

**9.4. Prédiction inverse**

C'est une forme de fonction inverse de la courbe d'étalonnage qui nous permet de déterminer les concentrations calculées, à partir des résultats de la validation, selon cette formule :

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

Avant d'appliquer cette fonction, il faut d'abord assurer l'alignement de toutes les concentrations. Le tableau VIII illustre ces prédictions selon l'alignement des fonctions de réponses utilisées [20].

**Tableau VIII : Calcul des prédictions inverses pour différentes fonctions de réponses [14].**

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

Si les observations ont été alignées, il faut remplacer les  $y_{ijk}$  par  $y_{ijk,c}$  dans le tableau précédent. Si une transformation a été utilisée il ne faut pas oublier d'effectuer la transformation inverse après ce calcul en retour.

Par exemple, après une transformation logarithmique ou racine carrée de la droite les concentrations calculées se font de la manière suivante [20] :

**Tableau IX : Calcul des prédictions inverses pour la droite ayant subi une transformation logarithmique ou racine carrée [20].**

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

## 9.5. Calcul de la justesse et de la fidélité [20]

### 9.5.1 Modèle

L'estimation de la justesse et de la fidélité de la méthode s'effectue avec les concentrations calculées provenant des standards de validation en phase de validation (ou des standards d'étalonnage eux-mêmes en phase de pré-validation).

Cette estimation est réalisée à chacun des  $j$  niveaux de concentration considérés à l'aide du modèle statistique suivant :

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

Avec :

- $x_{ijk}$  est la  $k^{\text{ième}}$  concentration calculée du niveau  $j$  de la  $i^{\text{ième}}$  série ;
- $\mu_j$  est la moyenne des concentrations calculées du niveau de concentration  $j$  ;
- $\alpha_{ij}$  est l'écart entre la moyenne de la  $i^{\text{ième}}$  série et la moyenne  $\mu_j$ . au niveau  $j$ ,  $\alpha_{ij}$  est considéré comme une variable aléatoire ayant une distribution normale de moyenne 0 et de variance  $\sigma_{Bj}^2$  ;
- $\varepsilon_{ijk}$  est l'erreur expérimentale, considérée comme une variable aléatoire ayant une distribution normale de moyenne 0 et de variance  $\sigma_{Wj}^2$ .

L'erreur expérimentale est supposée indépendante de la série.

Les variances  $\sigma_{Bj}^2$  et  $\sigma_{Wj}^2$  représentent les variances inter-série et intra-série respectivement.

La méthode du maximum de vraisemblance restreint est utilisée pour estimer à chaque niveau de concentration  $j$  les paramètres  $\mu_j$ ,  $\sigma_{Bj}^2$  et  $\sigma_{Wj}^2$  du modèle.

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

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

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

Où :

- $MSM_j$  et  $MSE_j$  : Maximum des vraisemblances des moindres carrés pour chaque niveau de concentration  $j$  ;
- $\bar{x}_{ij,calc}$  : Moyenne des concentrations calculées du niveau  $j$  de la série  $i$  ;
- $\bar{x}_{j,calc}$  : Moyenne des concentrations calculées du niveau  $j$  ;
- $x_{ijk,calc}$  : Concentration calculée du niveau  $j$  de la série  $i$  répétition  $k$  ;
- $n$  : nombre de répétitions ;
- $p$  : nombre de série.

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

- Si  $MSE_j < MSM_j$  alors :

$$\hat{\sigma}_{Wj}^2 = MSE_j$$

$$\bar{\sigma}_{Bj}^2 = \frac{MSM_j - MSE_j}{n}$$

- Sinon :

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

$$\bar{\sigma}_{Bj}^2 = 0$$

### 9.5.2. 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 [20] :

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

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

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

Avec :

- $\bar{x}_j$  : Moyenne des concentrations introduites ;
- $\hat{\mu}_j$  : Moyenne des concentrations prédites.

### 9.5.3. Fidélité

L'estimation de la variance intra-série donne une estimation de la variance de répétabilité tandis que la somme des estimations des variances intra et inter-série donne une estimation de la variance de fidélité intermédiaire [20] :

- ❖ Répétabilité :  $\hat{\sigma}_{Re,j}^2 = \hat{\sigma}_{Wj}^2$
- ❖ Fidélité intermédiaire :  $\hat{\sigma}_{IP,j}^2 = \hat{\sigma}_{W,j}^2 + \hat{\sigma}_{B,j}^2$

### 9.6. 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 :

$$Exactitude = X - \mu$$

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

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

L'erreur maximale relative observée pour chaque modèle sur l'ensemble des séries montre déjà l'impact du choix de la fonction de réponse sur l'exactitude des résultats [20,28].

### 9.6.1. 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 :

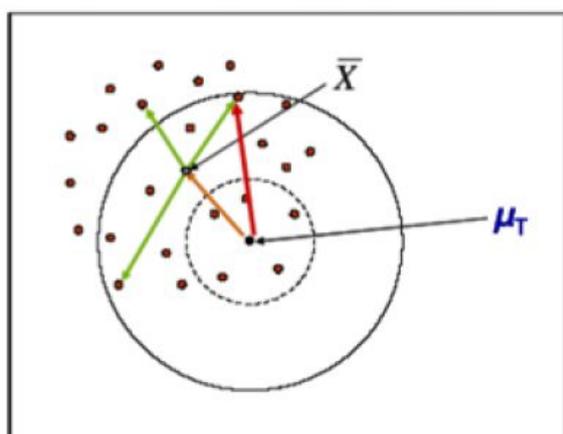
$$X = \mu + |\text{Biais}|_{\text{procédure}} + \text{Fidélité}_{\text{intermediaire}_{\text{procédure}}}$$

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

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

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

Pour mieux comprendre et différencier entre la justesse (biais), la fidélité et l'exactitude ; il faut bien différencier les erreurs ; l'erreur systématique qui représente la justesse et l'erreur aléatoire qui représente la fidélité. La somme de ces deux critères de performance d'une méthode d'analyse nous renseigne sur la qualité d'un résultat de mesure à travers cette erreur totale ou dite globale qui représente l'exactitude de mesure [29].



- Flèche orange : Erreur systématique ou biais,
- Flèche verte : erreur aléatoire ou écart type
- Flèche rouge : erreur totale.
- $\bar{X}$  Est la moyenne des résultats (points rouges)
- $\mu_T$  est la vraie valeur.

**Figure 06 : Représentation schématique des composantes de l'erreur [19].**

Cette erreur totale, comme indiqué ci-dessus, est la somme de la justesse (biais) et de la fidélité. Il est normal que l'erreur maximale observée sur un grand nombre d'observations soit sensiblement plus grande que l'erreur totale vu que ces erreurs maximales représentent des événements rares tandis que l'erreur totale reflète plutôt les plus grandes erreurs auxquelles on peut s'attendre dans la plupart des cas.

L'erreur totale d'une procédure analytique est donc bien un bon indicateur de l'exactitude des résultats qu'elle produit [19].

### 9.7. 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 :

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

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 :

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

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

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

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

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

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 ;
- $n$  : nombre de répétitions ;
- $p$  : nombre de séries.

Le même intervalle en échelle relative devient :

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

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 [20].

## 9.8. Profil d'exactitude et décision

### 9.8.1. Calcul du profil d'exactitude

Le profil d'exactitude de la méthode s'obtient en reliant d'une part les bornes  $L_j$  entre elles ( $L_1 \rightarrow L_2 \rightarrow \dots \rightarrow L_m$ ) et d'autre part les bornes  $U_j$  entre elles.

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

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

Si le profil d'exactitude est entièrement inclus dans les limites d'acceptation  $[-\lambda ; +\lambda]$  alors on peut affirmer que, en routine, le pourcentage de résultats dont la différence entre la valeur déterminée  $X$  et la valeur vraie  $V$  est inférieure, en valeur absolue à  $\lambda$  sera au moins égale à  $\beta$  [20].

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

### 9.8.2. Choix de la fonction de réponse

L'utilisation de certaines fonctions ne permet pas à la procédure analytique d'atteindre ses objectifs vu que pour certaines concentrations, les limites de tolérances sortent des limites d'acceptation. Par ailleurs, parmi les fonctions de réponses acceptables, on pourra remarquer que certaines fournissent des résultats meilleurs que d'autres. Ce seront ces dernières qui devront être retenues, sachant que le coefficient de détermination  $R^2$  est toujours supérieur à 0.99 et pas en rapport avec la qualité des résultats.

Le profil d'exactitude, qui est le reflet direct de ce que la procédure analytique est capable, permet de juger l'adéquation de différentes pratiques et permet de prendre des décisions sur le choix de la fonction de réponse adéquate [20].

### 10. 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 =  $f$  (concentrations introduites)), pas aux réponses (signal =  $f$  (concentrations introduites)). C'est un pré-requis à l'estimation de la justesse [20].

Le critère de linéarité se réfère à la relation entre la quantité introduite et la quantité calculée (résultat) d'analyte à partir de la courbe d'étalonnage tandis que la fonction de réponse se réfère à la relation entre la réponse instrumentale et la concentration [30].

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 [20].

### 11. Limites de quantification supérieures et inférieures

Le profil d'exactitude, construit à partir des intervalles de mesures attendus, 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 ( $LQ_{inf}$ ) et haute ( $LQ_{sup}$ ) 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 [20].

Ce travail étant focalisé sur la validation analytique de dosage du piroxicam. L'objectif principal est de mettre au point et de valider une méthode de dosage d'un principe actif «Piroxicam» dans des comprimés dosés à 20 mg par chromatographie liquide à haute performance (HPLC).

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

## 1. Matériel et méthodes

### 1.1. Matériel

#### 1.1.1. Matières premières

**Tableau X : Matières premières utilisées.**

<b>Matières premières</b>	
<b>Principe actif</b>	Piroxicam
<b>Excipients</b>	Lactose monohydraté
	Cellulose microcristalline
	Hydroxypropylcellulose
	Sodium stéarylfumarate

## 1.1.2. Réactifs

Tableau XI : Réactifs utilisés.

Réactifs	Propriétés physicochimiques	Précautions
Acide chlorohydrique	Formule brute : HCl N° CAS : 7647-01-0 Mr : 36,46 g/mol $\rho$ : 1,19 g.cm <sup>-3</sup>	
Méthanol	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>	
Acétonitrile	Formule brute : C <sub>2</sub> H <sub>3</sub> N N° CAS : 75-05-8 Mr : 41,05 g/mol $\rho$ : 0,8 g.cm <sup>-3</sup>	
Hydrogénophosphate de sodium	Formule brute : Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> N° CAS : 7558-79-4 Mr : 141,9588 g/mol $\rho$ : 0,5–1,2 g.cm <sup>-3</sup>	
Eau distillée	Formule brute : H <sub>2</sub> O N° CAS : 7732-18-5 Mr : 18 g/mol $\rho$ : 1 g.cm <sup>-3</sup>	

**1.1.3. Appareillages et équipements**

Les appareils et équipements du laboratoire de chimie analytique utilisés afin de réaliser ce travail sont résumés ci-dessous :

**Tableau XII : Appareillages utilisés.**

Désignation		Spécification	Usage
<b>HPLC SHIMADZU (LC20)</b>	Pompe	Lc 20 at	Analyse (obtention des chromatogrammes)
	Injecteur automatique	SIL 20 A	
	Contrôleur	CBM-20	
	Compartiment de la colonne	CTO-20 A	
	Colonne SHIMADZU	C18 (25 cm)	
	Détecteur	Spectrophotomètre UV visible	
	Logiciel d'exposition	LC-solution	
Sonicateur		Advantage-LAB	Solubilisation
Balances analytiques		KERN METLER TOLEDO	Pesée
Etuve		MEMMERT	Séchage

**1.1.4. Verreries et autres**

Durant notre travail nous avons utilisé la verrerie suivante fournie par le laboratoire de Chimie Analytique de Tizi Ouzou :

**Tableau XIII : Verreries et autres matériels utilisés.**

Verreries	Autres
Fioles jaugées de 20 ml, 50 ml, 100ml, 1000ml, 2000ml Béchers Eprouvettes 1000 ml, 2000 ml Pipette jaugée 2 ml Erlenmeyer Entonnoirs Vials Verre de montre	Pissette à eau Spatule Papier filtre Compte-goutte

## 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 les industriels du médicament 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.

#### 1.2.1.1. Choix du protocole de validation

Selon le logigramme des protocoles proposé par la SFSTP 2003 (figure n° 04) et le tableau V du même guide, nous avons pu sélectionner le protocole de validation adéquat pour notre étude, sachant qu'il y a absence d'effet matrice, la procédure de dosage est connue ultérieurement et l'étalonnage se fait à plusieurs niveaux de concentration, nous avons donc adopté le protocole V2 en utilisant 5 niveaux de concentration pour les SE et les SV quant à eux comportent 5 niveaux de concentration.

### 1.2.1.2. Choix des paramètres de validation

- **Limites d'acceptabilité ( $\lambda$ )** :  $\lambda = \pm 5\%$ .
- **Probabilité de confiance ( $\beta$ )** :  $\beta = 95\%$ , on choisit  $\geq 95\%$  dans le domaine pharmaceutique.
- **Risque d'erreur accepté ( $\alpha$ )** :  $5\%$ .

### 1.2.1.3. Choix de diluant

La British Pharmacopoeia recommande l'utilisation du méthanol comme solvant de dissolution du piroxicam, ce produit est connu pour sa toxicité et son coût élevé. Au sein du Laboratoire de Chimie Analytique de Tizi Ouzou, nous avons remplacé ce dernier par un mélange de l'acide chlorhydrique (HCl) et de méthanol « 60% HCl et 40% méthanol » pour des raisons de solubilité et de sécurité afin de pouvoir manipuler en toute fiabilité.

### 1.2.1.4. Choix de dilution

Pour réaliser un dosage direct, nous avons effectué des dilutions 1/10 à toutes les solutions mères de tous les niveaux de concentration (standards d'étalonnage et de validation). Cette dilution a été sélectionnée pour des raisons de concentration adéquate à celle du comprimé et pour une meilleure lecture des résultats.

## 1.2.2. Préparation des solutions

### 1.2.2.1. Diluant : HCl méthanolique (40% V/V) 0.05 M

Dans une fiole jaugée de 2L, verser une quantité de l'eau distillée, ajouter 8,7 ml d'HCl puis, ajouter 800 ml de méthanol et compléter au trait de jauge avec de l'eau distillée.

### 1.2.2.2. Préparations des solutions standards

#### A. Solutions standards du Piroxicam

Dans des fioles jaugées de 50 ml, peser les différentes masses correspondantes à chaque niveau de concentration du piroxicam, dissoudre dans des volumes suffisants du diluant, mettre au sonicateur pour une dissolution totale puis compléter au trait de jauge avec le même diluant.

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

Niveaux de concentrations en %	80	90	100	110	120
Masses théoriques du piroxicam	20 mg	22,5 mg	25 mg	27,5 mg	30 mg

### B. Préparation de la solution placebo

Dans une fiole jaugée de 100 ml peser 100 mg du placebo (mélange de HMC et de sodium stéarylfumarate), dissoudre dans un volume suffisant de diluant, ajuster jusqu'au trait de jauge puis filtrer à l'aide d'un papier filtre.

### C. Solutions des standards d'étalonnage

Dans des fioles jaugées de 20 ml, mettre 2 ml de la solution standard du piroxicam correspondant au niveau de concentration considéré, compléter au trait de jauge avec le diluant. Effectuer deux répétitions pour chaque niveau de concentration.

**Tableau XV : Tableau présentant le protocole de la préparation des solutions des standards d'étalonnages.**

Niveaux de concentrations en %	80	90	100	110	120
<b>Protocole</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Peser chaque PE théorique du piroxicam pour chaque répétition dans une fiole de 50 ml (solution mère);</li> <li>- Ajouter le diluant et mettre dans le sonicateur pour une dissolution complète;</li> <li>- Compléter au trait de jauge avec le diluant pour ainsi obtenir des solutions mères;</li> <li>- Mettre 2 ml de la solution mère dans une fiole de 20 ml;</li> <li>- Compléter au trait de jauge avec le diluant (une dilution 1/10);</li> <li>- Agiter par retournement à chaque fois et remplir les vials.</li> </ul>				
<b>Solutions à préparer</b>	<b>SE = 5x3x2 = 30 solutions (5 niveaux, 3 séries, 2 répétitions)</b>				

**D. Solutions des standards de validation**

Dans des fioles jaugées de 20 ml, mettre 2ml de la solution standard du piroxicam, ajouter 2ml de la solution placebo, mélanger et compléter au trait de jauge avec le diluant. Effectuer trois répétitions pour chaque niveau de concentration.

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

Niveaux de concentrations en %	80	90	100	110	120
<b>Protocole</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Peser chaque PE théorique du piroxicam pour chaque répétition dans une fiole de 50 ml;</li> <li>- Ajouter le diluant et mettre dans le sonicateur pour une dissolution complète;</li> <li>- Compléter au trait de jauge avec le diluant pour ainsi obtenir des solutions mères ;</li> <li>- Mettre 2 ml de la solution mère dans une fiole de 20 ml ;</li> <li>- Ajouter 5 ml de la solution placebo ;</li> <li>- Compléter au trait de jauge avec le diluant (une dilution 1/10) ;</li> <li>- Agiter par retournement à chaque fois et remplir les vials.</li> </ul>				
<b>Solutions à préparer</b>	<b>SE = 5x3x3 = 45 solutions (5 niveaux, 3 séries, 3 répétitions)</b>				

**1.2.2.3. Préparation de la phase mobile**

Peser 17,9g de Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, mettre cette masse dans une fiole jaugée de 1L et compléter au trait de jauge avec de l'eau distillée, mélanger et puis filtrer la solution à l'aide du papier filtre.

Dans une éprouvette de 1000ml, mettre 550ml la solution filtrée (55%), ajouté 300ml de l'acétonitrile (30%) et 150ml de méthanol (15%), bien mélanger la solution.

#### 1.2.2.4. Préparation de la feuille de calcul

Afin de réaliser l'étude statistique nous avons utilisé des feuilles de calcul développées par l'équipe du laboratoire de Chimie Analytique de Tizi Ouzou, à l'aide de logiciel Excel de Microsoft office 2016 enregistré et installé sur le système d'exploitation Windows 10 authentique.

L'ensemble des équations rentrant dans l'étude statistique de la validation et la construction du profil d'exactitude sont introduites dans ce tableau, pour avoir les résultats complets en tableaux et en graphes si nécessaire juste en introduisant les données brutes en termes de prises d'essais et de leurs réponses instrumentales.

### 1.3. Conditions chromatographiques

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

Colonne	Longueur	25 cm
	Diamètre	4,6 mm
	Taille des particules	5 $\mu\text{m}$
	Phase stationnaire	Gel de silice octadecylesilyle (C18)
Détection	Spectrophotomètre UV-Visible : longueur d'onde $\lambda=273$ nm	
Volume injecté	20 $\mu\text{l}$	
Débit	1 ml/min	
Température	Ambiante	

## 2. Résultats

## 2.1. Données brutes

Les données brutes obtenues pour les standards d'étalonnage et de validation sont mentionnées dans les deux tableaux ci-dessous :

Tableau XVIII : Données brutes des standards d'étalonnage.

<b>DONNEES BRUTES OBTENUES (STANDARD D'ETALONNAGE)</b>							
Niveaux de concentration	Rep	SERIES					
		Série 1		Série 2		Série 3	
		Quantités introduites (mg)	Réponse instrumentale (Aire du pic)	Quantités introduites (mg)	Réponse instrumentale (Aire du pic)	Quantités introduites (mg)	Réponse instrumentale (Aire du pic)
<i>J</i>	<i>k</i>	x	y	x	y	x	y
1	1	20,00	1679062	20,05	1689844	20,06	1661615
	2	19,96	1647438	20,03	1678458	19,99	1639697
2	1	22,47	1917522	22,46	1900597	22,52	1918724
	2	22,51	1912882	22,56	1942862	22,47	1908891
3	1	24,98	2116027	24,98	2124199	24,90	2101943
	2	24,90	2182922	25,05	2177075	25,01	2165853
4	1	27,49	2387276	27,50	2326065	27,50	2330520
	2	27,50	2393691	27,47	2316946	27,55	2354514
5	1	30,04	2643336	29,98	2630987	29,98	2625456
	2	30,05	2658622	30,03	2663776	30,02	2652029

Tableau XIX : Données brutes des standards de validation.

<b>DONNEES BRUTES OBTENUES (STANDARD DE VALIDATION)</b>							
Niveaux conc	Rep	SERIES <i>i</i>					
		Série 1		Série 2		Série 3	
		Quantités introduites (mg)	Réponse instrumentale (Aire du pic)	Quantités introduites (mg)	Réponse instrumentale (Aire du pic)	Quantités introduites (mg)	Réponse instrumentale (Aire du pic)
<i>J</i>	<i>k</i>	x	y	x	y	x	y
1	1	19,96	1680716	20,00	1683054	20,06	1706546
	2	20,06	1707313	20,03	1714143	20,00	1682857
	3	19,96	1698861	20,01	1702873	20,00	1690290
2	1	22,47	1853450	22,46	1910936	22,47	1853470
	2	22,47	1857069	22,56	1909312	22,51	1935600
	3	22,48	1867851	22,47	1886584	22,49	1868569
3	1	25,08	2151747	24,90	2098764	25,02	2092129
	2	25,10	2146090	24,98	2177026	25,05	2192211
	3	25,04	2101705	25,00	2198764	25,00	2184751
4	1	27,50	2393691	27,50	2392260	27,47	2308368
	2	27,53	2408828	27,55	2350832	27,5	2327013
	3	27,49	2324623	27,51	2321458	27,54	2414469
5	1	30,05	2683174	30,02	2629285	29,98	2692260
	2	30,04	2636676	29,98	2617581	29,97	2621458
	3	30,02	2621182	30,05	2643336	30,02	2658622

## 2.2. Spécificité

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

Tableau XX : Résultats obtenus sur la gamme SE.

STANDARD D'ETALONNAGE					
Niveaux	Répétition	Quantités introduites (mg)	Aire du pic de piroxicam	$(y_i - y^*)^2$	$(x - x^*)^2$
80%	1	20,06	1661615	1834960,735	24,40
	2	19,99	1639697	191081338,4	25,10
90%	1	22,52	1918724	466326136,5	6,15
	2	22,47	1908891	274763670,5	6,40
100%	1	24,90	2101943	593038333,8	0,01
	2	25,01	2165853	839024393,9	0,00
110%	1	27,50	2330520	2127492582	6,25
	2	27,55	2354514	726041713,2	6,50
120%	1	29,98	2625456	100329550,5	24,80
	2	30,02	2652029	1071772395	25,20

	Pente	Ordonnée à l'origine
	96288,22	- 271281,30
SD	2530,02064	63878,98001

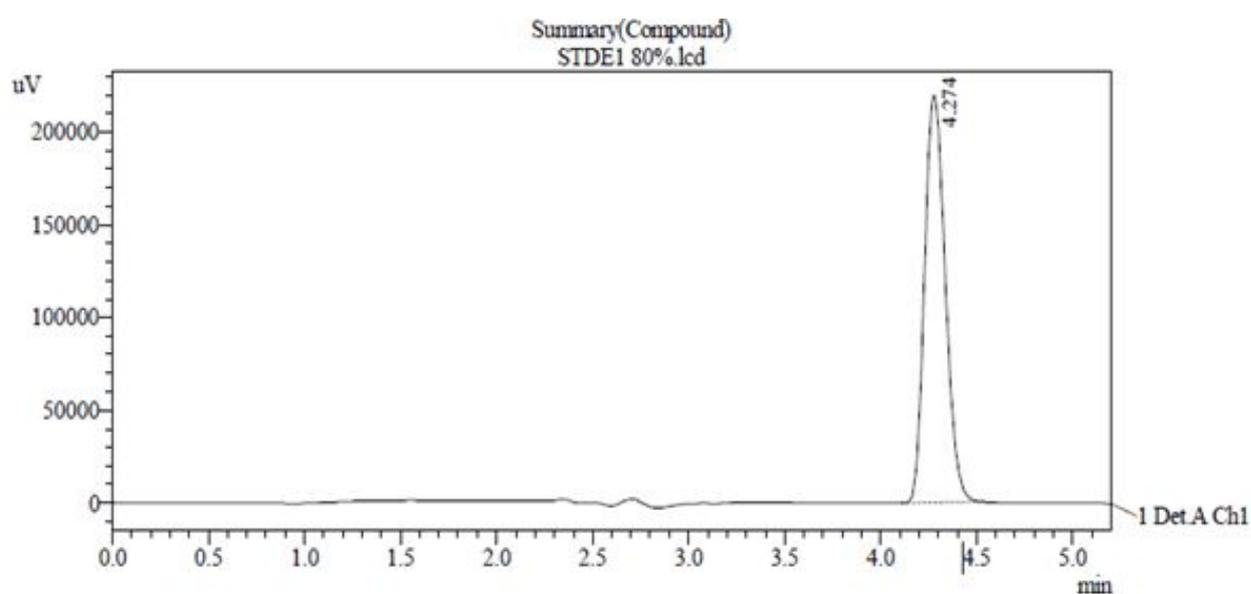


Figure 07 : Chromatogramme de la gamme standard d'étalonnage.

Tableau XXI : Résultats obtenus sur la gamme SV.

STANDARD DE VALIDATION					
Niveaux	Répétition	Quantités introduites (mg)	Aire du pic de piroxicam	$(y_i - y^*)^2$	$(x - x')^2$
80%	1	20,06	1706546	1044859121	24,46
	2	20,00	1682857	207084574,9	25,05
	3	20,00	1690290	476262247,6	25,05
90%	1	22,47	1853470	2695377207	6,43
	2	22,51	1935600	695704409,9	6,23
	3	22,49	1868569	1500509195	6,33
100%	1	25,02	2092129	3346855654	0,00
	2	25,05	2192211	1548612054	0,00
	3	25,00	2184751	1346036430	0,00
110%	1	27,47	2308368	5869871500	6,07
	2	27,5	2327013	3702438095	6,22
	3	27,54	2414469	518544330,3	6,42
120%	1	29,98	2692260	4424869035	24,75
	2	29,97	2621458	11643118,52	24,65
	3	30,02	2658622	843607410,5	25,15

	Pente	Ordonnée à l'origine
	95919,21	- 249917,69
SD	3409,533685	86101,41168

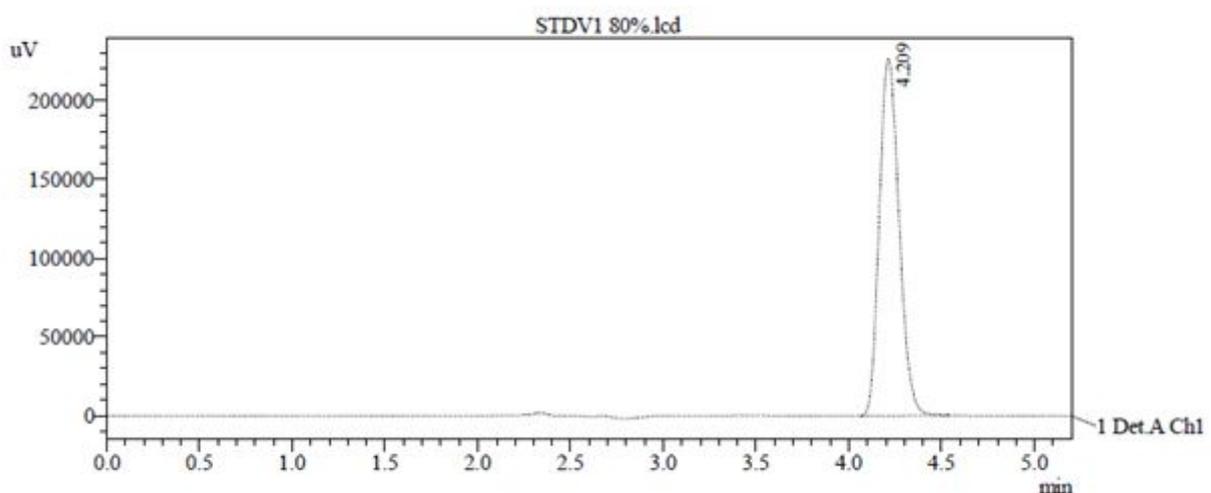
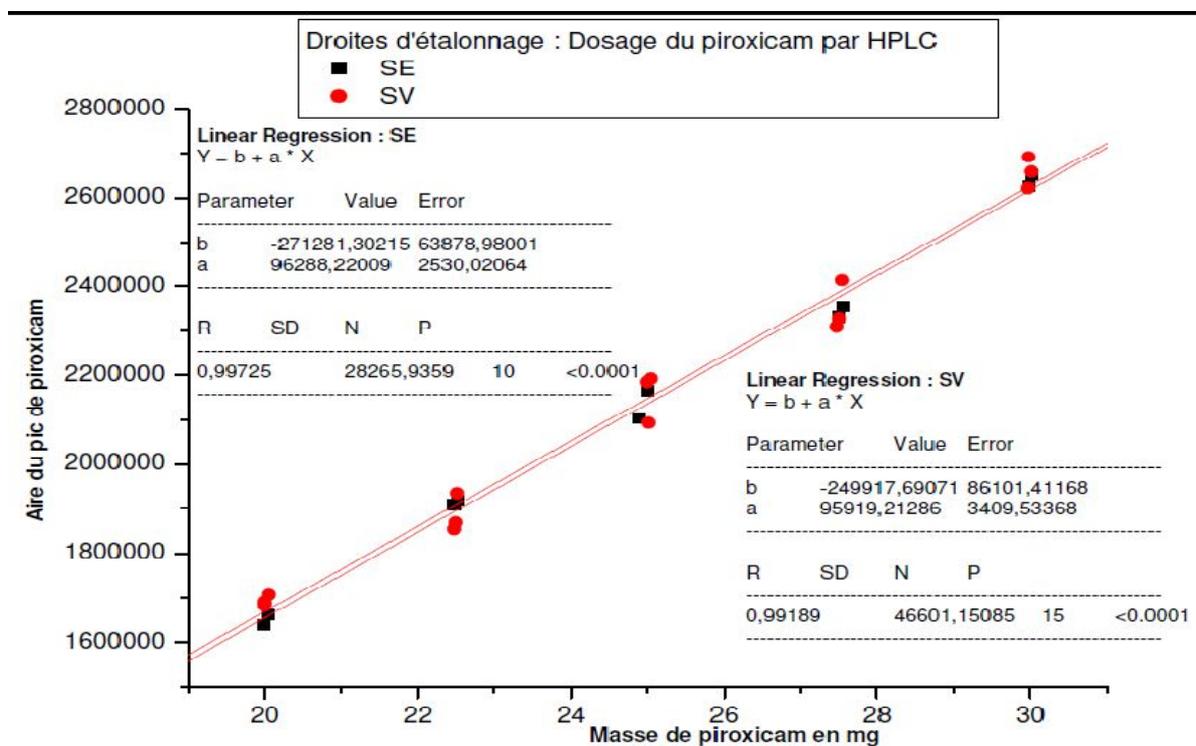


Figure 08 : Chromatogramme de la gamme standard de validation.

Tableau XXII : Comparaison des pentes et des ordonnées à l'origine des SE et SV.

	Pente	Ordonnée à l'origine
t calculé	0,038156769	0,006026708
t° (0,05, 21)	2,079613845	2,079613845
Condition	t calculé < t° (0,05, 21)	
Différence	Non significative	Non significative
Conclusion	Pente comparables : absence d'effet matrice	Ordonnées à l'origine comparables : absences d'erreurs systématiques

Figure 09 : Courbe de spécificité obtenue avec la fonction  $y = ax + b$ .

### 2.3. Fonction de réponse

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

❖ **Modèle :**  $y = ax + b$

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

NIVEAU CONC	Rep	SERIES <i>i</i>					
		Série 1		Série 2		Série 3	
		Quantités introduites (mg)	Réponse instrumentale (Aire du pic)	Quantités introduites (mg)	Réponse instrumentale (Aire du pic)	Quantités introduites (mg)	Réponse instrumentale (Aire du pic)
<i>j</i>	<i>k</i>	x	y	X	y	x	y
1		20,00	1679062	20,05	1689844	20,06	1661615
		19,96	1647438	20,03	1678458	19,99	1639697
2		22,47	1917522	22,46	1900597	22,52	1918724
		22,51	1912882	22,56	1942862	22,47	1908891
3		24,98	2116027	24,98	2124199	24,90	2101943
		24,90	2182922	25,05	2177075	25,01	2165853
4		27,49	2387276	27,50	2326065	27,50	2330520
		27,50	2393691	27,47	2316946	27,55	2354514
5		30,04	2643336	29,98	2630987	29,98	2625456
		30,05	2658622	30,03	2663776	30,02	2652029

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

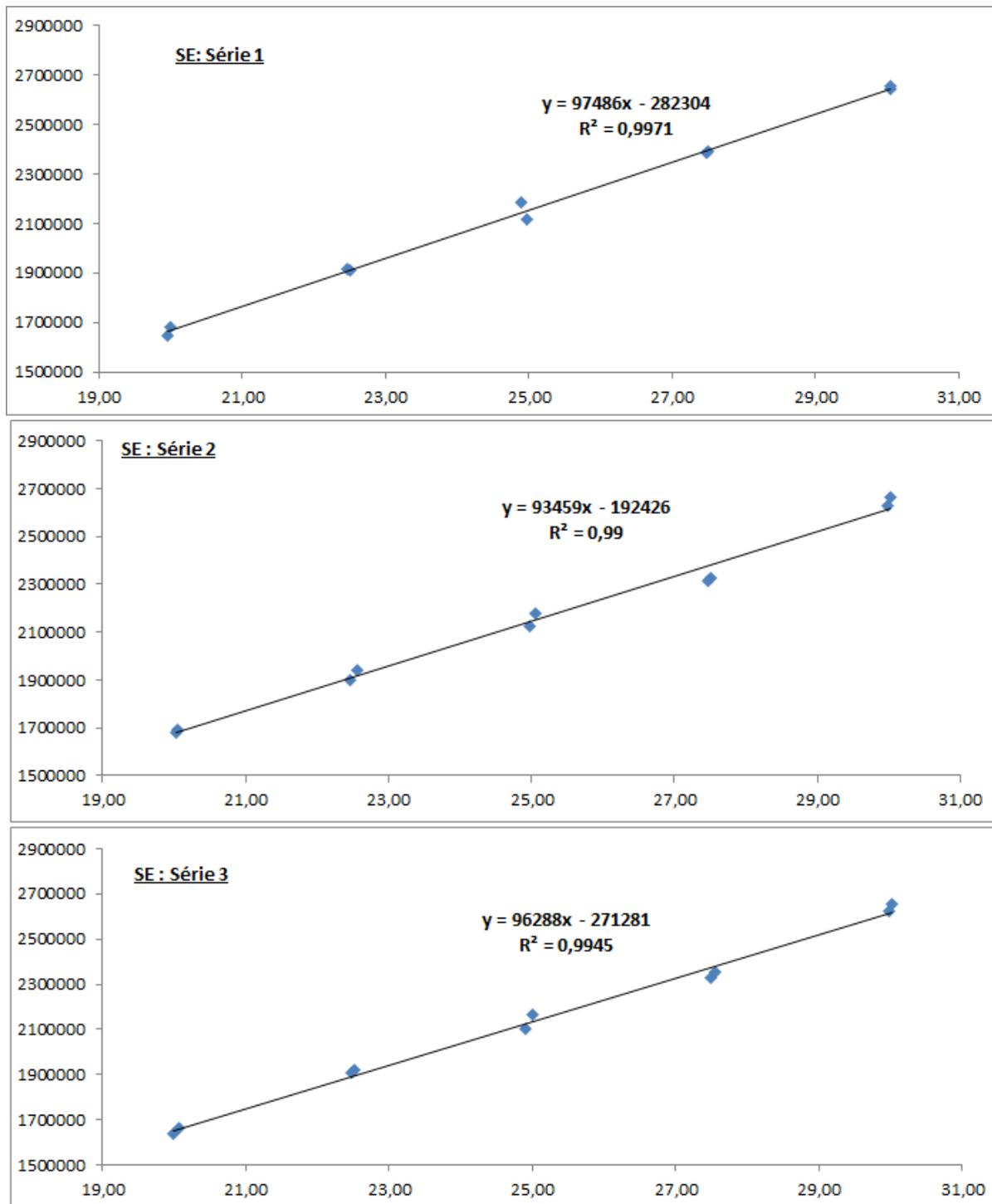


Figure 10 : Courbes d'étalonnages obtenues avec la fonction  $y = ax + b$ .

❖ Modèle :  $y = ax$

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

NIVEAU CONC	Rep	SERIES <i>i</i>					
		Série 1		Série 2		Série 3	
		Quantités introduites (mg)	Réponse instrumentale (Aire du pic)	Quantités introduites (mg)	Réponse instrumentale (Aire du pic)	Quantités introduites (mg)	Réponse instrumentale (Aire du pic)
<i>j</i>	<i>k</i>	x	y	X	y	x	y
1		20,00	1679062	20,05	1689844	20,06	1661615
		19,96	1647438	20,03	1678458	19,99	1639697
2		22,47	1917522	22,46	1900597	22,52	1918724
		22,51	1912882	22,56	1942862	22,47	1908891
3		24,98	2116027	24,98	2124199	24,90	2101943
		24,90	2182922	25,05	2177075	25,01	2165853
4		27,49	2387276	27,50	2326065	27,50	2330520
		27,50	2393691	27,47	2316946	27,55	2354514
5		30,04	2643336	29,98	2630987	29,98	2625456
		30,05	2658622	30,03	2663776	30,02	2652029

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

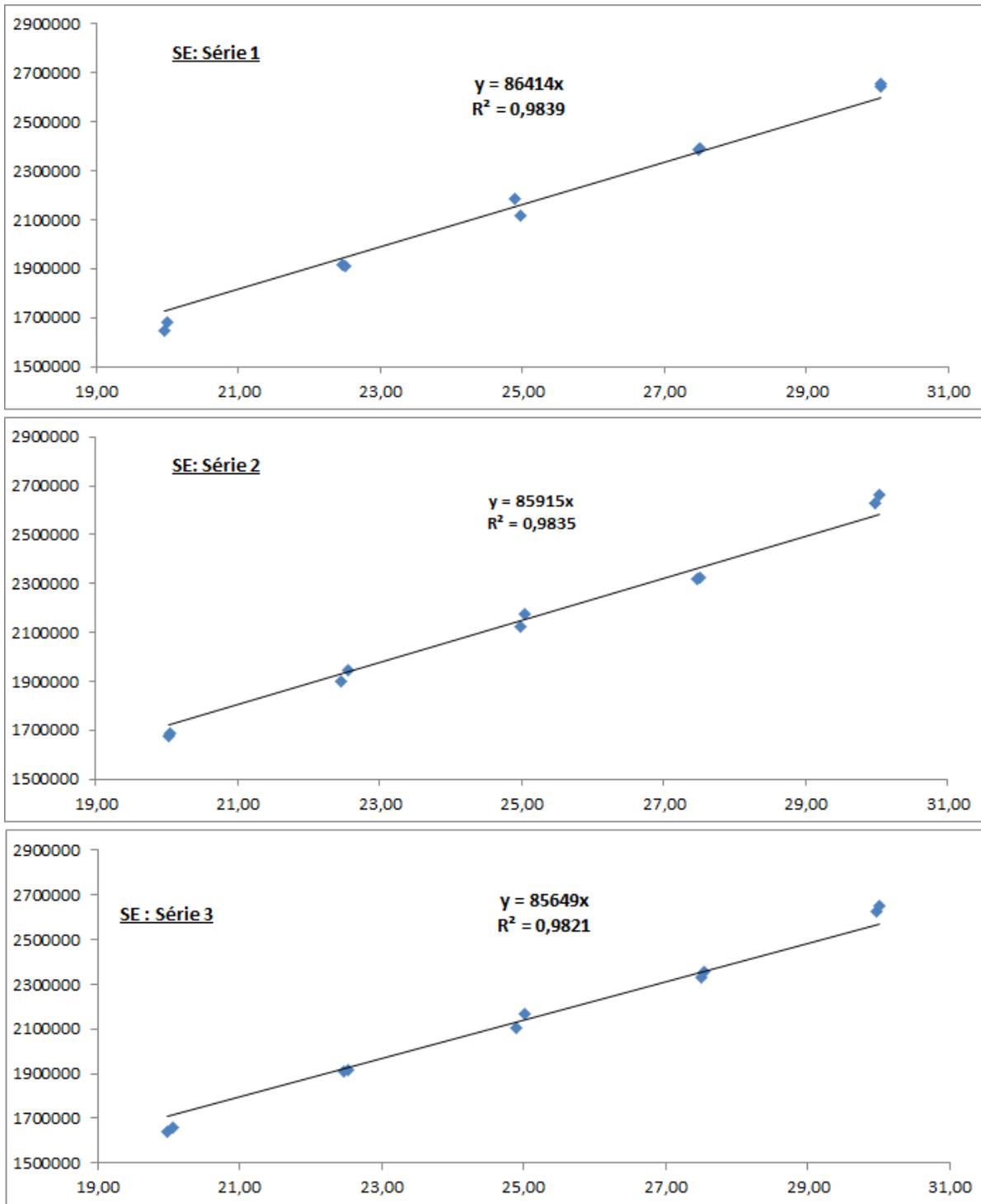


Figure 11 : Courbes d'étalonnages obtenues avec la fonction  $y = ax$ .

❖ Modèle :  $\sqrt{y} = f(\sqrt{x})$

Tableau XXV : Résultats obtenus pour la fonction  $\sqrt{y} = f(\sqrt{x})$ .

Données transformées racine racine : Standard d'étalonnage (sans la matrice)							
Niv de Conc j	Répétitions i	Série 1		Série 2		Série 3	
		Racine Quantités introduites (mg)	Racine signal (aire du pic)	Racine Quantités introduites (mg)	Racine signal (aire du pic)	Racine Quantités introduites (mg)	Racine signal (aire du pic)
1	1	4,47	1295,79	4,48	1299,94	4,48	1289,04
	2	4,47	1283,53	4,48	1295,55	4,47	1280,51
2	1	4,74	1384,75	4,74	1378,62	4,75	1385,18
	2	4,74	1383,07	4,75	1393,87	4,74	1381,63
3	1	5,00	1454,66	5,00	1457,46	4,99	1449,81
	2	4,99	1477,47	5,00	1475,49	5,00	1471,68
4	1	5,24	1545,08	5,24	1525,14	5,24	1526,60
	2	5,24	1547,16	5,24	1522,15	5,25	1534,44
5	1	5,48	1625,83	5,48	1622,03	5,48	1620,33
	2	5,48	1630,53	5,48	1632,11	5,48	1628,51
Pente		332,473909		pente 318,2610497		pente 329,4901528	
Ordonnée à l'origine		-195,00616		ord,origine -127,431536		ord,origine -186,524958	

Données transformées racine racine : Standard de validation (dans la matrice)							
Niv de Conc	Répétitions i	Série 1		Série 2		Série 3	
		Racine Quantités introduites (mg)	Racine signal (aire du pic)	Racine Quantités introduites (mg)	Racine signal (aire du pic)	Racine Quantités introduites (mg)	Racine signal (aire du pic)
1	1	4,47	1296,42	4,47	1297,33	4,48	1306,35
	2	4,48	1306,64	4,48	1309,25	4,47	1297,25
	3	4,47	1303,40	4,47	1304,94	4,47	1300,11
2	1	4,74	1361,41	4,74	1382,37	4,74	1361,42
	2	4,74	1362,74	4,75	1381,78	4,74	1391,26
	3	4,74	1366,69	4,74	1373,53	4,74	1366,96
3	1	5,01	1466,88	4,99	1448,71	5,00	1446,42
	2	5,01	1464,95	5,00	1475,47	5,00	1480,61
	3	5,00	1449,73	5,00	1482,82	5,00	1478,09
4	1	5,24	1547,16	5,24	1546,69	5,24	1519,33
	2	5,25	1552,04	5,25	1533,24	5,24	1525,46
	3	5,24	1524,67	5,24	1523,63	5,25	1553,86
5	1	5,48	1638,04	5,48	1621,51	5,48	1640,81
	2	5,48	1623,78	5,48	1617,89	5,47	1619,09
	3	5,48	1619,01	5,48	1625,83	5,48	1630,53

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

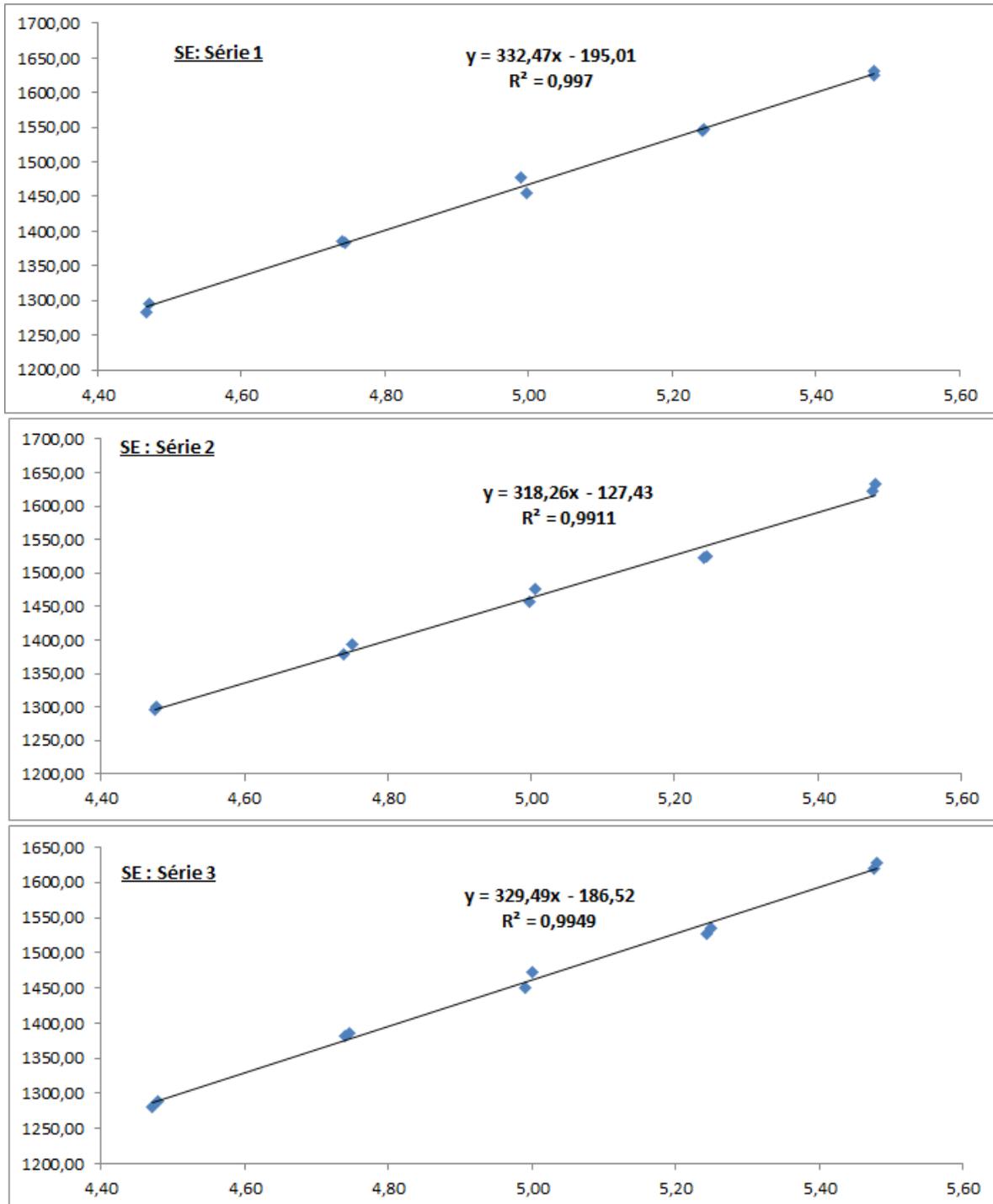


Figure 12 : Courbes d'étalonnages obtenues avec la fonction  $\sqrt{y} = f(\sqrt{x})$ .

❖ **Modèle** :  $\ln y = f(\ln x)$

**Tableau XXVI** : Résultats obtenus pour la fonction  $\ln y = f(\ln x)$ .

Données transformées ln ln : Standard d'étalonnage (sans la matrice)							
Niv Conc j	Répétitions i	Série 1		Série 2		Série 3	
		ln Quantités introduites (mg)	ln signal (aire du pic)	ln Quantités introduites (mg)	ln signal (aire du pic)	ln Quantités introduites (mg)	ln signal (aire du pic)
1	1	3,00	14,33	3,00	14,34	3,00	14,32
	2	2,99	14,31	3,00	14,33	3,00	14,31
2	1	3,11	14,47	3,11	14,46	3,11	14,47
	2	3,11	14,46	3,12	14,48	3,11	14,46
3	1	3,22	14,57	3,22	14,57	3,21	14,56
	2	3,21	14,60	3,22	14,59	3,22	14,59
4	1	3,31	14,69	3,31	14,66	3,31	14,66
	2	3,31	14,69	3,31	14,66	3,32	14,67
5	1	3,40	14,79	3,40	14,78	3,40	14,78
	2	3,40	14,79	3,40	14,80	3,40	14,79
<b>Pente</b>			<b>1,13527531</b>	<b>pe</b>	<b>1,085082655</b>	<b>pe</b>	<b>1,129178421</b>
<b>Ordonnée à l'origine</b>			<b>10,9273408</b>	<b>ord,origine</b>	<b>11,08440235</b>	<b>ord,origine</b>	<b>10,93820174</b>

Données transformées ln-ln : Standard de validation (dans la matrice)							
Niv Conc j	Répétitions i	Série 1		Série 2		Série 3	
		ln Quantités introduites (mg)	ln signal (aire du pic)	ln Quantités introduites (mg)	ln signal (aire du pic)	ln Quantités introduites (mg)	ln signal (aire du pic)
1	1	2,99	14,33	3,00	14,34	3,00	14,35
	2	3,00	14,35	3,00	14,35	3,00	14,34
	3	2,99	14,35	3,00	14,35	3,00	14,34
2	1	3,11	14,43	3,11	14,46	3,11	14,43
	2	3,11	14,43	3,12	14,46	3,11	14,48
	3	3,11	14,44	3,11	14,45	3,11	14,44
3	1	3,22	14,58	3,21	14,56	3,22	14,55
	2	3,22	14,58	3,22	14,59	3,22	14,60
	3	3,22	14,56	3,22	14,60	3,22	14,60
4	1	3,31	14,69	3,31	14,69	3,31	14,65
	2	3,32	14,69	3,32	14,67	3,31	14,66
	3	3,31	14,66	3,31	14,66	3,32	14,70
5	1	3,40	14,80	3,40	14,78	3,40	14,81
	2	3,40	14,79	3,40	14,78	3,40	14,78
	3	3,40	14,78	3,40	14,79	3,40	14,79

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

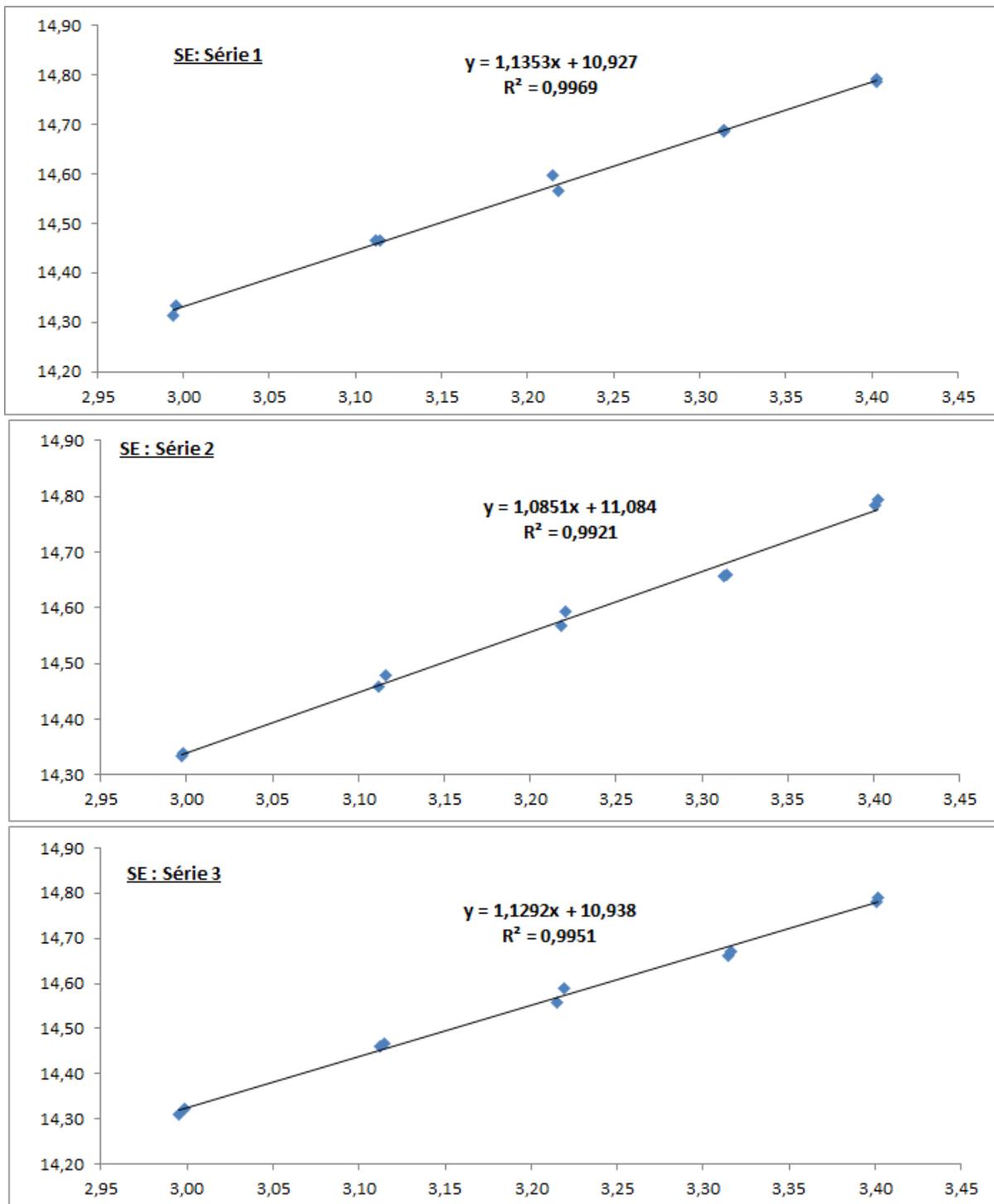


Figure 13 : Courbes d'étalonnages obtenues avec la fonction  $\ln y = f(\ln x)$ .

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

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

Dans le présent travail nous avons généré pour chaque fonction un profil d'exactitude présenté dans les figures suivantes :

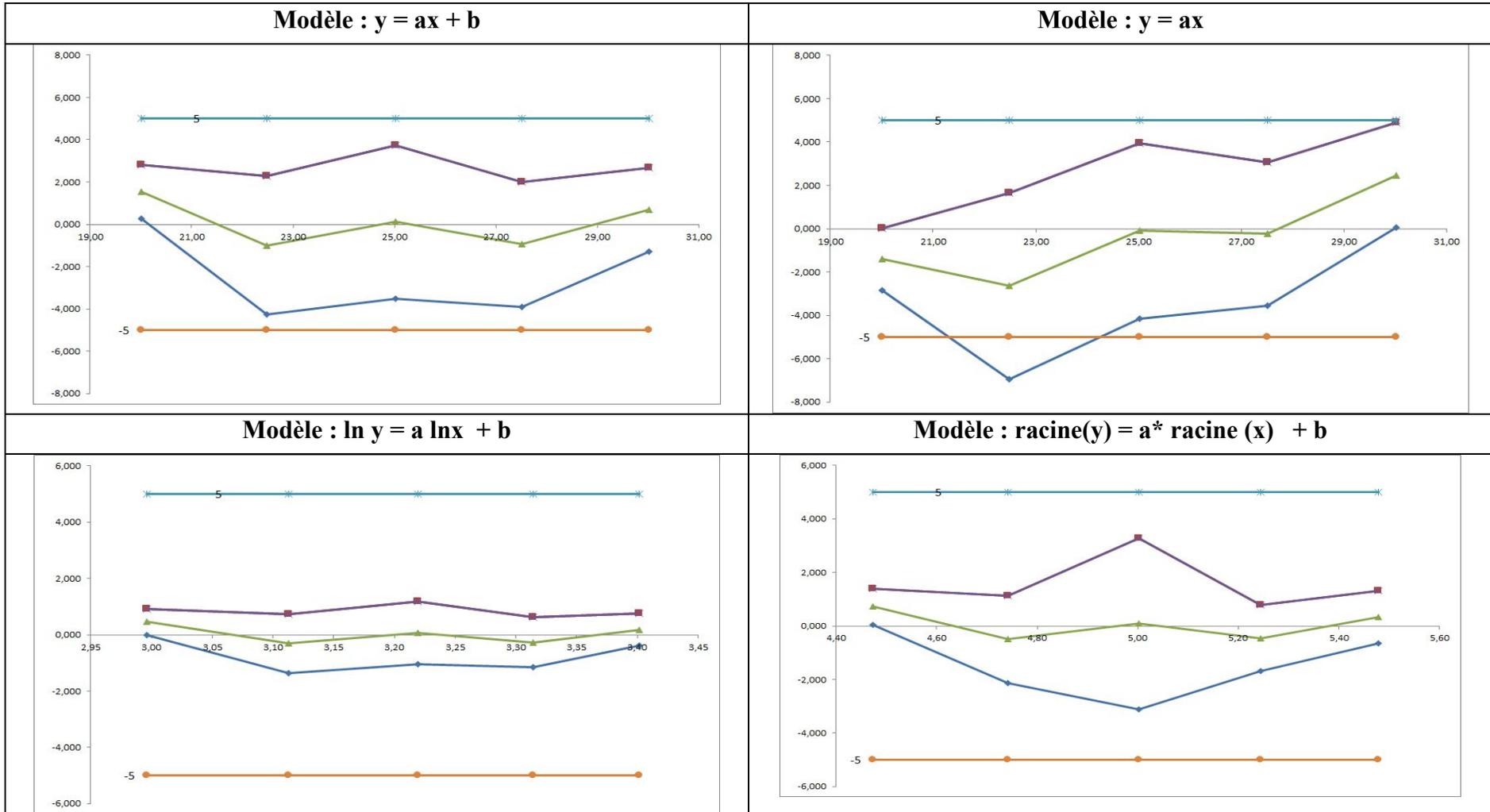


Figure 14 : Courbes des profils d'exactitude obtenues avec les différentes fonctions.

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

Après avoir examiné soigneusement les profils d'exactitude des différents modèles et en fonction de ces motifs de choix, nous avons sélectionné :

- Le modèle régression linéaire  $y = ax + b$

Vu sa simplicité et sa facilité de mise en œuvre dans l'analyse de routine le modèle régression linéaire est le plus adéquat.

#### **2.4. Alignement des observations**

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

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

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

Niv de Conc j	Répétitions i	Série 1		Série 2		Série 3		Moy des $x_{i,j,k}$			Moy $x_j$ introduite
		Quantités (Concentrations) introduites (mg)	signal (aire du pic, absorbance)	Quantités (Concentrations) introduites (mg)	signal (aire du pic, absorbance)	Quantités (Concentrations) introduites (mg)	signal (aire du pic, absorbance)	Série 1	Série 2	Série 3	
1	1	19,96	1680716,00	20,00	1683054,00	20,06	1706546,00	19,99	20,01	20,02	20,01
	2	20,06	1707313,00	20,03	1714143,00	20,00	1682857,00				
	3	19,96	1698861,00	20,01	1702873,00	20,00	1690290,00				
2	1	22,47	1853450,00	22,46	1910936,00	22,47	1853470,00	22,47	22,50	22,49	22,49
	2	22,47	1857069,00	22,56	1909312,00	22,51	1935600,00				
	3	22,48	1867851,00	22,47	1886584,00	22,49	1868569,00				
3	1	25,08	2151747,00	24,90	2098764,00	25,02	2092129,00	25,07	24,96	25,02	25,02
	2	25,10	2146090,00	24,98	2177026,00	25,05	2192211,00				
	3	25,04	2101705,00	25,00	2198764,00	25,00	2184751,00				
4	1	27,50	2393691,00	27,50	2392260,00	27,47	2308368,00	27,51	27,52	27,50	27,51
	2	27,53	2408828,00	27,55	2350832,00	27,50	2327013,00				
	3	27,49	2324623,00	27,51	2321458,00	27,54	2414469,00				
5	1	30,05	2683174,00	30,02	2629285,00	29,98	2692260,00	30,04	30,02	29,99	30,01
	2	30,04	2636676,00	29,98	2617581,00	29,97	2621458,00				
	3	30,02	2621182,00	30,05	2643336,00	30,02	2658622,00				

Pentes des droites d'étalonnage		Ordoonnées des droites d'étalonnage	
Série 1 : pente =	97486,274	Série 1 : ord. orig =	-282304,180
Série 2 : pente =	93459,150	Série 2 : ord. orig =	-192425,890
Série 3 : pente =	96288,220	Série 3 : ord. orig =	-271281,302

**2.5. Prédiction inverses**

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

Les prises d'essai prédites avec la fonction de réponse choisie sont présentées dans le tableau suivant :  $y = ax + b$

Tableau XXVIII : Prédications inverses obtenues avec les SV.

Alignement des réponses			Prédications inverses $X_{ijk, calc}$			Moy des prédictions inverses			$\mu_{j, calc} =$ $1/n \sum x_{ijk, cal}$
Série1	Série2	Série3	Série1	Série2	Série3	Série 1	Série 2	Série 3	
1683965,54	1684300,12	1702694,47	20,17	20,08	20,50	20,29	20,25	20,40	<b>20,314</b>
1700813,92	1712585,35	1684782,76	20,34	20,38	20,31				
1702110,54	1703184,53	1692215,76	20,36	20,28	20,39				
1853774,95	1914362,84	1855395,76	21,91	22,54	22,09	21,97	22,41	22,40	<b>22,262</b>
1857393,95	1903392,92	1933674,24	21,95	22,42	22,90				
1867201,09	1889076,24	1868569,00	22,05	22,27	22,22				
2151097,09	2104371,55	2092449,96	24,96	24,58	24,55	24,78	25,15	25,21	<b>25,047</b>
2143490,37	2175156,82	2189643,31	24,88	25,33	25,56				
2104954,54	2195025,63	2186997,73	24,49	25,55	25,53				
2394340,91	2394129,18	2311577,61	27,46	27,68	26,82	27,27	27,26	27,22	<b>27,248</b>
2406553,32	2348028,23	2327333,96	27,58	27,18	26,99				
2326247,77	2322392,59	2410938,43	26,76	26,91	27,86				
2681874,18	2628973,47	2693222,88	30,41	30,19	30,79	30,05	30,20	30,42	<b>30,222</b>
2636351,05	2621007,84	2623383,76	29,94	30,10	30,06				
2622806,77	2640220,70	2655733,35	29,80	30,31	30,40				

## 2.6. Justesse

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

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

Justesse				
Niveaux de concentration	Répétitions	Biais Absolus	Biais relatifs	% de Recouvrement
80%	1	0,322	1,611	101,611
	2			
	3			
90%	1	-0,211	-0,939	99,061
	2			
	3			
100%	1	0,037	0,147	100,147
	2			
	3			
110%	1	-0,257	-0,934	99,066
	2			
	3			
120%	1	0,207	0,690	100,690
	2			
	3			

## 2.7. Fidélité

La fidélité de notre méthode est évaluée dans de conditions de répétabilité et de fidélité intermédiaire. Elle est calculée pour chaque niveau de concentration, exprimée en écart type et en termes de coefficients de variations.

Les calculs des MSE<sub>j</sub>, MSM<sub>j</sub>, des variances intra-série et inter-série et les CV de répétabilité et de fidélité-intermédiaire sont présentés dans les deux tableaux suivants :

Tableau XXX : Calcul des MSEj , MSMj.

Calcul du MSMj						Calcul du MSEj							
(Xi,j - Uj)			(Xi,j - Uj) <sup>2</sup>			MSMj = 3/2Σ( Xi,j - Uj) <sup>2</sup>	(Xi,j,k- moyXi,j)			(Xi,j,k- moyXi,j) <sup>2</sup>			MSEj = 1/6Σ(xi,j,k- moyXi,j) <sup>2</sup>
Série 1	Série 2	Série 3	Série 1	Série 2	Série 3		Série 1	Série 2	Série 3	Série 1	Série 2	Série 3	
-0,02	-0,06	0,09	0,00	0,00	0,01	<b>0,019</b>	-0,12	-0,17	0,10	0,01	0,03	0,01	<b>0,014</b>
							0,05	0,13	-0,09	0,00	0,02	0,01	
							0,07	0,03	-0,01	0,00	0,00	0,00	
-0,29	0,15	0,14	0,09	0,02	0,02	<b>0,192</b>	-0,06	0,13	-0,32	0,00	0,02	0,10	<b>0,071</b>
							-0,02	0,01	0,50	0,00	0,00	0,25	
							0,08	-0,14	-0,18	0,01	0,02	0,03	
-0,27	0,10	0,17	0,07	0,01	0,03	<b>0,166</b>	0,18	-0,58	-0,66	0,03	0,33	0,44	<b>0,218</b>
							0,11	0,18	0,35	0,01	0,03	0,12	
							-0,29	0,39	0,32	0,08	0,16	0,10	
0,02	0,01	-0,03	0,00	0,00	0,00	<b>0,002</b>	0,19	0,42	-0,40	0,04	0,18	0,16	<b>0,219</b>
							0,32	-0,07	-0,23	0,10	0,01	0,06	
							-0,51	-0,35	0,63	0,26	0,12	0,40	
-0,17	-0,02	0,19	0,03	0,00	0,04	<b>0,102</b>	0,36	-0,01	0,37	0,13	0,00	0,14	<b>0,081</b>
							-0,11	-0,10	-0,35	0,01	0,01	0,13	
							-0,25	0,11	-0,02	0,06	0,01	0,00	

Tableau XXXI : Calcul des CV de répétabilité et de fidélité-intermédiaire.

Niv de Conc	Répétitions i	MSM	MSE	MSE <sub>2</sub>	(MSM - MSE)/3	$\sigma^2_{w,j}$	$\sigma^2_{B,j}$	Ecat type de répétabilité $\sigma_{w,j}$	Ecat type intersérie $\sigma_{B,j}$	Ecat type de Fidélité intermédiaire Racine( $\sigma^2_{w,j} + \sigma^2_{B,j}$ )	CV répétabilité	CV fidélité intermédiaire
1	1	0,019	0,014	0,016	0,002	0,014	0,002	0,120	0,039	0,126	0,600	0,631
	2											
	3											
2	1	0,192	0,071	0,101	0,040	0,071	0,040	0,266	0,201	0,334	1,185	1,484
	2											
	3											
3	1	0,166	0,218	0,205	-0,017	0,205	0,000	0,467	0,000	0,453	1,868	1,811
	2											
	3											
4	1	0,002	0,219	0,164	-0,072	0,164	0,000	0,468	0,000	0,405	1,700	1,474
	2											
	3											
5	1	0,102	0,081	0,086	0,007	0,081	0,007	0,285	0,084	0,297	0,949	0,989
	2											
	3											
<b>Normes</b>											<b>&lt; 2,0 %</b>	<b>&lt; 2,0 %</b>

**2.8. Exactitude**

Le tableau ci-dessous présente l'exactitude relative calculée pour chaque niveau de concentration des standards de validation

**Tableau XXXII : résultats de calcul de l'exactitude.**

Niv de Conc j	Répétitions i	Exactitude relative ijk			Exactitude relative ij
		Série 1	Série 2	Série 3	
1	1	1,051	0,404	2,197	1,217
	2	1,408	1,764	1,573	1,582
	3	1,983	1,363	1,959	1,769
2	1	-2,485	0,367	-1,706	-1,275
	2	-2,320	-0,599	1,731	-0,396
	3	-1,916	-0,882	-1,185	-1,328
3	1	-0,473	-1,304	-1,884	-1,220
	2	-0,863	1,412	2,028	0,859
	3	-2,204	2,182	2,122	0,700
4	1	-0,158	0,639	-2,351	-0,623
	2	0,189	-1,334	-1,862	-1,003
	3	-2,662	-2,188	1,148	-1,234
5	1	1,185	0,562	2,695	1,480
	2	-0,336	0,411	0,309	0,128
	3	-0,732	0,862	1,261	0,463

### 2.9. Erreur total et intervalle de tolérance

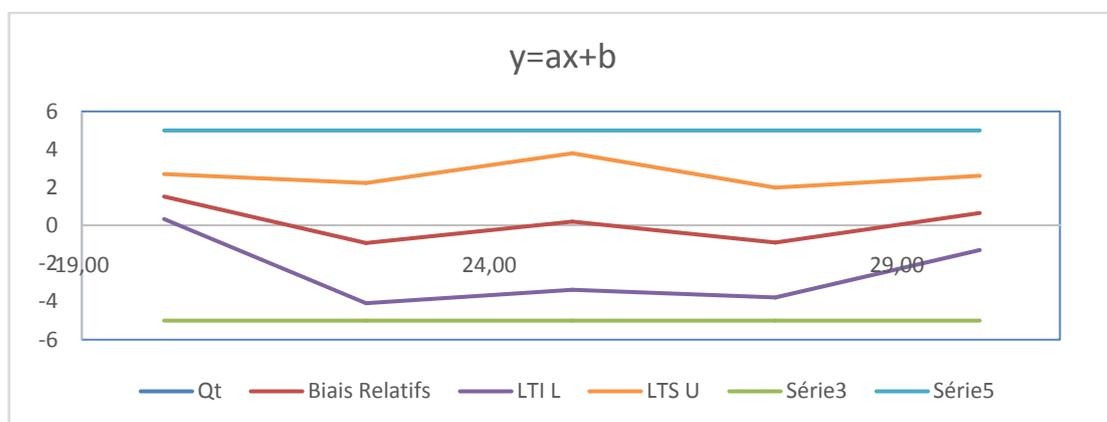
L'erreur totale et l'erreur totale relative ainsi que les limites de tolérance sont calculées pour chaque niveau de concentration, les résultats obtenus sont dans le tableau ci-dessous :

**Tableau XXXIII : Calcul de l'erreur totale et des intervalles de tolérances inférieurs et supérieurs.**

Niv de Conc j	Conc	Répétitions i	R <sub>j</sub>	B <sub>j</sub>	V	Q <sub>t</sub>	Erreur totale absolue	Erreur totale relative	Limite de tolérance inférieure	Limite de tolérance supérieure
1	20,01	1	0,105	0,916	7,174	1,895	0,431	2,154	0,251	2,795
		2								
		3								
2	22,49	1	0,569	0,761	5,117	2,015	0,558	2,483	-4,263	2,265
		2								
		3								
3	25,02	1	0,000	1,000	7,714	1,895	0,481	1,923	-3,504	3,729
		2								
		3								
4	27,51	1	0,000	1,000	7,714	1,895	0,667	2,426	-3,896	1,990
		2								
		3								
5	30,01	1	0,088	0,928	7,269	1,895	0,504	1,680	-1,301	2,682
		2								
		3								

### 2.10. Profil d'exactitude

Parmi les différents modèles, nous avons opté pour le modèle de régression linéaire pour la validation de la méthode de dosage du Piroxicam qui est illustré dans le profil d'exactitude indiqué dans la figure suivante :



**Figure 15 : Tracé du profil d'exactitude pour la fonction  $y = ax + b$ .**

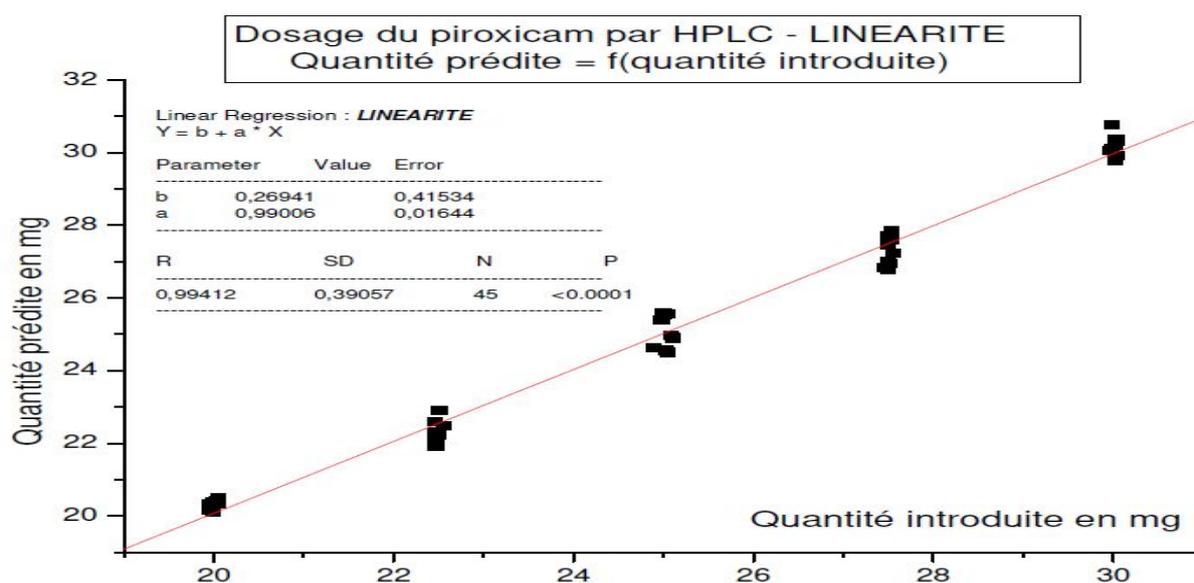
## 2.11. Linéarité

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

$$y = 0,99x + 0,269$$

Tableau XXXIV : Masses prédites en fonction des masses introduites.

Niveaux	Répétitions	SERIE 1		SERIE 2		SERIE 3	
		Quantités introduites (mg)	Quantités prédites (mg)	Quantités introduites (mg)	Quantités prédites (mg)	Quantités introduites (mg)	Quantités prédites (mg)
80%	1	19,96	20,15	20,00	20,11	20,06	20,49
	2	20,06	20,32	20,03	20,42	20,00	20,30
	3	19,96	20,34	20,01	20,32	20,00	20,38
90%	1	22,47	21,91	22,46	22,59	22,47	22,09
	2	22,47	21,95	22,56	22,47	22,51	22,91
	3	22,48	22,05	22,47	22,32	22,49	22,23
100%	1	25,08	24,97	24,90	24,62	25,02	24,56
	2	25,10	24,90	24,98	25,38	25,05	25,57
	3	25,04	24,50	25,00	25,59	25,00	25,55
110%	1	27,50	27,46	27,50	27,71	27,47	26,84
	2	27,53	27,59	27,55	27,22	27,5	27,00
	3	27,49	26,77	27,51	26,94	27,54	27,86
120%	1	30,05	30,38	30,02	30,20	29,98	30,77
	2	30,04	29,92	29,98	30,11	29,97	30,05
	3	30,02	29,79	30,05	30,31	30,02	30,38

Figure 16 : Courbe de linéarité obtenue avec la fonction  $y = ax + b$ .

### 2.12. Limites de quantification et intervalle de dosage

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

L'intervalle de dosage est l'intervalle compris entre les limites inférieures et supérieures de quantification où la procédure analytique atteint l'exactitude souhaité.

- Limite inférieure de quantification ( $LQ_{\text{inf}}$ ) (Unit) = **0,4 mg/ml**.
- Limite supérieure de quantification ( $LQ_{\text{sup}}$ ) = **0,6 mg/ml**.

### 3. Discussion

#### 3.1. Spécificité

Nous procédons à la comparaison des deux pentes et des deux ordonnées à l'origine.

❖ Comparaison des deux pentes :

$$t_{\text{calculé}} = 0,038156769$$

$t^0(0,05 ; 21)$  lu sur la table de Student = 2,079613845. (Annexe)

$t_{\text{calculé}} < t^0(0,05 ; 21)$  donc les deux pentes ne sont pas significativement différentes au risque  $\alpha = 5\%$  considéré, donc on conclue l'absence d'effet matrice.

❖ Comparaison des deux ordonnées à l'origine :

$$t_{\text{calculé}} = 0,006026708$$

$t^0(0,05 ; 21)$  lu sur la table de Student = 2,079613845. (Annexe)

$t_{\text{calculé}} < t^0(0,05 ; 21)$  donc les deux pentes ne sont pas significativement différentes au risque  $\alpha = 5\%$  considéré, ce qui explique une absence d'erreur systématique.

La discussion des résultats obtenus est résumée dans le tableau suivant :

**Tableau XXXV : Signification des résultats des deux pentes et des deux ordonnées à l'origine entre elles.**

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

La spécificité de la méthode est confirmée par l'absence d'effet matrice et d'erreurs systématiques suite à la comparaison des deux pentes et des deux ordonnées à l'origine.

On peut dire que statiquement la méthode est spécifique avec un risque de 5%.

### 3.2. Choix de la fonction de réponse

D'après la figure précédente (n°14) représentant les profils d'exactitude, nous sélectionnons l'un des modèles d'étalonnage suivants :

- Régression linéaire avec une équation  $y = ax + b$
- Fonction logarithmique népérien  $\ln y = (\ln x)$
- Fonction racine carrée  $\sqrt{y} = f(\sqrt{x})$

Nous avons opté pour la fonction linéaire  $y = ax + b$  en raison de la simplicité du modèle.

### 3.3. Critères de performance de la fonction de réponse choisie

L'estimation de la fidélité et de la justesse ne renseigne pas sur la qualité des résultats et ne permet pas de prendre une décision sur la validité de la méthode mais elle est une étape intermédiaire obligatoire pour pouvoir évaluer si la procédure analytique va vraisemblablement pouvoir ou non quantifier avec une exactitude suffisante chacune des quantités inconnues.

#### 3.3.1. Justesse

Vu que les biais relatifs des différents niveaux sont inférieurs à 1%. De plus, 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 théoriques considérée comme étant la valeur de référence est assez étroit pour tous les niveaux, on dit que la méthode est juste.

#### 3.2.2. Fidélité

La fidélité de la méthode de dosage est exprimée par le coefficient de variation (% CV) obtenu en effectuant le rapport entre l'écart-type et la moyenne des réponses.

La répétabilité et la fidélité intermédiaires ont été observées à tous les niveaux de concentration. Si les coefficients de variation de la fidélité intra-série sont inférieurs à 2%, la méthode sera considérée comme fidèle.

Compte tenu des valeurs obtenues des CV, la fidélité intra-série de la méthode est jugée satisfaisante, la méthode est donc fidèle.

### 3.4. Critères de décision sur la validité de la méthode

#### 3.4.1. Erreur totale

Selon les résultats de l'erreur totale montrés dans le tableau XXXIII, on juge que tous les niveaux de concentration sont inclus dans l'intervalle d'acceptabilité.

#### 3.4.2. Profil d'exactitude

En se référant au profil d'exactitude élucidé dans la figure 15, on considère que la méthode mise au point dans ce présent travail est **valide** pour l'intervalle de dosage où le profil d'exactitude est compris dans les limites d'acceptation de  $\pm 5\%$  puisque les limites de tolérance supérieure et inférieure n'interceptent pas avec les limites d'acceptabilité supérieure et inférieure.

Cela signifie 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.

Le domaine de validité de la méthode est donc compris entre les niveaux de concentrations 80% et 120%.

#### 3.4.3. Limites de quantification et intervalle de dosage

La méthode est considérée comme valide dans l'intervalle [0,4 ; 0,6] mg/ml pour lequel le profil d'exactitude est inclus dans les limites d'acceptation choisies [-5% ; +5%] avec un risque d'avoir au maximum 5% des mesures en dehors des limites d'acceptation.

#### 3.4.4. Linéarité

L'évaluation de la linéarité est faite à partir de cinq niveaux de concentration (80, 90, 100, 110, 120) avec trois répétitions indépendantes pour chaque niveau ( $n=3$ ).

La droite de régression linéaire est obtenue sous la forme  $y = 0,99x + 0,269$  où 0,99 représente la pente de la droite et 0,269 l'ordonnée à l'origine (figure 17). Avec  $y$  représentant la concentration prédite et  $x$  la concentration introduite en mg/ml.

Le coefficient de détermination  $R^2$  vaut 0,994, ce qui signifie que la variabilité totale de l'aire du pic est expliquée à 99,40% par la variabilité de la concentration de l'échantillon en solution.

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

- Un coefficient de détermination acceptable  $R^2 = 0,994$  ;
- Une pente significativement différente de zéro donc il existe une relation linéaire. De plus elle est comparable à 1 au risque de 5% ( $a = 0,99$ ) ;
- Une ordonnée à l'origine comparable à zéro au risque de 5% ( $b = 0,269$ ).

#### ❖ Synthèse des résultats

La spécificité, la linéarité et l'exactitude de la méthode de dosage du Piroxicam dans des comprimés dosés à 20 mg par HPLC mise au point dans le présent travail sont démontrés dans l'intervalle de dosage [0,4 ; 0,6] mg/ml avec une probabilité de confiance de 95 % dans les limites d'acceptation définies  $\pm 5$  %. Autrement dit, 95% des futurs résultats fournis par la méthode analytique développée se situeront dans les limites d'acceptabilité et les limites de dosage.

La méthode s'est révélée concluante est valide avec les critères d'acceptation prédéfinis sur l'intervalle décrit.

L'utilisation de l'HPLC avec une détection dans le domaine de l'Ultraviolet comme méthode de dosage a permis d'obtenir des résultats exacts, précis et spécifiques (méthode séparative).

## CONCLUSION

---

La réglementation en vigueur dans l'industrie pharmaceutique, est stricte et complexe afin de protéger au maximum les patients mais aussi les entreprises elles-mêmes. Le contrôle et la validation des méthodes sont essentiels pour la commercialisation des médicaments.

La validation des procédures analytiques est aujourd'hui un principe accepté et utilisé dans tous les domaines d'activité et générateurs de résultats de mesures.

L'objectif de notre étude a été de mettre au point et de valider une méthode de dosage du piroxicam dans des comprimés de 20 mg, et ce par chromatographie liquide à haute performance en utilisant le profil d'exactitude comme outil de décision.

En premier lieu, nous avons effectué un plan d'étalonnage pour générer un modèle d'étalonnage pour chaque série qui permet de relier la réponse analytique (la surface du pic) à la concentration introduite.

En deuxième lieu nous avons réalisé un plan de validation pour pouvoir estimer le biais et la fidélité de la méthode.

En troisième lieu, l'établissement des intervalles de tolérance apparié à des limites d'acceptation nous permet de tracer le profil d'exactitude. Le profil d'exactitude tracé à l'issue de ce travail caractérisant la validité de la méthode dans l'intervalle de concentration étudié [0,4 ; 0,6] mg/ml, avec une proportion  $\beta=95\%$  de mesures dans les limites d'acceptations ( $\pm 5\%$ ).

Les résultats obtenus ont répondu à toutes les exigences et performances spécifiques élaborées dans cette approche harmonisée ; ce qui atteste de la validité de la méthode utilisée et son aptitude à être appliquée en routine par les laboratoires de contrôle qualité pour le dosage du piroxicam dans des comprimés dosés à 20 mg.

Ce travail représente une porte entrouverte sur ce qui peut être fait dans le domaine de la validation analytique des médicaments, et propose une solution exploitable permettant de satisfaire aux exigences réglementaires en vigueur.

## PERSPECTIVES

---

Après avoir réalisé ce mémoire de fin d'étude, des perspectives potentielles de recherches peuvent être envisagées :

- Développer et proposer des protocoles standards pour la validation des méthodes analytiques des différents tests de contrôle dans l'industrie pharmaceutique.
- Etude critique des différentes pratiques rencontrées dans les laboratoires de contrôle.

Ces travaux pourraient avoir une finalité commune qui est d'améliorer la confiance entre le consommateur et les acteurs économiques concernant les principales décisions prises à l'aide des méthodes analytiques.

## REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

---

- [1] **Waseeq Ahmad SIDDIQUI**. Synthesis of Piroxicam-related Heterocyclic Molecules and Evaluation of Their Biological Activities, 2007, pp 2-9.
- [2] **pharmacopée européenne 6ème édition.**
- [3] **Sonia, Marie, Maryse CLEMENT-GUERCIA**. Les intoxications des animaux de compagnie par les médicaments à usage humain, 2003, pp 73.
- [4] **Base de données publique des médicaments**, <http://base-donnees-publique.medicaments.gouv.fr/>, consulté le 23/02/2020.
- [5] **Léon PERLEMUTER, Gabriel PERLEMUTER**. Guide de thérapeutique PERLEMUTER, 10<sup>ème</sup> édition, version électronique.
- [6] **Wiseman E.H.** Review of preclinical studies with piroxicam, pharmacokinetics, and toxicology. Roy. Soc. Med. Int. Congr. Symp. Series 1:11-23 (1978).
- [7] **Ahmed Abdeen, Samar Ibrahim**. Department of Forensic Medicine and Toxicology, Faculty of Veterinary Medicine, Benha University, Toukh 13736, Egypt.
- [8] **R. Ben Saad, A. Souissi, F. Derbel, S. Bellakhal, A. Jellouli, A. Mestiri, M.H. Douggu**. Médecine interne, hôpital des FSI la Marsa, Tunis, Tunisie.
- [9] **Frédéric HELUWAERT, Joanna POFELSKI, Emmanuel GERMAIN, Xavier ROBLIN**. Département d'Hépatogastroentérologie, CHU Michallon, Grenoble.
- [10] **Emaïlle. C.** qualification d'une ligne de conditionnement. Thèse de doctorat de l'université de Nantes, 2010, p145.
- [11] Exigences générales concernant la compétence des laboratoires d'étalonnages et d'essais. **ISO/CEI 17025:2005**
- [12] **US Food and Drug Administration**, Guideline on general principles of process validation 1987.
- [13] **PINGUET .I.** Validation analytique : application de la procédure SFSTP2003-2006 au domaine de la phytothérapie. Thèse de Doctorat université de Bordeaux, 2015, p85.
- [14] **Max Feinberg, Michel Laurentie, Annie Guerin**. Validation des méthodes d'analyse quantitatives par le profil d'exactitude 2010.
- [15] **BOUCHAMA Fatiha, MAMMOU Wahiba**. Validation analytique d'une méthode de dosage simultané du Paracétamol et du Tramadol de sodium dans des comprimés par HPLC. Application de la démarche harmonisée [thèse]. Tizi-Ouzou, université Mouloud Mammeri ; 2017.
- [16] **Marlène Ferderin, VALI-MEDIC'** : Une aide à la démarche de validation des méthodes analytiques. Mémoire d'intelligence méthodologique, Master 2 Qualité et Performance dans organisations. Université De Technologie de Compiègne 22 juin 2017.

## REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

---

[17] **Isabelle Pinguet**. Validation analytique application de la procédure SFSTP2003-2006 au domaine de la phytothérapie. Sciences pharmaceutiques 2015. [Thèse pour l'obtention du diplôme de docteur en pharmacie].

HAL Id: dumas-01188779-<http://dumas.ccsd.cnrs.fr>

[18] ICHQ3D et validation des méthodes analytiques, [www.ichq3d.fr/ICH-Q3D-validation-des-methodes-analytique](http://www.ichq3d.fr/ICH-Q3D-validation-des-methodes-analytique). Consulté le 12/03/2020

[19] **Hubert Ph, Nguyen JJ, Boulanger B, Chapuzet E, Chiap P, Cohen N, et al. SFSTP**. Validation des procédures analytiques quantitatives, Harmonisation des démarches. Partie I ; Généralités ; 2003.

[20] **Commission SFSTP, Hubert Ph, Nguyen-Huu J.J, Boulanger E, Chapuzet E, et al.2006**. Validation des procédures analytiques quantitatives : Harmonisation des démarches Partie II - Statistiques.

[21] **Note for guidance on validation of analytical procedures**: Text and methodology. ICH Q2 (R1) Validation of Analytical Procedures: Text and Methodology. CPMP/ICH/381/95.

[22] **Pharmacopée européenne 1998**.

[23] **Logeais Maxime**. Optimisation de la productivité des méthodes analytiques de contrôle d'un médicament [thèse]. Université de Poitiers, faculté de médecine et pharmacie, année 2013.

[24] **Michel Laurentic ,groupe de travail “ GT Val 2”** . Guide de validation des méthodes d'analyses. ANSES

[25] Choix et validation d'une méthode d'analyse, **Christian Ducauze, Arlette Baillet-Guffroy et Thanh X. Bui**

[26] **FEINBERG M**. Validation des méthodes d'analyse quantitatives au moyen du profil d'exactitude. Dossier : TECHNIQUES DE L'INGENIEUR, l'expertise technique et scientifique de référence

[27] **Mimoun N, Sahraoui N**. Validation analytique d'une méthode de dosage du diclofénac de sodium dans les suppositoires de 100 mg par HPLC [thèse]. Tizi Ouzou, université Mouloud Mammeri ; 2016.

[28] **Feinberg M**. Interprétation du profil d'exactitude. In: Validation des méthodes d'analyse quantitative par le profil d'exactitude [Internet]. 2010 p. 45–60, consulté le 15/03/2020

[29] **Bouabidi A**. Etude Critique des Différentes Approches de Validation des Méthodes Analytiques. Faculté des Sciences Ben M'Sik Casablanca; 2013.

[30] **Rozet E**. Improvement of the predictive character of test results issued from analytical methods life cycle, Thèse présentée en vue de l'obtention du grade de Docteur en Sciences Pharmaceutiques, Université de Liège, 2007-2008.

## REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

---

[31] Chromatographie liquide haute performance ou H.P.L.C. <http://mpdoc.iutlan.univ-rennes1.fr/CHIMIE/Chimie1/CHROMLIQ.HTM>. Consulté le 20/06/2020.

[32] **Latifa BEN SAAD**. Etude de la séparation des fluoroquinolones par HPLC : Application à l'étude de leur dégradation par rayonnement gamma. Thèse présentée pour l'obtention du mastère en chimie analytique. Université Tunis El Manar. Faculté des sciences de Tunis, 19/12/2013.

[33] **SELILA Lyliya, GRINE Zineb**. Mise au point et validation d'une méthode de dosage de l'irbésartan dans des comprimés de 150 mg par la chromatographie liquide à haute performance. Thèse présentée en vue de l'obtention du diplôme de docteur en Pharmacie. Faculté de médecine, département de pharmacie de Tizi-Ouzou, le 15 juillet 2018.

[34] **Pr M.MAMOU**. Cours chromatographie liquide à haute performance. Département de Pharmacie de Tizi-Ouzou. Laboratoire de Chimie Analytique.

[35] **Dr H.BEN SI SAID**. Cours chromatographie liquide haute performance (HPLC), 3<sup>ème</sup> année Pharmacie. Faculté de médecine de Tizi-Ouzou. Département de Pharmacie. Laboratoire de Chimie Analytique.

[36] **Pr H.BOUDIS**. Cours chromatographie liquide haute performance, 3<sup>ème</sup> année Pharmacie. Faculté de médecine d'Alger. Département de Pharmacie. Laboratoire de Chimie Analytique. 2015/2016.

[37] **Véronique JACOB**. La chromatographie liquide haute performance (HPLC). Salle de TP de génie analytique. Présentation théorique de la HPLC. IUT de chimie de Grenoble. 22/08/2010.

[38] **Myriam VO**. Les comprimés, une forme d'avenir ? [Thèse pour obtenir le diplôme de docteur en pharmacie]. Université de Lorraine, faculté de pharmacie ; 25 sept 2015

[39] **V. Grenouilleau**, Modification galéniques des formes orales sèches, diplôme d'état de docteur en pharmacie, Université Bordeaux 2 UFR des sciences pharmaceutiques, 2014, pp13-16.

[40] **Dr S. Djebara**. Cours, les comprimés.

[41] **D. Wiem**. Etude des interactions physicochimiques des bétabloquants avec les excipients, Diplôme National d'Ingénieur en Sciences Appliquées et en Technologie, Université de Carthage, 2013, pp15

[42] **Tout savoir sur la formulation d'un médicament ?**  
<https://www.superprof.fr/ressources/scolaire/physique-chimie/seconde/familles-chimiques/formulation-medicament.html>. Consulté le : 01/07/2020.

[43] **KétsiaYekpe**. Relier les attributs de matériaux et les paramètres de procédés de fabrication à un test de contrôle qualité, une application du concept quality by design [thèse]. Université de Montpellier 1 ; université de Sherbrooke ; 22 juillet 2014.

## REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

---

[44] M. Le moniteur de l'internat. Tome 4. Médicaments. p 183-187. Ed: **Wolters Kluwer**. (2007).

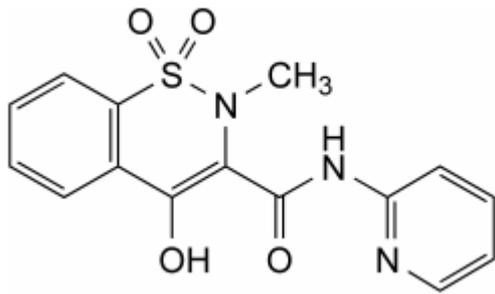
[45] Le Hir, Pharmacie galénique – Bonnes pratiques de fabrication des médicaments, 8<sup>e</sup> édition, Paris, Masson, 2001.

[46] A. Le Hir, J.-C. Chaumeil, D. Brossard. Abrégé de Pharmacie galénique. Bonne Pratique de Fabrication de médicaments. Préface de Pr. M.-M. Janot 9<sup>ème</sup> édition.

**Monographie de piroxicam**

01/2008:0944

Corrigé 6.0

**PIROXICAM****Piroxicamum**C<sub>15</sub>H<sub>13</sub>N<sub>3</sub>O<sub>4</sub>S Mr 331,4

[36322-90-4]

**1. Définition**

1,1-Dioxyde de 4-hydroxy-2-méthyl-N-(pyridin-2-yl)-2H-1,2-benzothiazine-3-carboxamide.

**Teneur :** 98,5 pour cent à 101,0 pour cent (substance desséchée).

**2. Caractères**

**Aspect :** poudre cristalline, blanche ou légèrement jaune.

**Solubilité :** pratiquement insoluble dans l'eau, soluble dans le chlorure de méthylène, peu soluble dans l'éthanol anhydre. Le piroxicam présente le phénomène du polymorphisme (5.9)

### 3. Identification

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

**Préparation :** pastilles à base de bromure de potassium R.

**Comparaison :** piroxicam SCR.

Si les spectres obtenus à l'état solide présentent des différences, dissolvez séparément la substance à examiner et la substance de référence dans un volume minimal de chlorure de méthylène R, évaporez à siccité au bain-marie et enregistrez de nouveaux spectres à partir des résidus.

### 4. Essai

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

**Solution à examiner.** Dissolvez 75 mg de piroxicam dans de l'acétonitrile R, en chauffant légèrement si nécessaire, et complétez à 50,0 ml avec le même solvant.

**Solution témoin (a).** Dissolvez 5 mg de piroxicam pour conformité du système SCR dans de l'acétonitrile R et complétez à 25,0 ml avec le même solvant.

**Solution témoin (b).** Prélevez 1,0 ml de solution à examiner et complétez à 10,0 ml avec de l'acétonitrile R. Prélevez 1,0 ml de cette solution et complétez à 50,0 ml avec de l'acétonitrile R.

**Colonne :**

— dimensions :  $l = 0,25 \text{ m}$ ,  $\varnothing = 4,6 \text{ mm}$ ,

— phase stationnaire : gel de silice octadécylsilylé pour chromatographie, désactivé pour les bases R ( $5 \mu\text{m}$ ),

— température :  $40 \text{ }^\circ\text{C}$ .

Phase mobile : mélangez 40 volumes d'acétonitrile R et 60 volumes d'une solution de phosphate monopotassique R à 6,81 g/l ajustée à pH 3,0 avec de l'acide phosphorique R.

Débit : 1 ml/min.

Détection : spectrophotomètre à 230 nm.

Injection : 20  $\mu\text{l}$ .

Enregistrement : 5 fois le temps de rétention du piroxicam.

Conformité du système : solution témoin (a) :

— rétention relative par rapport au piroxicam:

impureté B = environ 0,85,

— facteur de symétrie : au maximum 1,5 pour le pic dû à

l'impureté B,

— le chromatogramme obtenu est semblable au chromatogramme fourni avec le piroxicam pour conformité du système SCR

Limites :

— impuretés A, B, C, D, E, F, G, H, I, J, K, L : pour chaque impureté, au maximum la surface du pic principal du chromatogramme obtenu avec la solution témoin (b) (0,2 pour cent),

— total : au maximum 2 fois la surface du pic principal du chromatogramme obtenu avec la solution témoin (b) (0,4 pour cent),

— limite d'exclusion : 0,1 fois la surface du pic principal du chromatogramme obtenu avec la solution témoin (b) (0,02 pour cent).

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

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

**Perte à la dessiccation** (2.2.32) : au maximum 0,5 pour cent, déterminé sous vide à 105 °C pendant 4 h sur 1,000 g de piroxicam.

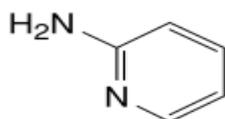
**Cendres sulfuriques** (2.4.14) : au maximum 0,1 pour cent, déterminé sur 1,0 g de piroxicam.

## 6. Dosage

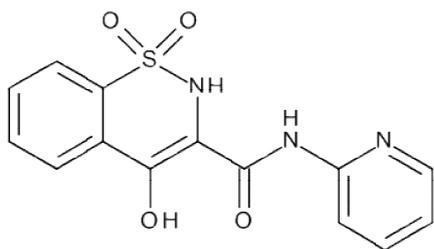
Dissolvez 0,250 g de piroxicam dans 60 ml d'un mélange à volumes égaux d'anhydride acétique R et d'acide acétique anhydre R. Titrez par l'acide perchlorique 0,1 M. Déterminez le point de fin de titrage par potentiométrie (2.2.20). 1 ml d'acide perchlorique 0,1 M correspond à 33,14 mg de C<sub>15</sub>H<sub>13</sub>N<sub>3</sub>O<sub>4</sub>S.

## IMPURETÉS

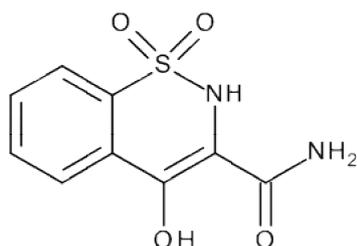
**Impuretés spécifiées** : A, B, C, D, E, F, G, H, I, J, K, L



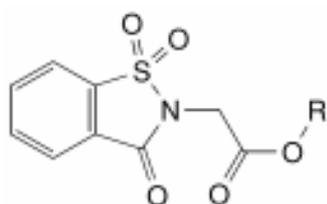
A. pyridin-2-amine,



B. 1,1-dioxyde de 4-hydroxy-N-(pyridin-2-yl)-2H-1,2-benzothiazine-3-carboxamide,



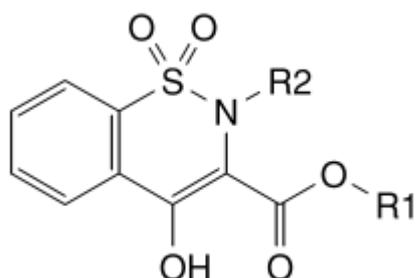
C. 1,1-dioxyde de 4-hydroxy-2-méthyl-2H-1,2-benzothiazine-3-carboxamide,



D. R = CH<sub>3</sub>: (3-oxo-1,1-dioxydo-1,2-benzisothiazol-2(3H)-yl) acétate de méthyle,

E. R = C<sub>2</sub>H<sub>5</sub> : (3-oxo-1,1-dioxydo-1,2-benzisothiazol-2(3H)-yl) acétate d'éthyle,

F. R = CH(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub> : (3-oxo-1,1-dioxydo-1,2-benzisothiazol-2-(3H)-yl) acétate de 1-méthyléthyle,



G. R1 = CH<sub>3</sub>, R2 = H : 1,1-dioxyde de 4-hydroxy-2H-1,2-benzothiazine-3-carboxylate de méthyle,

H. R1 = C<sub>2</sub>H<sub>5</sub>, R2 = H : 1,1-dioxyde de 4-hydroxy-2H-1,2-benzothiazine-3-carboxylate d'éthyle,

I. R1 = CH(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>, R2 = H : 1,1-dioxyde de 4-hydroxy-2H-1,2-benzothiazine-3-carboxylate de 1-méthyléthyle,

J. R1 = R2 = CH<sub>3</sub> : 1,1-dioxyde de 4-hydroxy-2-méthyl-2H-1,2-benzothiazine-3-carboxylate de méthyle,

K. R1 = C<sub>2</sub>H<sub>5</sub>, R2 = CH<sub>3</sub> : 1,1-dioxyde de 4-hydroxy-2-méthyl-2H-1,2-benzothiazine-3-carboxylate d'éthyle,

L. R1 = CH(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>, R2 = CH<sub>3</sub> : 1,1-dioxyde de 4-hydroxy-2-méthyl-2H-1,2-benzothiazine-3-carboxylate de 1-méthyléthyle.

Table de Student

k	$\gamma$										
	0.25	0.20	0.15	0.10	0.05	0.025	0.010	0.005	0.0025	0.0010	0.0005
1	1.000	1.376	1.963	3.078	6.314	12.71	31.82	63.66	127.3	318.3	636.6
2	0.816	1.061	1.386	1.886	2.920	4.303	6.965	9.925	14.09	22.33	31.60
3	0.765	0.978	1.250	1.638	2.353	3.182	4.541	5.841	7.453	10.21	12.92
4	0.741	0.941	1.190	1.533	2.132	2.776	3.747	4.604	5.598	7.173	8.610
5	0.727	0.920	1.156	1.476	2.015	2.571	3.365	4.032	4.773	5.893	6.869
6	0.718	0.906	1.134	1.440	1.943	2.447	3.143	3.707	4.317	5.208	5.959
7	0.711	0.896	1.119	1.415	1.895	2.365	2.998	3.499	4.029	4.785	5.408
8	0.706	0.889	1.108	1.397	1.860	2.306	2.896	3.355	3.833	4.501	5.041
9	0.703	0.883	1.100	1.383	1.833	2.262	2.821	3.250	3.690	4.297	4.781
10	0.700	0.879	1.093	1.372	1.812	2.228	2.764	3.169	3.581	4.144	4.587
11	0.697	0.876	1.088	1.363	1.796	2.201	2.718	3.106	3.497	4.025	4.437
12	0.695	0.873	1.083	1.356	1.782	2.179	2.681	3.055	3.428	3.930	4.318
13	0.694	0.870	1.079	1.350	1.771	2.160	2.650	3.012	3.372	3.852	4.221
14	0.692	0.868	1.076	1.345	1.761	2.145	2.624	2.977	3.326	3.787	4.140
15	0.691	0.866	1.074	1.341	1.753	2.131	2.602	2.947	3.286	3.733	4.073
16	0.690	0.865	1.071	1.337	1.746	2.120	2.583	2.921	3.252	3.686	4.015
17	0.689	0.863	1.069	1.333	1.740	2.110	2.567	2.898	3.222	3.646	3.965
18	0.688	0.862	1.067	1.330	1.734	2.101	2.552	2.878	3.197	3.610	3.922
19	0.688	0.861	1.066	1.328	1.729	2.093	2.539	2.861	3.174	3.579	3.883
20	0.687	0.860	1.064	1.325	1.725	2.086	2.528	2.845	3.153	3.552	3.850
21	0.686	0.859	1.063	1.323	1.721	2.080	2.518	2.831	3.135	3.527	3.819
22	0.686	0.858	1.061	1.321	1.717	2.074	2.508	2.819	3.119	3.505	3.792
23	0.685	0.858	1.060	1.319	1.714	2.069	2.500	2.807	3.104	3.485	3.767
24	0.685	0.857	1.059	1.318	1.711	2.064	2.492	2.797	3.091	3.467	3.745
25	0.684	0.856	1.058	1.316	1.708	2.060	2.485	2.787	3.078	3.450	3.725
26	0.684	0.856	1.058	1.315	1.706	2.056	2.479	2.779	3.067	3.435	3.707
27	0.684	0.855	1.057	1.314	1.703	2.052	2.473	2.771	3.057	3.421	3.690
28	0.683	0.855	1.056	1.313	1.701	2.048	2.467	2.763	3.047	3.408	3.674
29	0.683	0.854	1.055	1.311	1.699	2.045	2.462	2.756	3.038	3.396	3.659
30	0.683	0.854	1.055	1.310	1.697	2.042	2.457	2.750	3.030	3.385	3.646
40	0.681	0.851	1.050	1.303	1.684	2.021	2.423	2.704	2.971	3.307	3.551
50	0.679	0.849	1.047	1.299	1.676	2.009	2.403	2.678	2.937	3.261	3.496
60	0.679	0.848	1.045	1.296	1.671	2.000	2.390	2.660	2.915	3.232	3.460
80	0.678	0.846	1.043	1.292	1.664	1.990	2.374	2.639	2.887	3.195	3.416
100	0.677	0.845	1.042	1.290	1.660	1.984	2.364	2.626	2.871	3.174	3.390
120	0.677	0.845	1.041	1.289	1.658	1.980	2.358	2.617	2.860	3.160	3.373
$\infty$	0.674	0.842	1.036	1.282	1.645	1.960	2.326	2.576	2.807	3.090	3.291

## 1. Indice d'intervalle de dosage

L'indice d'intervalle de dosage est obtenu en calculant la différence entre la borne supérieure et inférieure des limites de quantification. C'est un nombre sans dimension variant dans l'intervalle [0,1]. Calculé selon la formule :

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

Avec :

- $C_{max}$  : La plus grande concentration introduite.
- $C_{min}$  : La plus petite concentration introduite.

L'indice prend la valeur 1 si la procédure d'analyse est apte à doser sur la totalité de l'intervalle envisagé (concentration minimale et maximales introduites).

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

## 2. Indice de fidélité

Pour le calcul de l'indice de fidélité on utilise l'aire à l'intérieur des limites de quantification, entre la limite inférieure et supérieure du profil d'exactitude. Cette aire est calculée par la règle de trapèzes selon la formule :

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

Avec :

- $\lambda$  : La limite d'acceptation
- $C_{max}$  : La plus grande concentration introduite.
- $C_{min}$  : La plus petite concentration introduite.

L'indice de fidélité est sans dimension et varie dans l'intervalle [0,1]. Plus cet indice est proche de 1, plus la méthode est fidèle.

### 3. Indice de justesse

La somme du carré des biais (SCB) est calculée en sommant le carré des biais estimés à chaque niveau de concentration. L'indice est calculé de la façon suivante :

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

Avec :

- $\lambda$  : La limite d'acceptation de la méthode ;
- $m$  : Le nombre de niveau de concentration.

L'indice de justesse est un nombre sans dimension variant dans l'intervalle [0,1] où 1 est l'optimum et signifie qu'il n'y a pas de biais pour tous les niveaux de concentrations observés.

### 4. Indice d'exactitude

Ces 3 indices sont compilés dans l'indice d'exactitude qui correspond à la moyenne géométrique  $D^*$  des indices respectifs. Il est calculé selon la formule :

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

L'indice d'exactitude varie de 0 à 1. Plus l'indice est proche de 1 meilleure est la méthode. Ce chiffre sans dimension est seulement utilisé pour comparer les différents modèles d'étalonnage et non pour comparer les procédures analytiques.

La chromatographie est un ensemble de procédés applicables à des mélanges moléculaires ou ioniques, basés sur des différences de distribution des solutés entre une phase stationnaire et une phase mobile continue: les deux phases étant mises en contact intime et à contre courant [31].

La première description de la méthode de séparation chromatographique est donnée dans le cadre d'une communication présentée en 1903 et a été appliquée en 1906. En 1930-31, la méthode est introduite en pratique dans les laboratoires par Kuhn et Elederer à Heidelberg en Allemagne. En quelques années, la chromatographie en phase liquide sur colonne devient une technique rendant possible de nombreuses découvertes concernant différentes disciplines. En 1938, Reichstein introduit la chromatographie liquide pour séparer des substances incolores.

Avant les années 1970, un petit nombre de méthode chromatographique est utilisé dans les laboratoires. Ultérieurement, des colonnes ouvertes sont utilisées pour initier l'introduction de chromatographie liquide à haute performance (HPLC) dans la séparation des composés chimiques complexes [32]. C'est l'une des techniques chromatographiques les plus employées actuellement dans les laboratoires d'analyse chimique. Cette technique est devenue un outil analytique indispensable, elle permet l'identification, la séparation et le dosage des composés chimiques dans un mélange. Son succès est du à la meilleure exploitation des mécanismes d'interactions, aux grandes efficacités des phases stationnaires de plus en plus fines ( $3\mu$ ) et au progrès importants effectués dans le domaine d'appareillage [33].

### **1. Principe de l'HPLC [32]**

Les composés à séparer (solutés) sont mis en solution d'abord, puis elle sera introduite dans la phase mobile liquide (éluant). Grâce à la répartition sélective des solutés entre la phase mobile et la phase stationnaire, chaque soluté est donc soumis à une force de rétention exercée par la phase stationnaire, et une force de mobilité due à la phase mobile. 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 forte pression, parcourt le système chromatographique. Le mélange à analyser est injecté puis transporté à travers le 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 représentés par des pics. L'ensemble des pics enregistrés est appelé chromatogramme.

Le mécanisme de la séparation chromatographique s'explique par les différences de répartition des molécules des composés d'un mélange entre deux phases non-miscibles : l'une mobile et l'autre stationnaire.

Ce principe est traduit par le schéma suivant :

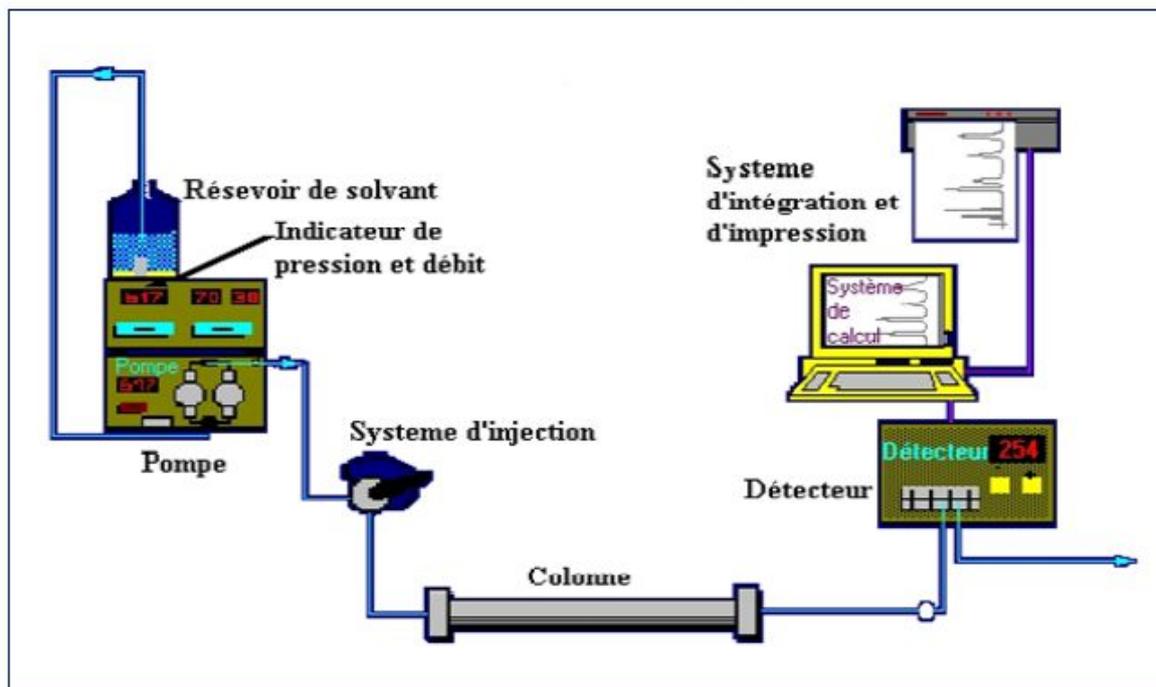


Figure : Principe de fonctionnement d'une chaîne HPLC [32].

## 2. Appareillage

Les différentes composantes d'une chaîne HPLC sont présentées sur le schéma suivant. Tous les organes du système sont liés à un micro-ordinateur qui pilote tous les processus [32].



Figure : Les organes d'une chaîne HPLC [32].

L'appareillage se compose d'un réservoir contenant la phase mobile, d'un système de pompage, d'un injecteur, d'une colonne chromatographique (éventuellement thermostatée), d'un détecteur et d'un système d'acquisition des données (avec un logiciel pour traiter les signaux) [32].

Les principaux solvants d'une chaîne HPLC sont présentés dans le tableau suivant.

**Tableau : Principaux solvants en HPLC [33].**

Phénomène	Solvants
Adsorption	Hexane, méthanol, acétonitrile dichlorométhane, chloroforme
Partition	Méthanol- eau, acétonitrile- eau
Echange d'ions	Solution tampon (pH contrôlé)
Exclusion	Tétrahydrofurane, toluène

### 2.1. Réservoirs de phases mobiles (éluant)

Un appareil HPLC comprend un ou plusieurs réservoirs, en verre ou en acier inoxydable. Ces réservoirs contiennent la phase mobile en quantité suffisante [33]. Plusieurs flacons d'éluant (solvant de polarités différentes) sont disponibles pour pouvoir réaliser des gradients d'éluant (mélange de plusieurs solvants à des concentrations variables) à l'aide de la pompe qui réalise le mélange demandé [32].

Ils sont étanches afin d'éviter l'évaporation ou contamination des solvants, équipés également de dispositifs (barbotage d'azote ou agitateurs magnétiques) qui ont pour but de chasser les gaz dissous [33].

### 2.2. Systèmes de pompage

Toute installation d'HPLC comporte au moins une pompe, pour forcer le passage de la phase mobile à travers la colonne dont le remplissage est très compact. La pompe doit fournir la phase mobile à un débit constant à une certaine pression pour atteindre la colonne. Elle permet de travailler soit : En mode isocratique, c'est à dire avec 100% d'un même éluant tout au long de l'analyse. En mode gradient, c'est à dire avec une variation des constituants du mélange d'éluant [33].

Le système de pompage doit:

- Atteindre des pressions élevées: ~200 bars (20 000kPa) ou plus ;
- Etre exempt d'impulsions ;
- Imposer des débits reproductibles de 0,1 à 10 ml/min ;
- Résister à la corrosion et aux solvants ;
- Permettre de délivrer un éluant de composition fixe en mode isocratique ou de composition variable pour travailler en en gradient d'éluant [33].

La pression à imposer dépend des facteurs suivants [32]:

- ✓ Débit de la phase mobile ;
- ✓ Viscosité du modificateur organique ;
- ✓ Taille des grains de la phase stationnaire ;
- ✓ Géométrie de la colonne.

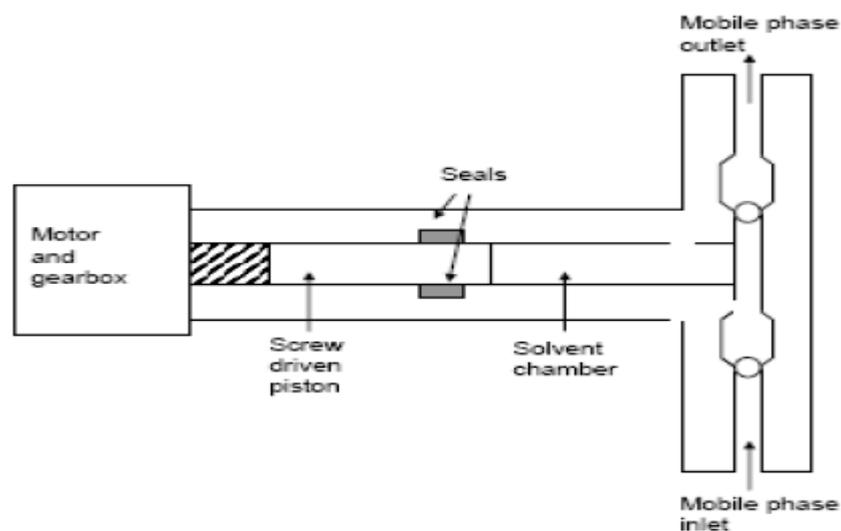


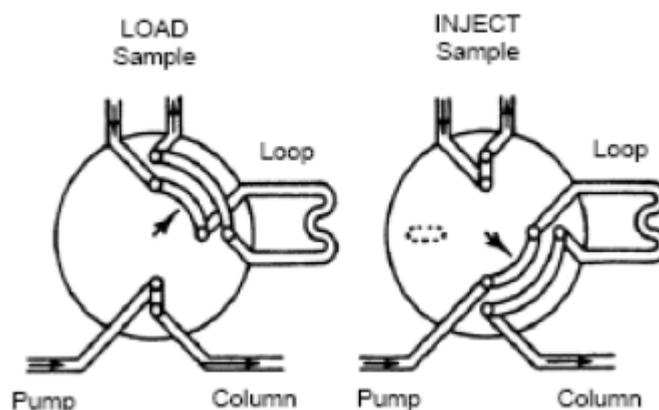
Figure : Schéma d'une pompe en HPLC [33].

### 2.3. Injecteurs

Les procédés d'introduction des échantillons dépendent des volumes des solutions à chromatographier et des pressions aux quelles s'effectuent les séparations.

- Procédés par injection directe.
- Procédés par boucles [34].

L'injection doit se faire en un temps très bref afin de ne pas perturber le régime d'écoulement dans la colonne et le détecteur [35].



**Figure : Schéma d'un injecteur à boucle externe [33].**

#### 2.4. Colonnes

La colonne est la partie la plus importante du système, puisque c'est à cet endroit que se fait la séparation des composés [32]. La colonne se présente comme un tube, souvent en acier inoxydable ou en verre, de longueur de 5 à 25 cm et de diamètre différent selon les modèles.

Le choix, la construction et le remplissage de la colonne sont d'une grande importance car la qualité d'une séparation est toujours en fonction de celle de la colonne qui constitue le cœur du système chromatographique [34].

La colonne analytique est souvent précédée d'une précolonne (colonne de garde) courte (0,4 à 1 cm), remplie de même phase stationnaire, ce qui sert à retenir certaines impuretés. On augmente ainsi la durée de vie de la colonne principale [34].

Ces colonnes ont l'avantage [35] :

- De la rapidité de l'analyse ;
- De consommer moins de solvant (les solvants de haute pureté pour l'HPLC sont très coûteux) ;
- De conduire à une meilleure résolution de l'analyse ;
- De permettre de faire du couplage HPLC/MS

Remarque : Les écarts de températures modifient les temps de rétentions → les colonnes sont contenues dans des thermostats [35].

## 2.5. Phase stationnaire

La phase stationnaire est maintenue entre deux disques frittés, on distingue deux types de phase stationnaire [32].

### 2.5.1. Phase normale

La phase normale est constituée de gel de silice. Ce matériau est très polaire. Il faut donc utiliser un éluant apolaire. Ainsi lors de l'injection d'une solution, les produits polaires sont retenus dans la colonne, contrairement aux produits apolaire qui sortent en tête.

L'inconvénient d'une telle phase, c'est une détérioration rapide au cours du temps du gel de silice, ce qui entraîne un manque de reproductibilité des séparations [33].

### 2.5.2. Phase inverse

La phase inverse est majoritairement composée de silice greffée par des chaînes linéaires de 8 ou 18 atomes de carbones (C8 et C18). Cette phase est apolaire et nécessite donc un éluant B polaire (ACN, Me OH, H<sub>2</sub>O). Dans ce cas, ce sont les composés polaires qui seront élués en premier. Contrairement à une phase normale, il n'y a pas d'évolution de la phase stationnaire au cours du temps, et la qualité de la séparation est donc maintenue constante [33].

## 2.6. Phase mobile [36]

Le choix d'un solvant adéquat lors d'une analyse chromatographique est primordial.

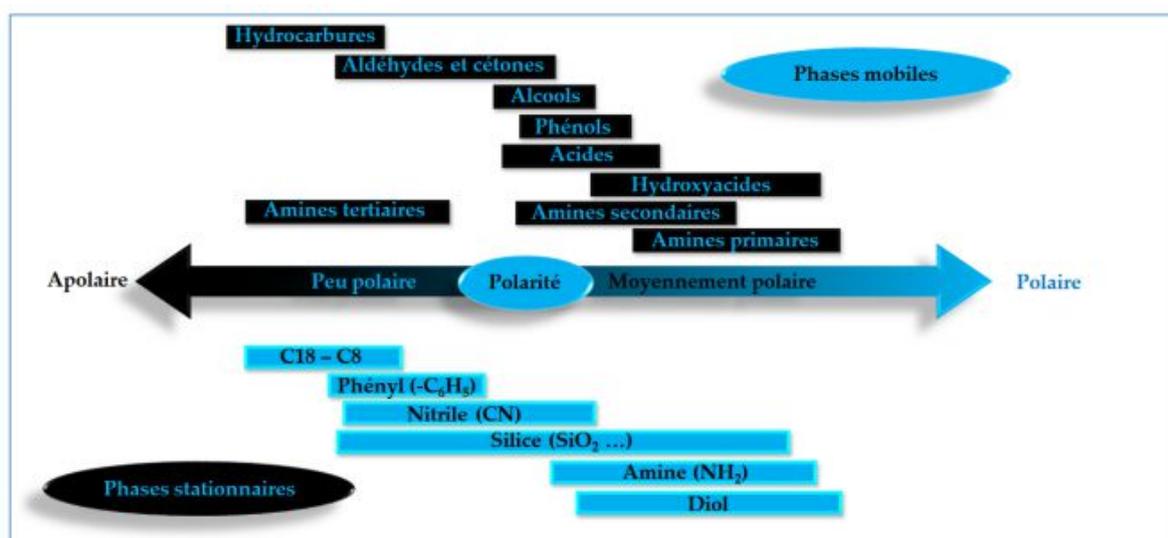


Figure : Classification des phases mobiles et des phases stationnaires les plus utilisées en HPLC [36].

Pour une phase stationnaire polaire, on utilise une phase mobile apolaire et inversement mais en pratique, cela n'est pas absolu.

Si on prend l'exemple d'une phase stationnaire polaire, un composé apolaire est rapidement élué et un composé polaire est fortement retenu. L'utilisation d'une phase mobile apolaire n'améliorera pas l'élué du composé polaire d'où l'ajout de modifiant (s) avec un fort pouvoir d'élué à la phase mobile. Le modifiant est ajouté en faible proportion à la phase mobile.

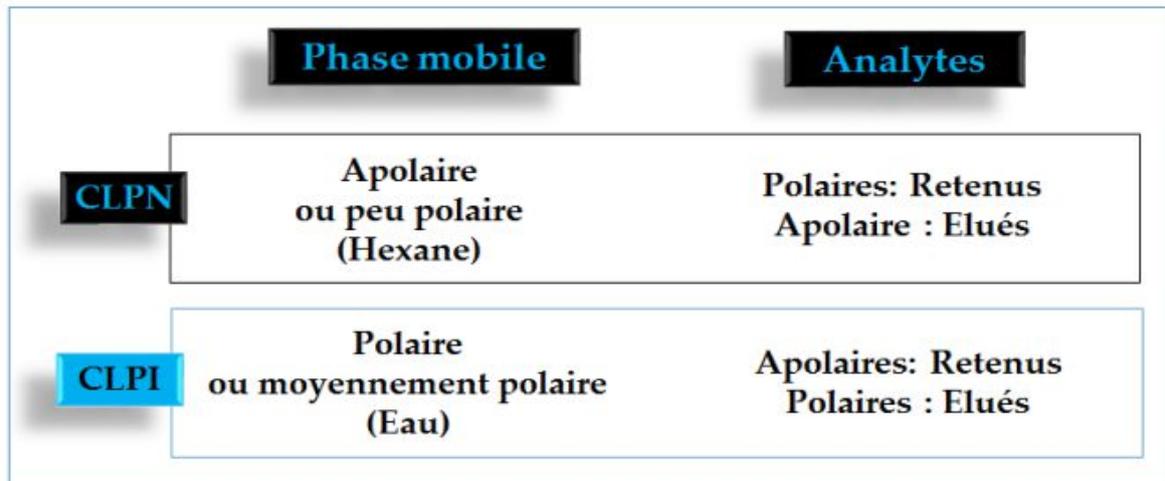


Figure : Comportement des analytes lors de la séparation chromatographique selon la nature de la phase stationnaire [36].

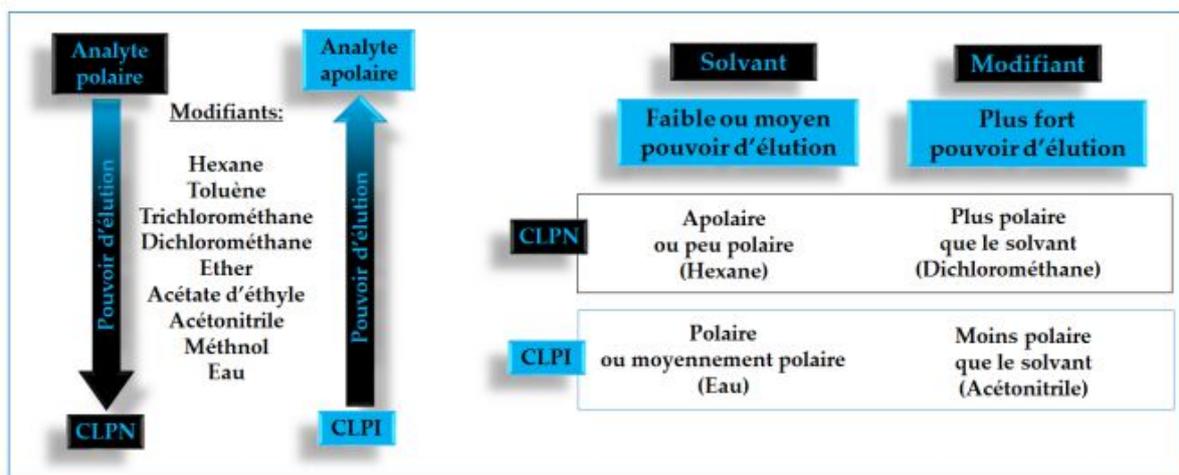


Figure : Evolution du pouvoir d'élué des solvants selon la polarité de l'analyte [36].

#### ❖ Modes isocartique et gradient :

L'ajout de modifiant (s) à la phase mobile n'est pas toujours suffisant. Afin d'améliorer la vitesse d'élué des composés les plus retenus on peut faire varier la composition de la phase mobile au cours de la séparation.

On définit ainsi :

- Le mode isocratique : La phase mobile est constituée d'un seul solvant ou d'un mélange de solvants mais garde la même composition au cours de toute la durée de la séparation.
- Le mode gradient : La phase mobile est constituée d'un mélange de solvants dont les proportions changent au cours de la même analyse chromatographique. Le but étant de réduire le temps d'analyse.

❖ **Critères de choix d'une phase mobile :**

- Interactions avec les analytes (forces intermoléculaires dipôle – dipôle, liaisons hydrogènes, liaisons ioniques).
- Polarité – Pouvoir d'élution – Viscosité.
- Compatibilité avec le système de détection.

## 2.7. Détecteurs [34]

Ils permettent de visualiser, de suivre en continu la séparation et mesurer la concentration des solutés.

❖ **Détecteurs universels :**

- Exploitent une modification par les solutés d'une propriété de la phase mobile (indice de réfraction, constante diélectrique...).
- Ils sont utilisés pour l'analyse de mélanges inconnus (réfractomètre, conductimètre, et DDI...)

❖ **Détecteurs spécifiques :**

- Utilisent les propriétés physico-chimiques particulières des solutés (absorption lumineuse, fluorescence, électrochimie).
- Avantageux pour doser des traces de produits « visibles » parmi d'autres produits non détectés.

Pour permettre une analyse quantitative précise, un système de détection doit satisfaire à plusieurs critères :

- Donner une réponse stable, rapide et reproductible ;
- Garantir une bonne sensibilité de détection ;
- Ne pas altérer la qualité de la séparation.

Les détecteurs sont classés selon leur principe de mesure ou selon le degré d'information qu'ils peuvent apporter.

❖ Principe de mesure :

- Détection directe : mise en œuvre d'une propriété spécifique du soluté
- Détection indirecte : mise en œuvre d'une propriété spécifique d'un des constituants de l'éluant.
- Détection différentielle : mesure d'une différence de propriété entre le soluté et l'éluant.

❖ Degré d'information :

- Détecteur simple : qui assure la visualisation du chromatogramme.
- Détecteur semi-informatif : fournit des critères de pureté et permet d'optimiser la sélectivité
- Détecteur intelligent : fournit des éléments d'identification.

## 2.8. Intégrateur-enregistreur

L'enregistreur reçoit un signal électrique proportionnel à la concentration de l'analyte qui traverse le détecteur. Ce signal est traité, amplifié puis utilisé pour tracer le chromatogramme. Pour qu'un pic soit exploitable, on considère généralement que le rapport signal / bruit doit être au moins de trois [32].

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 [32]:

- La variation de température ;
- De la pression ;
- L'instabilité électronique.

Par ailleurs on doit avoir une ligne de base aussi proche que possible de l'horizontale [32].

## 3. Domaines d'application de l'HPLC [36]

La chromatographie liquide haute performance est utilisée pour le contrôle des matières premières et des produits finis.

- Comme test d'identification, c'est une méthode insuffisante. Elle est toujours associée avec d'autres tests.
- Elle est très utilisée dans l'essai de contrôle des substances apparentées (impuretés organiques).

- Peut être utilisée pour le dosage afin de contrôler les teneurs.

A chaque fois qu'une chromatographie liquide est préconisée dans une pharmacopée, toutes les conditions opératoires sont détaillées.

L'HPLC est reconnue par la réglementation comme une méthode indicatrice de stabilité.

#### 4. Application de Chromatographie Liquide Haute Performance à l'analyse

##### 4.1. Informations apportées par un chromatogramme

Un chromatogramme est un digramme montrant l'évolution du signal du détecteur (proportionnel à la concentration en soluté) en fonction du temps d'élution (plus rarement du volume d'élution) [33].

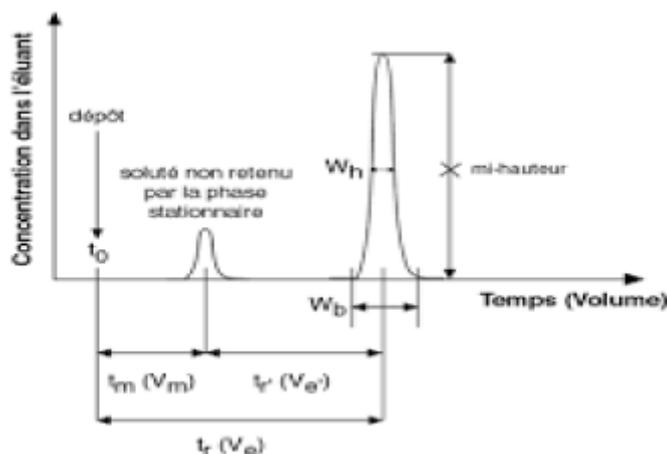


Figure : Informations apportées par un chromatogramme [33].

##### 4.1.1. Caractéristiques du chromatogramme [33]

$T=0$  : Le temps du début d'injection

$t_m$  : Le temps mort : est le temps mis par un composé non retenu par la phase stationnaire pour traverser la colonne (temps passé dans la phase mobile)

$t_r$  : Le temps de rétention : est le temps mis par le soluté pour traverser la colonne. C'est le temps passé dans la phase stationnaire et dans le volume mort dans la colonne. Ce temps est caractéristique d'un soluté dans des conditions d'analyse donnée.

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

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

$$t'_r = t_r - t_m$$

$\omega$  : La largeur du pic à la base, mesurée à 13,5 pour cent de la hauteur du pic.

$\omega_{1/2}$  ou  $\delta$ : La largeur du pic à mi hauteur exprimée en unité de temps.

$h$  : La hauteur du pic.

Ecart type relatif des aires du pic :  $\frac{1}{16} \sum (y_i - Y')^2$

Avec :

$y_i$  est l'aire du pic pour l'injection  $i$  donnée par l'intégration du pic.

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

On peut calculer l'écart type relatif en pourcentage :

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

RSD : Relative Standard Deviation.

#### 4.1.2. Grandeurs de rétention [32]

Ce sont :

##### ➤ Temps de rétention

Le temps de rétention est une grandeur caractéristique d'un analyte dans des conditions opératoires données, c'est le temps écoulé entre l'injection et le maximum du pic du composé élué, noté  $t_r$  et exprimé en minutes. On utilise ce paramètre pour identifier les composés dans un chromatogramme. Il varie en fonction du débit de la phase mobile et de leur composition, de la température d'élution et de la nature de colonne utilisée.

Le temps de rétention  $t_r$  d'un soluté est fonction de son affinité avec l'éluant d'une part et avec la phase stationnaire d'autre part. A un instant  $t$ , le soluté est à la concentration  $C_m$  dans la phase mobile et à la concentration  $C_s$  dans la phase stationnaire, leur rapport est appelé coefficient de partage noté  $K$ .

$$K = C_s / C_m$$

Le coefficient de partage dépend de trois types d'affinités : la première celle entre le soluté et la phase mobile, la deuxième entre le soluté et la phase stationnaire, la troisième entre les deux phases. La surface ou la hauteur du pic chromatographique est proportionnelle à la masse ou à la concentration du produit injecté.

➤ **Temps mort**

Le temps mort est le temps nécessaire pour qu'un composé non retenu traverse la colonne ; il est noté  $t_m$  ou  $t_0$  et exprimé en minutes.

$$t_m = t_0 = L/V$$

Avec :

L : la longueur de la colonne.

V : la vitesse de la phase mobile.

➤ **Volume de rétention**

C'est le volume de la phase mobile nécessaire pour éluer un composé d'un mélange à analyser. Ce volume est caractéristique d'un seul composé dans des conditions opératoires données. Il est lié au temps de rétention  $t_r$  d'un soluté et au débit d'écoulement de la phase mobile D. Le volume de rétention est noté  $V_r$ .

$$V_r = t_r \cdot D$$

➤ **Facteur de rétention**

Le facteur de rétention  $k'$  représente l'affinité d'un composé vis-à-vis de la phase stationnaire. C'est un paramètre important indépendant du débit de la phase mobile et des dimensions de la colonne. Si pour deux analyses identiques, dans les mêmes conditions opératoire, on obtient deux valeurs de temps de rétention identiques et deux valeurs de  $k'$  différentes, cela signifie qu'il y a une fuite de phase mobile avant la colonne. Et si on a deux valeurs de  $t_r$  et deux valeurs de  $k'$  différentes, ce qui indique qu'il y a des problèmes au niveau de la phase mobile ou phase stationnaire.

$$k' = (t_r - t_m) / t_m$$

## 4.2. Analyse qualitative

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

L'efficacité d'une colonne analytique d'une chaîne HPLC peut s'exprimer par le nombre N de plateaux théoriques [32].

Plus le nombre des plateaux théoriques N est élevé, plus la colonne est efficace. On définit également HEPT, la hauteur équivalente à un plateau théorique, et L, la longueur de la colonne. Plus la hauteur du plateau HEPT est faible, plus la colonne est efficace. Il existe une équation dite équation de Knox en chromatographie liquide à haute performance qui relie la

hauteur équivalente à un plateau théorique (HEPT) à la vitesse linéaire moyenne de la phase mobile. L'efficacité  $N$  traduit la finesse des pics [32].

$$\text{HEPT} = H = L/N$$

L'efficacité d'une colonne dépend de trois facteurs principaux [32]:

- De sa géométrie : plus une colonne sera longue et plus elle sera efficace.
- De son garnissage : plus les particules de silice seront fines et plus la colonne sera efficace.
- Du débit de l'éluant : Il existe un débit optimal d'utilisation d'une colonne pour lequel son efficacité est la plus grande.

Dans le cas où les pics sont symétriques et gaussiens, le nombre de plateaux théoriques sera calculé selon la relation:

$$N = 16(t_r/\omega)^2$$

Si les pics sont non symétriques:

$$N = 5,54(t_r/\omega_{1/2})^2$$

Avec :

$t_r$  : Temps de rétention.

$\omega$  : Largeur de pic à la base.

$\omega_{1/2}$  : Largeur de pic à mi-hauteur [32].

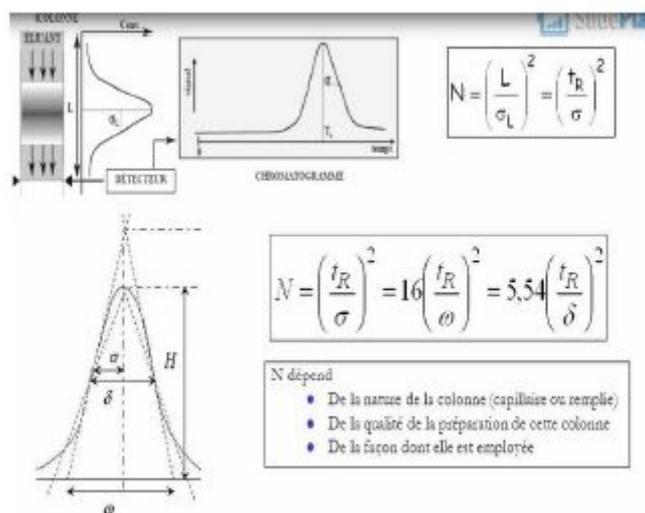


Figure : schéma montrant la performance d'une colonne [33].

### Les facteurs d'élargissement des pics [33]

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

Ce phénomène est fonction des particules et de la régularité du remplissage.

- **La résistance au transfert de masse** : l'élargissement est expliqué par l'accumulation de la phase mobile dans les anfractuosités du support. Les molécules qui y diffusent vont moins vite que celles qui n'y diffusent pas.
- **La diffusion longitudinale** : ce phénomène diminue plus la vitesse de la phase mobile augmente. Dans la pratique cette diffusion est négligeable en HPLC.

En conclusion l'efficacité calculée d'une chromatographie, représentée par la HEPT, est fonction de la vitesse de la phase mobile donc du débit, et de la qualité (régularité, remplissage) de la phase stationnaire [33].

#### 4.2.2. Qualité de la séparation

Une bonne séparation se traduira par une séparation distincte des pics correspondant à chacun des produits [33].

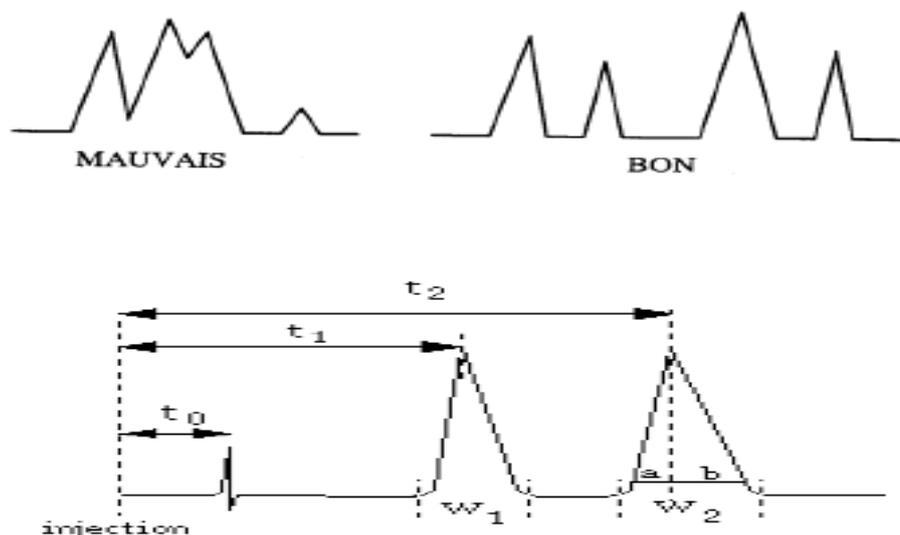


Figure : chromatogramme montrant la qualité de la séparation chromatographique [33].

#### ❖ La sélectivité [32]

On définit la sélectivité  $\alpha$  d'une séparation par le rapport de facteur de distribution ( $k_1$  et  $k_2$ ) de deux solutés. Plus  $k$  est grand, plus le composé est adsorbé fortement dans la phase

stationnaire et plus la rétention est grande et inversement. La valeur de  $k$  dépend de la structure du composé qui détermine son affinité pour chacune des deux phases.

$$\alpha = k_2/k_1$$

$\alpha$  est égale à 1 lorsqu'il n'y a pas une séparation entre les deux signaux consécutifs.

#### ❖ La résolution $R_s$ [32]

La résolution est une mesure de la qualité d'une séparation de point de vue chevauchement de deux signaux consécutifs. Elle est exprimée à partir des temps de rétention. La résolution est calculée à partir de la relation suivante :

$$R_s = 2(t_{r2} - t_{r1})/(\omega_{1/2(1)} + \omega_{1/2(2)})$$

Avec :

Si  $R_s < 1$  : une mauvaise résolution ;

Si  $1 < R_s < 1,5$  : une résolution acceptable ;

Si  $R_s \geq 1,6$  : une bonne résolution ;

Si  $1,4 < R_s < 1,6$  : une résolution optimale.

Deux caractéristiques déterminent le degré de recouvrement des pics :

- La distance séparant les sommets de deux pics mesurée par les temps de rétention  $t_{r2}$  et  $t_{r1}$ .
- la largeur des pics à la base  $\omega_{1/2(1)}$  et  $\omega_{1/2(2)}$ .

#### 4.3. Analyse quantitative [33]

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

Dans la pratique on injecte les composés en solution et on préfère utiliser des 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 :  $A = K_c \cdot C$

$A$  = air du pic.

$K_c$  = coefficient de réponse du détecteur.

$C$  = concentration du composé injecté.

La chromatographie liquide à haute performance est utilisée dans l'industrie pharmaceutique pour analyser les matières premières et les produits finis afin d'assurer que les niveaux de qualité préétablis sont respectés. L'HPLC est particulièrement utile pour la séparation de

---

matériaux de masse élevée qui ont une très faible volatilité et ne peuvent pas être séparés par chromatographie en phase gazeuse. Sa large utilisation est due à sa capacité d'agir d'une manière très précise sur la sélectivité par le choix de la colonne et de la composition de l'éluant, autrement dit à la meilleure exploitation des interactions soluté-phase mobile-phase stationnaire.

Le comprimé est une présentation pharmaceutique qui a été mise au point au cours du XIX<sup>ème</sup> siècle. L'invention (initialement imaginée pour comprimer la poudre de graphite) reviendrait au britannique William BROCKEDON qui breveta en 1843 la fabrication de comprimés par compactage de poudre entre deux poinçons. La fabrication manuelle a vite été remplacée par l'utilisation de machines automatisées qui apparurent dès 1875. La forme comprimé présente à ses débuts diverses appellations dont : « pastilles comprimées », « médicament comprimé », « lentilles comprimées », « tabloïd(e) » (dérivé du terme anglais tablet), « tablettes comprimées », « discoid », « comprimé discoïde ». Le terme « comprimé » n'est apparu qu'en 1893 avec la promotion des comprimés d'Exalgine (antalgique à base de méthylacétalide) par les Laboratoires Blancard. L'usage des comprimés va se répandre que tardivement en France [38].

## 1. Comprimés

### 1.1. Définition du comprimé

Les comprimés sont des préparations de consistance solide contenant une unité de prise d'une ou plusieurs substances actives. Ils sont obtenus en agglomérant par compression un volume constant de particules ou par un autre procédé de fabrication approprié tel que l'extrusion, le moulage ou la cryodessiccation (lyophilisation). Les comprimés sont généralement destinés à la voie orale [39].

### 1.2. Différents aspects des comprimés

Les comprimés peuvent être classés en deux catégories selon le type de libération

- Comprimés à libération conventionnelle.
- Comprimés à libération modifiée.

#### 1.2.1 Comprimés à libération conventionnelle (immédiate)

Ce sont des formes pour lesquelles la libération du principe actif n'a pas fait l'objet d'une modification délibérée résultant de la mise en œuvre d'une formulation particulière et/ou d'un procédé de fabrication spécial [39].

##### 1.2.1.1 Comprimés nus ou non enrobés

Ce sont des comprimés qui ne comportent pas un enrobage mais ils peuvent être constitués d'une seule couche comme ils peuvent être constitués de plusieurs couches superposées ou concentriques [40].

### 1.2.1.2 Comprimés enrobé

Ce sont des comprimés dont la surface est recouverte d'une ou plusieurs couches de mélanges de substances diverses comme les résines, les gommes, la gélatine, les sucres, les cires, les polyols et les colorants [41].

- La dragéification ou l'enrobage au sucre. Le comprimé obtenu est dit dragée ;
- Le pelliculage ou l'enrobage par film à l'aide d'un agent filmogène. Le comprimé obtenu est dit pelliculé [40].

### 1.2.2 Comprimés à libération modifiée

Les comprimés à libération modifiée sont des comprimés, enrobés ou non, qui sont préparés avec des excipients spéciaux ou par des procédés particuliers, ou les deux, visant à modifier la vitesse, le lieu où le moment de libération de la (ou des) substance(s) active(s). Ce sont des préparations dont la vitesse de libération du (ou des) principe(s) actif(s) est inférieure ou supérieure à celle qu'assurerait la forme à libération conventionnelle administrée par la même voie [39].

#### 1.2.2.1 Comprimés à libération prolongée (Forme LP)

Il s'agit de préparations dont la vitesse de libération de la substance active est inférieure à celle qu'assurerait la forme à libération conventionnelle administrée par la même voie. La dose de principe actif total y est toujours plus élevée que dans une forme à libération conventionnelle. La vitesse de libération plus lente a pour but d'obtenir une concentration principeactif

la plus constante possible dans l'organisme tout en diminuant le nombre d'administration. La difficulté est grande car cette concentration en principe actif doit toujours être comprise entre le seuil d'activité et le seuil de toxicité [39].

#### 1.2.2.2 Comprimés à libération retardée

Les comprimés à libération retardée sont des formes galéniques où le principe actif est libéré à un moment ou un lieu différent par rapport à la forme conventionnelle administrée par la même voie. C'est le cas notamment des comprimés gastrorésistants. Ce sont des comprimés à libération modifiée destinés à résister au suc gastrique et à libérer la ou les substances actives dans le suc intestinal [39].

### 1.2.2.3 Comprimés à libération accélérée

Ce sont des préparations dont la vitesse de libération de la substance active est plus rapide que celle de la forme à libération conventionnelle destinée à la même voie d'administration.

Elles sont généralement administrées après mise en solution. On trouve :

- Les comprimés dispersibles;
- Les comprimés solubles ;
- Les comprimés effervescents ;
- Les comprimés orodispersibles;
- Les lyophilisats oraux [39].

### 1.2.3.4 Comprimés à utiliser dans la cavité buccale

Les comprimés à utiliser dans la cavité buccale sont le plus souvent des comprimés non enrobés. Leur formule est établie de façon à permettre une libération lente et une action locale de la ou des substances actives, ou la libération et l'absorption de la (ou des) substance(s) active(s) dans une partie définie de la cavité buccale [39].

## 1.3 Caractéristiques organoleptiques des comprimés

Le comprimé doit être identifiable afin d'éviter toute confusion chez les patients mais également le personnel soignant. Le risque iatrogène est augmenté en cas de polymédication et ou déconditionnement des médicaments. Chaque comprimé est caractérisé visuellement par sa forme, ses dimensions, sa couleur et son marquage [38].

### 1.3.1 Formes et dimensions

Un comprimé correspond en général à « un cylindre droit dont les faces inférieures et supérieures peuvent être plates ou convexes et les bords biseautés ». En effet, lors de la production de comprimés par compression, la matrice et les poinçons définissent la forme du comprimé. Il faut souligner que la forme du comprimé n'est pas une caractéristique anodine : Certaines géométries sont facilement érodées et peuvent être difficilement enrobées. A noter que la surface externe du comprimé peut avoir une influence sur la libération du principe actif selon les recommandations de la FDA relatives aux attributs physiques des comprimés et capsules génériques, les comprimés ronds doivent être privilégiés par rapport aux comprimés plats dont le risque d'adhérence aux parois de l'œsophage est favorisé par sa grande surface.

Il est également souligné que plus le comprimé est petit, plus son administration est aisée : Passage rapide à travers le pharynx et l'œsophage. Le diamètre recommandé n'excède pas 22 mm et est préférentiellement inférieure à 17 mm [38].

### **1.3.2. Couleurs et marquage**

La couleur du comprimé correspond à celle du mélange de matières premières ou à la coloration de l'enrobage. La réglementation relative à l'emploi de colorant diffère selon les pays, et l'ajout d'un colorant peut donc restreindre la commercialisation du comprimé à un territoire.

La coloration joue un rôle esthétique et constitue un critère d'identification discriminant dans le cadre de l'identification du comprimé pour preuve, le guide visuel d'identification des médicaments classe les médicaments photographiés par couleur.

Enfin, l'altération du médicament peut se traduire par un changement de couleur.

Le marquage des comprimés peut se faire à l'aide de motifs en relief, de gravures, ou des impressions. Les comprimés sécables présentent une ou plusieurs barres de cassure assurant la division des comprimés en fractions uniformes [38].

### **1.3.3. Structure :**

En fonction des contraintes de formulation et du profil de libération souhaité, les comprimés peuvent présenter des structures variées, un comprimé peut être nu ou enrobé. A noter que si l'enrobage est très mince (tel un film ou pellicule), on parle de comprimé pelliculé.

La couverture en sucre est spécifique des comprimés dragéifiés. L'enrobage a pour but de masquer le goût ou l'odeur désagréable, protéger le principe actif (de la lumière, des agents atmosphériques, ...), contrôler la libération du principe actif, améliorer l'esthétique du comprimé et/ou faciliter l'identification (coloration) [38].

## **1.4. Composition des comprimés [42]**

### **1.4.1. Principes actifs**

Le principe actif d'un médicament correspond à l'ensemble des espèces chimiques qui sont responsables de l'action de ce médicament sur l'organisme.

Ces espèces chimiques peuvent être de nature ionique ou moléculaire et elles sont censées réagir au sein du corps humain avec organes ou éléments précis. Les principes actifs sont toujours indiqués sur les notices des médicaments. On distingue différentes origines pour les produits actifs :

- Produits actifs d'origine végétale.
- Produits actifs d'origine animale.
- Produits actifs d'origine microbiologique et biotechnologique.
- Produits actifs d'origine synthétique.

On compte à peu près 1700 principes actifs actuellement.

Les principes actifs sont désignés par une appellation abrégée en un mot, qui se nomme la dénomination commune internationale ou DCI et qui est officialisée par l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS). Quelques exemples de principes actifs :

- Le paracétamol est le principe actif de l'effergal.
- L'acide acetylsalicylique est le principe actif de l'aspirine.

#### 1.4.2. Principaux excipients

Les excipients sont indispensables au bon fonctionnement du médicament car ils ont des rôles indispensables parmi lesquels :

- Ils assurent la conservation des médicaments ;
- Ils donnent au médicament leur forme (identifiable) : comprimé, poudre, sirop... ;
- Ils donnent un goût tolérable au médicament.

Attention même s'ils n'ont pas d'intérêts thérapeutiques, les excipients peuvent parfois néanmoins provoquer des réactions au sein de l'organisme. On appelle ce type d'excipient « excipient à effet notoire ». Exemple :

- L'huile d'arachide : les médicaments en contenant sont déconseillés aux enfants de moins de 3 ans et aux personnes allergiques. En effet, ce médicament est contre-indiqué aux personnes allergiques au soja et à l'arachide.
- L'aspartame : L'aspartame est contre indiqué pour les personnes souffrant de phénylcétonurie, une maladie génétique qui se caractérise par l'intolérance à la phénylalanine, un acide aminé. L'aspartame contient de la phénylalanine et doit donc être évité.

On trouve de nombreuses catégories d'excipients :

- **Les agrégants** : ils permettent la cohésion d'un mélange de poudres.
- **Les diluants** : ils permettent la dilution et de compléter un volume.
- **Les intermédiaires** : ils peuvent stabiliser le médicament et permettre de le fabriquer.
- **Les colorants** : ils servent pour l'identification d'un médicament.

- **Les édulcorants** : ils donnent un goût acceptable voire agréable, on les appelle aussi les correctifs.
- **Les conservateurs** : ils empêchent la dégradation des médicaments, ils empêchent également la prolifération de micro-organismes.

La figure ci après liste les principaux types d'excipients utilisés dans la fabrication des médicaments.

Excipients liquides	↕ Eau, alcool...
Excipients surfactifs...	Surfactifs ioniques...
Excipients minéraux	Silice...
Excipients sucres	Saccharose...
Excipients cires	Lanoline...
Excipients glycérine	Huile végétale...
Excipients hydrocarbures	Huile de vaseline...

**Figure : les principaux types d'excipients utilisés dans la fabrication des médicaments [42].**

### 1.5. Fabrication des comprimés

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

- Le mélange des poudres de matières premières ;
- La granulation ;
- La compression qui peut être suivie ou non d'une étape d'enrobage [43].

#### 1.5.1 Mélange des poudres

Le mélange est une opération fondamentale car elle intervient dans la fabrication de toutes les formes pharmaceutiques. Cette opération consiste à mélanger le PA avec une partie des adjuvants pour avoir un mélange homogène [44,45].

### **1.5.2. Granulation**

La granulation a pour but de transformer des particules de poudres cristallisées ou amorphes en agrégats solides plus ou moins résistants et plus ou moins poreux appelés granulés ou grains. Selon les caractéristiques du principe actif, on aura recours soit à la granulation par voie humide soit à la granulation par voie sèche [44,45].

#### **1.5.2.1. Granulation humide**

Le mélange est additionné d'un liquide de mouillage (souvent de l'eau, seul ou additionnée d'un liant), le mouillage est assuré dans des mélangeur-malaxeur. La granulation qui suit est réalisé dans des granulateurs rotatifs ou oscillants, avec séchage en étuve ou dans des séchoirs à lit fluidisé. Les granulés sont ensuite tamisés, mélangés aux adjuvants avant de faire l'objet de la compression [44,45].

#### **1.5.2.2. Granulation sèche**

Rarement employée, elle est destinée à la formulation de PA ne supportant pas l'humidité ni la chaleur du séchage. On réalise une compression préliminaire, avec obtention des briquettes qui sont ensuite concassées dans des broyeurs [44,45].

### **1.5.3. Compression**

La compression est une opération qui consiste à faire subir une pression à des particules (poudre ou mélange pulvérulent) afin d'aboutir à des comprimés. La compression s'effectue dans une chambre de compression dont le volume est adapté à la dose médicamenteuse choisie, elle est limitée latéralement par les parois d'un bâti appelé matrice et aux 2 extrémités par 2 surfaces mobiles appelés poinçons dont le mouvement relatif réalise l'effet de compression [44,45].

#### **1.5.3.1. Compression directe**

C'est le procédé par lequel les comprimés sont obtenus directement par compression du mélange de poudres : principe actif et excipients.

Peu de principes actifs peuvent donner des comprimés par compression directe, leur nature et leur proportion constituent une limite à cette technique qui ne peut être appliquée que si le pourcentage du principe actif est inférieur à 25%.

Les comprimés obtenus par compression directe sont essentiellement composés de diluants qui apportent au mélange à comprimer les propriétés physiques et mécaniques nécessaires à l'obtention de comprimés [40].

### 1.5.3.2. Compression après granulation

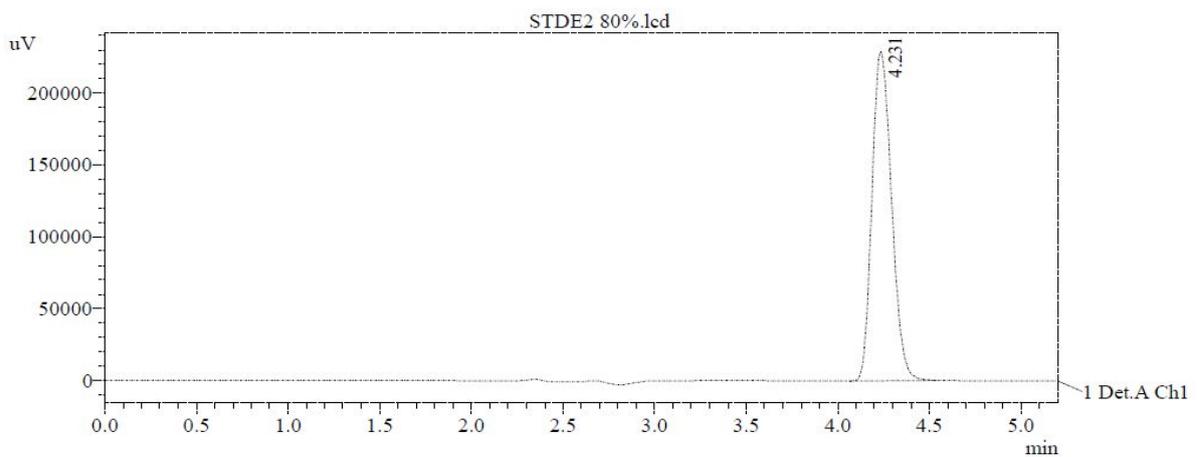
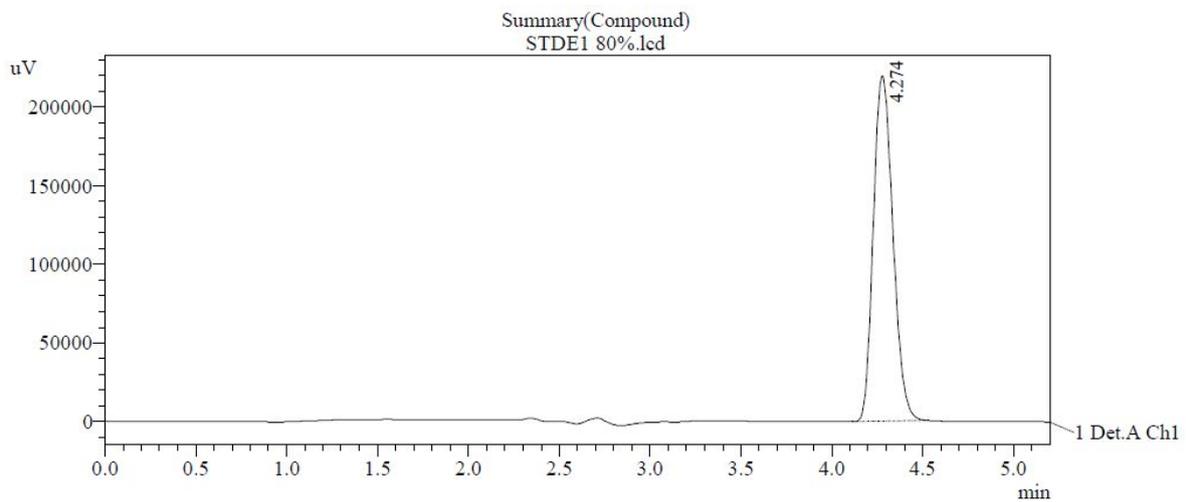
La granulation modifie la texture du mélange pour augmenter sa densité, ceci afin qu'il coule bien dans la matrice et qu'il y ait le moins d'air possible entre les particules ce qui donne une plus grande aptitude à la compression [40].

### 1.6. Avantages et inconvénients [46]

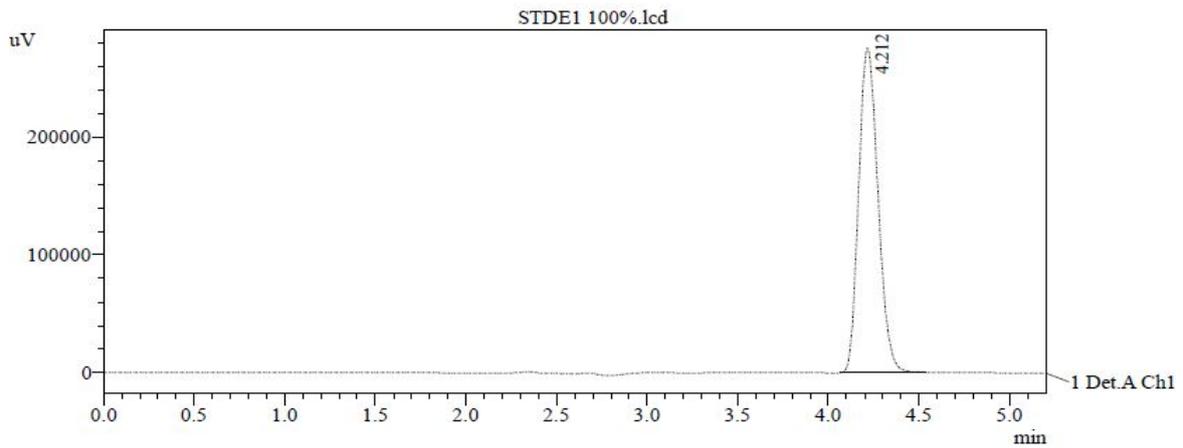
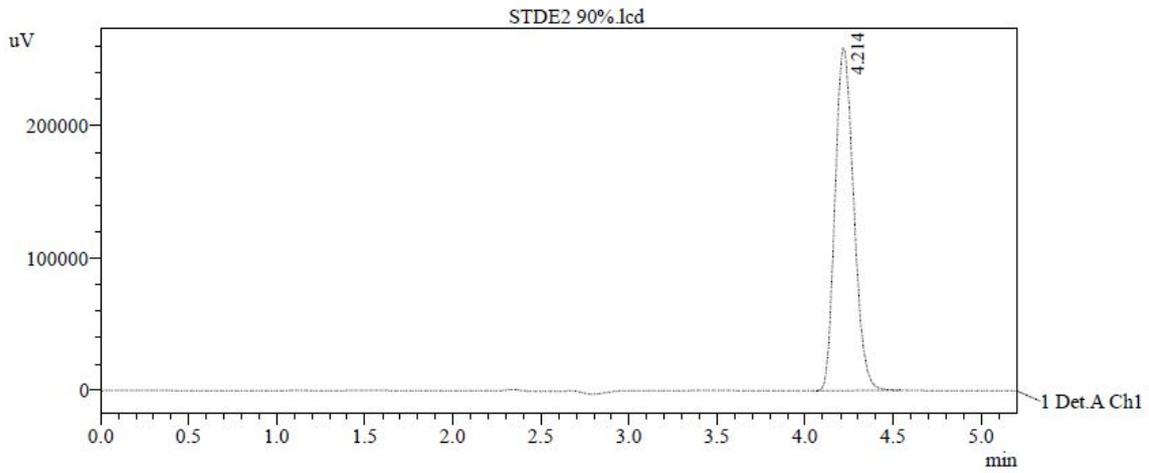
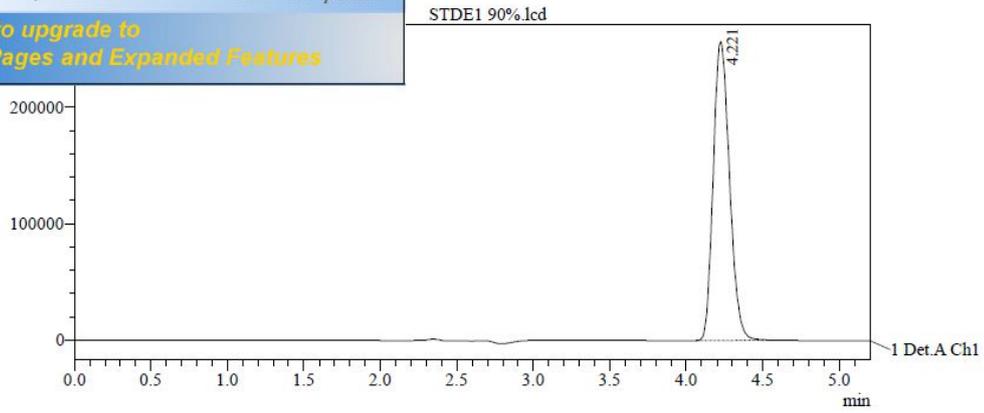
Les comprimés	
Avantages	Inconvénients
<ul style="list-style-type: none"> <li>- Emploi facile : solidité suffisante pour le transport et le conditionnement, faciles à avaler</li> <li>- Dosage précis</li> <li>- Forme sèche : bonne conservation</li> <li>- Prix de revient bas car fabrication industrielle à grande échelle</li> <li>- Possibilité de masquer complètement la saveur par l'enrobage</li> <li>- Possibilité de contrôler la libération du principe actif</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Si le délitement n'est pas rapidement assuré, il y a un risque pour la muqueuse digestive</li> <li>- La mise au point est délicate</li> <li>- Pas de principe actif liquide</li> <li>- Nécessité d'utiliser de nombreux excipients qui peuvent présenter des effets secondaires(EEN).</li> </ul>

Figure : Avantages et inconvénients des comprimés [46].

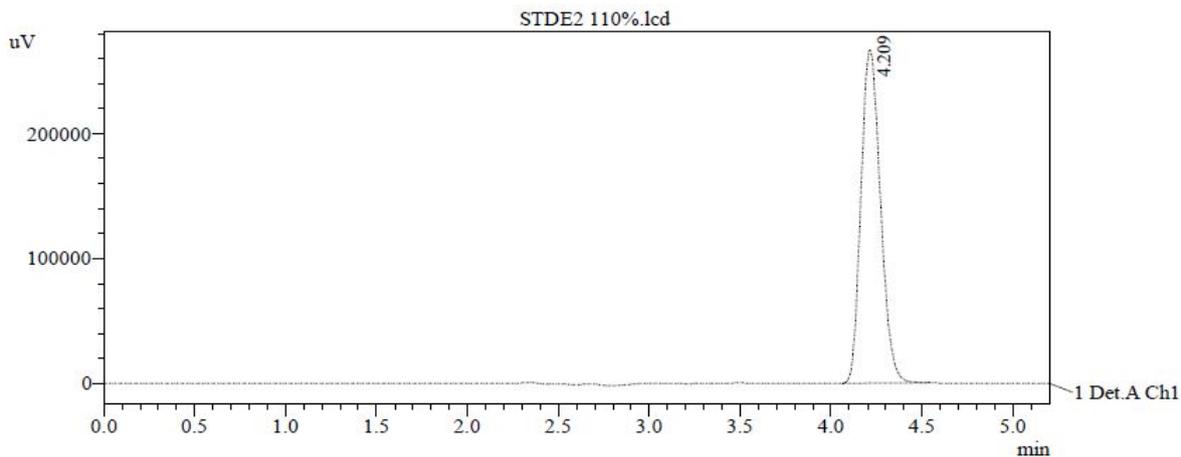
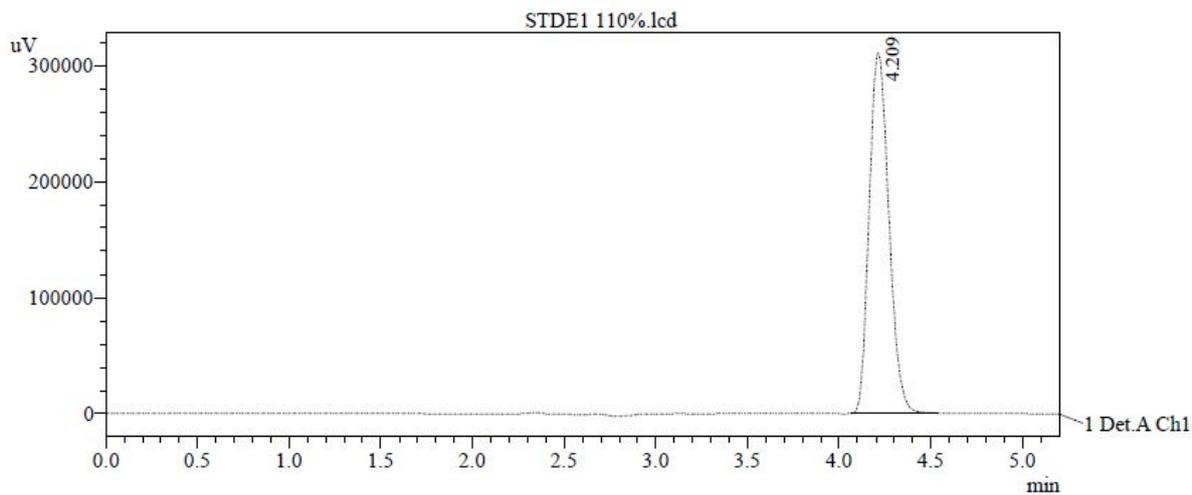
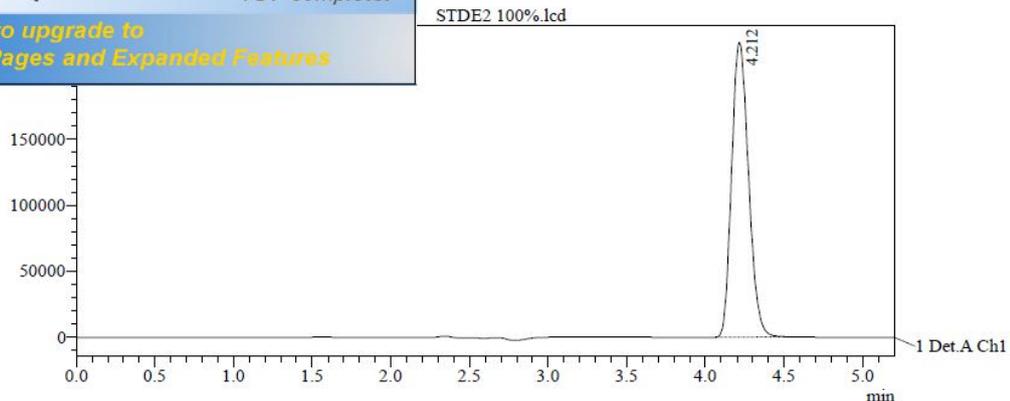
Acquired by : Admin  
Sample Name : STDE1 80%  
Sample ID : STDE1 80%  
Tray# : 1L  
Vial # : 31  
Injection Volume : 20 uL  
Data File Name : STDE1 80%.lcd  
Method File Name : Piroxicam.lcm  
Batch File Name : Piroxicam.lcb  
Report File Name : Default.lcr  
Data Acquired : 01/01/2006 02:33:34  
Data Processed : 01/01/2006 02:38:50

**SERIE 1**

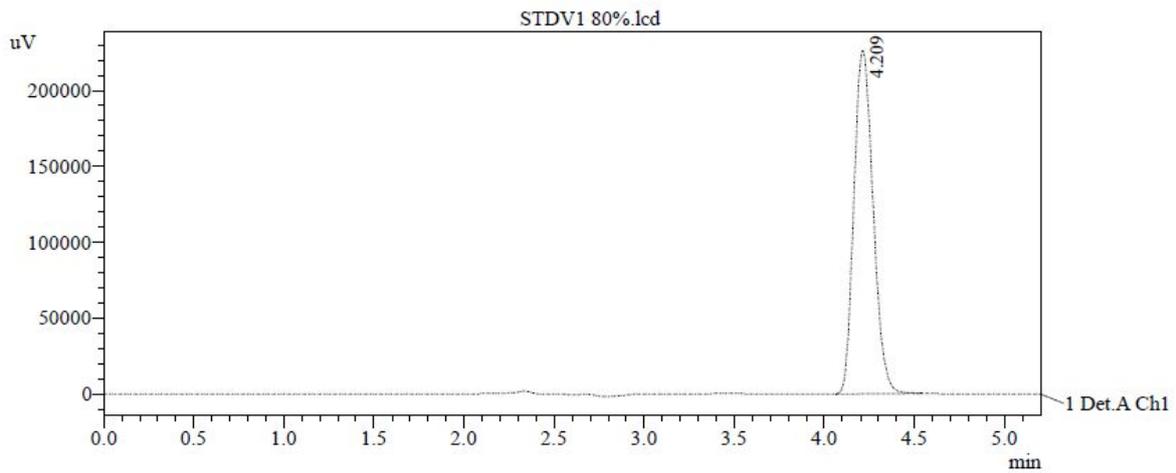
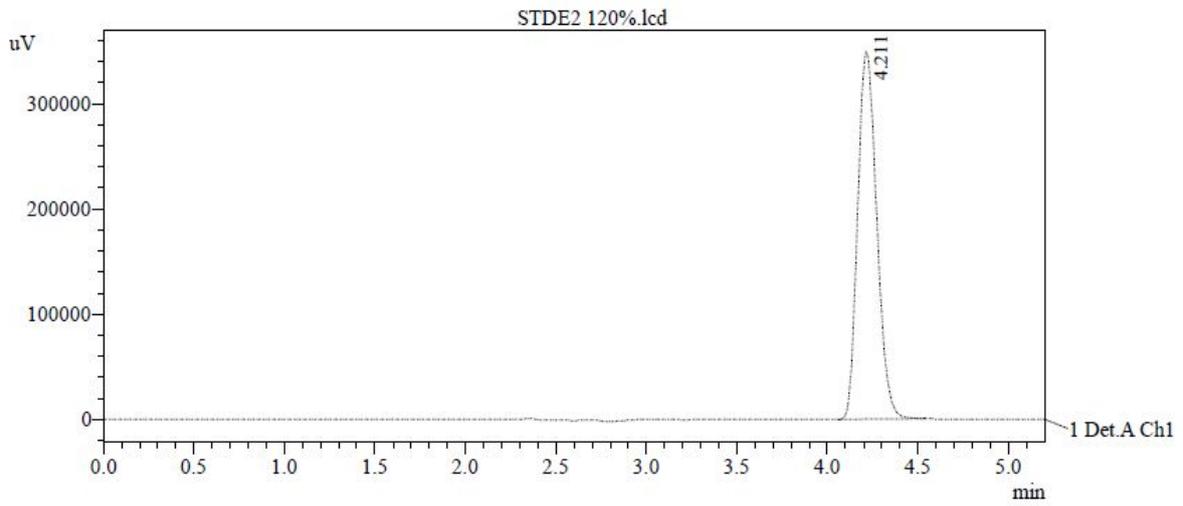
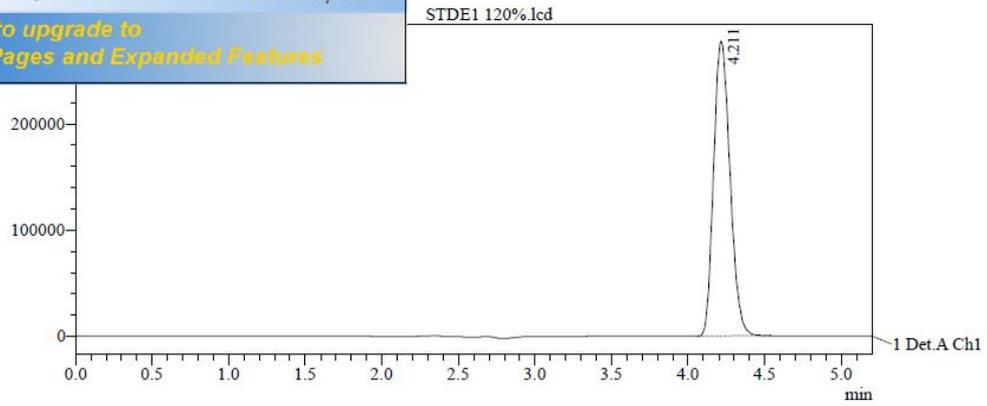
 **PDF Complete**  
Your complimentary use period has ended.  
Thank you for using PDF Complete.  
[Click Here to upgrade to Unlimited Pages and Expanded Features](#)



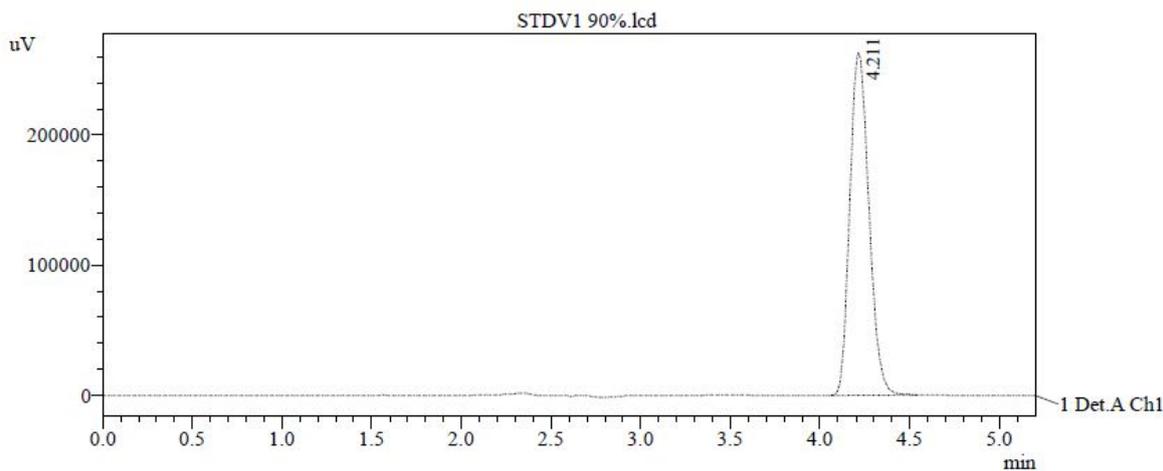
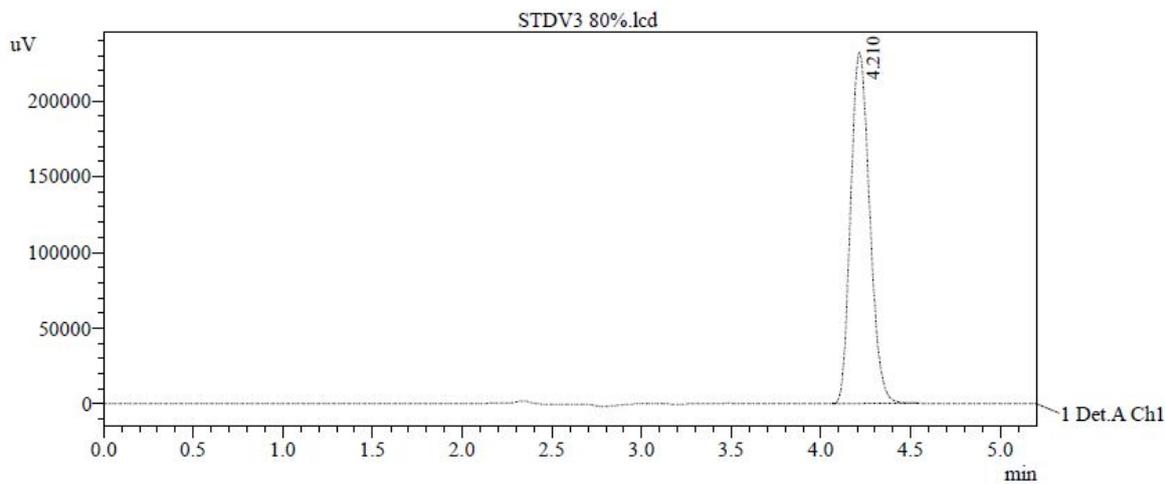
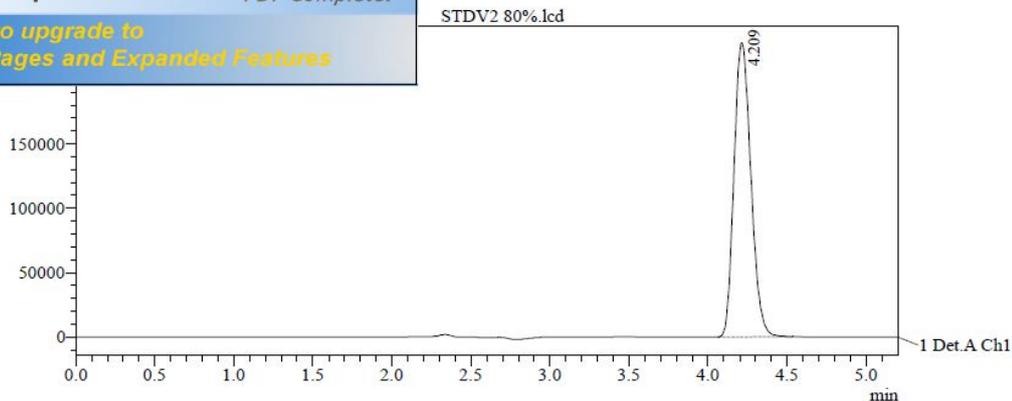
 **PDF Complete**  
Your complimentary use period has ended.  
Thank you for using PDF Complete.  
[Click Here to upgrade to Unlimited Pages and Expanded Features](#)



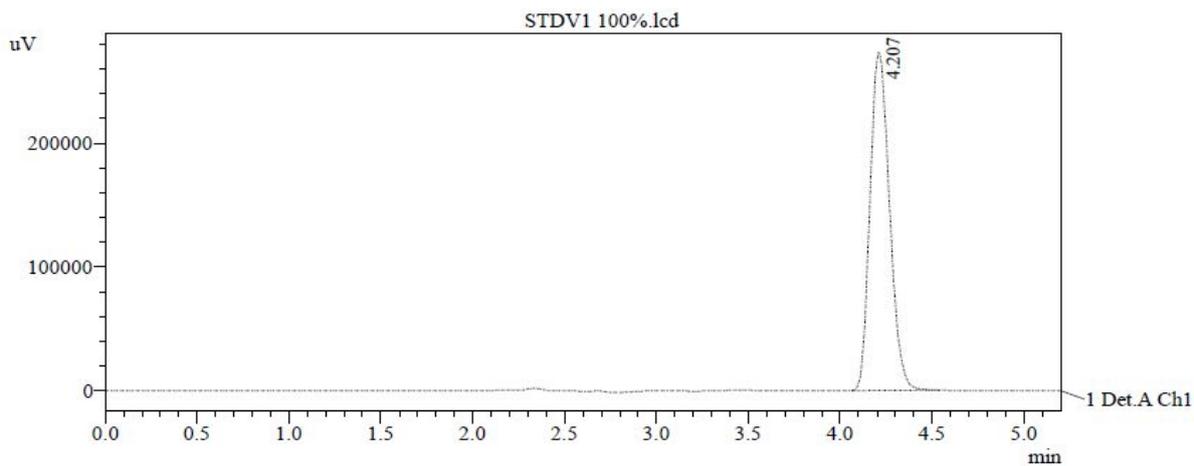
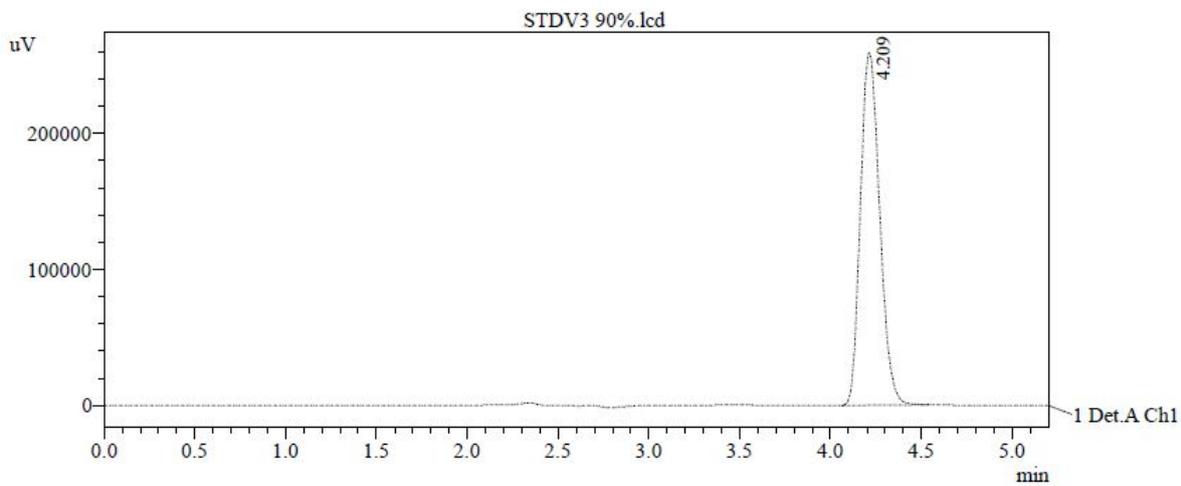
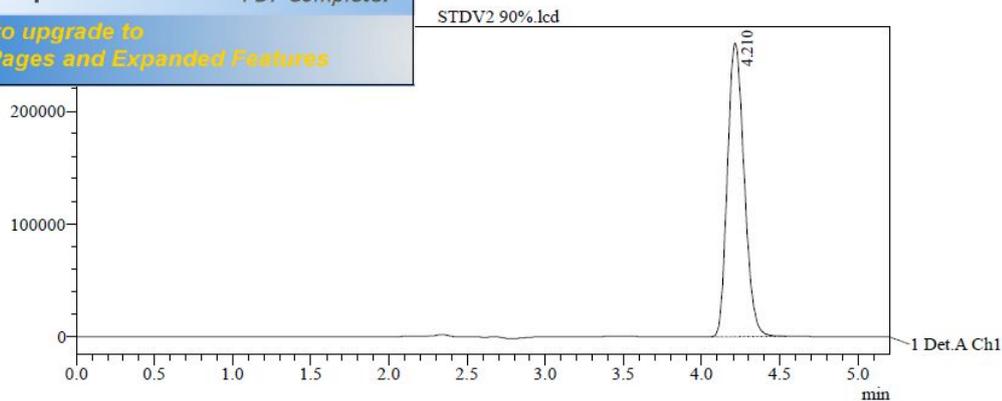
 **PDF Complete**  
Your complimentary use period has ended.  
Thank you for using PDF Complete.  
[Click Here to upgrade to Unlimited Pages and Expanded Features](#)



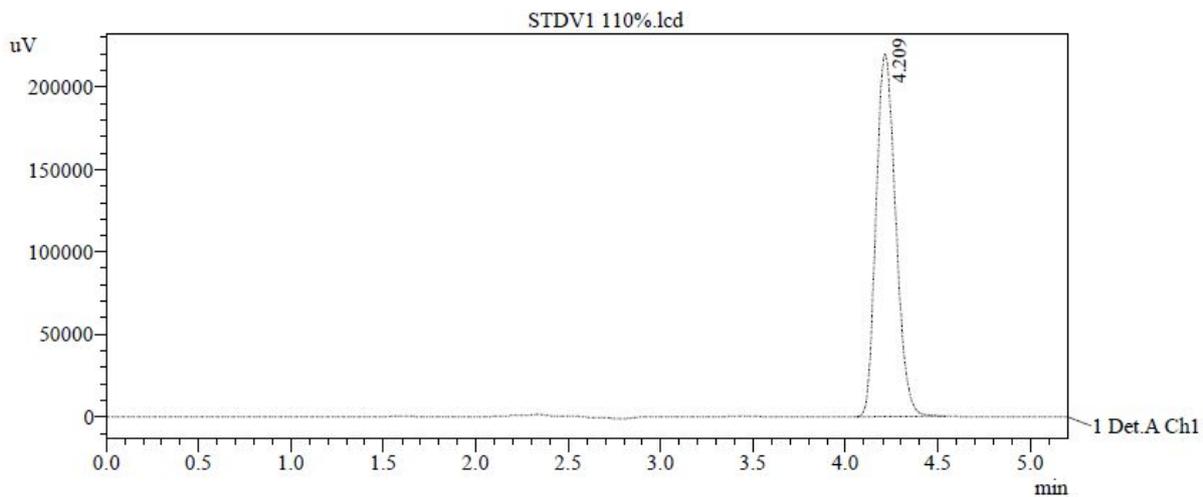
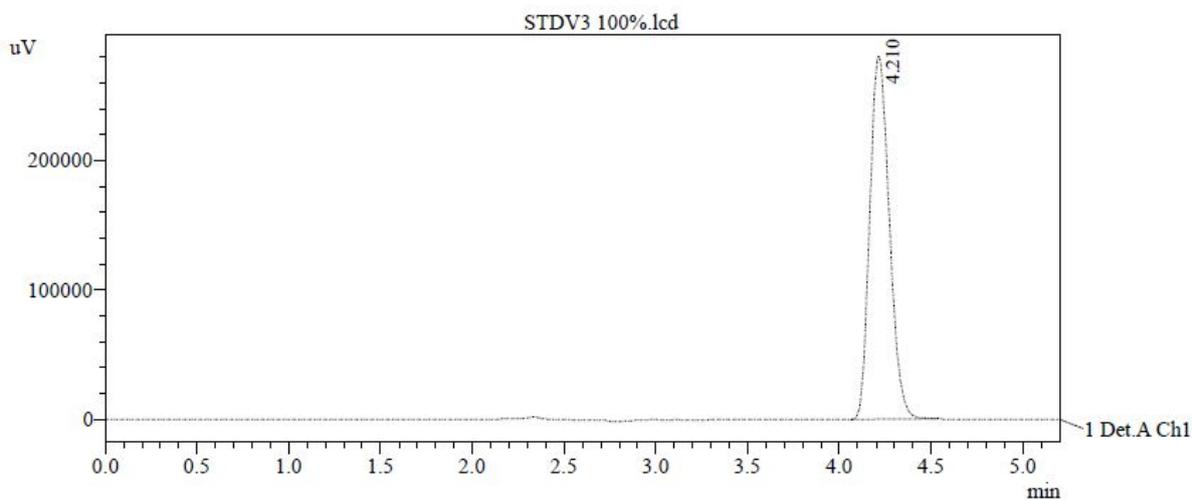
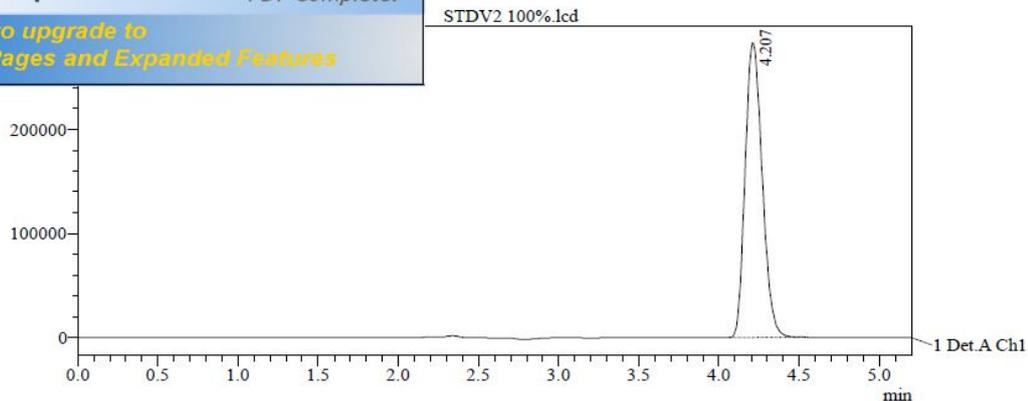
 **PDF Complete**  
Your complimentary use period has ended.  
Thank you for using PDF Complete.  
[Click Here to upgrade to Unlimited Pages and Expanded Features](#)



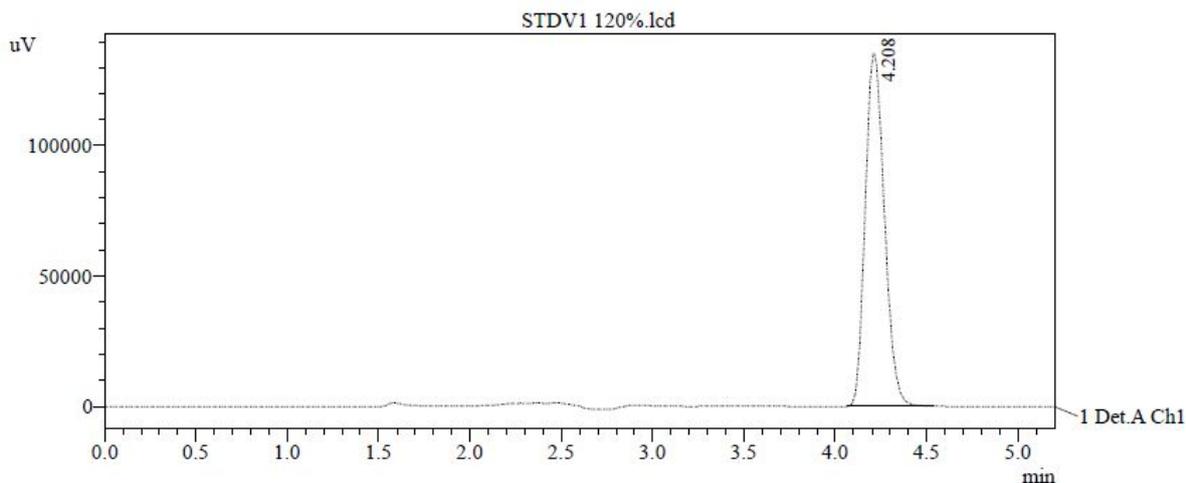
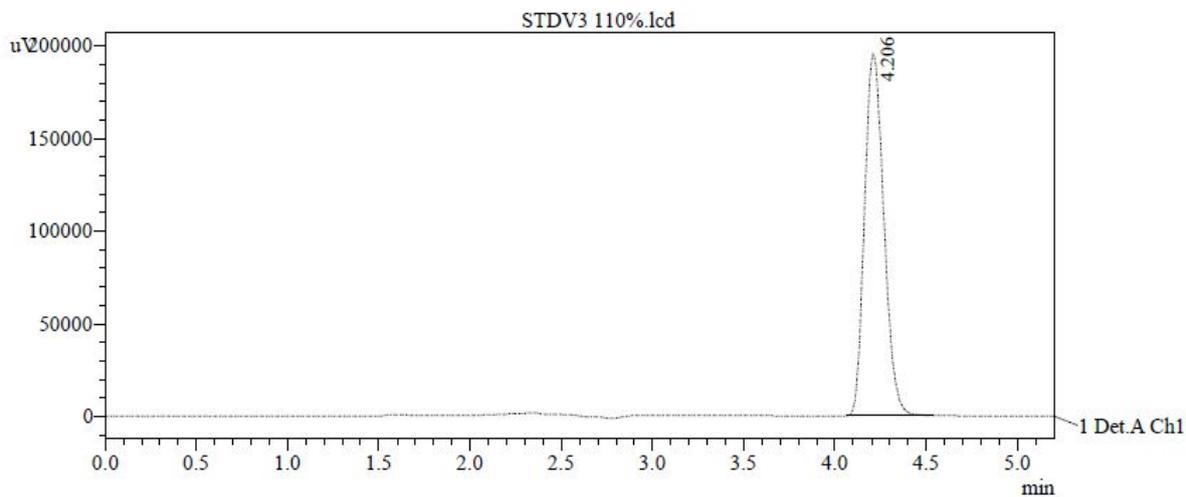
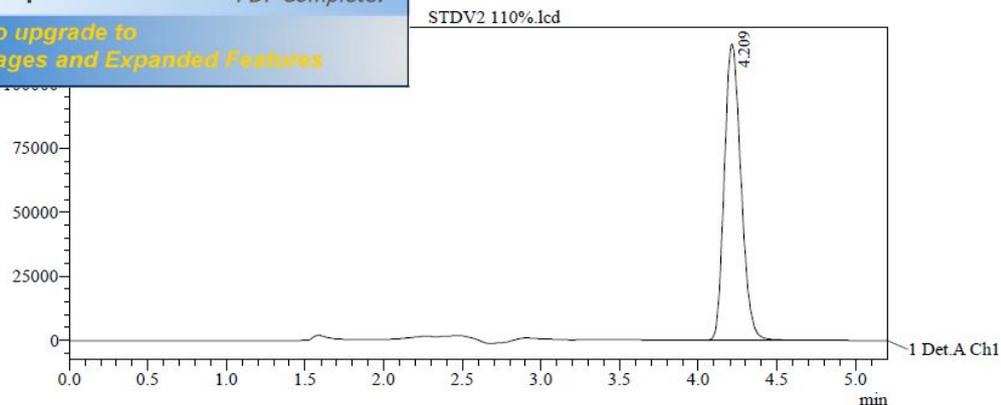
 **PDF Complete**  
Your complimentary use period has ended.  
Thank you for using PDF Complete.  
[Click Here to upgrade to Unlimited Pages and Expanded Features](#)



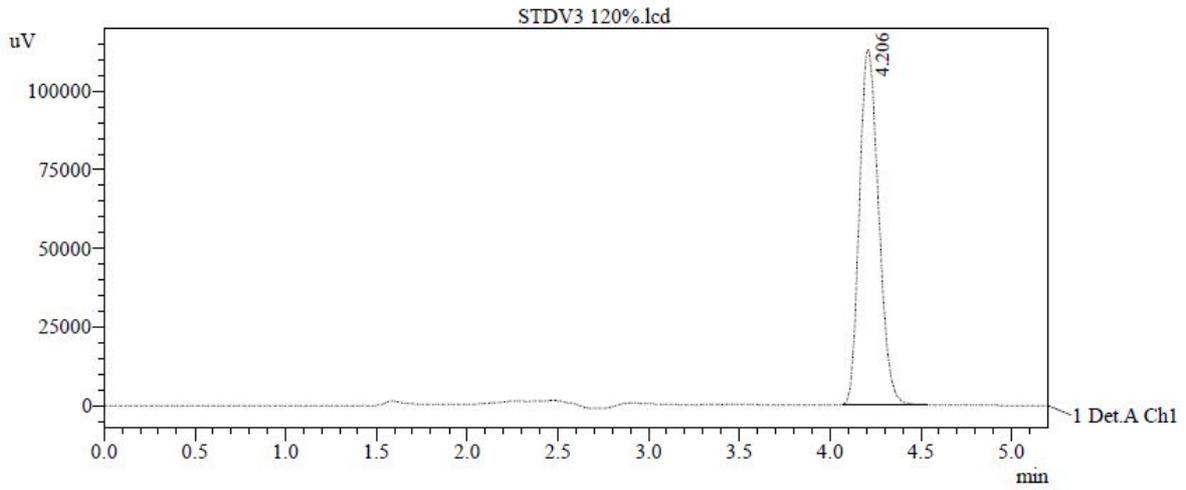
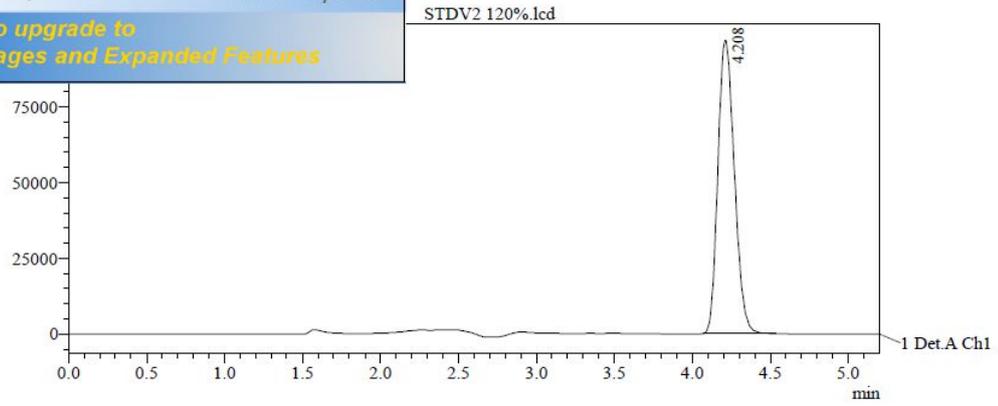
 **PDF Complete**  
Your complimentary use period has ended.  
Thank you for using PDF Complete.  
[Click Here to upgrade to Unlimited Pages and Expanded Features](#)



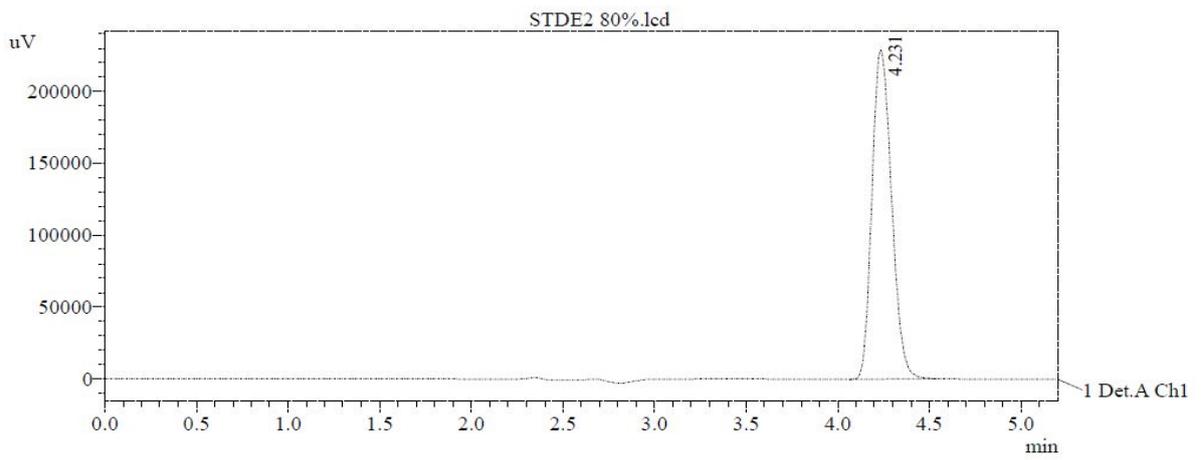
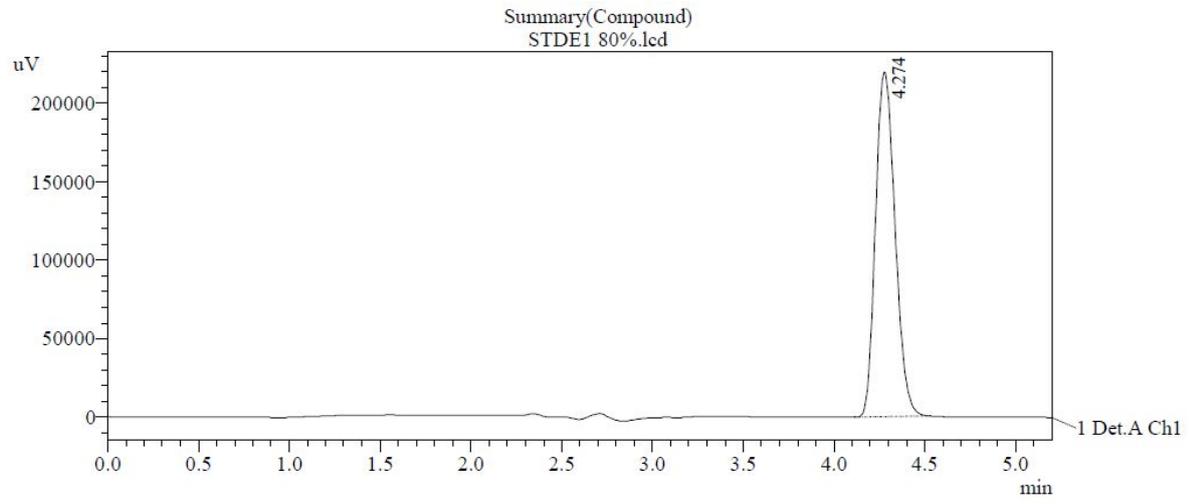
 **PDF Complete**  
Your complimentary use period has ended.  
Thank you for using PDF Complete.  
[Click Here to upgrade to Unlimited Pages and Expanded Features](#)



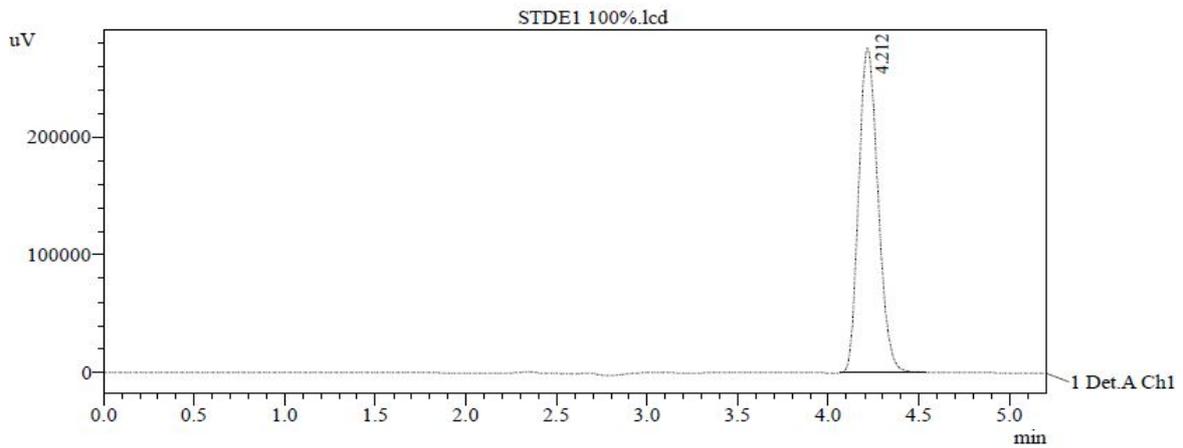
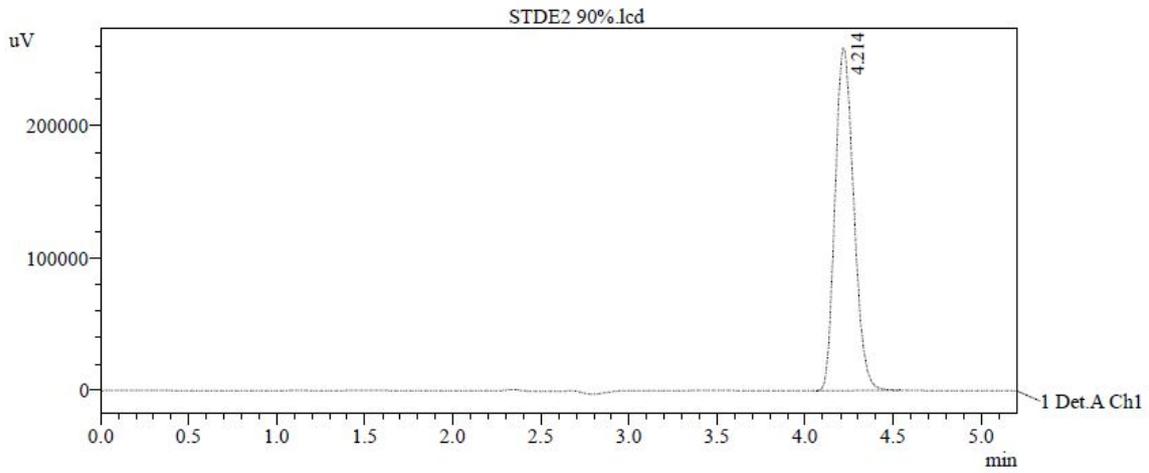
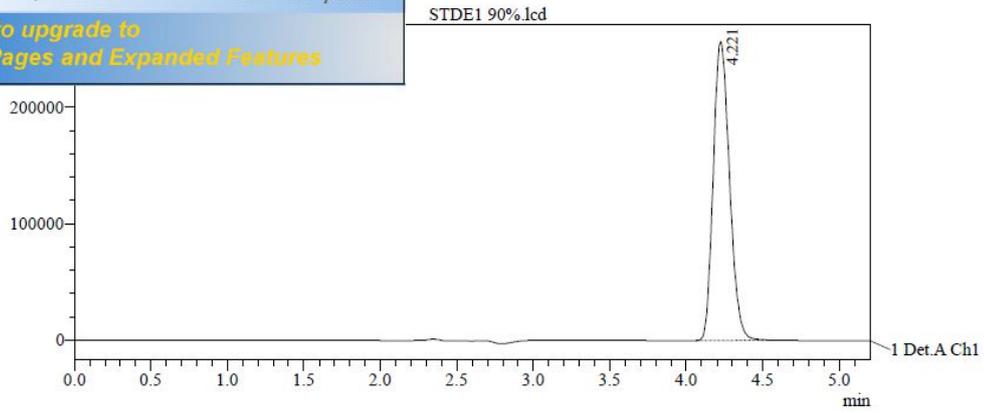
 **PDF Complete**  
Your complimentary use period has ended.  
Thank you for using PDF Complete.  
[Click Here to upgrade to Unlimited Pages and Expanded Features](#)



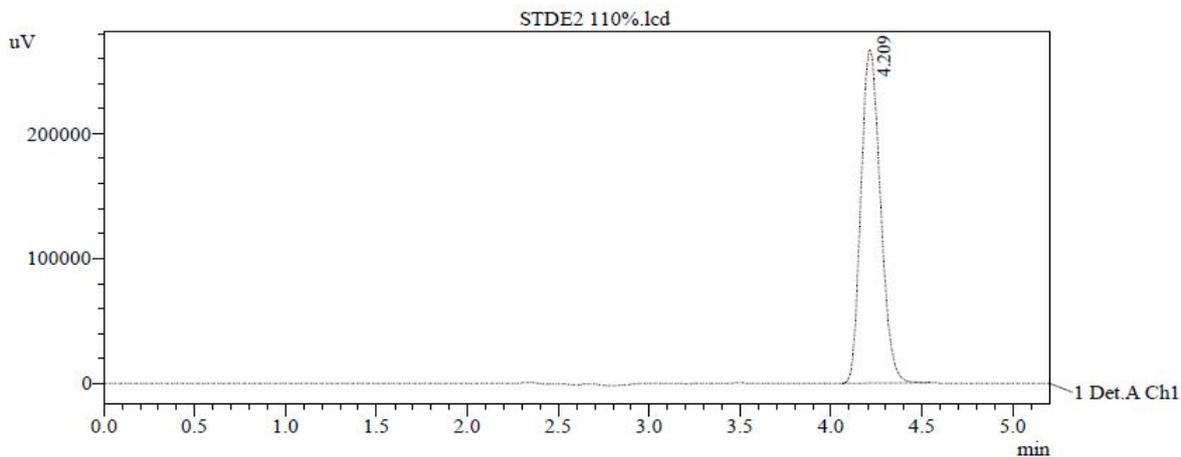
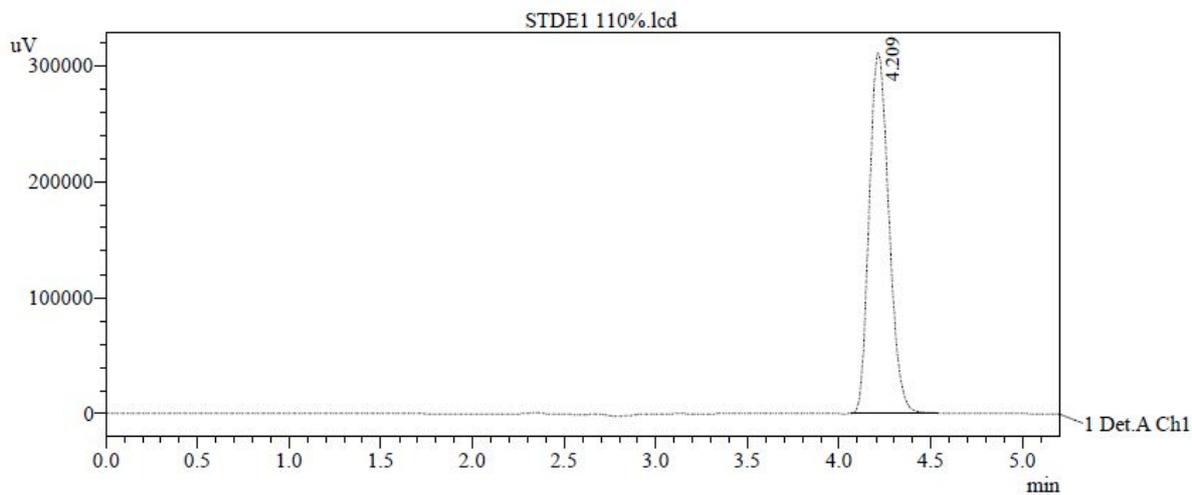
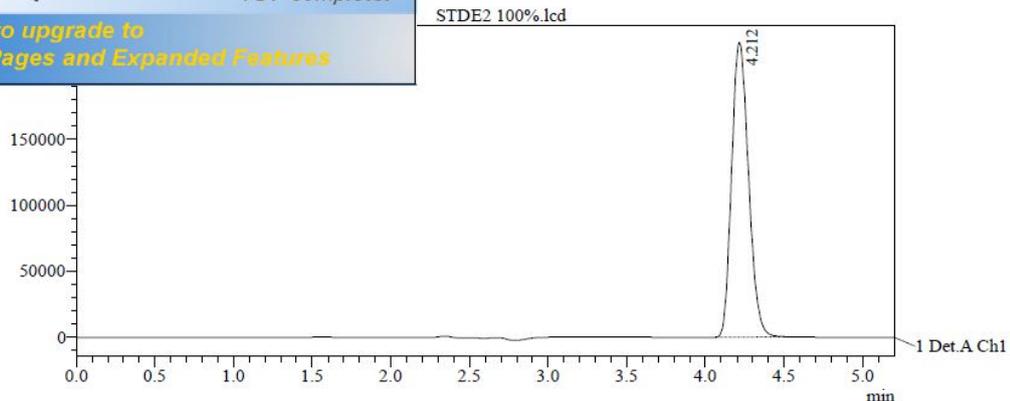
SERIE 2



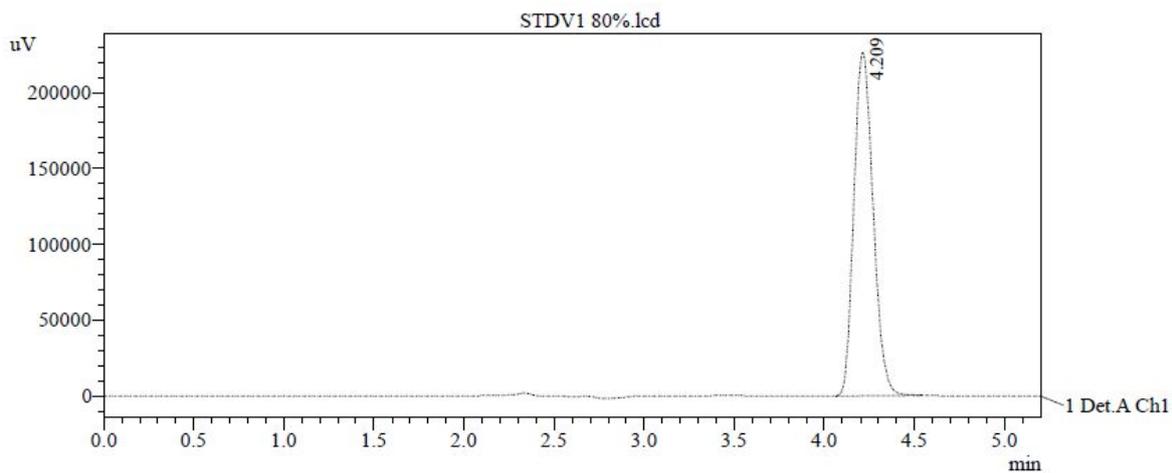
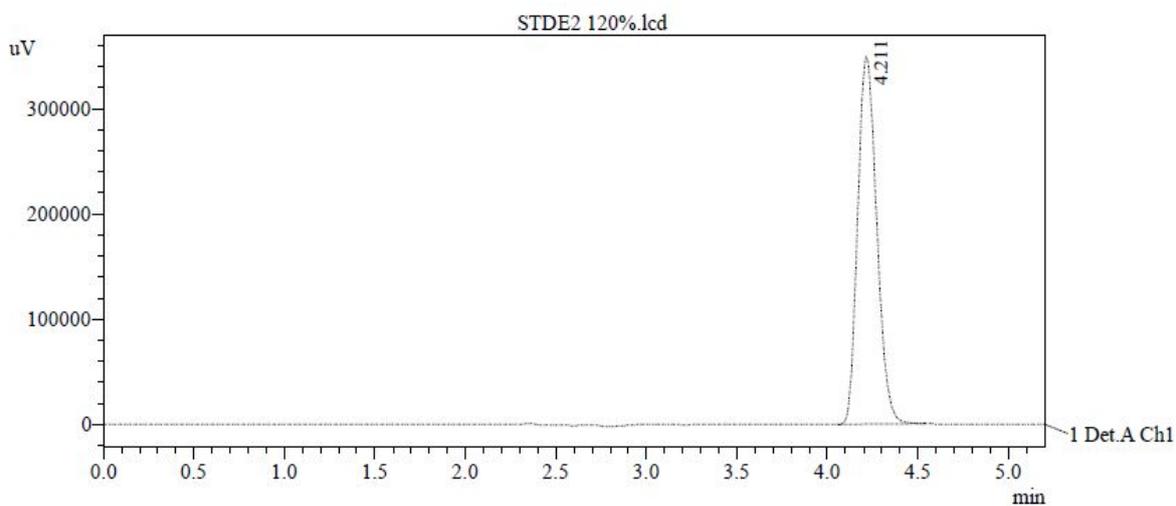
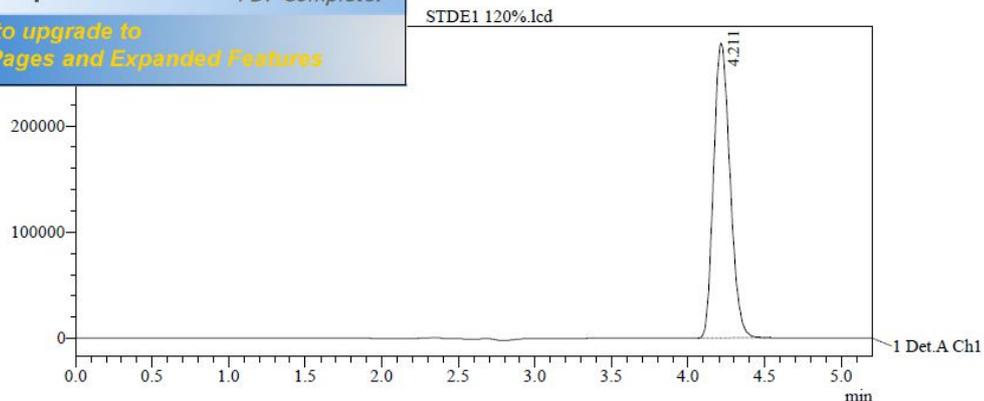
 **PDF Complete**  
Your complimentary use period has ended.  
Thank you for using PDF Complete.  
[Click Here to upgrade to Unlimited Pages and Expanded Features](#)



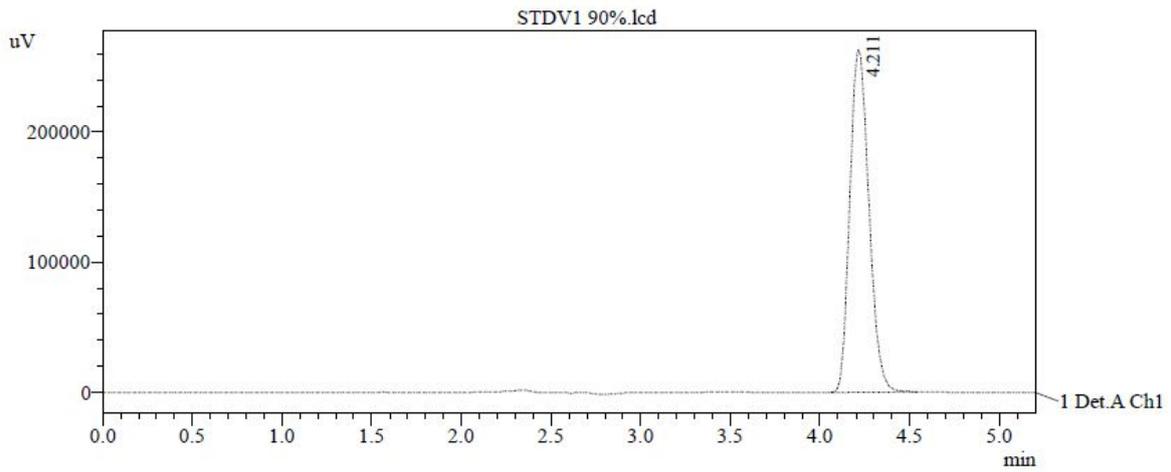
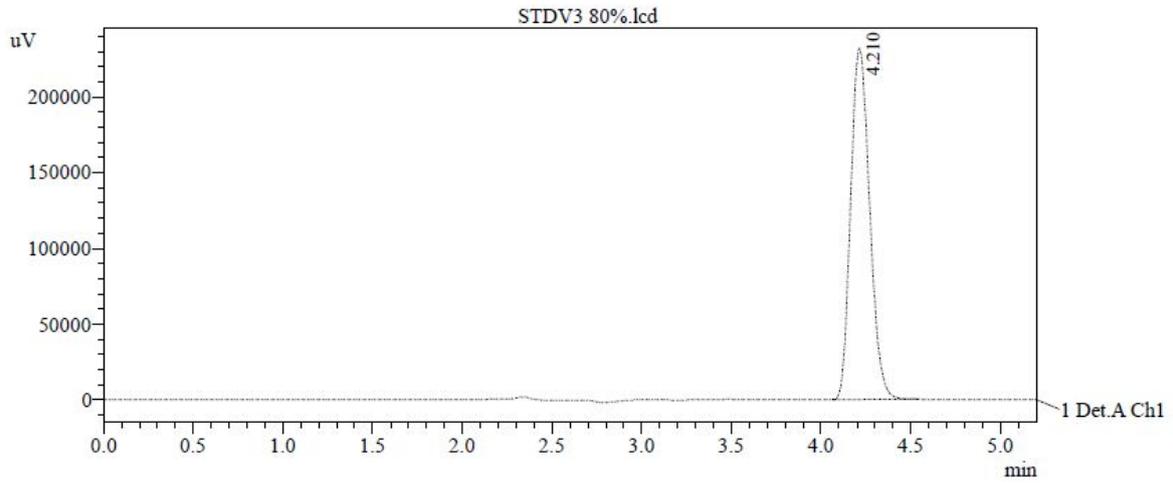
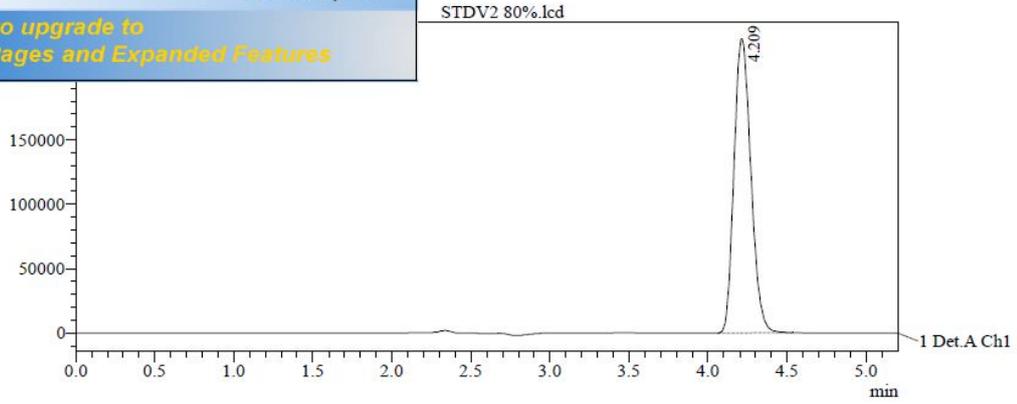
 **PDF Complete**  
Your complimentary use period has ended.  
Thank you for using PDF Complete.  
[Click Here to upgrade to Unlimited Pages and Expanded Features](#)



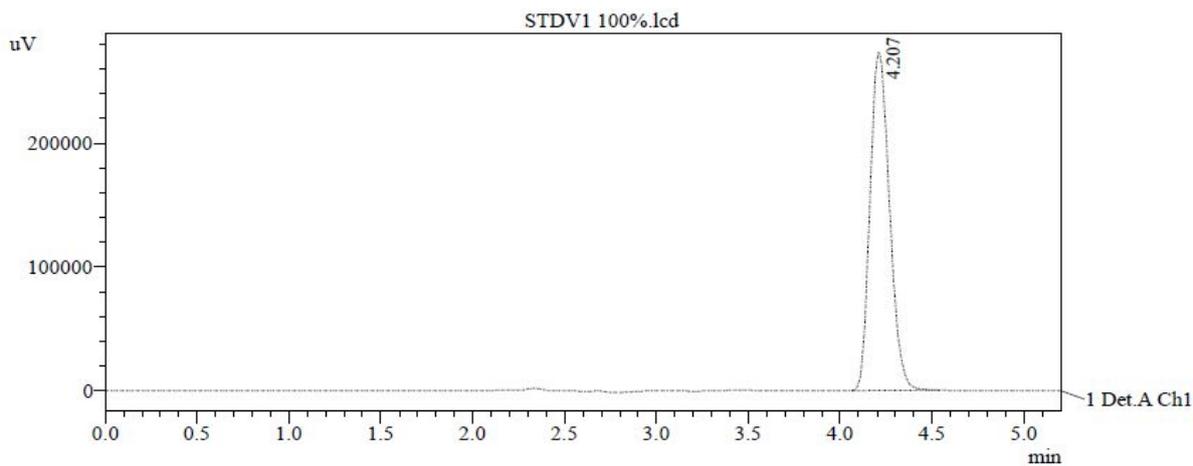
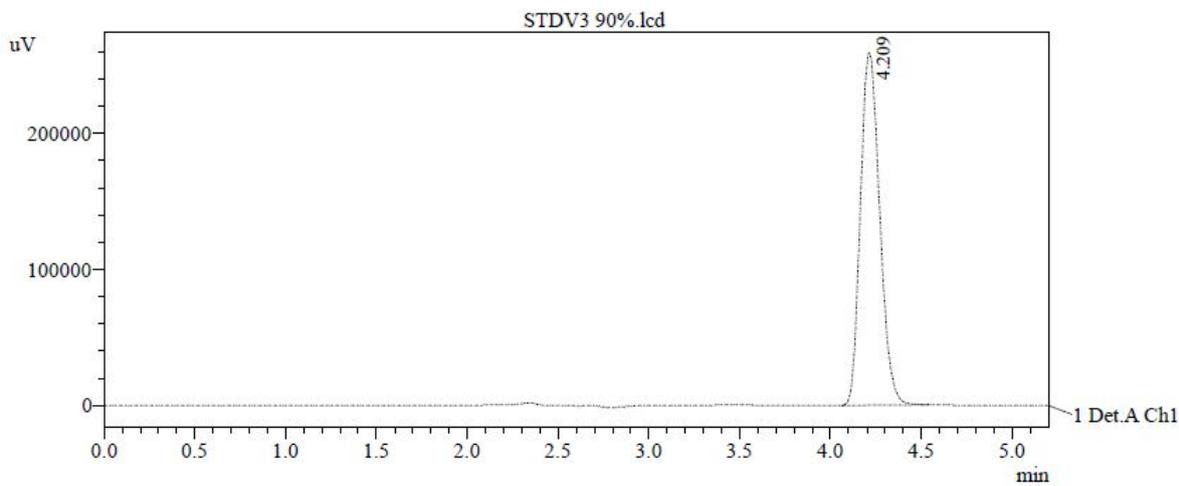
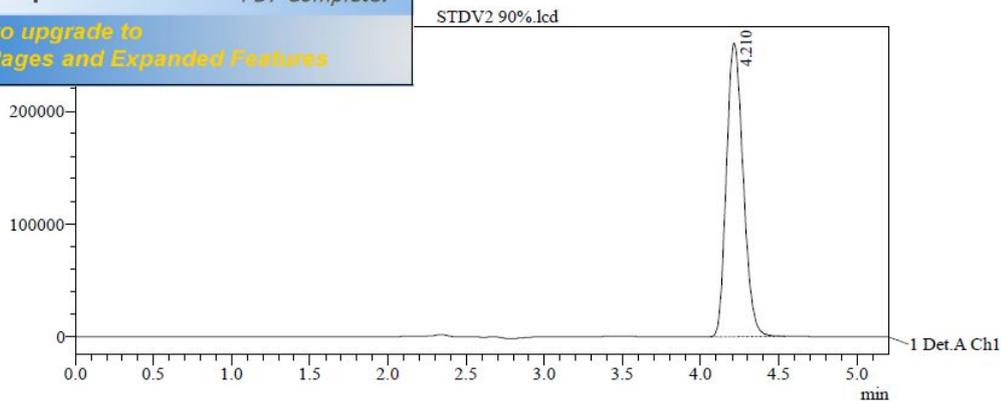
 **PDF Complete**  
Your complimentary use period has ended.  
Thank you for using PDF Complete.  
[Click Here to upgrade to Unlimited Pages and Expanded Features](#)



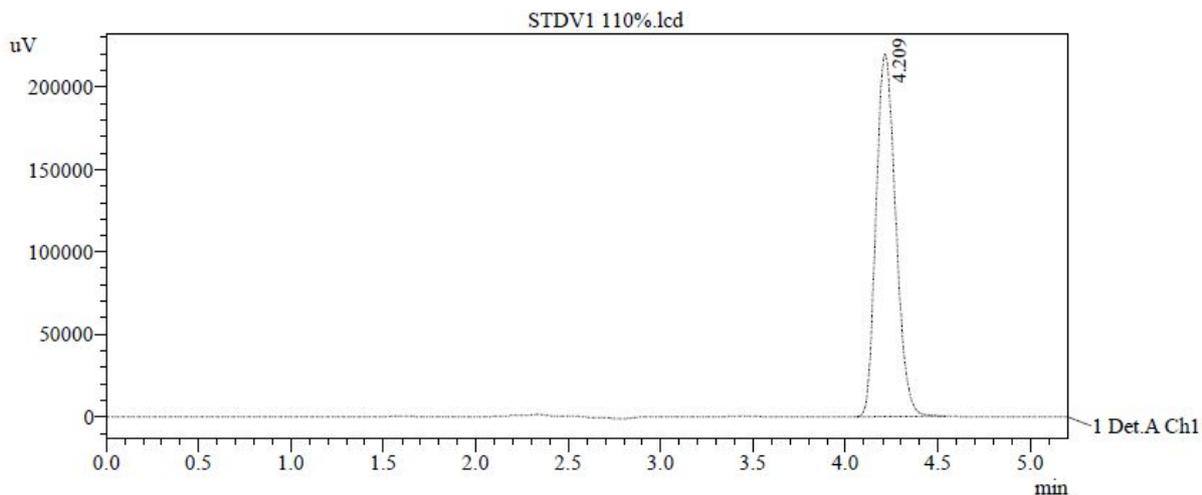
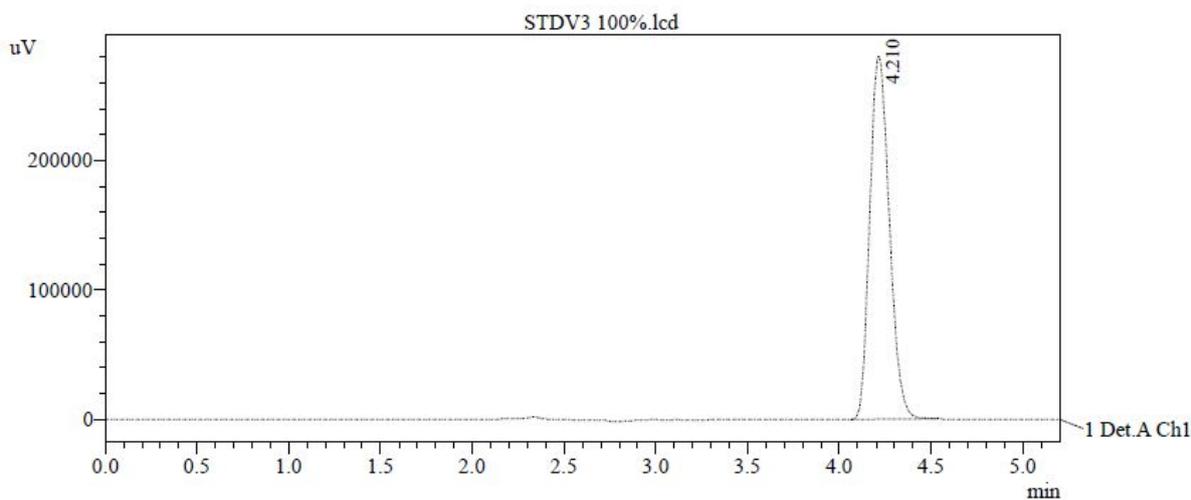
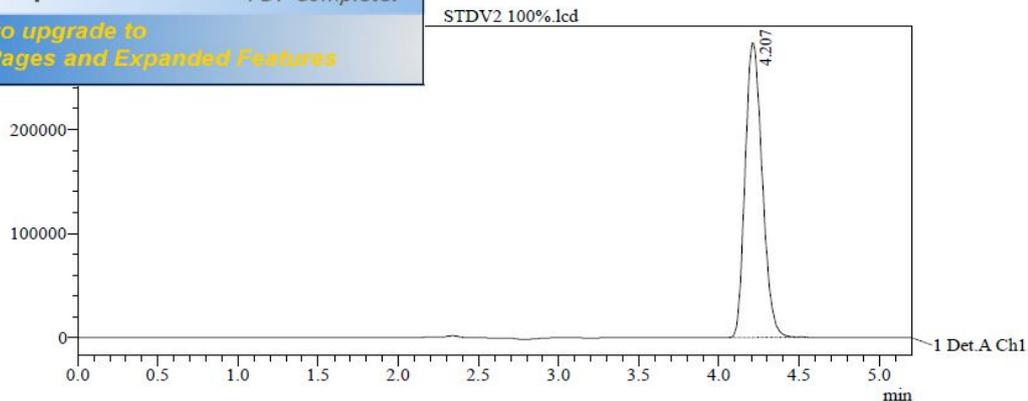
 **PDF Complete**  
Your complimentary use period has ended.  
Thank you for using PDF Complete.  
[Click Here to upgrade to Unlimited Pages and Expanded Features](#)



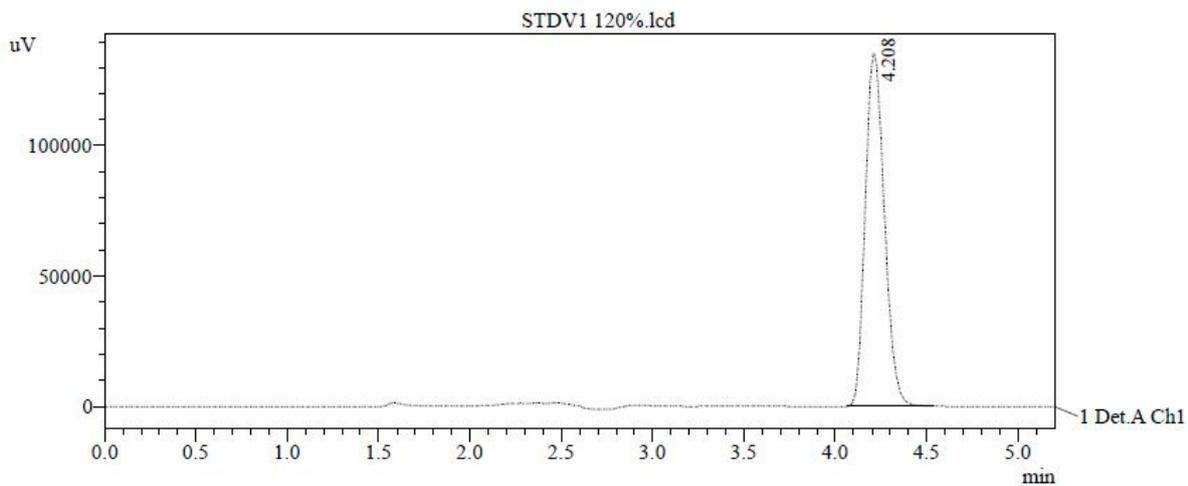
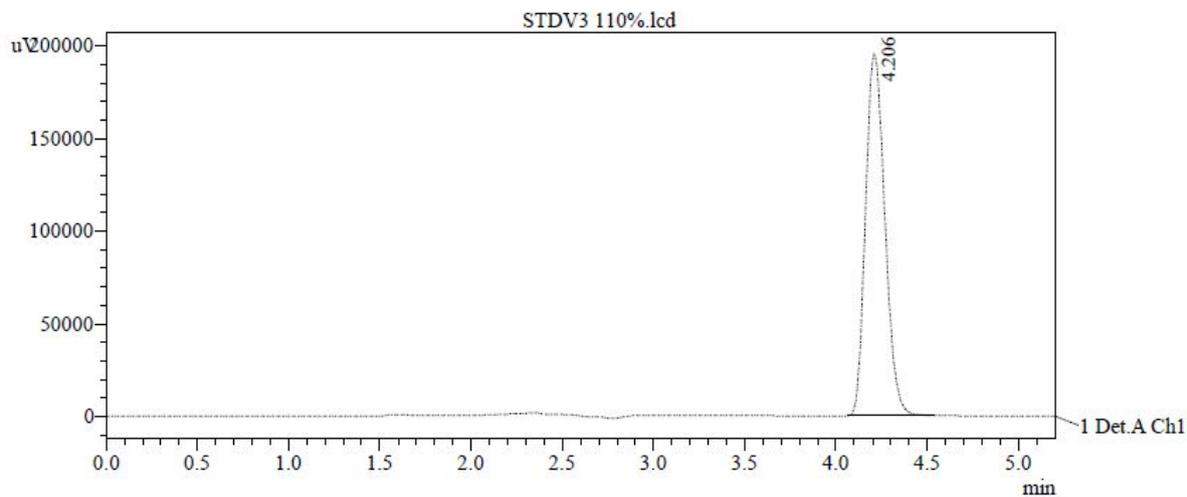
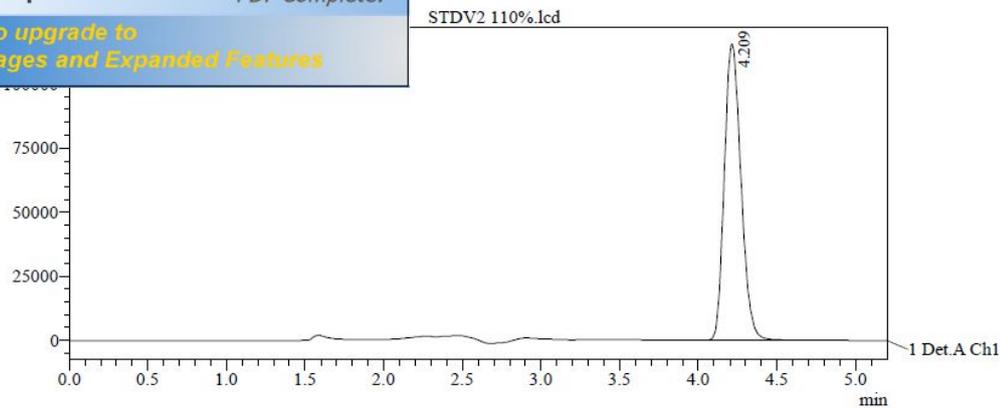
 **PDF Complete**  
Your complimentary use period has ended.  
Thank you for using PDF Complete.  
[Click Here to upgrade to Unlimited Pages and Expanded Features](#)



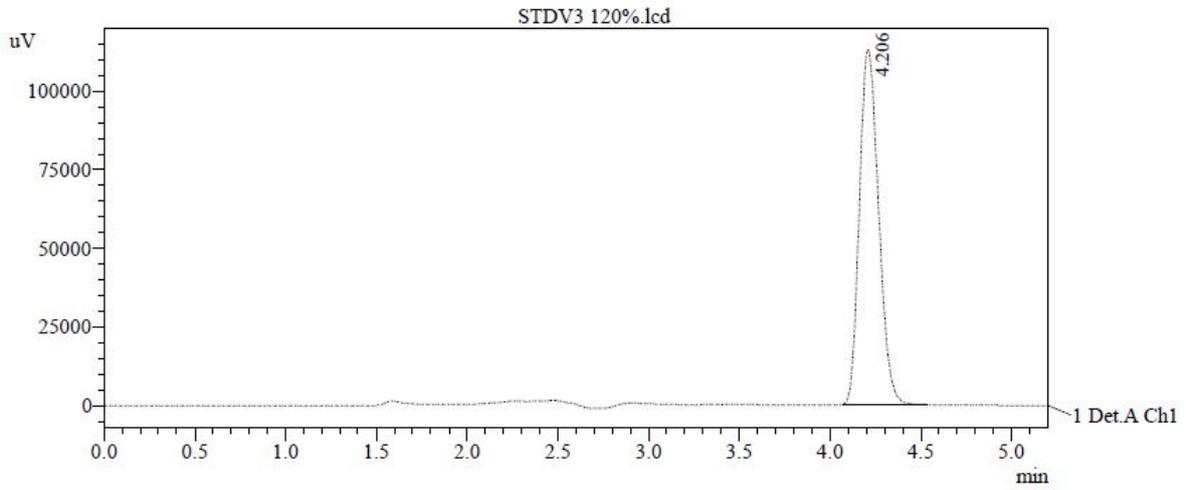
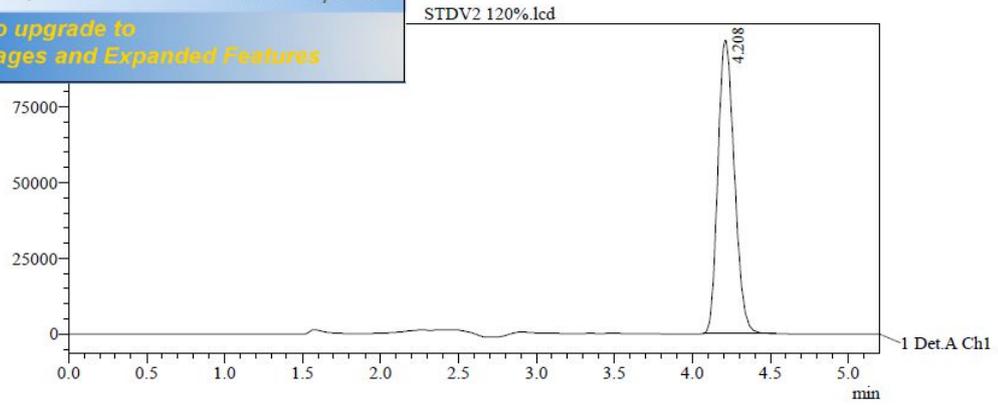
 **PDF Complete**  
Your complimentary use period has ended.  
Thank you for using PDF Complete.  
[Click Here to upgrade to Unlimited Pages and Expanded Features](#)



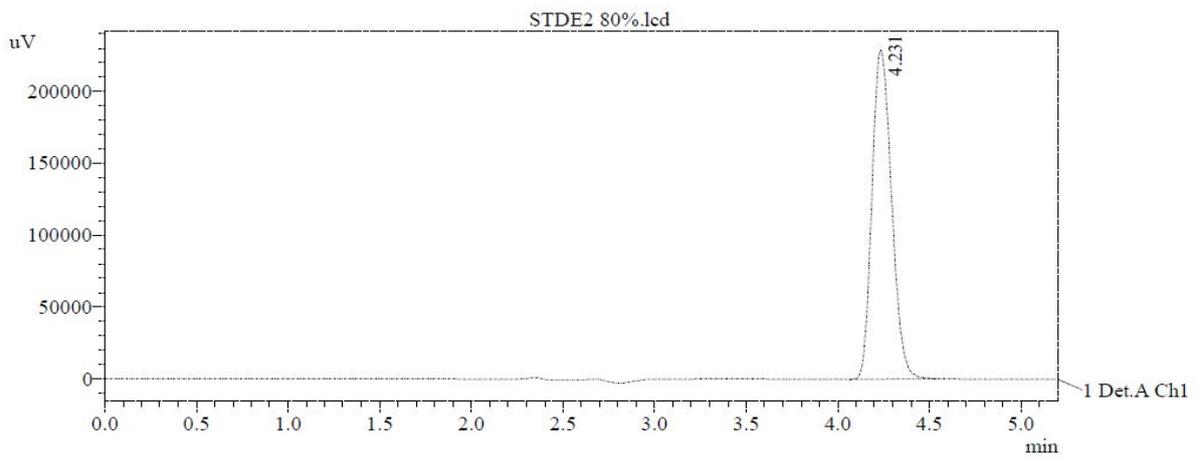
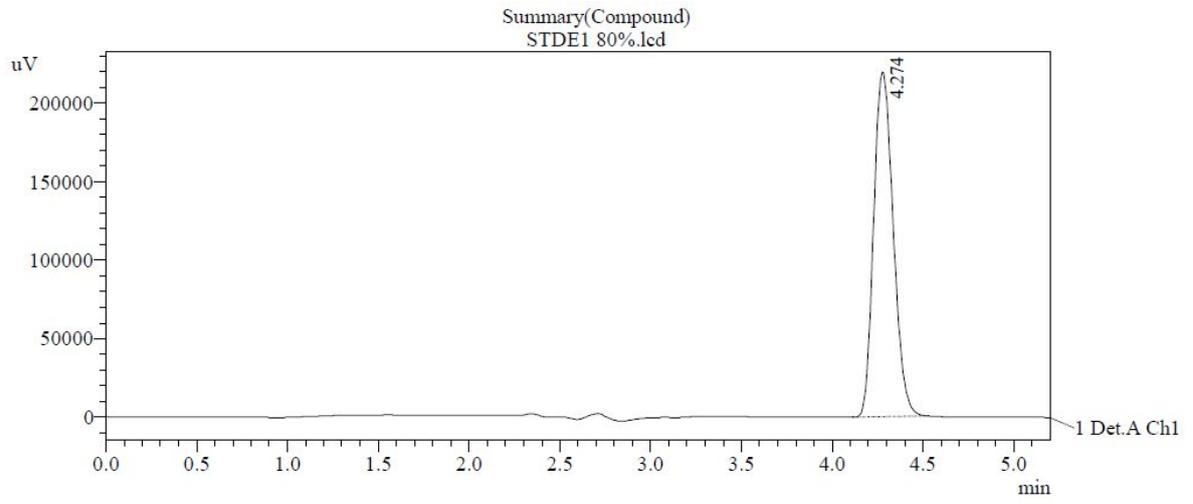
 **PDF Complete**  
Your complimentary use period has ended.  
Thank you for using PDF Complete.  
[Click Here to upgrade to Unlimited Pages and Expanded Features](#)



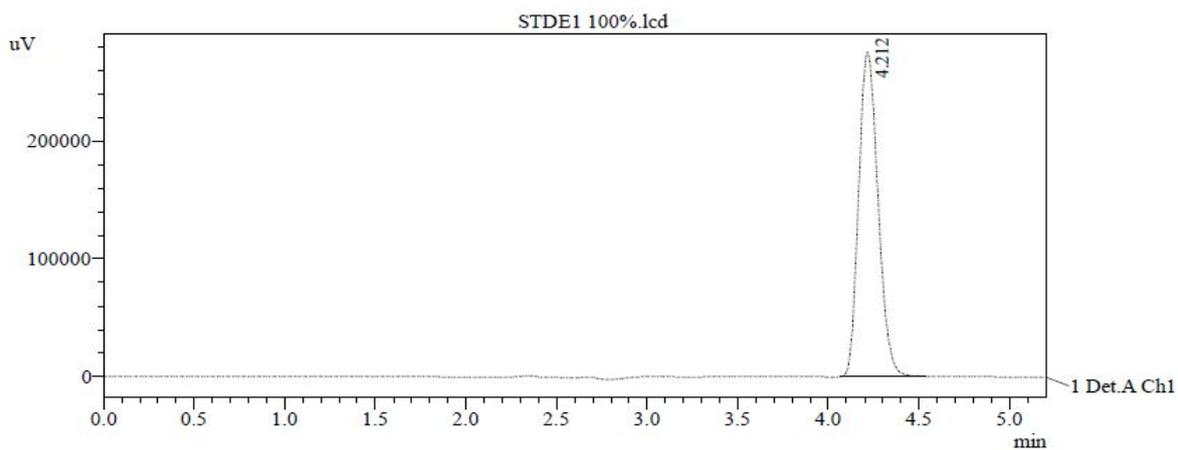
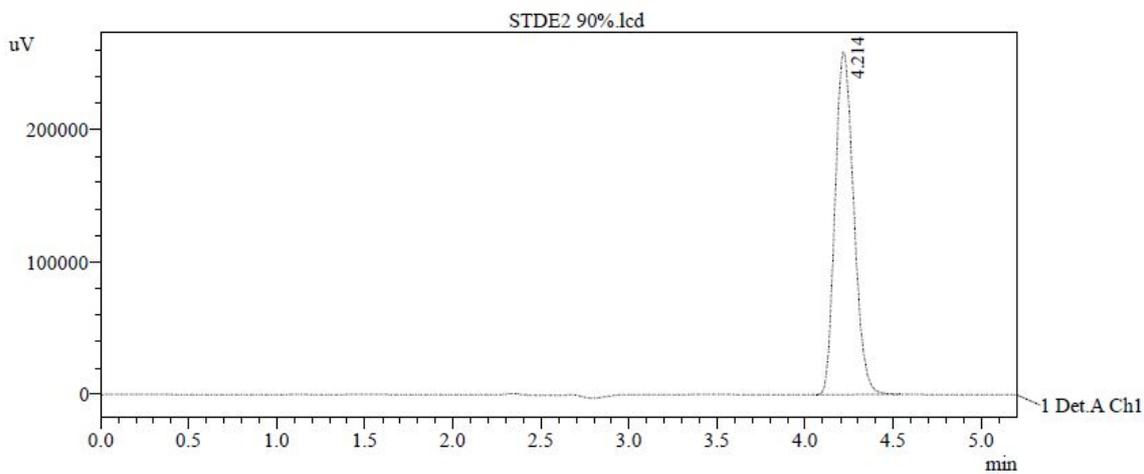
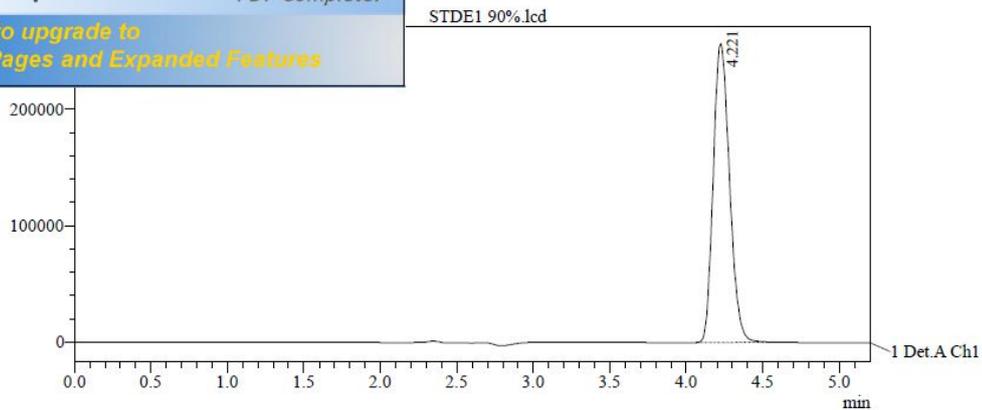
 **PDF Complete**  
Your complimentary use period has ended.  
Thank you for using PDF Complete.  
[Click Here to upgrade to Unlimited Pages and Expanded Features](#)



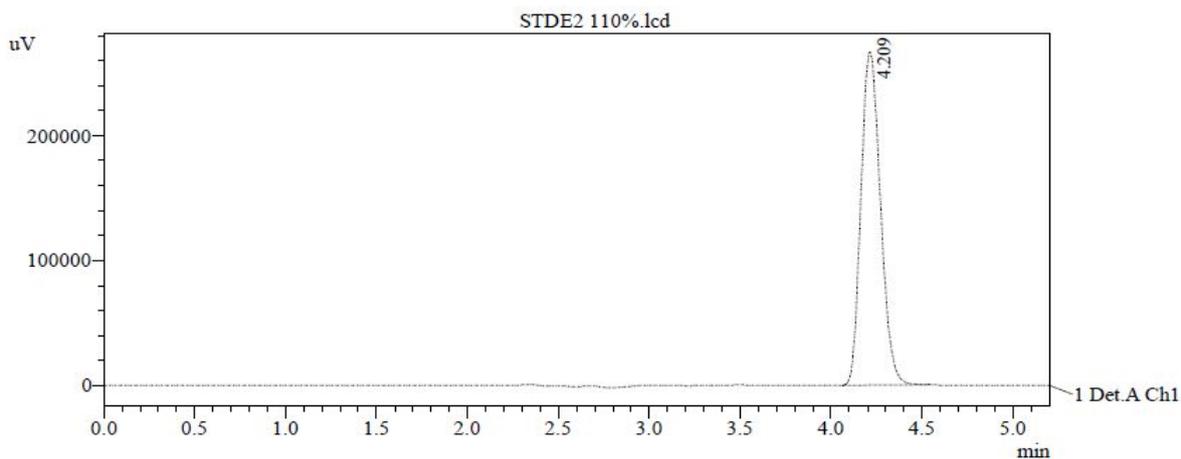
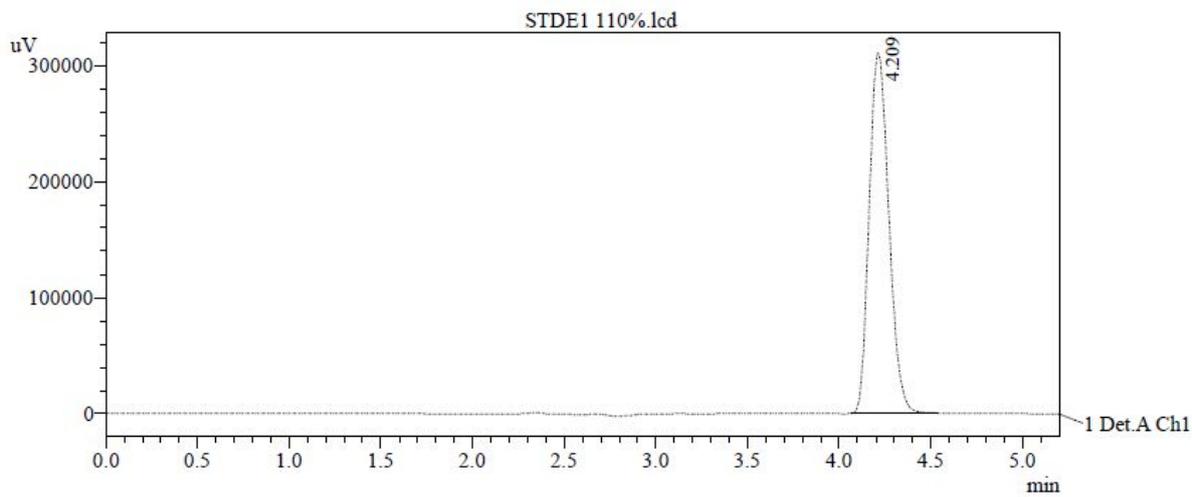
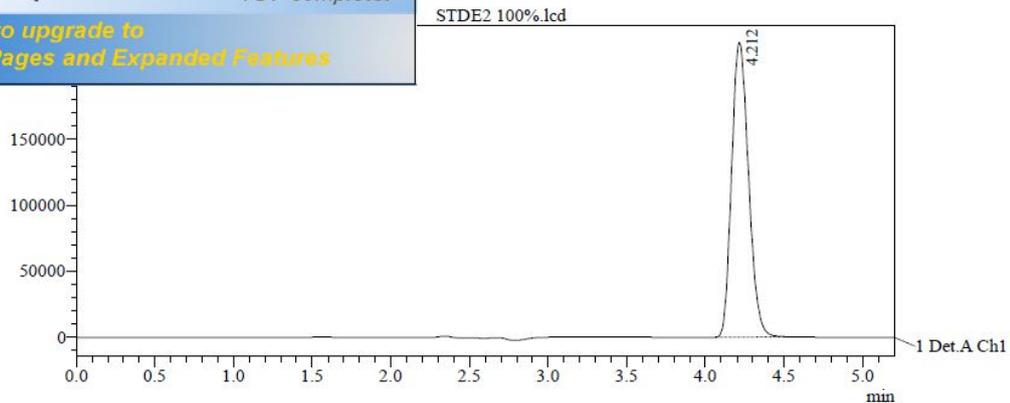
**SERIE 3**



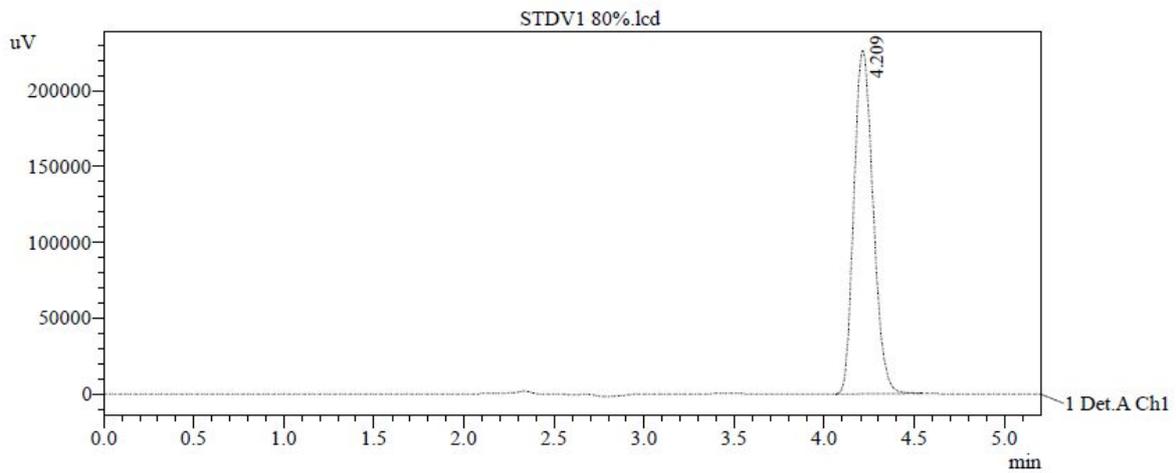
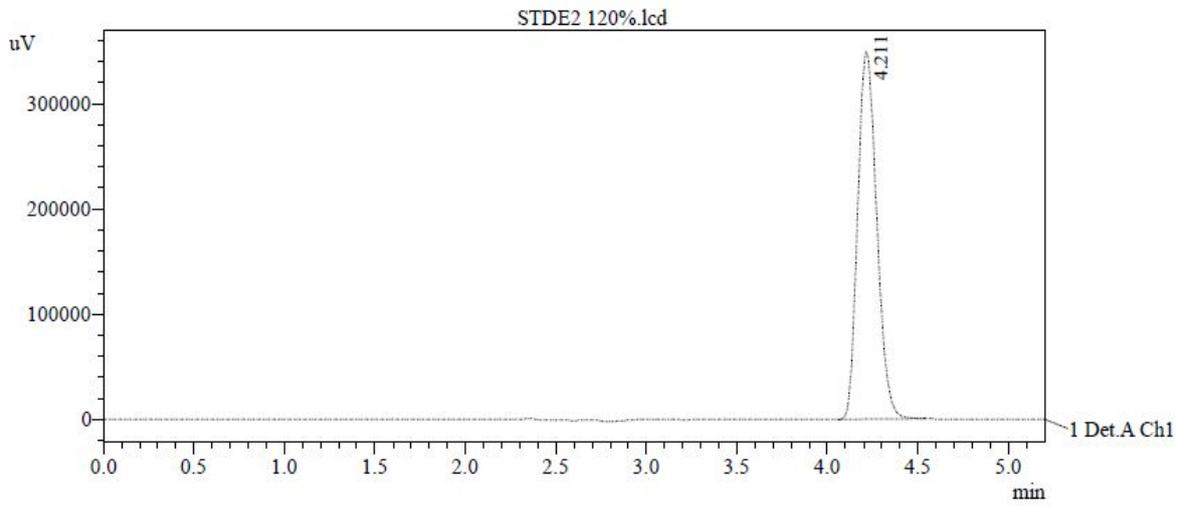
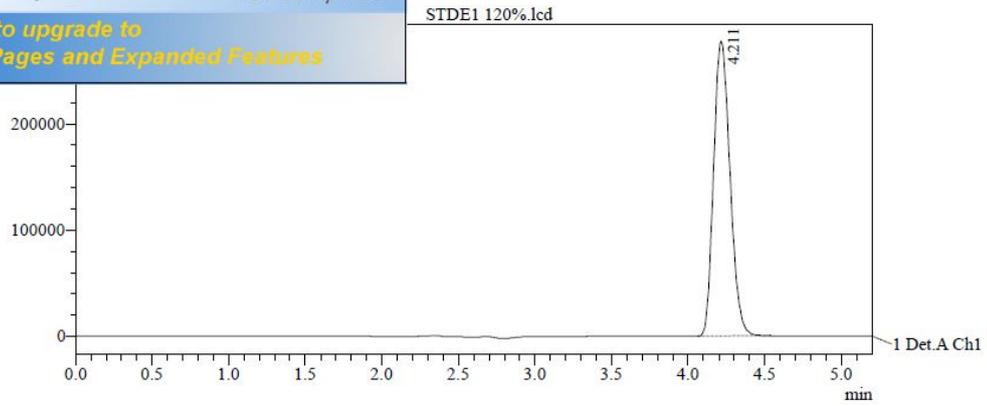
 *Your complimentary use period has ended. Thank you for using PDF Complete.*  
[Click Here to upgrade to Unlimited Pages and Expanded Features](#)



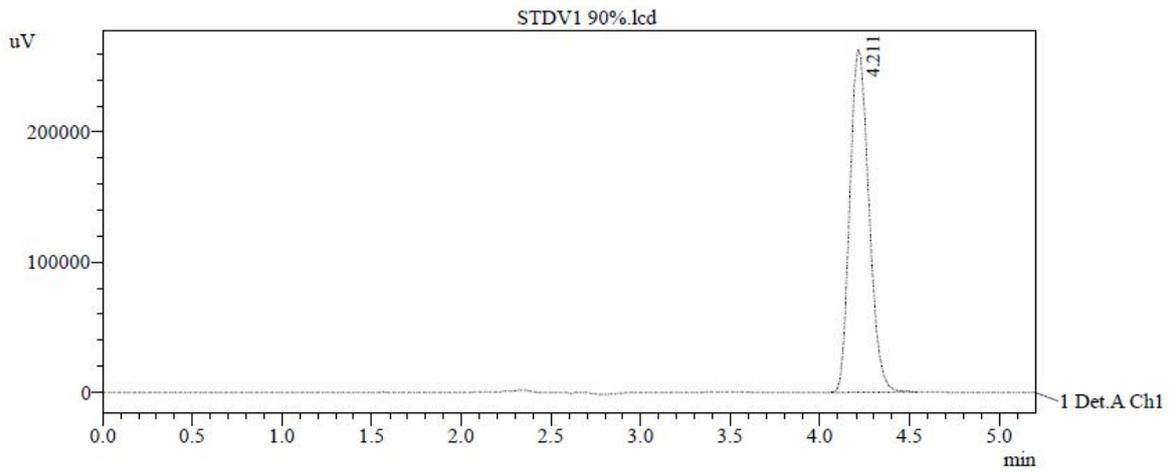
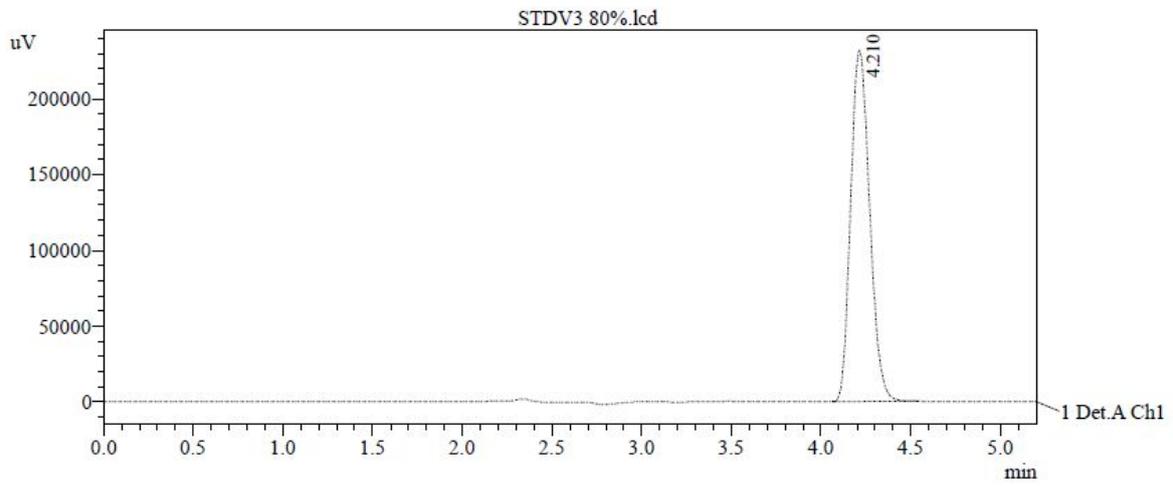
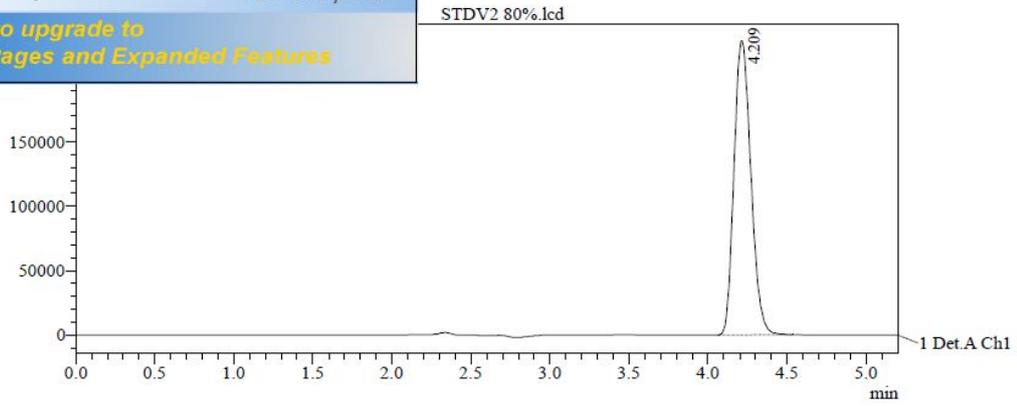
 **PDF Complete**  
Your complimentary use period has ended.  
Thank you for using PDF Complete.  
[Click Here to upgrade to Unlimited Pages and Expanded Features](#)



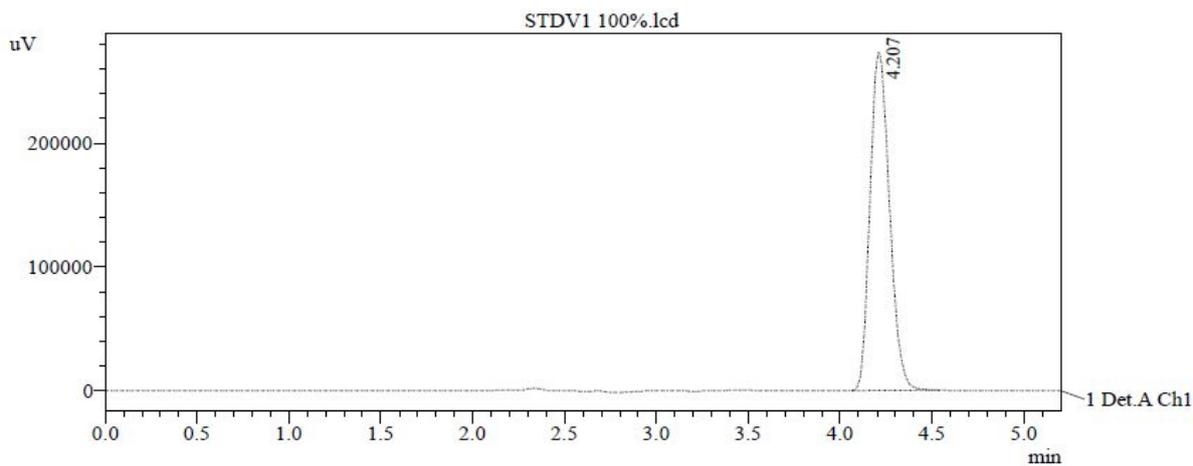
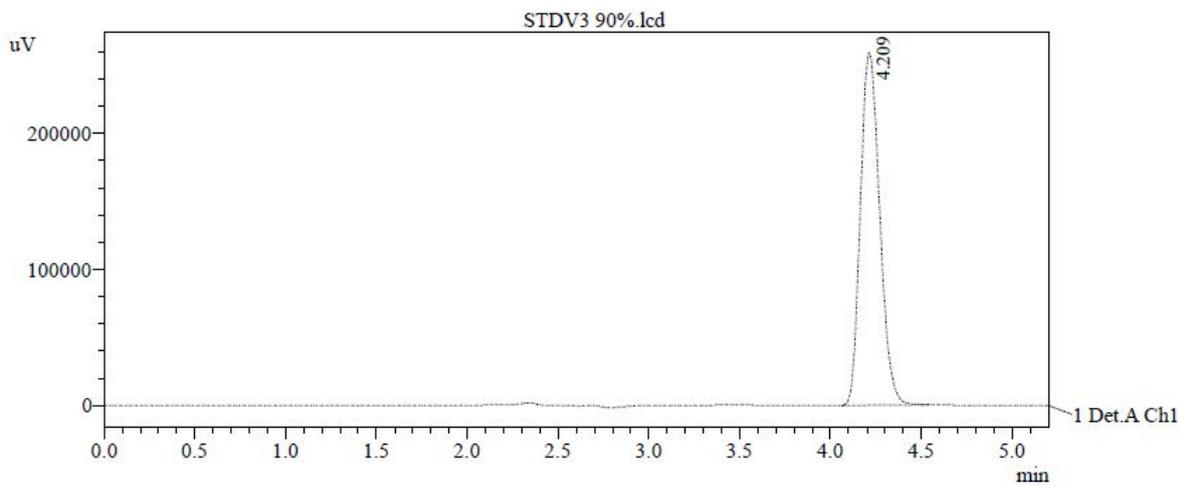
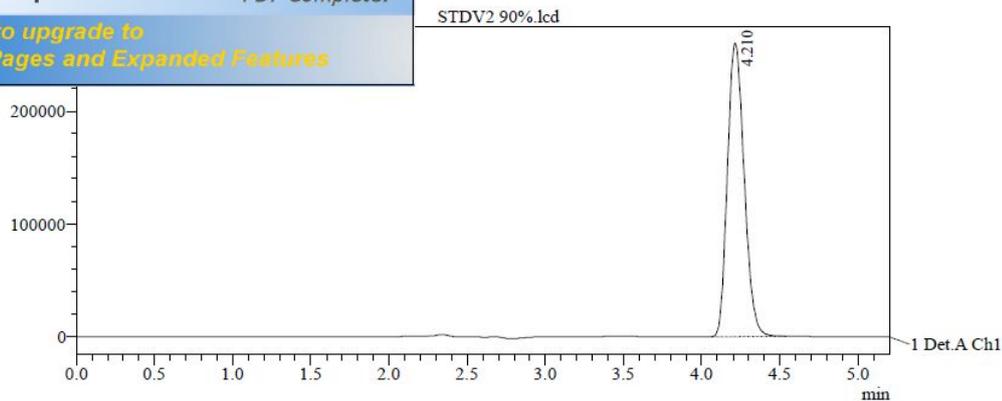
 **PDF Complete**  
Your complimentary use period has ended.  
Thank you for using PDF Complete.  
[Click Here to upgrade to Unlimited Pages and Expanded Features](#)



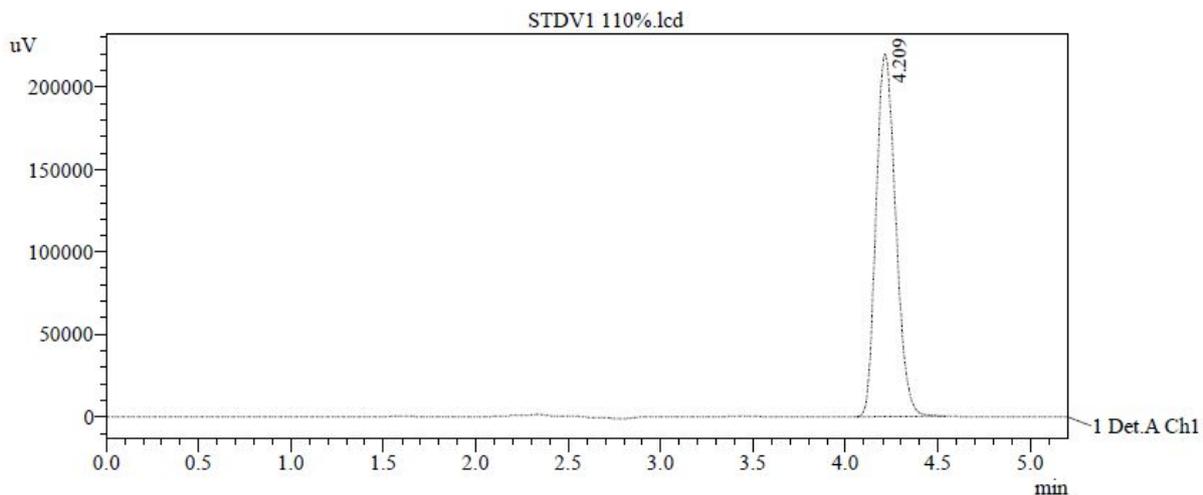
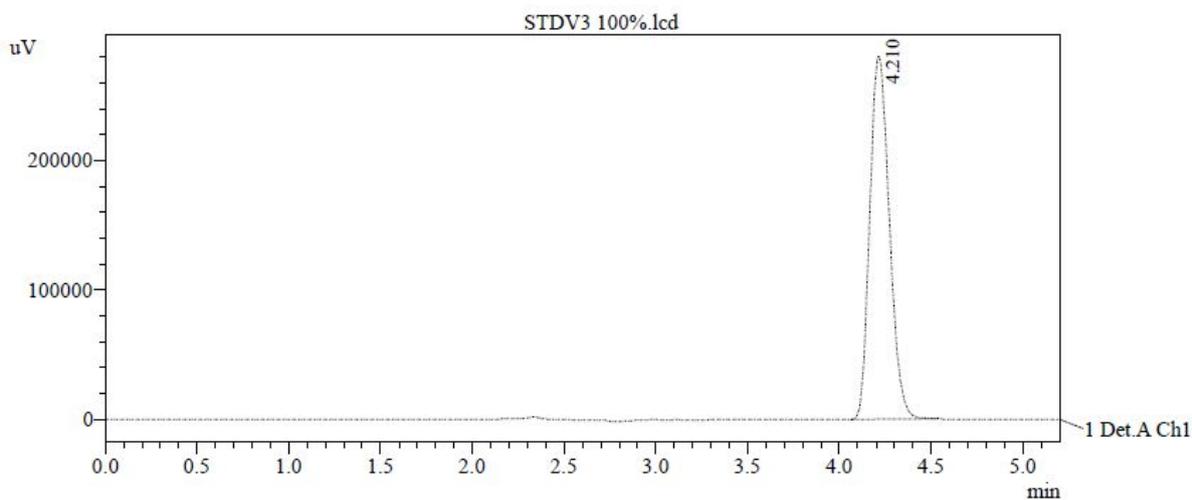
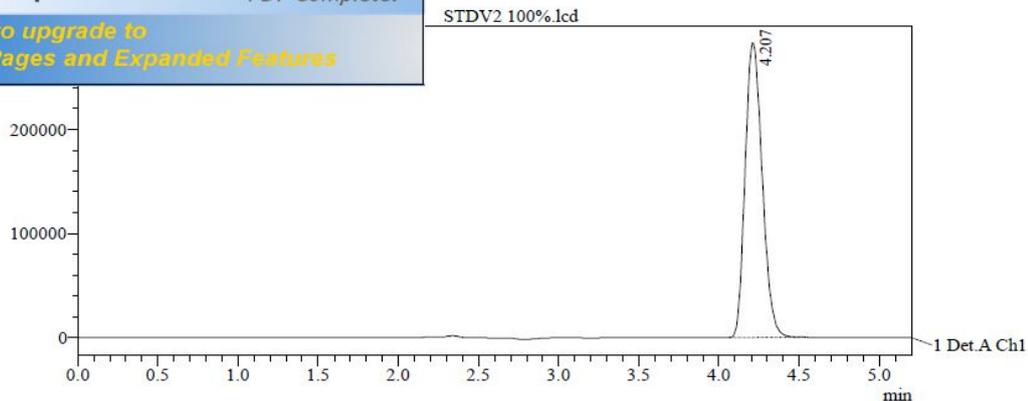
 **PDF Complete**  
Your complimentary use period has ended.  
Thank you for using PDF Complete.  
[Click Here to upgrade to Unlimited Pages and Expanded Features](#)



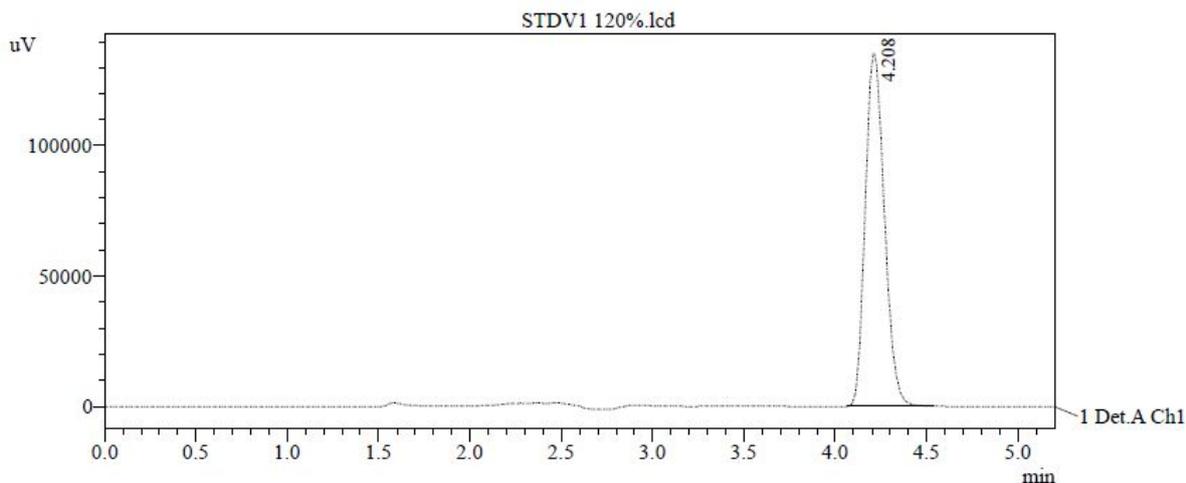
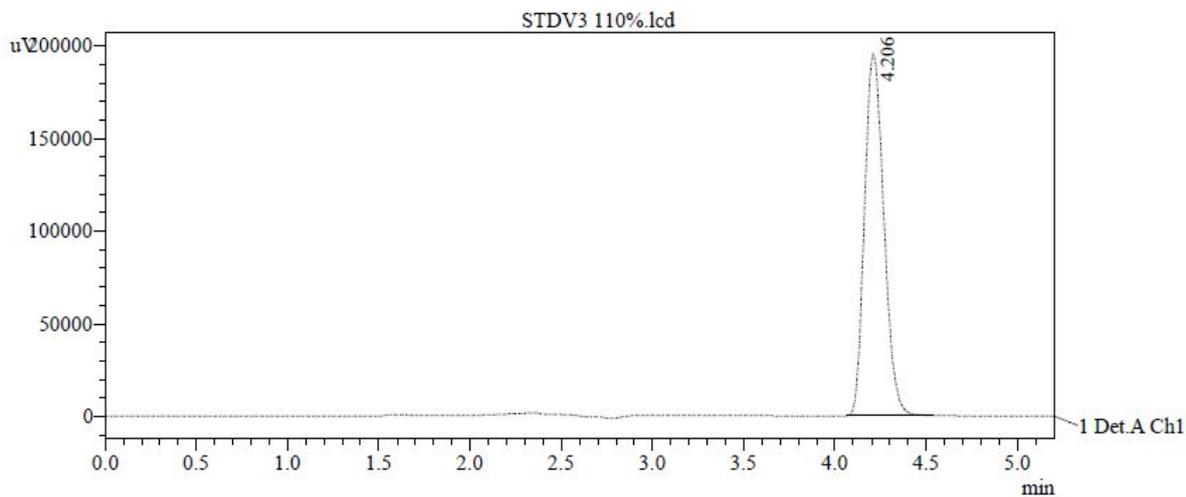
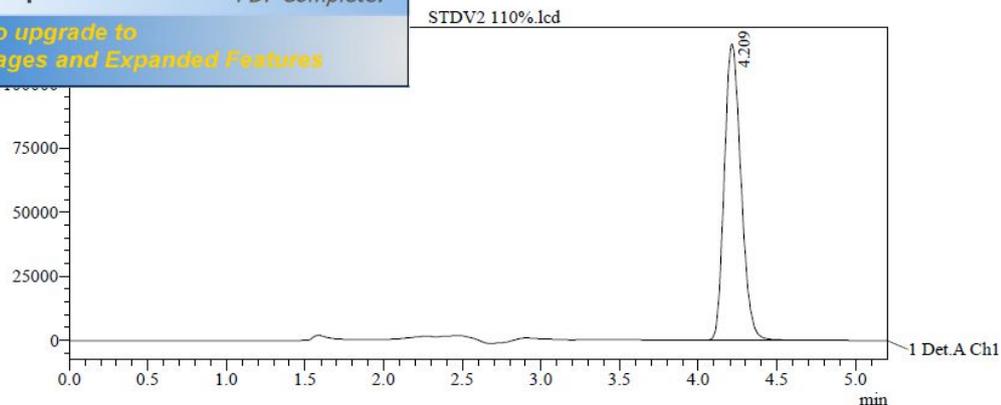
 **PDF Complete**  
Your complimentary use period has ended.  
Thank you for using PDF Complete.  
[Click Here to upgrade to Unlimited Pages and Expanded Features](#)



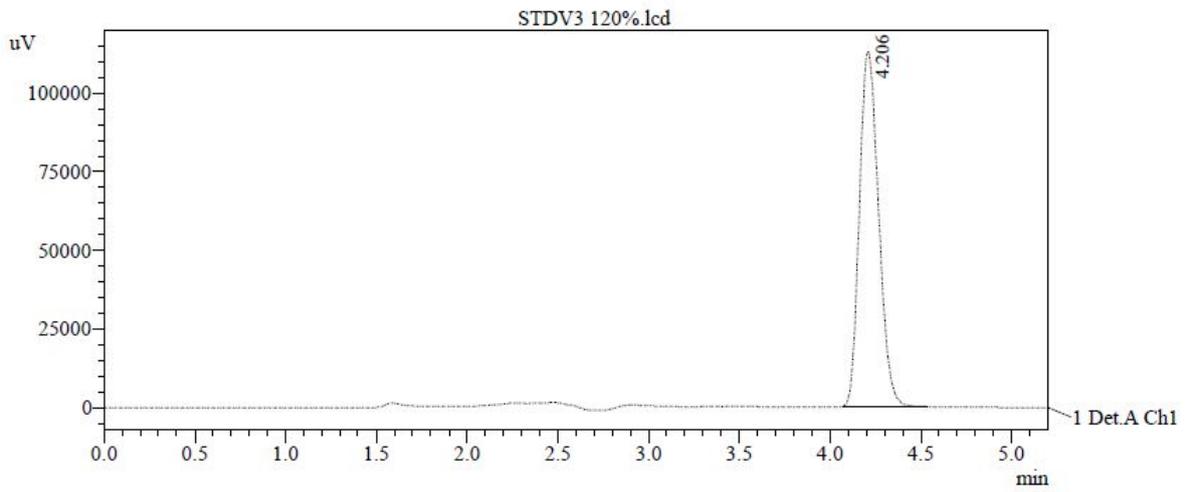
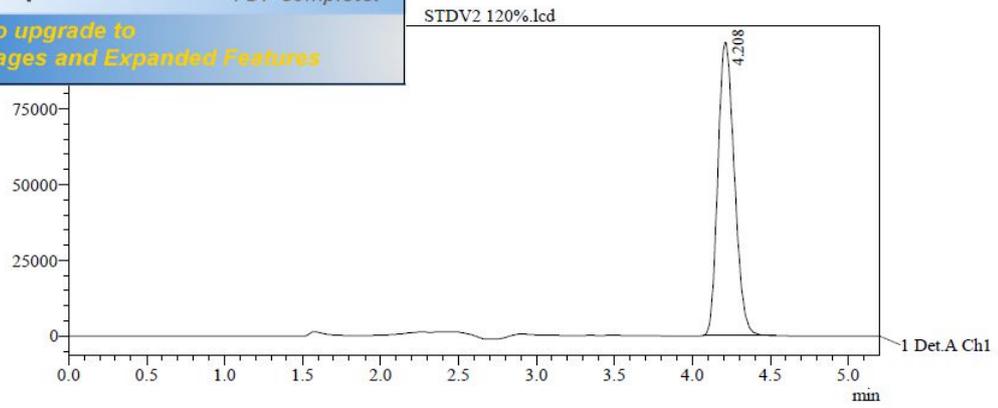
 **PDF Complete**  
Your complimentary use period has ended.  
Thank you for using PDF Complete.  
[Click Here to upgrade to Unlimited Pages and Expanded Features](#)



 **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](#)



## RESUME

Le concept de l'assurance qualité est une nécessité inexorable dans le domaine de l'industrie pharmaceutique, sur ce toute méthode analytique utilisée dans le parcours de la conception du médicament doit être validée selon un protocole bien défini.

Le but du présent travail est de mettre au point et de valider une méthode de dosage du piroxicam dans des comprimés de 20 mg par chromatographie liquide à haute performance en utilisant le profil d'exactitude comme outil de décision de validation.

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

Les résultats obtenus prouvent que toutes les exigences spécifiques élaborées dans cette approche harmonisée sont remplies, ce qui atteste la validité de la méthode proposée dans le présent travail, prouvant ainsi mathématiquement la fiabilité et l'exactitude des résultats. Cela démontre la validité de la méthode dans l'intervalle de concentration étudié [0,4 ; 0,6] mg/ml, avec une proportion  $\beta=95\%$  de mesures dans les limites d'acceptations ( $\pm 5\%$ ) et son aptitude à être appliquée en routine pour le dosage du piroxicam dans les comprimés dosés de 20 mg.

Mots clés: Piroxicam, validation analytique, HPLC, SFSTP, profil d'exactitude.

## ABSTRACT

The concept of insuring quality is an undeniable requirement in the field of pharmaceutical industry. Thus, every analytical method used along the path underlying the conception of a medicine must be validated according to a well defined protocol.

The purpose of this work is to develop and validate a method for the determination of piroxicam in tablets of 20 mg by high performance liquid chromatography using accuracy profile as decision tool.

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

The results attained show that all the specific requirements elaborated within this balanced approach have been met, and this confirms the validity of the method suggested in the current work, proving therefore mathematically the reliability and accuracy of the results. This confirms the validity of the develop method in the concentration range studied [0,4 ; 0,6] mg/ml with a proportion  $\beta=95\%$  of measurements within the acceptance limits ( $\pm 5\%$ ) and its suitability for its routine application in the determination of piroxicam in the tablets of 20 mg.

Key words: Piroxicam, analytical validation, HPLC, SFSTP, accuracy profile.