

N° d'ordre :

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

UNIVERSITE MOULOUD MAMMERI DE TIZI-OUZOU

FACULTE DES SCIENCES

DEPARTEMENT DE CHIMIE



DOMAINE : SCIENCES DE LA MATIERE
FILIERE : CHIMIE

MEMOIRE DE MASTER

SPECIALITE : CHIMIE PHARMACEUTIQUE

THEME

**Validation d'une méthode de dosage du paracétamol par HPLC
dans les comprimés de 500mg.
Application du protocole SFSTP 2006**

Présenté par : Melle **RAHMI**
Melle **SIZINE**

SOUHILA
HACINA

Soutenu publiquement, le 12 / 10 /2017, *devant le Jury composé de :*

Mme MAKHLOUFI	MALIKA	MCA	UMMTO	PRESIDENTE
Dr MAMOU	MARZOUK	MACH	UMMTO	ENCADREUR
Dr BOURSOUTI	MOURAD	RESIDENT	UMMTO	Co-ENCADREUR
Mme BELMAHDI	LILA	MAA	UMMTO	EXAMINATRICE
Mr AIDEN	MOHEND	MCA	UMMTO	EXAMINATEUR

REMERCIEMENTS

*Au terme de ce modeste travail, nous tenons à remercier en premier lieu **BON DIEU** qui nous a donné la patience et la force d'achever cette étude.*

Ce travail n'aurait pu prendre naissance sans l'assistance et l'intervention généreuse de certaines personnes dont les apports ne pourraient être qu'infiniment reconnus. Ainsi, j'aisaisi l'occasion pour présenter mes profonds respects et dévouements.

Nous désirons adresser nos remerciements les plus chaleureux à notre encadreur

Dr MAMOU MARZOUK

Quoiqu'on dise, les mots ne seront jamais à la portée de ce qu'on ressent. Nous tenons à vous remercier chaleureusement d'avoir bien voulu encadrer et suivre avec bienveillance la réalisation de ce travail, toutes nos reconnaissances pour vos précieux conseils, aides et surtout pour tout le temps que vous avez pu consacré à ce mémoire, malgré vos responsabilités.

Nos profonds remerciements s'étendent également à notre Co-promoteur

Dr M. BOURSOUTI

Pour son aide, ses efforts et le temps qu'il nous a consacré,

Nos sincères remerciements vont aussi à

Mr A. TIGHRINE et Dr K. AKLI

Pour leurs aides, conseils et leurs encouragements afin de mener à bien ce travail,

Nos vifs remerciements vont également aux membres du jury

M^{me} MAKHLOUFI, Mme BELMAHDI, Mr AIDEN

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

A nos parents, Qui nous ont aidés par leur extrême affection, leur soutien inconditionnel et leurs conseils avisés à avancer dans nos études et dans notre vie,

Nos profonds remerciements vont également à tout le personnel du laboratoire de chimie analytique du département pharmacie de la faculté de médecine de l'université MOULOUD MAMMARI de TIZI-OUZOU pour leur gentillesse et leur soutien,

*Et enfin, nous tiens à remercier toute la promo **master II chimie pharmaceutique 2016***

2017. Merci à tous et à toutes.

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

*A mes parents, aucune expression ne pourrait traduire tout l'amour que je porte à votre
égard. sans qui je ne serai pas où j'en suis aujourd'hui,*

*A ma précieuse sœur Ikram, les mots ne peuvent résumer ma reconnaissance et
mon amour à ton égard,*

*A mes deux chers frères Hocine et Abed Rezak, que j'aime tant, pour leur appui et
leur encouragement,*

Que Dieu vous prête tous, une longue vie, de bonheur, de santé et de prospérité

*C'est avec une grande tristesse et les larmes aux yeux que je dédie ce travail à mon
grand-père, que dieu bénisse son âme et l'accueille
dans son vaste paradis,*

A ma binôme Souhila et sa famille,

*A tous mes amis avec lesquels j'ai partagé mes moments de joie et de bonheur Que toute
personne m'ayant aidé de près ou de loin, trouve ici l'expression de ma reconnaissance.*

HACINA

C'est avec profonde gratitude et sincères mots, que je dédie ce modeste travail à

A ma mère

Ce travail représente le si peu avec lequel je pourrai vous remercier pour tous vos sacrifices et prières durant ce long cheminement.

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

Mon diplôme vous appartient.

Que Dieu vous garde et vous accorde longue vie et bonne santé,

A mon père

En témoignage de tant d'années de sacrifices, d'encouragement et de prières.

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

Veillez trouvez dans ce travail, le fruit de vos peines et vos efforts, ainsi que le témoignage de ma grande reconnaissance.

Puisse Dieu vous gardez et vous accordez longue vie et bonne santé,

A mon frère

MASSINISSA

Qui ont toujours été près de moi, et toujours offert beaucoup de tendresse et d'affection et toujours épaulée pendant mon parcours.

A mes sœurs

LILA, KAHINA

Merci, adorable sœurs, d'avoir montré tant de complaisance et de serviabilité à mon égard.

Puisse Allah, le Très-Haut, vous accorder une vie heureuse et un avenir prospère,

C'est avec une grande tristesse et les larmes aux yeux que je dédie ce travail à ma grand-mère que dieu bénisse son âme et l'accueille dans son vaste paradis,

A ma binôme HACINA et sa famille.

SOUHILA

Liste des figures

Figure 1 : Formule chimique du paracétamol	5
Figure 2 : Cycle de vie d'une méthode d'analyse.....	12
Figure 3: Logigramme permettant de sélectionner un protocole de validation. SE : standard d'étalonnage SV : standard de validation.....	17
Figure 4 : Droites d'étalonnage sur standard et forme reconstitué du paracétamol.....	35
Figure 5 : Courbes d'étalonnage obtenues avec la fonction $y=ax$	36
Figure 6 : Courbes d'étalonnage obtenues avec la fonction $y=ax+b$	37
Figure 7: Courbes d'étalonnage obtenues avec la fonction $\ln y=f(\ln x)$	38
Figure 8: Courbes d'étalonnage obtenues avec la fonction $\sqrt{y}=f(\sqrt{x})$	39
Figure 9 : Profil d'exactitude	46
Figure 10 : Droite de régression linéaire entre les quantités prédites et les quantités introduites.....	46
Figure 11: schéma des principaux modules d'une chaine HPLC	

Liste des tableaux

Tableau 1 : Propriétés physicochimiques du Paracétamol.....	6
Tableau 2 : Tableau récapitulatif des critères de validation	15
Tableau 3 : Choix du nombre de standards d'étalonnage et de validation en fonction du protocole choisi	18
Tableau 4 : Exemple de fonction de réponses.....	20
Tableau 5 : Règles d'alignement pour différentes fonctions de réponses	21
Tableau 6 : Calcul des prédictions inverses pour différentes fonctions de réponses.....	22
Tableau 7 : Calcul des prédictions inverses pour la droite ayant subi une transformation logarithmique ou racine carrée	22
Tableau 8 : Matières premières utilisées dans le présent travail.....	30
Tableau 9 : Matériels du laboratoire de chimie analytique utilisés dans le présent travail.....	30
Tableau 10 : Montage expérimental des SE	32
Tableau 11 : Montage expérimental des SV	32
Tableau 12 : Condition chromatographique de la méthode de dosage	33
Tableau 13 : Résultats du test de comparaison des deux pentes des deux droites de régression (gamme standard et gamme placebo chargé)	34
Tableau 13. 1 : Comparaison des deux pentes.....	35
Tableau 13. 2 : Comparaison des ordonnées à l'origine	35
Tableau 14 : Résultats obtenus pour la fonction $y = ax$	36
Tableau 15 : Résultats obtenue pour la fonction $y = ax + b$	37
Tableau 16 : Résultats obtenus pour fonction $\ln y = f(\ln x)$	38
Tableau 17 : Résultatsobtenus pour la fonction $\sqrt{y} = f(\sqrt{x})$	39
Tableau 18 : Critères de choix de la fonction de réponse	40
Tableau 19 : Alignement des réponses observées avec les trois séries des SV	41
Tableau 20 : Prédications inverses obtenues avec les SV	42
Tableau 21 : Justesse calculée pour chaque niveau de concentration des standards de validation.....	42
Tableau 22 : Fidélité calculée pour chaque niveau de concentration des standards de validation.....	43
Tableau 23 : Résultats de calcul de l'exactitude relative	44
Tableau 24 : Calcul de l'erreur totale pour chaque niveau de concentration des standards de validation.....	45

Tableau 25 : Calcul des limites de tolérance pour chaque niveau de concentration j.....	45
Tableau 26 : Comparaison des deux pentes	47

TABLE DES MATIERES

Introduction générale.....	1
Objectifs	3

Partie théorique

Chapitre I : Paracétamol

1. Historique	4
2. Structure et Propriétés	4
2. 1 Structure	4
2. 2. Mécanisme de synthèse du paracétamol	5
2. 3. Propriétés Physicochimique	6
2. 4. Propriétés Pharmacologique.....	6
2. 4. 1. Pharmacocinétique	6
2. 4. 1. 1. Absorption	6
2. 4. 1. 2. Distribution.....	6
2. 4. 1. 3. Métabolisme	7
2. 4. 1. 4. Elimination	7
2. 4. 2. Pharmacodynamique	7
3. Mécanisme d' action	8
4. Posologie	8
5. Contre-indications, interactions médicamenteuses et précautions d'emploi	8
6. Toxicité.....	9
Conclusion.....	9

Chapitre II : Validation Analytique

1. Place de la validation dans la qualité	10
1. 1. Définition de la qualité	10
1. 2. Définition de l'assurance qualité.....	10
2. Définition et objectif de la validation.....	10
2. 1. Définition	10
2. 2. Objectif.....	11
3. Contexte réglementaire et normatif	11
4. Cycle de vie d'une méthode	12
5. Critères de la validation analytique	13
5. 1. Spécificité/ sélectivité	13
5. 2. Fonction de réponse	13
5. 3. Linéarité	13

5. 4. Fidélité.....	14
5. 5. Justesse	14
5. 6. Exactitude.....	14
5. 7. Limite de détection.....	15
5. 8. Limite de quantification	15
5. 9. Intervalle de dosage.....	15
5.10. Sensibilité.....	15
6. Les 10 étapes pour valider une méthode avec le profil d'exactitude	16
7. Protocoles en phase de validation	16
8. Etudes statistiques de la validation analytique.....	18
8. 1. Spécificité.....	18
8. 2. Fonction de réponse	19
8. 3. Alignement des observations	20
8. 4. Prédications inverses.....	21
8. 5. Calcule de la justesse et de la fidélité.....	23
8. 5. 1. Modèle.....	23
8. 5. 2. Justesse	24
8. 5. 3. Fidélité.....	25
8. 6. Calcul de l'exactitude.....	25
8.6.1. Erreur totale et profil de l'erreur totale	25
8. 7. Calcul de l'intervalle de tolérance.....	26
8. 8. Profil d'exactitude et décision.....	27
8. 8. 1. Calcul	27
8. 8. 2. Choix de la fonction de réponse.....	28
8. 9. Linéarité	28
8. 10. Limites de quantification.....	28

Partie pratique

1. Matériels.....	30
1. 1. Matières premières et réactifs.....	30
1. 2. Appareillages et équipements.....	30
2. Méthodes	31
2. 1. Méthodologie de la validation analytique	31
2. 2. Choix du Protocol de validation.....	31
3. Préparation des solutions.....	31

4. Résultats	34
4. 1. Spécificité.....	34
4.1 .1. Confirmation de la spécificité sur les deux gammes d'étalonnage et de validation.....	34
4. 1. 2. Vérification de l'absence d'effet matrice	35
4. 1. 3. Vérification de l'absence d'erreur systématique.....	35
4. 2. Fonction de réponse	35
4. 2 .1 Critères de choix de la fonction de réponse	40
4. 3. Alignement des observations	41
4. 4. Prédications inverses.....	42
4. 5. Justesse	42
4. 6. Fidélité.....	43
4. 7. Exactitude.....	44
4. 8. Erreur totale et profil d'erreur totale	45
4. 9. Intervalle de tolérance	45
4. 10. Profil d'exactitude	45
4. 11. Linéarité	46
4. 12. Intervalles de dosage acceptés.....	46
5. Discussion	47
5.1. Spécificité.....	47
5. 2. Choix de la fonction de réponse	47
5. 3. Profil d'exactitude	47
5. 4. Intervalle de dosage.....	47
5.5. Linéarité	48
Conclusion.....	48
Conclusion générale	49

Références bibliographiques

Annexes

Résumé

INTRODUCTION GENERALE

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.

Avec la mise en place des systèmes d'assurance qualité dans les laboratoires, la validation des méthodes d'analyse est aujourd'hui un objectif important et omniprésent.

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

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

Pour cela, toute nouvelle méthode d'analyse mise au point au sein d'un laboratoire doit faire l'objet d'une validation analytique, avant sa mise en routine, cette dernière repose sur un ensemble de mesures expérimentales, et de tests statistiques qui permettent de prouver qu'une procédure est suffisamment exacte et fiable.

Actuellement, de nouvelles tendances et de nouveaux concepts scientifiques apparaissent et proposent de revoir les bases mêmes de la validation analytique pour une démarche harmonisée, avec notamment l'apparition de l'utilisation du profil d'exactitude comme outil de décision.

L'objectif de cette démarche est d'aider les spécialistes en industrie pharmaceutique, à réduire le temps et le coût de l'analyse.

Généralement les méthodes d'analyses ont pour objectif d'effectuer le contrôle qualité du principe actif ainsi que son dosage pour les formes pharmaceutiques. La mise au point a consisté en la détermination des paramètres de validation analytique telle décrite dans la nouvelle approche proposée par SFSTP afin de pouvoir juger la validité de la méthode.

Après l'introduction générale, ce manuscrit s'articule autour de deux grandes parties suivies d'une conclusion générale.

La première partie correspond à la synthèse bibliographique, elle est subdivisée en trois chapitres :

Chapitre I : Paracétamol

Chapitre II : Comprimés

Chapitre III : Validation analytique

La seconde partie est consacrée à la partie pratique de notre travail qui comprend la validation d'une méthode de dosage du paracétamol dans des comprimés de 500 mg par HPLC.

Nous présenterons et nous discuterons les résultats obtenus et conclurons à la fin la validité de la méthode analytique objet de l'étude.

Le présent travail a été réalisé au niveau du Laboratoire de Chimie Analytique du Département de Pharmacie de la Faculté de Médecine, Université Mouloud MAMMARI de Tizi-Ouzou.

Objectif

L'objectif de notre travail est de valider une technique analytique de dosage du paracétamol dans les comprimés de 500 mg par Chromatographie Liquide à Haute Performance (HPLC) en vue d'être appliquée en routine, en utilisant le profil d'exactitude comme outil de décision, le décrit dans le guide de validation élaboré par une commission de la Société Française des Sciences Techniques et Pharmaceutiques (SFSTP) publié dans la revue STP Pharma Pratique en janvier 2006.

Chapitre I : Paracétamol

De nos jours, le paracétamol aussi appelé acétaminophène est devenu un des analgésiques et des antipyrétiques non salicylés les plus utilisés chez l'homme, c'est un médicament d'usage très répandu, qui entre dans la composition de très nombreuses spécialités pharmaceutiques telles que le Doliprane et l'Effergal. Son efficacité, sa bonne tolérance, son profil pharmacocinétique, son coût et son acceptabilité en font le médicament de première intention dans le traitement de la douleur d'intensité légère à modérée.

1. Historique

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

En 1893, un médecin allemand, J. Von Mering, découvre les propriétés antipyrétiques et analgésiques de l'acétylaminophénol, et le reconnaît déjà comme médicament. [1] [2]

En 1898, un pharmacien de francfort, E. Ritsert intervient dans cette découverte en éliminant de nombreuses impuretés générées par le processus de fabrication de l'acétanilide, le rendant ainsi moins toxique. [3]

Toutefois, ce n'est que vers 1950 que le paracétamol connaît un essor lorsqu'il est identifié comme le principal métabolite actif de la phénacétine et de l'acétanilide qui furent, elles abandonnées pour leur action méthémoglobinisante.

Le paracétamol connaît alors un franc succès dans les pays anglo-saxons (première AMM en 1955 aux Etats-Unis) ; en France (AMM en 1957), se développent aussi de nombreuses spécialités en vente libre en pharmacie. [2]

En 1956, les comprimés de 500mg de paracétamol ont été commercialisés par la compagnie GlaxoSmithKline sous la marque Panadol®.

Deux années plus tard, des formes pédiatriques du paracétamol ont été commercialisées : TynelolElixir® et Panadol Elixir®. [3]

2. Structure et propriétés

2. 1. Structure

Le paracétamol est un dérivé phénolique, c'est le **para-acétyl-amino-phénol**. Sa structure comporte donc un cycle benzénique substitué par un groupement hydroxyle et un groupement acétamide en position *para* (Figure 1).

Le paracétamol ne comporte pas de carbone asymétrique et n'a pas de stéréo-isomères [4]

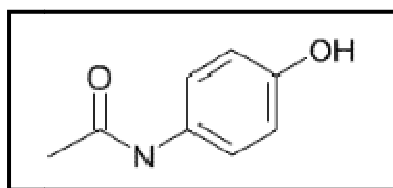


Figure 1 : Formule chimique du paracétamol.

2. 2. Mécanisme de synthèse du paracétamol

Le para-aminophénol appartient à la famille des phénols ainsi qu'à celle des amines aromatiques. Le paracétamol appartient à la famille des amides ainsi qu'à celle des phénols.

L'atome d'azote et l'atome d'oxygène sont électronégatifs et de plus possèdent des doublets électroniques non liants. Ce sont des sites riches en électrons. Le mécanisme simplifié de la réaction de synthèse du paracétamol peut être modélisé selon le schéma 1 :

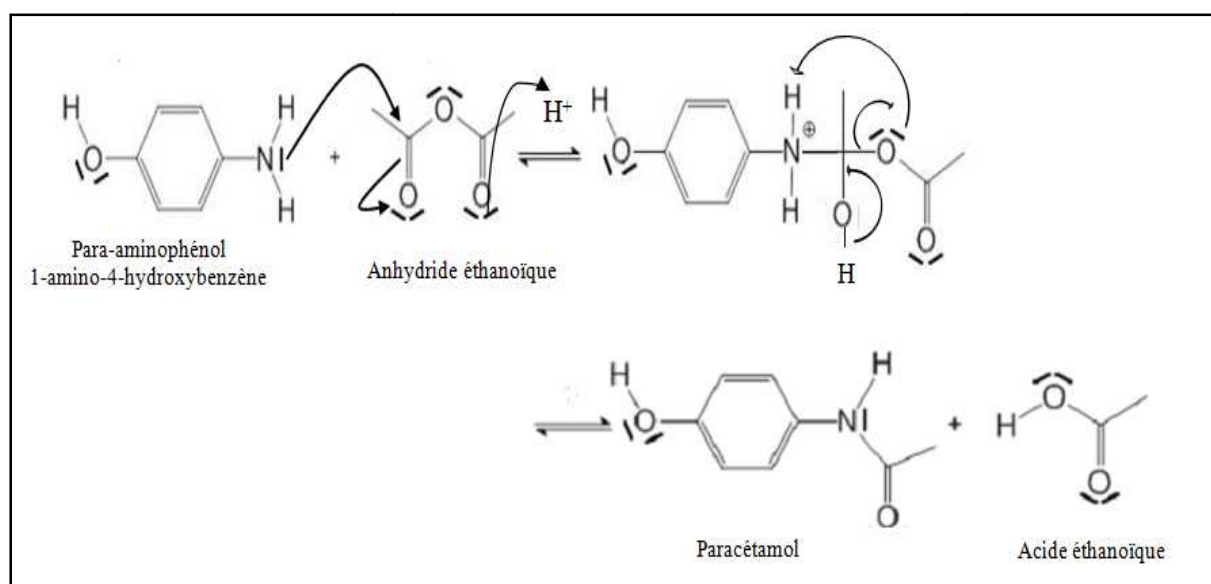


Schéma 1 : Mécanisme de synthèse du paracétamol

2. 3. Propriétés physicochimiques

Tableau 1 : Propriétés physicochimiques du Paracétamol. [2] [5]

Formule brute	C ₈ H ₉ NO ₂
Dénomination Commune Internationale(DCI)	Paracétamol (contraction de para-acétyl-amino-phénol)
Nom chimique	<i>N</i> -(4-Hydroxyphényl) acétamide
Nom IUPAC	4-acétylaminophénol
Classes chimiques	Acétanilide anilide
Masse molaire	151,2 g/mol
Point de fusion	168-172°C
Densité	1.263 g/cm ³
Solubilité	Soluble dans l'eau (14g/L à 20°C) Facilement soluble dans l'alcool Peu soluble dans le chlorure de méthylène
Aspects	Poudre cristalline blanche, inodore, de saveur amère.

2. 4. Propriétés Pharmacologiques

2. 4. 1 Pharmacocinétiques

2. 4. 1. 1. Absorption

Le paracétamol est rapidement et presque totalement résorbé au niveau de l'intestin grêle. Le pic plasmatique est obtenu en 15 minutes à 2 heures selon les formulations. Il existe un effet de premier passage hépatique peu marqué et sa biodisponibilité absolue par voie orale est voisine de 80 %. Un retard de vidange gastrique peut retarder sa résorption.

La forme soluble (solution, comprimés effervescents) est absorbée plus rapidement que la forme solide. [2]

2. 4. 1. 2. Distribution

La concentration plasmatique est maximale 1h à 1h30 après la prise orale de comprimés contre moins de 30 min pour la forme effervescente. Le temps de demi-vie plasmatique est rapide de 2h à 2h30 aux doses thérapeutiques. La demi-vie augmente lors d'intoxication au paracétamol avec une concentration maximale atteinte 4h après l'ingestion. [3]

2. 4. 1. 3. Métabolisme

Aux doses thérapeutiques habituelles, 90% du paracétamol subit une métabolisation hépatique au niveau du cytosol des hépatocytes. Cette conjugaison s'effectue sur le groupement OH phénolique et mobilise l'acide glucuronique ou l'acide sulfurique, le paracétamol est ainsi transformé en dérivés glucuro- ou sulfoconjugués non toxiques qui seront éliminés dans les urines. Les 10% restant sont métabolisés par les cytochromes P450 (CYP2E1 et CYP3A4) en un intermédiaire électrophile fortement réactif, le N-acétyl-p-benzo-quinone imine (NAPQI). Ce dernier est neutralisé par conjugaison avec le glutathion et rapidement inactivé en cystéine non toxique et en métabolite de l'acide mercapturique.[3]

2. 4. 1. 4. Elimination

L'élimination du paracétamol est essentiellement urinaire : 90 % de la dose ingérée est éliminée par le rein en 24 heures, principalement sous forme glycuconjuguée et sulfoconjuguée et moins de 5 % est éliminé sous forme de paracétamol inchangé. La demi-vie d'élimination est d'environ 2 heures.

La demi-vie d'élimination du paracétamol administré par voie rectale est près de 2fois supérieure à celle obtenue par une prise orale.

Les demi-vies d'élimination plasmatiques sont identiques pour les voies orale et intraveineuse.

En cas d'insuffisance rénale, la demi-vie des deux métabolites conjugués est augmentée tandis que la demi-vie plasmatique du paracétamol reste inchangée. [2]

2. 4. 2. Pharmacodynamiques

Il a deux actions principales :

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

3. Mécanisme d'action

Bien qu'il soit utilisé depuis longtemps, son mécanisme d'action est encore mal précisé. Plusieurs hypothèses ont été discutées.

Tout d'abord, le paracétamol a des propriétés antipyrétiques et antalgiques. Ceci a suggéré une cible commune, à savoir les cyclo-oxygénases (COX). L'activité de ces enzymes conduit à la production de prostaglandines, substances impliquées dans le mécanisme de la douleur et la régulation de la température corporelle. Le paracétamol n'ayant pas de propriétés anti-inflammatoires, cette hypothèse peut être remise en cause.

Un autre mécanisme d'action proposé serait lié à l'activation des voies sérotoninergiques descendantes. Cette action a été confirmée chez l'homme. Il s'agit donc d'une action centrale ayant pour effet d'inhiber les voies de la douleur.

Un troisième mécanisme proposé plus récemment repose sur la découverte d'un métabolite hépatique, le p-aminophénol. Il se conjugue à l'acide arachidonique sous l'effet de la FattyAcid Amide Hydrolase(FAAH) au niveau du site central. Il donne alors naissance à un composé (appelé AM404) qui serait impliqué dans les propriétés antalgiques du paracétamol, par inhibition des prostaglandines. [7]

4. Posologies

Le paracétamol existe sous plusieurs formes galéniques : comprimé sec ou effervescent, poudre en gélules ou sachets, sirop, suppositoire, injectable pour voie intraveineuse.

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

Chez l'enfant le paracétamol est l'antalgique non opioïde le plus sûr, il est utilisable à la posologie de 60mg/kg/jr à répartir en 4 prises orales ou rectales.[8]

5. Contre-indications, interactions médicamenteuses et précautions d'emploi

Les précautions d'emploi résident essentiellement dans les schémas posologiques. En cas d'insuffisance rénale, la demi-vie du paracétamol étant environ de 2h30, il faut espacer les prises de 6 heures et de 8 heures minimum en cas d'insuffisance rénale sévère, soit une clairance de la créatinine inférieure à 10mL/min.

En cas d'insuffisance hépatique légère à modérée, d'alcoolisme chronique, de malnutrition chronique ou de déshydratation ainsi que chez les patients de moins de 50kg, la dose à ne pas dépasser est de 3g/jour.

Au cours de la grossesse et de l'allaitement l'utilisation du paracétamol est possible et préconisée aux doses usuelles. [3]

6. Toxicité

Le paracétamol a été largement étudié et sa sécurité d'emploi aux doses habituelles recommandées est connue. Ainsi, après une utilisation large en clinique du paracétamol pendant de longues années, il semble qu'il soit dépourvu d'effets cancérigène, mutagène ou tératogène. Cependant, certains auteurs continuent à étudier ce principe actif afin de prouver son innocuité absolue.

- Un surdosage, à partir de 10 g de paracétamol en une seule prise chez l'adulte et 150 mg/kg de poids corporel en une seule prise chez l'enfant (selon la susceptibilité des patients), provoque une cytolysse hépatique.
- Certains ne parlent d'intoxication aiguë que pour des doses élevées supérieures à 200 milligrammes par kilogramme. [2]

Conclusion

Les connaissances des patients à propos du paracétamol apparaissent satisfaisantes. Les risques de mésusage avec le paracétamol intéressent une partie restreinte de la population. Malgré l'ancienneté de cette molécule il demeure encore certaines incertitudes concernant son mode d'action.

Chapitre II : Validation Analytique

Valider c'est avant tout maîtriser.

Depuis toujours les analystes « valident » leurs méthodes en effectuant des séries de mesures plus ou moins bien organisées pour essayer de démontrer qu'elles conviennent à leurs objectifs. Bien sûr, celles et ceux qui sont dans des laboratoires savent qu'une validation doit être conduite selon une procédure expérimentale plus stricte où on parle de justesse, de reproductibilité, etc...

La validation est fondée sur une analyse statistique basée sur un certain nombre de critères aboutissant à des méthodes analytiques permettant de donner des résultats fiables, et que la méthode adoptée à l'application prévue est performante.

1. Place de la validation dans la qualité

1. 1. Définition de la qualité

La norme **ISO 8402-94** définit la qualité comme suit :

« L'ensemble des caractéristiques d'une entité qui lui confèrent l'aptitude à satisfaire des besoins exprimés ou implicites ».

1.2. Définition de l'assurance qualité

Selon la norme **ISO 8402**

« C'est l'ensemble des actions préétablies et systématiques mises en œuvre dans le cadre du système qualité, et démontrées en tant que de besoin pour donner la confiance appropriée en ce qu'un produit ou service satisfera aux exigences données relatives à la qualité ».

2. Définition et objectif de la validation

2. 1. Définition

Nous avons retenu comme définitions de la validation analytique celle de BPF, FDA et la norme ISO :

FDA : valider c'est l'établir à l'évidence, avec un degré de confiance élevée et sous une forme documentée, qu'un procédé déterminé permet d'obtenir un produit (ou service) qui atteint des spécifications définies à l'avance.[9]

BPF : la validation c'est l'établissement de la preuve, en conformité avec les principes de bonne pratique de fabrication ; que la mise en œuvre ou l'utilisation de tout processus, procédure, matériel, matière première, article de conditionnement ou produit, activité ou système permet réellement d'atteindre les résultats escomptés. [10]

Pour la norme **ISO** : elle définit la validation comme étant la confirmation par examen et fourniture de preuves réelles que les exigences particulièrement d'un usage projeté donnésont remplies. [11]

2. 2. Objectif

Selon ICH Q2 (R1) : validation d'une procédure analytique : «l'objectif de la validation d'une procédure analytique est de démontrer qu'elle est appropriée à l'usage auquel elle est destinée».

Elle permet de garantir que chaque mesure qui doit être réalisée en routine est comprise dans une limite d'acceptation appropriée au type de procédure analytique et au produit concerné. Il faut donc définir correctement à la fois les conditions et le but dans lesquels la méthode sera utilisée. [12]

3. Contexte réglementaire et normatif

3.1. Guidelines ICH (International Conference on Harmonization)

Les documents élaborés ont été, entre autres :

- **Q2 : « Analytical Validation »**

1-**Q2A**: « Text on Validation of Analytical Procedures » “definitions and terminology” (1995)

2- **Q2B**: « Text on Validation of Analytical Procedures » “Methodology” (1997)

- **Q2(R1)** : «Validation of Analytical Procedures » “Text and Methodology”(2005)

3.2. Guide SFSTP : ce guide a été élaboré dans le but d'aider les industriels pharmaceutiques à valider leurs procédures d'analyse et de constituer un support permettant à toute analyse une réflexion sur les méthodes statistiques applicables à la validation analytique :

- ✓ SFSTP : «Guide de validation analytique-Rapport d'une commission SFSTP»
 - 1- I. Méthodologie, paru dans STP PharmaPratiques en 1992. [13]
 - 2- II. Exemples d'application, paru dans STP PharmaPratiques en 1992.[14]
- ✓ SFSTP : «Méthodes chromatographiques de dosage dans les milieux biologiques » : stratégie de validation. Rapport d'une commission SFSTP, paru dans STP Pharma Pratique en1997.
- ✓ SFSTP : «Validation des procédures analytiques quantitatives » : Harmonisation des démarches.
 - 1- Partie I –Généralités, paru dans STP Pharma Pratique en 2003 ;[15]
 - 2- Partie II- Statistiques, paru dans STP Pharma Pratique en 2006 ; [16]
 - 3- Exemples d'application, paru dans STP Pharma Prat. En2006. [17]

- 4- Exemples d'application, paru dans Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis en 2008. [12]

4. Cycle de vie d'une méthode

D'abord, il convient de préciser à quel moment il faut valider une méthode. En effet, comme tout processus, les méthodes d'analyse naissent, évoluent et disparaissent ; ce périple peut être résumé sous la forme d'un cycle de vie, concept déjà largement employé dans l'approche système. La figure 3 résume le cycle de vie d'une méthode d'analyse. [18]

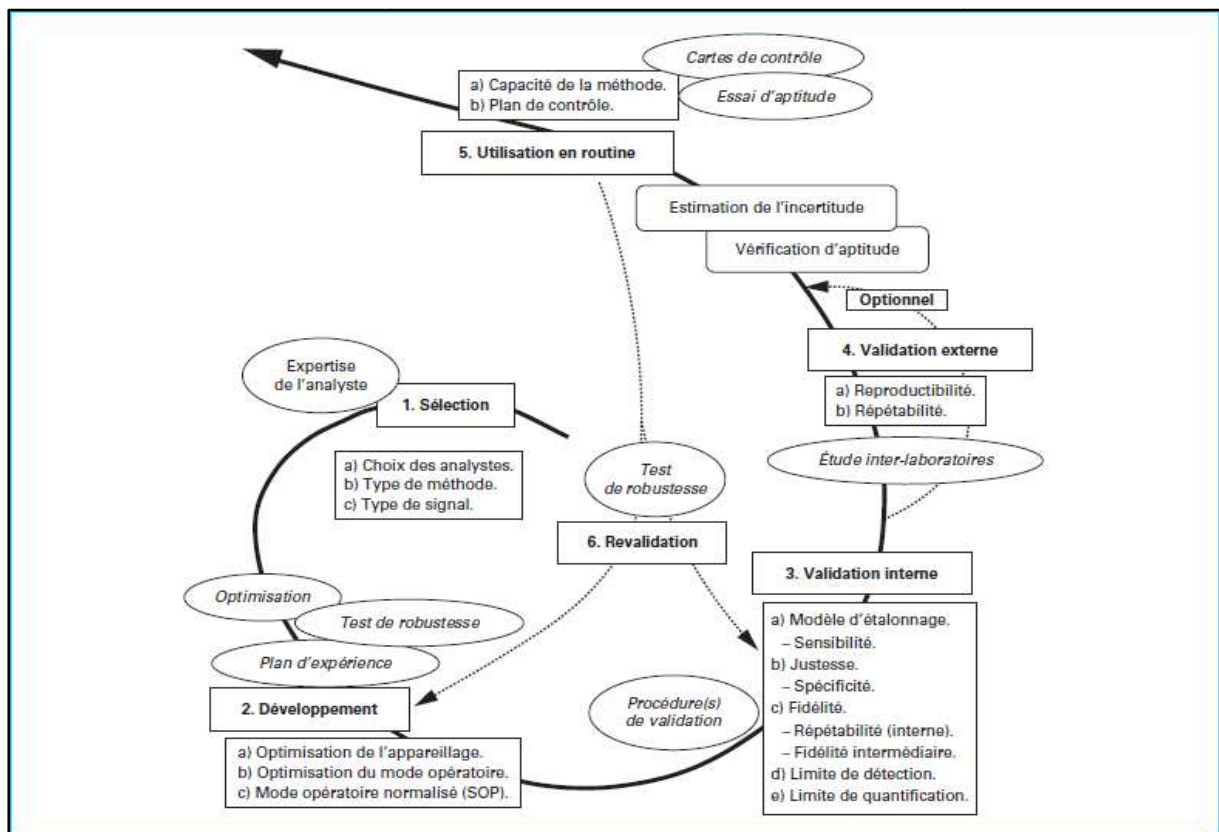


Figure 2 : Cycle de vie d'une méthode d'analyse [18]

Ainsi que l'illustre la figure 3, la mise en œuvre d'une procédure de dosage peut se décomposer essentiellement en quatre phases successives :

- Phase de sélection qui permet de définir les objectifs et les conditions opératoires initiales ;
- Phase de développement, avec ou sans optimisation au moyen de plans d'expériences (optimisation robuste) ;
- Phase de validation précédée, selon les cas, d'une phase de prévalidation ;
- Phase d'application en routine, incluant le plus souvent une validation en routine et parfois une validation partielle. [16]

5. 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 les suivants : [16]

- 1- Spécificité-Sélectivité ;
- 2- Fonction de réponse (courbe d'étalonnage) ;
- 3- Linéarité ;
- 4- Fidélité (répétabilité et fidélité intermédiaire) ;
- 5- Justesse ;
- 6-Exactitude ;
- 7- Limite de détection (LD) ;
- 8- Limite de quantification (LQ) ;
- 9- Intervalle de dosage ;
- 10- Sensibilité.

5. 1. Spécificité-Sélectivité

La sélectivité ou spécificité d'une méthode est son aptitude à mesurer la concentration de l'analyte sans interférence de la part des autres constituants de l'échantillon.[19]

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 physico-chimique ou un groupement fonctionnel d'une ou de plusieurs substance(s) dans l'échantillon.[20]

Dans le cas des méthodes séparatives, on parle plutôt de **sélectivité**: capacité à différencier et quantifier l'analyte cible en présence d'interférents dans l'échantillon.

5. 2. Fonction de réponse (courbe d'étalonnage)

La fonction de réponse d'une procédure d'analyse traduit, à l'intérieur de l'intervalle de dosage, la relation existant entre la réponse (signal) et la concentration (quantité) en substance à examiner dans l'échantillon. La fonction de réponse monotone la plus simple qui exprime cette relation est appelée « courbe d'étalonnage ». [16]

5. 3. Linéarité

La linéarité d'une méthode analytique est sa capacité à l'intérieur d'un certain intervalle de dosage d'obtenir des résultats directement proportionnels à la concentration en analyte dans l'échantillon. [20][19]

5. 4. Fidélité (précision)

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. La fidélité peut être évaluée à trois niveaux : la répétabilité, la fidélité intermédiaire (intra-laboratoire) et la reproductibilité (inter-laboratoire). [16]

- **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. [16]

5. 5. 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). [16]

5. 6. Exactitude

Exprime l'étroitesse de l'accord entre la valeur qui est acceptée soit comme une valeur conventionnellement vraie (standard interne de la firme), soit comme une valeur de référence acceptée (standard international, par exemple standard d'une pharmacopée) et la valeur trouvée (valeur moyenne) obtenue en appliquant la procédure d'analyse un certain nombre de fois. [13]

5. 7. Limite de détection (LD)

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. [16]

5. 8. Limite de quantification (LQ)

La plus petite quantité de l'analyte dans un échantillon pouvant être dosée dans les conditions expérimentales décrites avec une exactitude définie et une précision acceptable lorsqu'on applique la méthode indiquée. [16]

5. 9. Intervalle de dosage

L'intervalle de dosage d'une procédure d'analyse est la région entre les niveaux supérieur et inférieur (ces valeurs incluses) pour laquelle il a été démontré que la procédure est appropriée quant à son exactitude (justesse + fidélité) et sa linéarité, en utilisant la méthode décrite. [16]

6. 10. Sensibilité

C'est la capacité de la méthode d'analyse d'enregistrer de faibles variations de la concentration. Variation minimale qu'il faut imposer à la grandeur X à déterminer (par exemple une concentration) pour obtenir une variation significative du signal mesuré y. [16]

Tableau 2: Tableau récapitulatif des critères de validation.

Critère	Type d'analyse			
	Impureté	Dosage	Quantification bio analyse	
	Identification	Essai limite		
Spécificité/ sélectivité	+	+	+	+
Linéarité	-	-	+	+
Fidélité	-	-	+	+
LLOQ	-	+	-	+
Exactitude	-	+	+	+
Robustesse	-	-	-	+

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

- 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. [21]

7. Protocoles en phase de validation

Le profil d'exactitude ne s'applique qu'aux méthodes complètement développées et mises au point. En particulier, la sélectivité / spécificité doit avoir été étudiée ainsi que le domaine d'application de la méthode à valider, en termes de types de matrice et de niveaux de concentrations. L'ensemble des données de la phase de validation doit faire l'objet d'un rapport détaillé dans lequel tous les résultats obtenus doivent être documentés. Au terme de la phase de validation et avant son exploitation en routine, la procédure d'analyse doit être complètement décrite sous forme d'un mode opératoire standardisé.

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, utilisé pour établir 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, utilisé 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 inférieures et supérieure de quantification (intervalle de dosage).

En ce qui concerne la préparation des SE et SV, celle-ci dépend du protocole de validation choisi. Le logigramme de la figure 4 suivante, présente la démarche proposée dans le guide SFSTP 2003 pour sélectionner un protocole expérimental de la validation en fonction des contraintes ou des spécificités liées à la procédure de dosage sous épreuve. [15]

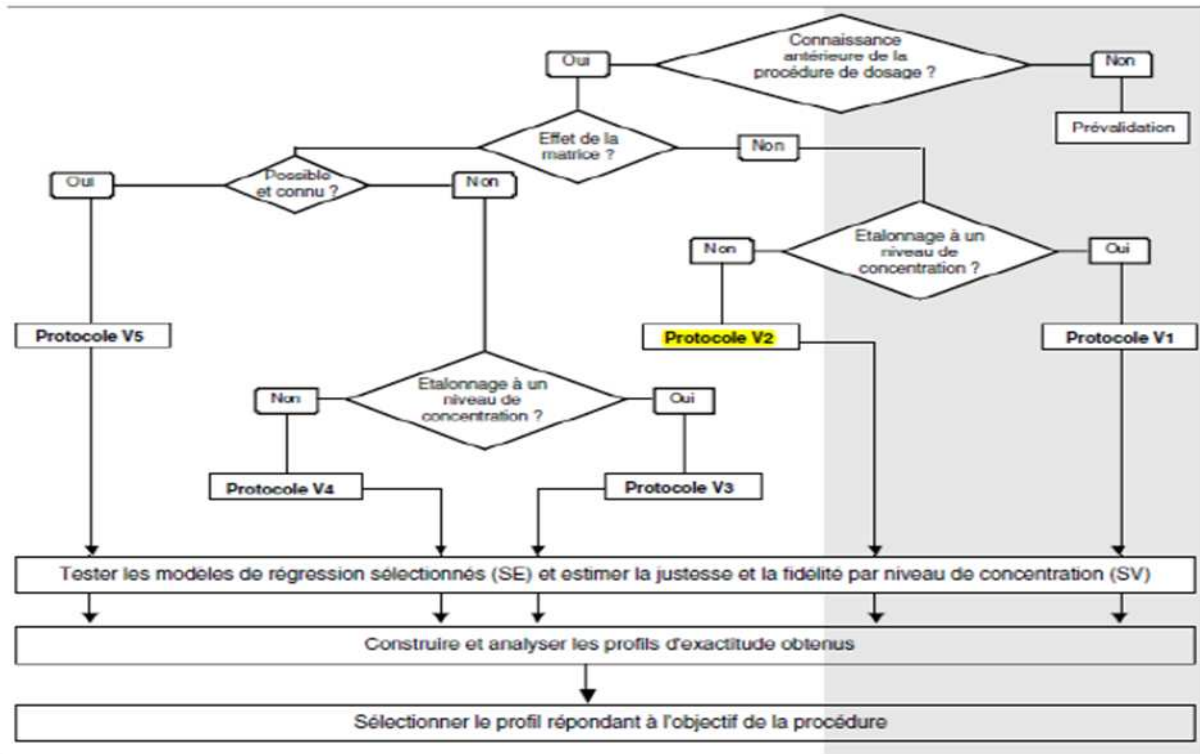


Figure 3 : Logigramme permettant de sélectionner un protocole de validation. SE : standard d'étalonnage. SV : standard de validation. [15]

SE : standard d'étalonnage.

SV : standard de validation.

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

Tableau 3 : Choix du nombre de standards d'étalonnage et de validation en fonction du protocole choisi. [15]

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

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

8. Etudes statistiques de la validation analytique

8. 1. Spécificité

La spécificité peut être démontrée de deux façons :

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

Test t de Student

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

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

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

$$t \text{ calculé} = \frac{|\alpha_1 - \alpha_2|}{\sqrt{\sigma_{\alpha 1}^2 + \sigma_{\alpha 2}^2}}$$

Le t calculé est comparé à la valeur t° (α ; $n_1 + n_2 - 4$) lue sur la table de Student.

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

Avec :

- α_1 et α_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).
- $\sigma_{\alpha 1}^2$ et $\sigma_{\alpha 2}^2$: variances respectives des pentes α_1 et α_2 .
- α : risque 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). [13] [15]

8. 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) X . Cette relation se caractérise à l'aide d'une fonction f qui doit être strictement monotone (strictement croissante ou décroissante) sur l'intervalle de dosage envisagé:

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

Où ε est l'erreur associée à la fonction de réponse f appelée communément erreur résiduelle.

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

Différentes fonctions de réponse peuvent être envisagées lors de la validation de la méthode, comme illustré au tableau 4. Le choix dépend du type de méthode (méthode physicochimique, bio analytique, immuno-dosage, etc.). [16]

Tableau 4: Exemple de fonction de réponses.

Type	Equation	Paramètres/Parameters	Linéaire/Linear
Droite passant par l'origine/ Straight line through	$Y = \beta X$	β	oui/yes
Droite/Straight line	$Y = \alpha + \beta X$	α, β	oui/yes
Fonction quadratique/ Quadratic function	$Y = \alpha + \beta X + \gamma X^2$	α, β, γ	oui/yes
Fonction logistique à 4 paramètres/4-parameter logistic function	$Y = \alpha + \frac{\delta - \alpha}{1 + \left(\frac{X}{\gamma}\right)^\beta}$	$\alpha, \beta, \gamma, \delta$	non/no
Fonction logistique à 5 paramètres/5-parameter logistic function	$Y = \alpha + \frac{\delta - \alpha}{\left[1 + \left(\frac{X}{\gamma}\right)^\beta\right]^\psi}$	$\alpha, \beta, \gamma, \delta, \psi$	non/no

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

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

Des transformations mathématiques sont également envisageables. Par exemple, le logarithme népérien ou la racine carrée pourrait être appliqué à la concentration X ainsi qu'à la réponse Y. Il est cependant recommandé de n'appliquer ce type de transformation qu'avec les modèles linéaires du tableau 4.[16]

8. 3. Alignement des observations

Si, pour un niveau de concentration, les quantités introduites ne sont pas identiques pour toutes les séries (souvent pour de raisons de pesées qui doivent être indépendantes), il est indispensable de procéder à un alignement sur la concentration moyenne dès lors qu'un calcul de variance doit être effectué (estimation de la répétabilité et de la fidélité intermédiaire).

Cela consiste à transformer les réponses observées ($y_{ijk} \rightarrow y_{ijk,c}$) afin de les aligner sur cette concentration moyenne. Cet alignement s'effectue par interpolation en ajoutant à la réponse observée la différence entre la valeur de la fonction de réponse considérée à la concentration moyenne et la valeur de cette fonction à la concentration introduite.

En validation, l'alignement s'applique aux réponses obtenues avec les échantillons de validation en utilisant les équations ou fonction de réponses obtenues avec les standards de d'étalonnage. Ainsi l'alignement des n_{ij} répétitions du niveau de concentration j de la série i s'effectue comme suit :

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

Où : \bar{x}_{ij} : Moyenne des concentrations introduites du niveau j de la série i.

x_{ijk} : Concentration introduite du niveau j de la série i répétition k.

En résumé, pour les différentes fonctions de réponse (tableau 5) [16]

Tableau 5: Règles d’alignement pour différentes fonctions de réponses. [16]

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

8. 4. Prédiction inverses :

Après avoir choisi le modèle mathématique adéquat des concentrations en retour avec la fonction de réponse sont calculées.

Les prédictions inverses pour les différents modèles de régression s’obtiennent comme suit (tableau 6)

Tableau 6 : Calcul des prédictions inverses pour différentes fonctions de réponses. [16]

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

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:

Tableau 7 : Calcul des prédictions inverses pour la droite ayant subi une transformation logarithmique ou racine carrée.[16]

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

8. 5. Calcul de la justesse et de la fidélité

8. 5. 1. Modèle

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

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

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

Où : X_{ijk} est la k -ième concentration calculée du niveau j de la i -ème série.

μ_j est la moyenne des concentrations calculées du niveau de concentration j .

α_{ij} est au niveau j l'écart entre la moyenne de la i -ème série et la moyenne μ_j ; α_{ij} est considéré comme une variable aléatoire ayant une distribution normale de moyenne 0 et de variance σ_{Bj}^2 .

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

L'erreur expérimentale est supposée indépendante de la série.

Les variances $\sigma_{B,j}^2$ et $\sigma_{w,j}^2$ 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 μ_j , $\sigma_{B,j}^2$ et $\sigma_{w,j}^2$ du modèle.

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

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

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

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

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

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

$\bar{x}_{ijk,calc}$: concentration calculée du niveau j de la série i répétition k.

n : nombre de répétition.

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).[16]

Si $MSE_j < MSM_j$ alors :

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

$$\hat{\sigma}_{B,j}^2 = \frac{MSM_j - MSE_j}{n}$$

Sinon :

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

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

8. 5. 2. Justesse

La justesse (ou le biais) de la méthode au niveau de concentration est obtenue en calculant la différence entre la moyenne arithmétique des concentrations introduites et la moyenne des concentrations calculées.

Le biais peut s'exprimer en termes absolu, relatif ou de recouvrement par rapport aux quantités introduites, comme suit:

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

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

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

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

\bar{x}_j : moyenne des concentrations introduites du niveau j. [16]

8. 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 :

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

$$\text{Fidélité intermédiaire} : \hat{\sigma}_{IP,j}^2 = \hat{\sigma}_{W,j}^2 + \hat{\sigma}_{B,j}^2 [16]$$

8. 6. Calcul de l'exactitude

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

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

Avec x : concentration prédite

μ : concentration introduite

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

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

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.[17]

8. 6. 1. Erreur totale et profil d'erreur totale

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

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



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



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

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

Cette erreur totale, comme indiqué ci-dessus, est la somme de la justesse (biais) et de la fidélité. L'erreur totale observée avec chaque modèle et pour chaque niveau de concentration est étroitement liée avec les erreurs maximales observées correspondantes.

Il est normal que l'erreur maximale observée sur un grand nombre d'observations soit sensiblement plus grande que l'erreur totale vu que ces erreurs maximales représentent des événements rares tandis que l'erreur totale reflète plutôt les plus grandes erreurs auxquelles on peut s'attendre dans la plupart des cas.

Si l'on considère la seconde erreur la plus grande, on voit alors que les points se répartissent bien autour de la bissectrice $y=x$, ce qui démontre bien que l'estimation de l'erreur totale rend compte des erreurs les plus grandes que la méthode produit. L'erreur totale d'une procédure analytique est donc bien un bon indicateur de l'exactitude des résultats qu'elle produit.

C'est la raison pour laquelle nous proposons ce critère pour une première évaluation simple de la procédure analytique.[16]

8. 7. Calcul de l'intervalle de tolérance

L'importance dans une validation analytique ce n'est pas la validité des résultats obtenus 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 et du profil d'exactitude.

L'estimation des paramètres de justesse et fidélité μ_j , $\sigma_{B,j}^2$ et $\sigma_{W,j}^2$ et à chaque niveau de concentration j , n'est pas une fin en soi mais une étape indispensable pour calculer la proportion attendue de résultats qui se situent dans les limites d'acceptation.

L'intervalle de tolérance sera calculé pour chaque niveau de concentration envisagé avec les standards de validation et pour chaque modèle mathématique.

Pratiquement, l'intervalle de tolérance se calcule comme suit en valeur absolue :

Où :

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

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

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

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

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

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

n : nombre de répétitions

p : nombre de séries

Le même intervalle en échelle relative devient :

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

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

La méthode peut dès lors être considérée comme exacte au niveau de chance β pour le niveau de concentration en question, si l'intervalle de tolérance est inclus dans les limites $[-\lambda, +\lambda]$ définies a priori en fonction des objectifs de la méthode. [16]

8. 8. Profil d'exactitude et décision

8. 8. 1. Calcul

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

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

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

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 inférieur, en valeur absolue à λ sera au moins égale à β . [14]

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

8. 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 (-20%, + 20%) retenues pour cet exemple. Par ailleurs, parmi les fonctions de réponses acceptables, on pourra remarquer que certaines fournissent des résultats meilleurs que d'autres. Ce seront ces dernières qui devront être retenues.

Nous attirons également l'attention sur le fait, que pour l'ensemble de ces modèles, le coefficient de détermination R^2 est toujours supérieur à 0.99 et pas en rapport ici avec la qualité des résultats. Une fois de plus nous tenons à souligner ici que ce coefficient n'est pas une indication fiable de la qualité des résultats que la procédure rendra. [16]

8. 9. Linéarité

La linéarité d'une procédure d'analyse est sa capacité à l'intérieur d'un certain intervalle de dosage d'obtenir des résultats directement proportionnels à la quantité (ex : concentration) en analyte dans l'échantillon. Rappelons que l'exigence de linéarité s'applique aux résultats (concentration calculée = f (concentrations introduites)), pas aux réponses (signal = f (concentrations introduites)). C'est un prérequis à l'estimation de la justesse. A l'inverse, l'existence d'une relation linéaire entre la concentration estimée et la concentration introduite n'implique pas que la méthode soit juste. [16]

8. 10. Limites de quantification

Le profil d'exactitude, construit à partir des intervalles des mesures attendues, permet donc de décider des niveaux de concentration pour lesquels une procédure est apte à fournir des résultats dans les limites d'acceptation. Ainsi, par définition, quand elle se produit, l'intersection entre le profil d'exactitude et les limites d'acceptation définissent les limites de quantification basse (L_{LOQ}) et haute (U_{LOQ}) 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. [16]

Partie Pratique



Le dosage du paracétamol dans les comprimés de 500mg peut être effectué par diverses méthodes analytiques.

L'objectif du présent travail est de valider une méthode de dosage du paracétamol dans les comprimés de 500mg par Chromatographie Liquide Haute performance (HPLC).

Cette étude a été réalisée au sein de 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

1.1. Matières premières et réactifs

Tableau 8 : Matières premières et réactifs utilisés

Matières premières		Réactifs
Principe actif	Excipients (qsp 1cmp)	
Paracétamol : principe actif fourni gracieusement par le laboratoire pharmaceutique BIOPHARM	Amidon de maïs	Méthanol grade HPLC
		Hydroxyde de sodium (0.1M)
	Amidon pré-gélatinisé	Phosphate mono-sodique
		Phosphate di-sodique
	Stéarate de magnésium	Tetrabutyl ammonium hydroxyde
CMC	Eau distillée	

1. 2. Appareillages et équipements

Tableau 9 : Matériels du laboratoire de chimie analytique utilisés dans le présent travail

Désignation		Spécification	Usage
Appareil HPLC (SHIMADZU LC 20)	Pompe	LC 20 AT	Analyse des solution et obtention des chromatogrammes
	Injecteur automatique	SIL 20 A	
	Contrôleur	CBM-20	
	Compartiment de la colonne	C TO-20A	
	Colonne	C 18	
	Détecteur	Détecteur spectrophotométrique UV-visible	
	Logiciel d'exploitation	LC-solution	
Purificateur de l'eau		Human power I	Purification de l'eau
Pompe à vide		Fisher bioblockscientific Pmax = 4 bar	Filtration de la phase mobile
Bain ultrason : sonicateur		Advantage-LAB	Dissolution
Agitateur magnétique		STUART	Homogénéisation des solutions
Balance de précision		KERN ALT 220-5DAM	Pesée
Etuve		MEMMERT	Séchage

2. Méthodes

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 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 sur la prise de décision au regard des 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. [16]

2.2. Choix du Protocole de validation

Selon le logigramme de la figure 04 ci-dessous et compte tenu de l'absence de l'effet matrice, le protocole choisi est le V2 modifié qui consiste à préparer ;

- Trois séries du standard d'étalonnage (SE) : Chaque série comporte 5 niveaux de concentration avec deux répétitions par niveau.
- Trois séries du standard de validation (SV) : Chaque série comporte 5 niveaux de concentration avec trois répétitions par niveau.

3. Préparation des solutions

3. 1. Préparation du diluant (NaOH 0,1 N)

Dans une fiole jaugée de 1L, peser 4gde NaOH, dissoudre dans un volume suffisant d'eau purifiée. Agiter et compléter au trait de jauge avec le même solvant.

3. 2. Solutions standards d'étalonnage

Chaque jour, pendant 03 jours, 05 niveaux de concentration sont préparés à raison de 02 répétitions.

Tableau 10 : Montage expérimental des SE.

Niveaux	80%		90%		100%		110%		120%	
Répétition	1	2	1	2	1	2	1	2	1	2
Prise d'essai théorique	80mg		90mg		100mg		110mg		120mg	
Protocole	<ul style="list-style-type: none"> -Peser chaque prise d'essai du paracétamol pour chaque répétition dans une fiole de 100 ml (solution mère); - Ajouter environ 50 ml du diluant et mettre dans l'ultrason pour une dissolution complète ; - Compléter au trait de jauge avec le diluant pour ainsi obtenir des solutions mères ; - Mettre 2 ml de la solution mère dans une fiole de 100 ml ; - Compléter au trait de jauge avec le diluant (une dilution 2/100) ; - Agiter par retournement à chaque fois et remplir les vials. 									
Nombre de solutions à préparer	SE = 5x3x2 = 30 solutions (5 niveaux, 3 séries, 2 répétitions)									

3. 3. Solution placebo

Dans une fiole de 100 ml, peser 20 mg de placebo, compléter au trait de jauge avec le diluant, puis filtrer la solution.

3. 4. Solution des standards de validation

Chaque jour, pendant les 03 jours, 05 niveaux de concentration sont préparés à raison de 03 répétitions par niveau selon le tableau suivant :

Tableau 11 : Montage expérimental des SV.

Niveaux	80%			90%			100%			110%			120%		
Répétition	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3
Prise d'essai théorique	80mg			90mg			100mg			110mg			120mg		
Protocole	<ul style="list-style-type: none"> -Peser chaque prise d'essai théorique du paracétamol pour chaque répétition dans une fiole de 100 ml ; - Ajouter environ 50 ml du diluant et mettre dans l'ultrason pour une dissolution complète ; - Compléter au trait de jauge avec le diluant pour ainsi obtenir des solutions mères ; - Mettre 2 ml de la solution mère dans une fiole de 100 ml ; - Ajouter 2 ml de la solution placebo ; - Compléter au trait de jauge avec le diluant (une dilution 2/100) ; - Agiter par retournement à chaque fois et remplir les vials. 														
Nombre de Solutions à préparer	SV = 5x3x3 = 45 solutions (5 niveaux, 3 séries, 3 répétitions)														

3. 5. Préparation de la phase mobile

La phase mobile est composé d'un mélange d'une solution méthanolique de tetrabutyle ammonium hydroxide à 25% et du tampon phosphate à 75% (pourcentage volumique)

- Solution méthanolique de tetrabutyle ammonium hydroxide : Dans une fiole de 250 ml, prélever 1,15 g de la solution aqueuse de tetrabutyleammonium hydroxyde à 160 g/L, Compléter au trait de jauge avec du méthanol grade HPLC.
- Tampon phosphate: Dans une fiole de 1L, peser 13,429 g/l de Na_2HPO_4 , 4,99g/l de NaH_2PO_4 , compléter au trait de jauge avec l'eau distillé.

3. 6. Conditions chromatographies

Tableau 12 :Condition chromatographique de la méthode de dosage

Colonne	Longueur	25 cm
	Diamètre	4,6 mm
	Taille des particules	5 μm
	Phase stationnaire	Gel de silice octadecylesilyle (C18)
Détection	Spectrophotomètre UV-Visible : longueur d'onde $\lambda=273$ nm	
Volume injecté	20 μl	
Débit	1,2ml/min	
Température	Ambiante	

4. Résultats

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

4. 1. Spécificité

4. 1. 1. Confirmation de la spécificité sur les deux gammes d'étalonnage et de validation

Les résultats de la comparaison des deux pentes de la droite de régression obtenue sur la gamme sans matrice (standard d'étalonnage) et la droite obtenue sur la gamme avec matrice (standard de validation) sont évalués dans les tableaux suivants :

Tableau 13 : Résultats du test de comparaison des deux pentes des deux droites de régression (gamme standard et gamme placebo chargé)

Gamme standard d'étalonnage		Gamme standard de validation	
série 1		série 1	
Masse introduite (mg)	Aire du pic	Masse introduite (mg)	Aire du pic
79,57	1415387	80,18	1440721,92
80,25	1435967	80,25	1414155,57
		80,03	1425746,52
90,22	1618211	90,02	1615232,64
90,01	1612965	90,01	1592513,55
		89,93	1592536,80
99,94	1791022	99,94	1786206,86
102,77	1845679	100,03	1776133,70
		100,43	1764828,44
110,32	1958476	110,32	1970444,92
110,56	1989133	110,56	1990955,17
		109,89	2001452,91
120,17	2174748	119,77	2137120,87
120,61	2191095	120,05	2145092,48
		119,96	2113262,64
pente	pente	pente	18006,1043
ord;origine	ord;origine	ord;origine	-17827,988

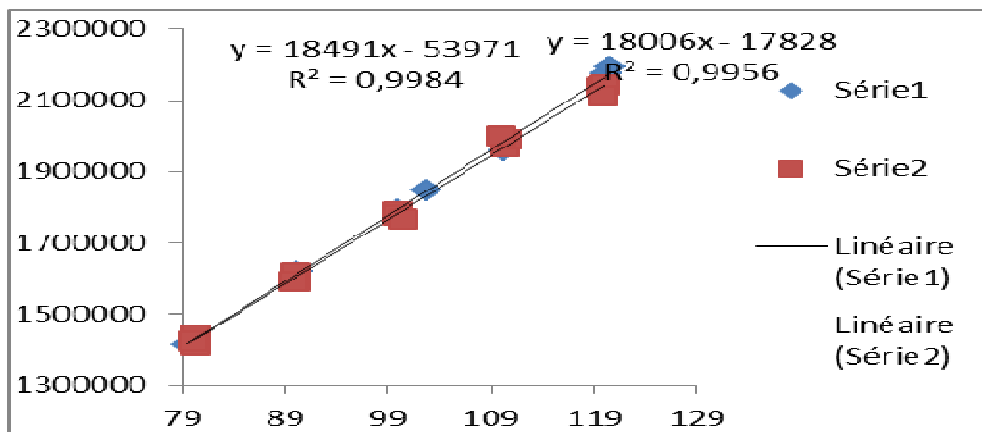


Figure 4 : droites d'étalonnage sur standard et forme reconstitué du paracétamol

4. 1. 2. Vérification de l'absence d'effet matrice

Tableau 13.1 : Comparaison des deux pentes

Teste de STUDENT		VRAI
ddl	21	
β	0,95	
α	0,05	
t^0	2,07961384	
t_c	1,15326738	
si vrai: la méthode est spécifique		

Données droite de validation SV1			
		Ecart-type	Variance
Pente	18006,10	331,83	110112,07
l'origine	-17827,99	33542,20	1125079483

4. 1. 3. Vérification de l'absence d'erreur systématique

Tableau 13.2 : Comparaison des ordonnées à l'origine

Teste de STUDENT		VRAI
ddl	21	
β	0,95	
α	0,05	
$t_0 =$	2,07961384	
$t_c =$	0,84980492	
si vrai: absence d'erreurs systématique		

Données droite de validation SV1			
		Ecart-type	Variance
Pente	18006,10	331,83	110112,07
l'origine	-17827,99	33542,20	1125079483

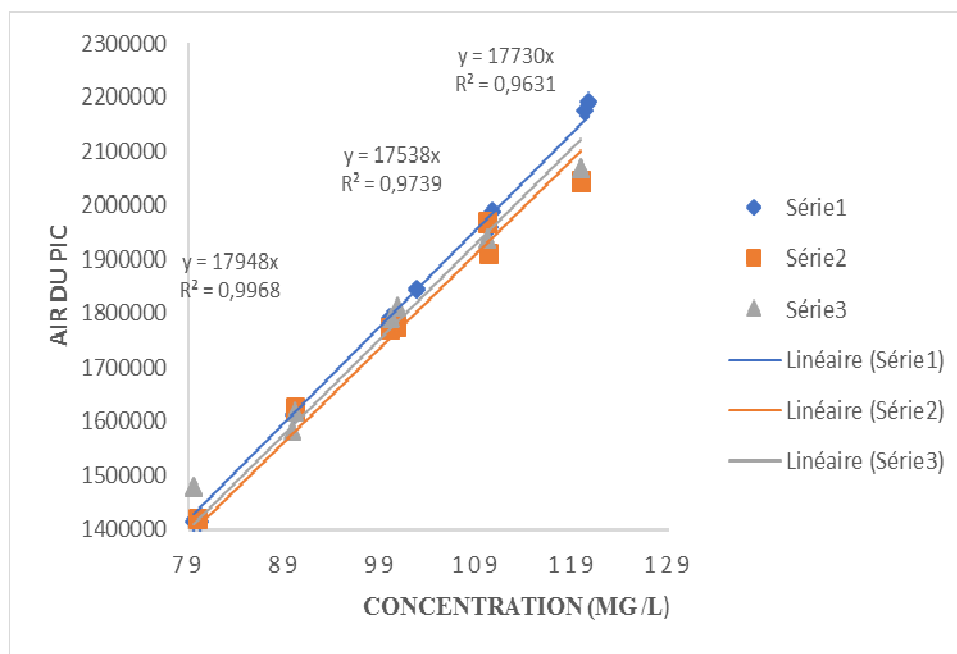
4. 2. Fonction de réponse

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

- Modèle $y = ax$:

Tableau 14 : Résultats obtenus pour la fonction $y = ax$

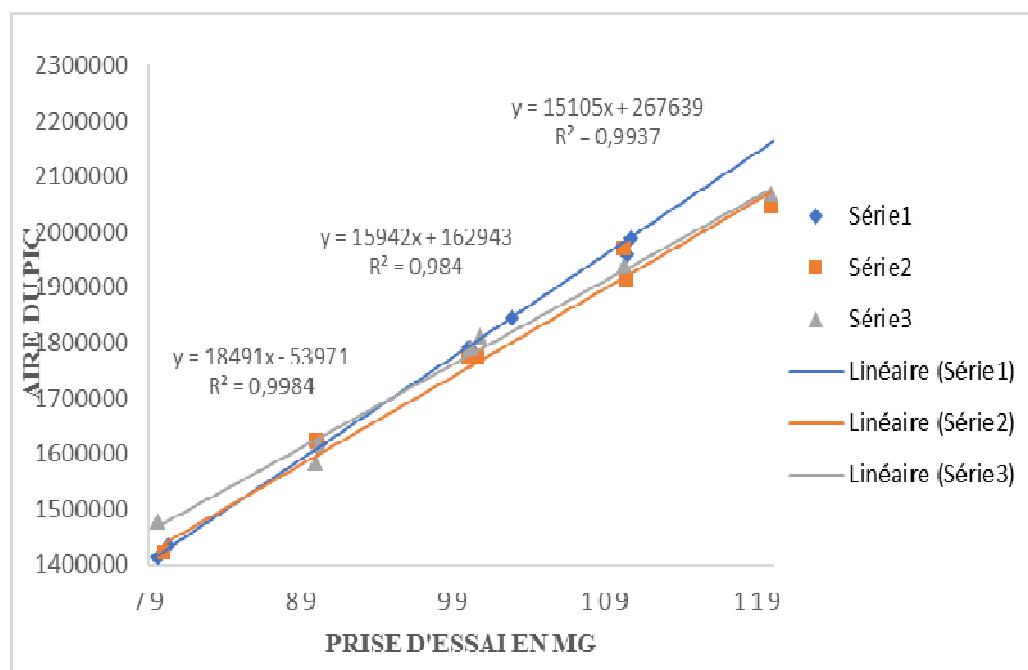
Gamme standard d'étalonnage					
série 1		série 2		série 3	
Prise d'essai (mg)	Aire du pic (A)	Prise d'essai (mg)	Aire du pic (A)	Prise d'essai (mg)	Aire du pic (A)
79,57	1415387	80,14	1397134	79,53	1478605
80,25	1415387	80	1421015	79,57	1478523
90,22	1618211	90,03	1620968	90,06	1616989
90,01	1612965	90,02	1624908	89,88	1583753
99,94	1791022	100,61	1777195	100,71	1811890
102,77	1845679	99,97	1772478	100,05	1791022
110,32	1958476	110,28	1912026	110,1	1938606
110,56	1989133	110,11	1970095	110,13	1938546
120,17	2174748	119,82	2043877	119,78	2068827
120,61	2191095	119,79	2043818	119,76	2068558
 pente	17948,00	 pente	17538,00	 pente	17730,00
ord, l'origine	0,00	ord,origine	0,00	ord,origine	0,00

Figure 5: courbes d'étalonnage obtenues avec la fonction $y=ax$

- Modèle $y = ax + b$

Tableau 15 : Résultats obtenue pour la fonction $y = ax + b$

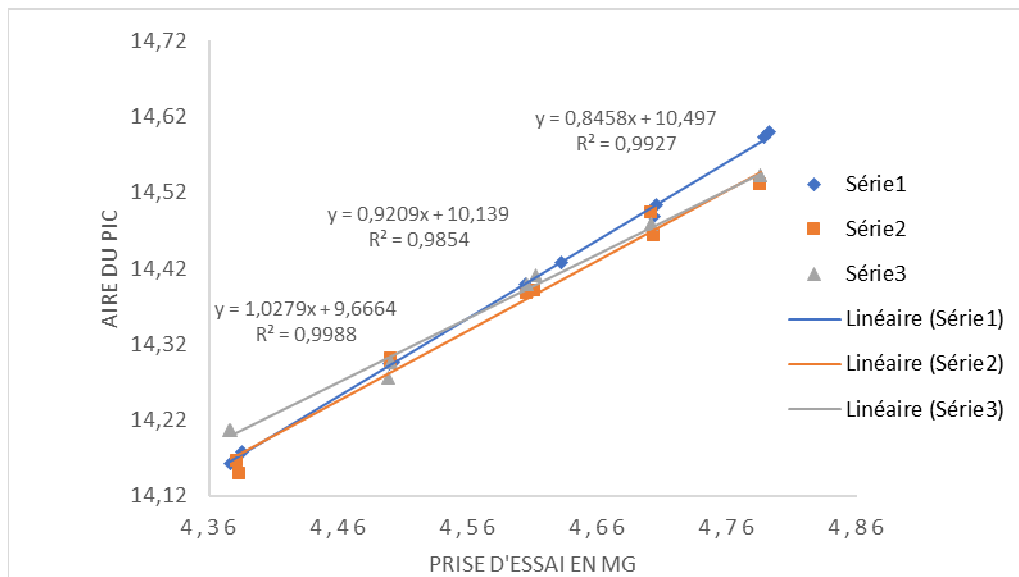
gamme standard d'étalonnage					
série 1		série 2		série 3	
Prise d'essai (mg)	Aire du pic (A)	Prise d'essai (mg)	Aire du pic (A)	Prise d'essai (mg)	Aire du pic (A)
79,57	1415387	80,14	1397134	79,53	1478605
80,25	1435967	80	1421015	79,57	1478523
90,22	1618211	90,03	1620968	90,06	1616989
90,01	1612965	90,02	1624908	89,88	1583753
99,94	1791022	100,61	1777195	100,71	1811890
102,77	1845679	99,97	1772478	100,05	1791022
110,32	1958476	110,28	1912026	110,1	1938606
110,56	1989133	110,11	1970095	110,13	1938546
120,17	2174748	119,82	2043877	119,78	2068827
120,61	2191095	119,79	2043818	119,76	2068558
pente	18490,66	pente	15941,81	pente	15105,43
ord, l'origine	-53971,03	ord,origine	162942,70	ord,origine	267638,54

Figure6: Courbes d'étalonnage obtenues avec la fonction $y = ax + b$

- Modèle $\text{Ln } y = f(\text{Ln } x)$

Tableau 16 : Résultats obtenus pour fonction $\text{Ln } y = f(\text{Ln } x)$

gamme standard d'étalonnage					
série 1		série 2		série 3	
Masse introduite (Ln x)	Aire du pic (Ln y)	Masse introduite (Ln x)	Aire du pic (Ln y)	Masse introduite (Ln x)	Aire du pic (Ln y)
4,38	14,16	4,38	14,15	4,38	14,21
4,39	14,18	4,38	14,17	4,38	14,21
4,50	14,30	4,50	14,30	4,50	14,30
4,50	14,29	4,50	14,30	4,50	14,28
4,60	14,40	4,61	14,39	4,61	14,41
4,63	14,43	4,60	14,39	4,61	14,40
4,70	14,49	4,70	14,46	4,70	14,48
4,71	14,50	4,70	14,49	4,70	14,48
4,79	14,59	4,79	14,53	4,79	14,54
4,79	14,60	4,79	14,53	4,79	14,54
 pente	1,03	 pente	0,92	 pente	0,85
ord, l'origine	9,67	ord,origine	10,14	ord,origine	10,50

Figure 7: courbes d'étalonnage obtenues avec la fonction $\text{Ln } y = f(\text{Ln } x)$

- Modèle : $\sqrt{y} = f(\sqrt{x})$

Tableau 17 : Résultats obtenus pour la fonction $\sqrt{y} = f(\sqrt{x})$

Gamme standard d'étalonnage					
série 1		série 2		série 3	
Masse introduite (\sqrt{x})	Aire du pic (\sqrt{y})	Masse introduite (\sqrt{x})	Aire du pic (\sqrt{y})	Masse introduite (\sqrt{x})	Aire du pic (\sqrt{y})
8,92	1189,70	8,95	1182,00	8,92	1215,98
8,96	1198,32	8,94	1192,06	8,92	1215,95
9,50	1272,09	9,49	1273,17	9,49	1271,61
9,49	1270,03	9,49	1274,72	9,48	1258,47
10,00	1338,29	10,03	1333,11	10,04	1346,06
10,14	1358,56	10,00	1331,34	10,00	1338,29
10,50	1399,46	10,50	1382,76	10,49	1392,34
10,51	1410,37	10,49	1403,60	10,49	1392,32
10,96	1474,70	10,95	1429,64	10,94	1438,34
10,98	1480,23	10,94	1429,62	10,94	1438,25
 pente	137,84	 pente	121,20	 pente	113,12
 ord, l'origine	-38,70	 ord, origine	113,82	 ord, origine	202,73

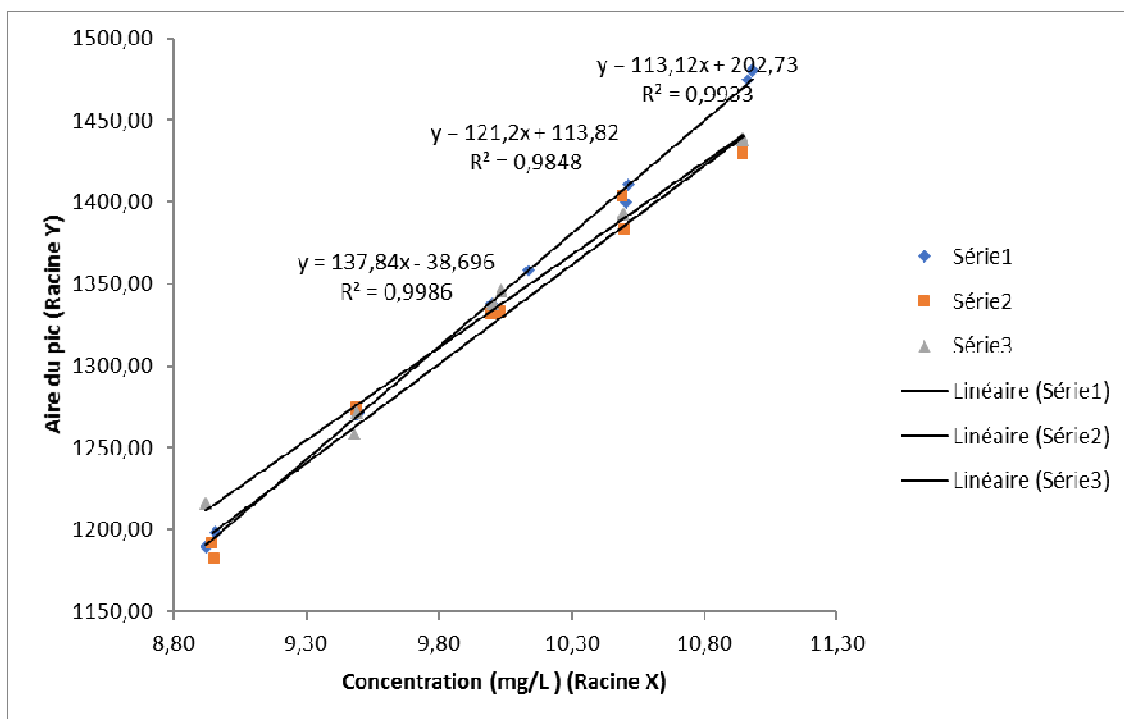


Figure 8: Courbes d'étalonnage obtenues avec la fonction $\sqrt{y} = f(\sqrt{x})$

4. 2. 1. Critères de choix de la fonction de réponse

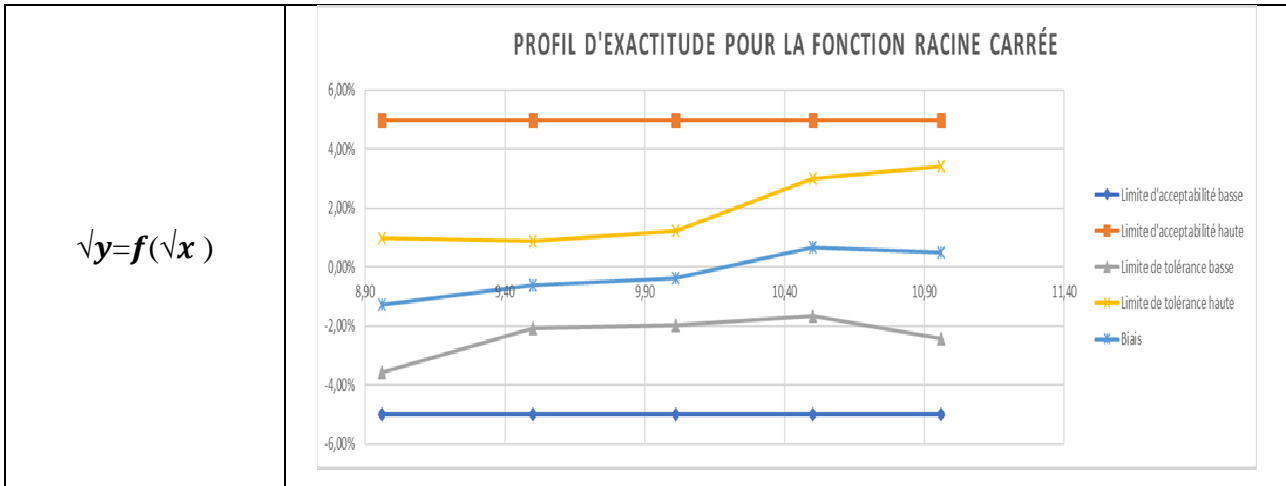
Pour le choix de la fonction de réponse, qui est capable de prédire une proportion suffisante des futurs résultats qui se situeront à l'intérieur de la zone d'acceptabilité [-5, +5], nous pouvons procéder par deux méthodes soit :

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

Dans notre travail la méthode utilisée pour le choix de la fonction de réponse est celle basée sur le profil d'exactitude. Les différents modèles de régression testés aboutissant aux profils d'exactitudes élucidés dans le tableau 20 ci-dessous :

Tableau 18 : Critères de choix de la fonction de réponse

Modèle de fonction de réponse	Profil d'exactitude
$y=ax$	<p style="text-align: center;">PROFIL D'EXACTITUDE POUR LA FONCTION LINEAIRE PASSANT PAR (0)</p>
$y=ax+b$	<p style="text-align: center;">PROFIL D'EXACTITUDE POUR LA FONCTION LINEAIRE SIMPLE</p>
$Ln y=f(Ln x)$	<p style="text-align: center;">PROFIL D'EXACTITUDE POUR LA FONCTION LOGARITHME NÉPÉRIEN</p>



Les résultats qui seront désormais élucidés sont basés sur le modèle mathématique choisi, en l'occurrence la fonction de réponse : $Ln y=f(Ln X)$, sachant que ce sont les mêmes étapes aussi suivies avec les autres modèles.

4. 3. Alignement des observations

Comme pour chaque niveau de concentrations, les quantités introduites ne sont pas identiques, l'alignement des réponses sur la moyenne des concentrations introduites est exigé. L'alignement appliqué aux réponses obtenues avec les trois séries des standards de validation, sur la moyenne des masses introduites pour chaque niveau de concentration théorique est résumé dans le tableau suivant :

Tableau 19 : Alignement des réponses observées avec les trois séries des SV.

Niveaux	série 1			série 2			série 3			moyenne des PE (mg)
	Masse introduite (mg)	Réponses instrumentales	Réponse alignées	Masse introduite (mg)	Réponses instrumentales	Réponses alignées	Masse introduite (mg)	Réponses de instrumentales	Réponses alignées	
1	4,38	14,18	14,18	4,39	14,14	14,14	4,39	14,17	14,17	4,39
	4,39	14,16	14,16	4,39	14,14	14,14	4,39	14,17	14,17	
	4,38	14,17	14,17	4,38	14,18	14,18	4,38	14,16	14,16	
2	4,50	14,30	14,29	4,50	14,28	14,28	4,50	14,29	14,29	4,50
	4,50	14,28	14,28	4,50	14,28	14,28	4,50	14,29	14,29	
	4,50	14,28	14,28	4,51	14,28	14,28	4,52	14,29	14,28	
3	4,60	14,39	14,40	4,61	14,38	14,38	4,61	14,37	14,37	4,61
	4,61	14,39	14,39	4,60	14,38	14,38	4,61	14,39	14,39	
	4,61	14,39	14,38	4,60	14,38	14,38	4,60	14,39	14,39	
4	4,70	14,49	14,49	4,70	14,48	14,48	4,70	14,50	14,50	4,70
	4,71	14,51	14,50	4,70	14,48	14,48	4,70	14,50	14,50	
	4,70	14,51	14,51	4,70	14,47	14,47	4,70	14,50	14,50	
5	4,79	14,57	14,57	4,79	14,56	14,56	4,79	14,57	14,58	4,79
	4,79	14,58	14,58	4,79	14,56	14,56	4,80	14,57	14,57	
	4,79	14,56	14,56	4,79	14,56	14,56	4,79	14,57	14,57	
Pente	1,010851673			1,008169107			1,017978491			
Ord.l'	9,738394434			9,736308253			9,701192285			

4. 4. Prédications inverses

Les prises d'essai prédites avec la fonction de réponse choisie ($\text{Ln } y = f(\text{Ln } x)$) sont présentées dans les tableaux 20 ci-dessous :

Tableau 20 : Prédications inverses obtenues avec les SV

Gamme standard de validation (forme reconstituée)						
Niveaux	série 1		série 2		série 3	
	Réponses alignées	prédications inverses (mg)	Réponses alignés	prédications inverses (mg)	Réponses alignés	prédications inverses (mg)
1	14,18	4,39	14,14	4,35	14,17	4,34
	14,16	4,37	14,14	4,35	14,17	4,34
	14,17	4,38	14,18	4,39	14,16	4,33
2	14,29	4,50	14,28	4,49	14,29	4,49
	14,28	4,49	14,28	4,50	14,29	4,49
	14,28	4,49	14,28	4,49	14,28	4,47
3	14,40	4,60	14,38	4,60	14,37	4,57
	14,39	4,60	14,38	4,61	14,39	4,60
	14,38	4,59	14,38	4,61	14,39	4,60
4	14,49	4,70	14,48	4,71	14,50	4,73
	14,50	4,71	14,48	4,71	14,50	4,73
	14,51	4,71	14,47	4,70	14,50	4,73
5	14,57	4,78	14,56	4,80	14,58	4,83
	14,58	4,78	14,56	4,80	14,57	4,81
	14,56	4,76	14,56	4,80	14,57	4,82
Pente	0,972810415		1,085853133		1,017978491	
Ord.l'Origin	-9,403543922		-11,0092557		9,701192285	

4. 5. Justesse

Comme indiqué dans les tableaux 14 ci-dessous, la justesse est exprimée en termes de biais absolu, de biais relatif (%) ou de taux de recouvrement (%) pour chaque niveau de concentration des standards de validation.

Tableau 21 : Justesse calculée pour chaque niveau de concentration des standards de validation.

Niveau de concentration (ratio)	Moyenne des concentrations introduites (unit)	Moyenne des concentrations calculées (unit)	Biais absolu (unit)	Biais relatif (%)	Taux de Recouvrement (%)
80%	4,39	4,36	-2,02	-0,569	99,96
90%	4,50	4,49	-0,01	-0,268	99,86
100%	4,61	4,60	-0,01	-0,174	99,75
110%	4,70	4,71	0,01	0,276	100,04
120%	4,79	4,80	0,01	0,205	99,70

4. 6. Fidélité

La fidélité de notre méthode est évaluée dans des conditions de répétabilité et de fidélité intermédiaire. Exprimée en écart type et en termes de coefficient de variation suite à l'étude de la variance du modèle choisie qui a donné les résultats suivants :

Tableau 22 : Fidélité calculée pour chaque niveau de concentration des standards de validation.

Niveaux %	MSM	MSE1	MSE2	Ecart type de répétabilité	Ecart type inter série	Ecart type de F,I,	CV répétabilité	CV fidélité intermédiaire
80	0,00141	0,00025	0,00054	0,01565	0,01136	0,02	0,36	0,44
90	0,00018	0,00007	0,00010	0,00830	0,00343	0,01	0,18	0,20
100	0,00023	0,00008	0,00012	0,00918	0,003999	0,01	0,20	0,22
110	0,00073	0,00002	0,00020	0,00489	0,00883	0,01	0,10	0,21
120	0,00161	0,00004	0,00043	0,00624	0,01323	0,01	0,13	0,31

4. 7. Exactitude

Le tableau 23 ci-dessous présente l'exactitude relative calculée pour chaque niveau de concentration des standards de validation.

Tableau 23 : Résultats de calcul de l'exactitude relative

Niveaux %	série 1			série 2			série 3			Moyenne de l'exactitude relative
	Concentration introduite (mg/L)	Concentration prédite (mg/L)	Exactitude relative	Concentration prédite (mg/L)	Concentration prédite (mg/L)	Exactitude relative	Concentration prédite (mg/L)	Concentration prédite (mg/L)	Exactitude relative (%)	
80	4,38	4,39	0,17	4,39	4,35	-0,91	4,39	4,34	-1,11	-0,61836578
	4,39	4,37	-0,27	4,39	4,35	-0,90	4,39	4,34	-1,10	-0,75662005
	4,38	4,38	-0,02	4,38	4,39	0,12	4,38	4,33	-1,09	-0,33108555
90	4,50	4,50	0,06	4,50	4,49	-0,27	4,50	4,49	-0,33	-0,17790304
	4,50	4,49	-0,24	4,50	4,50	0,09	4,50	4,49	-0,19	-0,11606613
	4,50	4,49	-0,22	4,51	4,49	-0,29	4,52	4,47	-1,01	-0,50890031
100	4,60	4,60	-0,09	4,61	4,60	-0,15	4,61	4,57	-0,66	-0,29926643
	4,61	4,60	-0,22	4,60	4,61	0,09	4,61	4,60	-0,11	-0,08175711
	4,61	4,59	-0,44	4,60	4,61	0,13	4,60	4,60	-0,11	-0,14181281
110	4,70	4,70	-0,15	4,70	4,71	0,13	4,70	4,73	0,69	0,22230511
	4,71	4,71	0,01	4,70	4,71	0,14	4,70	4,73	0,68	0,276990647
	4,70	4,71	0,25	4,70	4,70	0,14	4,70	4,73	0,60	0,329446834
120	4,79	4,78	-0,22	4,79	4,80	0,34	4,79	4,83	0,83	0,318751675
	4,79	4,78	-0,19	4,79	4,80	0,33	4,80	4,81	0,27	0,135975368
	4,79	4,76	-0,48	4,79	4,80	0,32	4,79	4,82	0,64	0,161512837

4. 8. Erreur totale et profil d'erreur totale

L'erreur totale et l'erreur totale relative calculées pour chaque niveau de concentration sont présentées dans le tableau 26 suivant :

Le tableau ci-dessous représente le calcul de l'erreur totale relative pour chaque niveau de concentration théorique :

Tableau 24: Calcul de l'erreur totale pour chaque niveau de concentration des standards de validation

Niveaux %	Erreur totale absolue	erreur totale relative	Erreur maximale observée
80	0,04	1,010	0,17
90	0,02	0,468	0,09
100	0,02	0,392	0,13
110	0,02	0,491	0,69
120	0,02	0,511	0,83

4. 9. Intervalle de tolérance

Les limites de tolérance sont calculées pour chaque niveau de concentration, les résultats obtenus sont résumés dans le tableau 25 ci-dessous :

Tableau 25 : Calcul des limites de tolérance pour chaque niveau de concentration j.

Niveaux %	R_j	B_j	V	Q_t	Limite de tolérance inférieure	Limite de tolérance supérieure
80	0,53	0,54	6,38	2,41	-2,20	1,06
90	0,17	0,63	10,86	2,20	-1,27	0,74
100	0,19	0,62	10,43	2,22	-1,23	0,88
110	3,26	0,44	2,89	3,25	-1,25	1,80
120	4,50	0,42	2,66	3,43	-1,71	2,12

4. 10. Profil d'exactitude

Parmi les différents modèles, nous avons opté pour le modèle logarithme népérien qui est illustré par le profil d'exactitude indiqué dans la figure 10 suivante:

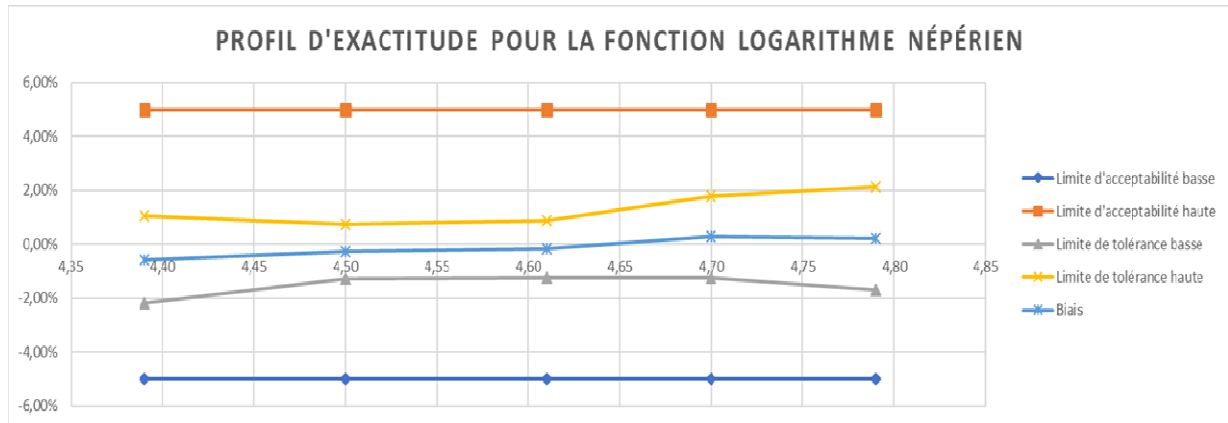


Figure 9 : Profil d'exactitude

4. 11. Linéarité

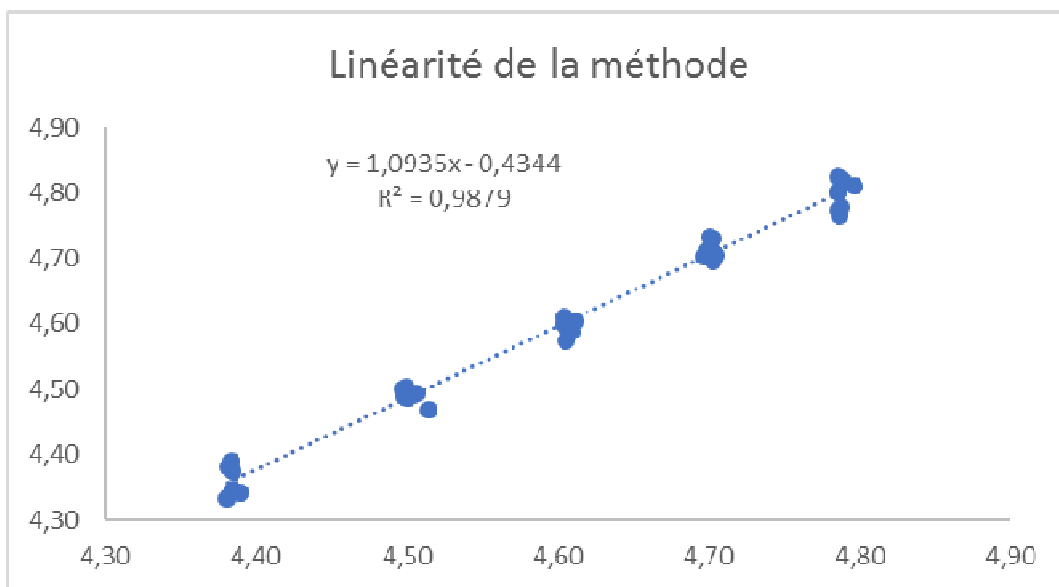


Figure 10 : Droite de régression linéaire entre les quantités prédites et les quantités introduites.

4. 12. Intervalles de dosage acceptés

Selon les profils d'exactitude des modèles adéquats représentés précédemment, aucune concentration ne sort de l'intervalle de tolérance, donc nous pouvons considérer l'intervalle de dosage est l'intervalle compris entre les limites de tolérance inférieure et supérieure où la procédure analytique atteint l'exactitude souhaitée.

Limite de dosage inférieure (Unit) = 80 mg/ml.

Limite de dosage supérieure (Unit) = 120 mg/ml.

5. Discussion

5.1. Spécificité

Tableau 26 : Comparaison des deux pentes

Les pentes sont-elles comparable avec 0 ?	t calculé	1,15326738	Pas d'effet matrice
	t° (0,05, 21)	2,079613845	
	Condition	t calculé < t° (0,05, 21)	
	Résultat	VRAI	

Les ordonnées à l'origine sont-elles comparable avec 0 ?	t calculé	0,849804919	Pas d'erreur systématique
	t° (0,05, 21)	2,07961384	
	Condition	t calculé < t° (0,05, 21)	
	Résultat	VRAI	

On peut dire qu'avec un risque de 5%, l'absence d'effet matrice et d'erreur systématique est confirmée donc statistiquement la méthode est spécifique.

5. 2. Choix de la fonction de réponse

D'après les profils d'exactitude élucidés dans le tableau 20 est les intervalles de validité de la méthode qui en découlent pour chaque modèle simulé et validé.

On constate que le modèle de la fonction logarithme népérien avec l'équation $Ln y = f(Ln x)$: $Ln y = Ln(1,0935 x) + 0,8338$ a donné l'erreur totale la plus serrée autour de 0, ce qui nous permis de le sélectionner comme le modèle qui convient le plus à notre méthode de dosage.

5. 3. Profil d'exactitude

En se référant au profil d'exactitude élucidé dans la figure 9, on considère que la méthode présenté dans ce présent travail est valide pour l'intervalle de dosage où le profil d'exactitude est compris dans les limites d'acceptation de $\pm 5\%$, et

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 avoir des résultats non fiables.

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

5. 4. Intervalle de dosage

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

La limite de quantification inférieure est de 80 mg/l.

La limite de quantification supérieure est de 120 mg/l.

La méthode est tenue pour valide dans l'intervalle [80 mg/l ; 120 mg/l].

5. 5. Linéarité

La linéarité de la méthode est démontrée par corrélation des résultats obtenus (masses prédites) à des masses réellement introduites du paracétamol dans les gammes des SV. La droite de régression obtenue présente une équation : $y = 1,0935x - 0,4344$ avec

- un coefficient de corrélation ($R^2=0,9879$).
- Une pente significativement différente de zéro donc il existe une relation linéaire. De plus elle est comparable à 1 au risque 5% ($a = 1,0935$) ;
- Une ordonnée à l'origine comparable à zéro au risque 5% ($b = 0,4344$). Ce qui nous amène à conclure que la linéarité de la méthode de dosage est validée.

Conclusion

La méthode de dosage du paracétamol dans les comprimés de 500mg par HPLC développée dans le présent travail s'est révélée exacte et valide dans l'intervalle de dosage [80mg ; 120mg] au risque 5%.

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

La finalité de notre étude a été de valider une méthode de dosage du paracétamol dans des comprimés de 500mg, et ce par Chromatographie Liquide à Haute Performance en utilisant le profil d'exactitude et l'intervalle de tolérance comme outil de décision de la validation : démarche harmonisée proposée par une commission de la SFSTP publiée en 2006 dans la revue STP Pharma Pratique qui consiste à évaluer l'exactitude d'une manière globale au lieu de mesurer les critères statistiques séparément.

Selon les résultats obtenus la méthode de dosage du paracétamol dans les comprimés de 500mg par Chromatographie Liquide à Haute Performance est jugé valide il peut être utilisé en routine par les laboratoires de contrôle qualité pharmaceutique en toute confiance.

Références bibliographiques

- [1] Pierre-Yves Tremblay, B. Sc. Toxicologie clinique Historique de l'acétaminophène INSPQ - Institut national de santé publique du Québec.
- [2] DRIAD Yacine. 2009. Stabilité du paracétamol: Application à un sachet produit en industrie pharmaceutique. Doctorat : Pharmacie: Université Henri Poincare – Nancy 1.
- [3] JOUET Laëtitia. 2014. Toxicité du paracétamol : résultats d'une étude multicentrique relative aux intoxications volontaires au paracétamol dans les SAU adultes français. Doctorat: Pharmacie : Université Angers.
- [4] Pharmacopée Européenne. Edition 7.
- [5] Pharmacopée Européenne. Edition 8.
- [6] Vidal. Edition 2011.
- [7] MICHAUT Anaïs. 2015. Mise au point d'un modèle cellulaire de stéatose hépatique liée à l'obésité: Application à l'étude de la toxicité du paracétamol. Doctorat : Biologie et Sciences de la Santé : Université de Rennes 1
- [8] BEAULIEU P, ESCHALIER A. La douleur : Guide pharmacologique et thérapeutique. Page 51.
- [9] Code of Federal Regulations – Parts 210 and 211, FDA, <http://www.fda.gov/cder/dmpq/cgmpregs.htm>, 2 janvier 2004.
- [10] La réglementation des médicaments dans l'union européenne vol.4 bonne pratique de fabrication .médicament à usage humains et médicament vétérinaire édition 1998.
- [11] NF EN ISO 17025 (2005) Prescriptions générales concernant la compétence des laboratoires d'étalonnage et d'essais, ISO, Genève.
- [12] PINGUET Isabelle. 2015. Validation analytique : application de la procédure SFSTP 2003-2006 au domaine de la phytothérapie. Doctorat : Pharmacie : Bordeaux.
- [13] Caporal-Gautier J., Nivet J.M., Algranti P., et al. Guide de validation analytique. Rapport d'une commission SFSTP, Partie I: Méthodologie. STP Pharma Pratiques, 1992, 2, 4, 205-226.
- [14] Caporal-Gautier J., Nivet J.M., Algranti P., et al. 1992. Guide de validation analytique. Rapport d'une commission SFSTP, Partie II : Exemples d'application. STP Pharma Pratiques, 2, 4, 227-239.

- [15]Hubert Ph., Nguyen-Huu J.J., Boulanger E., Chapuzet E., et al. 2003. Validation des procédures analytiques quantitatives : Harmonisation des démarches.STP Pharma Pratiques, STP PHARMA PRATIQUES, 13, 3, 101-138.
- [16]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. STP Pharma Pratique, 16, 1, 28-58.
- [17]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 –Exemple d’application. STP Pharma Pratique, 16, 2, 87-121.
- [18]KAOUNI Hassania.2010 Etude Comparative de la Validation d’une Méthode de Dosage d’AmlodipineBesilate dans une Spécialité Pharmaceutique par HPLC/UV. Doctorat : Pharmacie : Université Mohammed V -Rabat-
- [19]<http://apps.who.int/medicinedocs/fr/d/Jh1814f/5.2.html#Jh1814f.5.2>
- [20] Guide de validation des méthodes d’analyses. ANSES Agence Nationale de Sécurité Sanitaire Alimentaire, Environnement, Travail.
- [21] FEINBERG M. 2013. Validation des méthodes d'analyse quantitatives au moyen du profil d'exactitude. Techniques de l’Ingénieur l’expertise technique et scientifique de référence, page 224.
- [22]HPLC Principe et appareillage. 2010.Extract of Biotechnologie & Biologie et Physiopathologie humaine - Académie de Rouen

ANNEXES



La chromatographie est une méthode physique permet la séparation ou la purification d'un ou de plusieurs composés d'un mélange en vue de leur identification et de leur quantification. Il existe trois types de chromatographie : chromatographie en phase gazeuse, chromatographie sur couche mince et chromatographie en phase liquide.

La chromatographie en phase liquide a permis de réaliser des analyses qui n'étaient auparavant pas possible avec les techniques sur couche mince ou en phase gazeuse.

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

1. Principe

La chromatographie liquide haute performance est une méthode d'analyse physicochimique qui sépare les constituants d'un mélange par entraînement au moyen d'une phase mobile liquide le long d'une phase stationnaire, grâce à la répartition sélective des solutés entre ces deux phases.

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

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

Le mélange à analyser est injecté puis transporté au travers du système chromatographique. Les composés en solution se répartissent alors suivant leur affinité entre la phase mobile et la phase stationnaire.

En sortie de colonne grâce à un détecteur approprié les différents solutés sont caractérisés par un pic. L'ensemble des pics enregistrés est appelé chromatogramme. [22]

2. Appareillage

Une installation HPLC comporte divers modules. Ces modules sont reliés entre eux par l'intermédiaire de canalisations de très faible diamètre interne (0.1mm) pour permettre l'écoulement de la phase mobile. Elles peuvent être en acier inoxydable ou en PEEK (polyether-etherketone). [22]

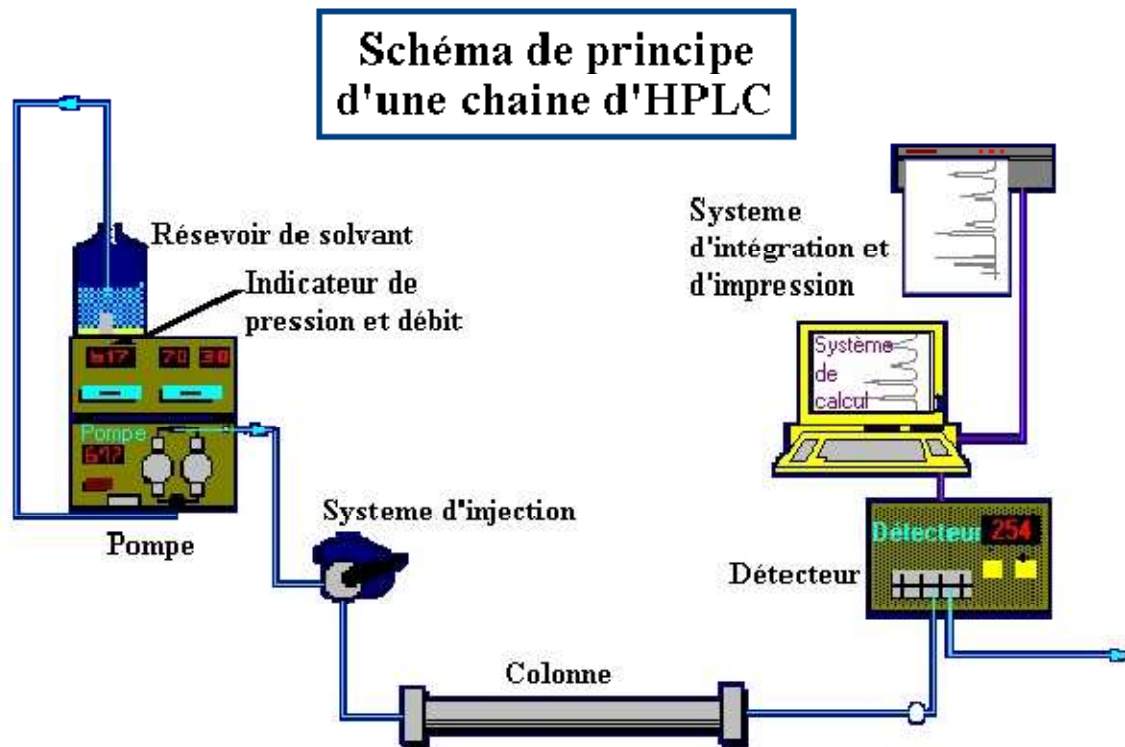


Figure 11 : schéma des principaux modules d'une chaîne HPLC

La phase mobile est pompée à partir d'une bouteille et parcourt en permanence le chromatographe : l'injecteur, la colonne dans le four et le détecteur. La température du four est maintenue constante. Le signal du détecteur est amplifié et enregistré.

2. 1. Réservoir de la phase mobile : La phase mobile est pompée à partir d'une bouteille et parcourt en permanence le chromatographe : l'injecteur, la colonne dans le four et le détecteur. La température du four est maintenue constante. Le signal du détecteur est amplifié et enregistré. Le plus souvent ce réservoir est une bouteille en verre dans lequel plonge un tube avec une extrémité filtrante en téflon. S'il est nécessaire le dégazage peut se faire par agitation puis conservation du solvant sous atmosphère d'hélium.

2. 2. Pompe : Elle délivre en continu la phase mobile. Elle est définie par la pression qu'elle permet d'atteindre dans la colonne, son débit, et la stabilité du flux. Actuellement les paramètres d'une pompe sont

- débit : 0,01 à 10 mL/min
- stabilité < 1% (<0,2% pour des chromatographies d'exclusion diffusion)
- pression maximale > 350 bars

Certaines sont pilotées par informatique (bien utile lors de l'utilisation de gradient d'élution).

2. 3. Injecteur : Le type d'injecteur le plus couramment utilisé comporte une vanne à boucle d'échantillonnage d'une capacité fixe (10, 20, 50 μL ...). Cette boucle permet d'introduire l'échantillon sans modifier la pression dans la colonne.

Vanne à boucle d'échantillonnage. Elle possède 2 positions. La première permet le remplissage de la boucle d'injection de volume fixe (load), la seconde permet la mise en circulation de l'échantillon dans le système chromatographique (inject). Le remplissage de la boucle d'injection se fait à l'aide d'une seringue.

2. 4. Colonne : En mode analytique, les colonnes en inox ont généralement un diamètre interne de 4,6mm. La longueur est de 5, 10, 15, ou 25cm. Le remplissage (en silice, silice greffée ou particules polymériques) a une granulométrie de 3, 5, ou 10 μm . Le diamètre interne d'une colonne est usuellement de 4 ou 4,6 mm. Si des substances pures doivent être collectées en fin de chromatogramme des colonnes de gros diamètre seront nécessaires.

2. 5. Détecteurs : Le détecteur suit en continu l'apparition des solutés. Pour détecter, on utilise différents phénomènes physico-chimiques. Le signal obtenu est enregistré en fonction du temps.

Le détecteur le plus utilisé en HPLC est un spectrophotomètre d'absorption UV-visible (190-600 nm) relié à la sortie de colonne.

Il existe d'autres détecteurs :

- réfractomètre différentiel
- UV à barrette de diodes
- électrochimique
- fluorimétrie...

Ainsi que différents types de couplage :

- Spectrométrie infrarouge
- Spectrométrie de masse
- Résonance Magnétique Nucléaire...

2. 6. Intégrateur : Il s'agit d'un petit ordinateur qui récupère les données issues du détecteur, trace les chromatogrammes et intègre la surface des pics.

La chromatographie est une méthode de séparation utilisée en vue d'un dosage. Une intégration consiste à mesurer la surface sous un pic mais avant tout chercher à séparer correctement les pics avant de les intégrer.

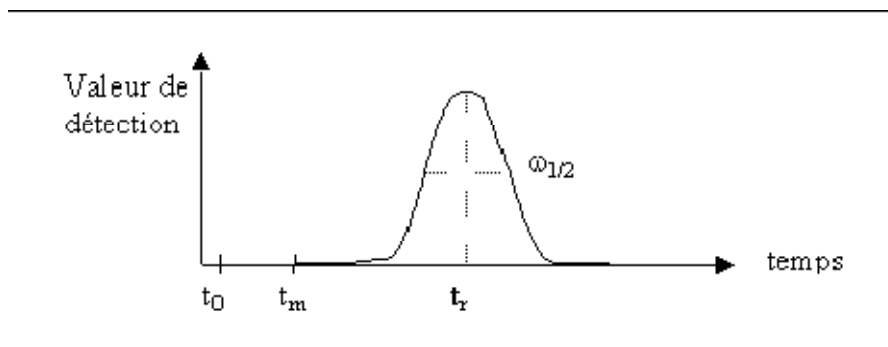
La détection d'un pic chromatographique par l'intégrateur, dépend de 2 paramètres :

- la largeur attendue des pics
- le seuil d'intégration (sensibilité)

La largeur de pic est à peu près prévisible en fonctions de la technique d'analyse et des conditions opératoires. Elle détermine la fréquence d'échantillonnage du signal. Le pic est alors découpé en tranches. Le seuil d'intégration est la valeur du signal à partir de laquelle le calculateur repère un début de pic. [22]

3. Notions fondamentales : La phase stationnaire est un support plus ou moins poreux recouvert d'un gel (liquide greffé) qui a les propriétés désirées pour retenir les molécules de solutés. La phase mobile ou éluant est un liquide qui entraîne les solutés à travers la colonne.

3. 1. Notion de temps :



- t_0 : est le temps du début de l'injection ;

- t_m : 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 : temps de rétention est le temps mis par un soluté pour traverser la colonne. C'est le temps passé dans la phase stationnaire et dans le volume mort de la colonne. Ce temps est caractéristique d'un soluté dans des conditions d'analyse donnée. La surface du pic est fonction de la quantité du constituant dont il est la trace.

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

$$t'_r = t_r - t_m$$

- $\omega_{1/2}$: la largeur du pic ; mesurée à mi-hauteur : exprimée en unité de temps ;

- $\omega_{1/2}$ ou δ : La largeur du pic à la base exprimée en unité de temps : déterminée par l'intersection des tangentes au point d'inflexion à la courbe gaussienne et de la ligne de base ;

- h : la hauteur du pic ;

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

Avec :

y_i est l'air du pic pour l'injection i donné par l'intégration du pic ;

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

On peut calculer l'écart type relatif en pourcentage : $\%RSD=100\sigma/Y'$

3.2. Notion de concentration

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

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

Ce coefficient est fonction de 3 types d'affinités :

- Celle entre le soluté et la phase mobile ;
- Celle entre le soluté et la phase stationnaire ;
- Celle entre les phases mobile et stationnaire.
- **Le facteur de capacité K'** : est le rapport de la quantité d'un soluté dans la phase stationnaire et dans la phase mobile.

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

V_s : volume de la phase stationnaire ;

V_m : volume de la phase mobile ou volume mort ;

K' : est aussi déterminé expérimentalement par le rapport de temps de rétention réduit sur le temps mort :

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

3.3. Notion d'efficacité : La largeur d'un pic est caractéristique de l'efficacité de la séparation plus le pic est fin plus la chromatographie est efficace. L'efficacité est mesurée par :

- **le nombre de plateaux théoriques Nth** : contenus dans la colonne (nombre des opérations que subit le soluté pour traverser la colonne chromatographique). Plus N est grande plus la colonne est efficace elle est traduite par la finesse des pics obtenus. Sa détermination est réalisée pour chaque composé par la relation suivante :

$$N_{th} = 5.54 \left(\frac{t_r}{\omega_{1/2}} \right)^2 = 16 \left(\frac{t_r}{\omega} \right)^2$$

t_r : temps de rétention ;

$\omega_{1/2}$: largeur du pic à mi-hauteur ;

ω : largeur du pic à la base ;

Remarque

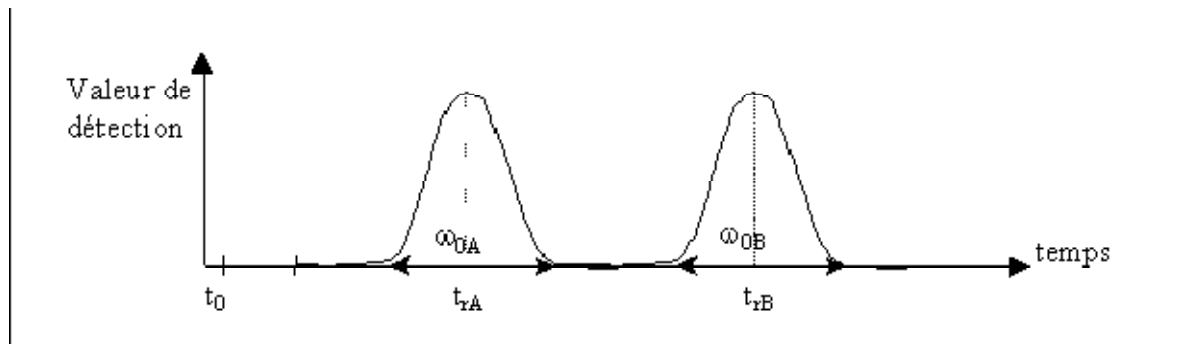
N_{th} est très utilisé en HPLC. Pourtant il serait plus judicieux d'utiliser Neff (nombre de plateaux effectifs) puisqu'il dépend vraiment du temps passé dans la phase stationnaire.

$$N_{\text{eff}} = 5.54 \left(\frac{t_r - t_m}{\omega_{1/2}} \right)^2$$

Expérimentalement t_m est difficile à déterminer d'où l'utilisation de N_{th} .

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

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



L : Longueur de la colonne

N_{th} : Nombre de plateaux théoriques

3. 4. Qualité de la séparation : La séparation entre les pics chromatographiques se base sur plusieurs critères :

- **La sélectivité (α)** : entre 2 pics A et B

Elle mesure la capacité de la colonne à séparer les maximums des pics. Plus elle est supérieure à 1, plus les temps de rétention sont éloignés.

Elle est défini comme le rapport des temps de rétention réduits.

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

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

$\alpha = 1$ pas de séparation

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

α est toujours supérieur 1 car on choisit ($t'_{rB} > t'_{rA}$). Par convention, on choisit toujours les pics pour que l'on ait un α supérieur à 1.

- **La résolution (R)**

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

$$R = \frac{(t'_{rB} - t'_{rA})}{(\omega_{0B} + \omega_{0A})}$$

$R < 1$: mauvaise résolution ;

$1 < R < 1,4$: résolution acceptable ;

$1,4 < R < 1,6$: résolution optimale ;

$R > 1,6$: résolution trop bonne car le temps d'analyse est rallongé.

3.5. Notion de pression :

A l'intérieur d'une colonne la phase mobile frotte sur les parois de la colonne mais aussi sur les particules de phase stationnaire. Ces frottements définissent la résistance à l'écoulement.

Les particules de phase stationnaire sont sphériques. Si l'on divise leur diamètre par 10, on diminue leur surface d'un facteur 100 et leur volume d'un facteur 1000. On peut donc placer dans la colonne 1000 fois plus de particules et donc augmenté de 10 fois la surface en contact avec la phase mobile. La résistance à l'écoulement est donc augmentée.

En conséquence, pour maintenir le débit constant dans la colonne il faut augmenter la pression plus la granulométrie de la phase stationnaire est faible.

En HPLC on travaille, en tête de colonne, à des pressions entre 20 et 150 bars. [22]

ANNEXE II
TABLES DES TESTS STATISTIQUES DE LA
VALIDATION

TABLE DE STUDENT

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

Exemple : avec $ddl = 10$, pour $t = 2,223$, la probabilité est $\alpha = 0,05$

α ddl	0,90	0,50	0,30	0,20	0,10	0,05	0,02	0,01	0,001
1	0,158	1,000	1,963	3,078	6,314	12,706	31,821	63,656	636,578
2	0,142	0,815	1,386	1,886	2,920	4,303	6,965	9,925	31,600
3	0,137	0,765	1,250	1,638	2,353	3,182	4,541	5,841	12,924
4	0,134	0,741	1,190	1,533	2,132	2,776	3,747	4,604	8,610
5	0,132	0,727	1,156	1,476	2,015	2,571	3,365	4,032	6,869
6	0,131	0,713	1,134	1,440	1,943	2,447	3,143	3,707	5,959
7	0,130	0,711	1,119	1,415	1,895	2,365	2,998	3,499	5,408
8	0,130	0,705	1,108	1,397	1,850	2,306	2,896	3,355	5,041
9	0,129	0,703	1,100	1,383	1,833	2,262	2,821	3,250	4,781
10	0,129	0,700	1,093	1,372	1,812	2,228	2,764	3,169	4,587
11	0,129	0,697	1,088	1,363	1,796	2,201	2,718	3,106	4,437
12	0,128	0,695	1,083	1,356	1,782	2,179	2,681	3,055	4,318
13	0,128	0,694	1,079	1,350	1,771	2,160	2,650	3,012	4,221
14	0,128	0,692	1,076	1,345	1,761	2,145	2,624	2,977	4,140
15	0,128	0,691	1,074	1,341	1,753	2,131	2,602	2,947	4,073
16	0,128	0,690	1,071	1,337	1,746	2,120	2,583	2,921	4,015
17	0,128	0,689	1,069	1,333	1,740	2,110	2,567	2,898	3,965
18	0,127	0,688	1,067	1,330	1,734	2,101	2,552	2,878	3,922
19	0,127	0,688	1,066	1,328	1,729	2,093	2,539	2,861	3,883
20	0,127	0,687	1,064	1,325	1,725	2,086	2,528	2,845	3,850
21	0,127	0,686	1,063	1,323	1,721	2,080	2,518	2,831	3,819
22	0,127	0,685	1,061	1,321	1,717	2,074	2,508	2,819	3,792
23	0,127	0,685	1,060	1,319	1,714	2,069	2,500	2,807	3,768
24	0,127	0,685	1,059	1,318	1,711	2,064	2,492	2,797	3,745
25	0,127	0,684	1,058	1,316	1,708	2,060	2,485	2,787	3,725
26	0,127	0,684	1,058	1,315	1,706	2,056	2,479	2,779	3,707
27	0,127	0,684	1,057	1,314	1,703	2,052	2,473	2,771	3,689
28	0,127	0,683	1,056	1,313	1,701	2,048	2,467	2,763	3,674
29	0,127	0,683	1,055	1,311	1,699	2,045	2,462	2,756	3,660
30	0,127	0,683	1,055	1,310	1,697	2,042	2,457	2,750	3,646
40	0,126	0,681	1,050	1,303	1,684	2,021	2,423	2,704	3,551
80	0,126	0,678	1,043	1,292	1,664	1,990	2,374	2,639	3,416
120	0,126	0,677	1,041	1,289	1,658	1,980	2,358	2,617	3,373
∞	0,126	0,675	1,037	1,282	1,645	1,960	2,327	2,577	3,293



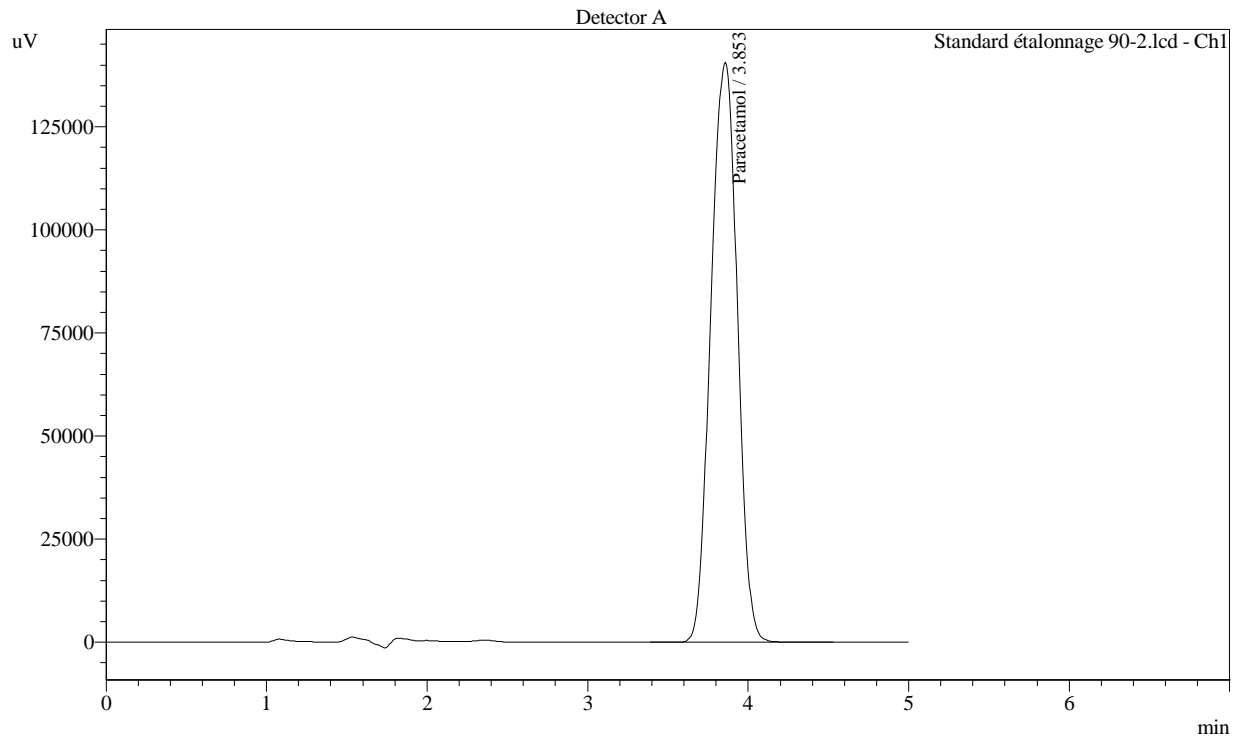
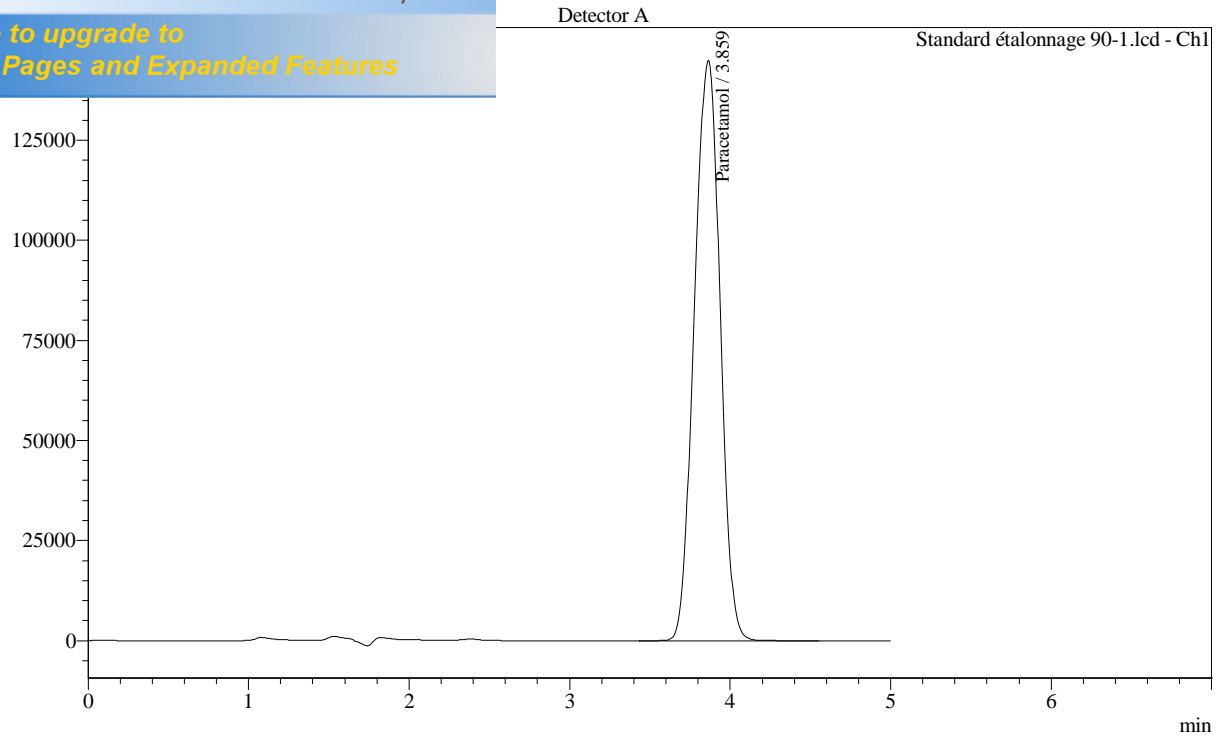
*Your complimentary
use period has ended.
Thank you for using
PDF Complete.*

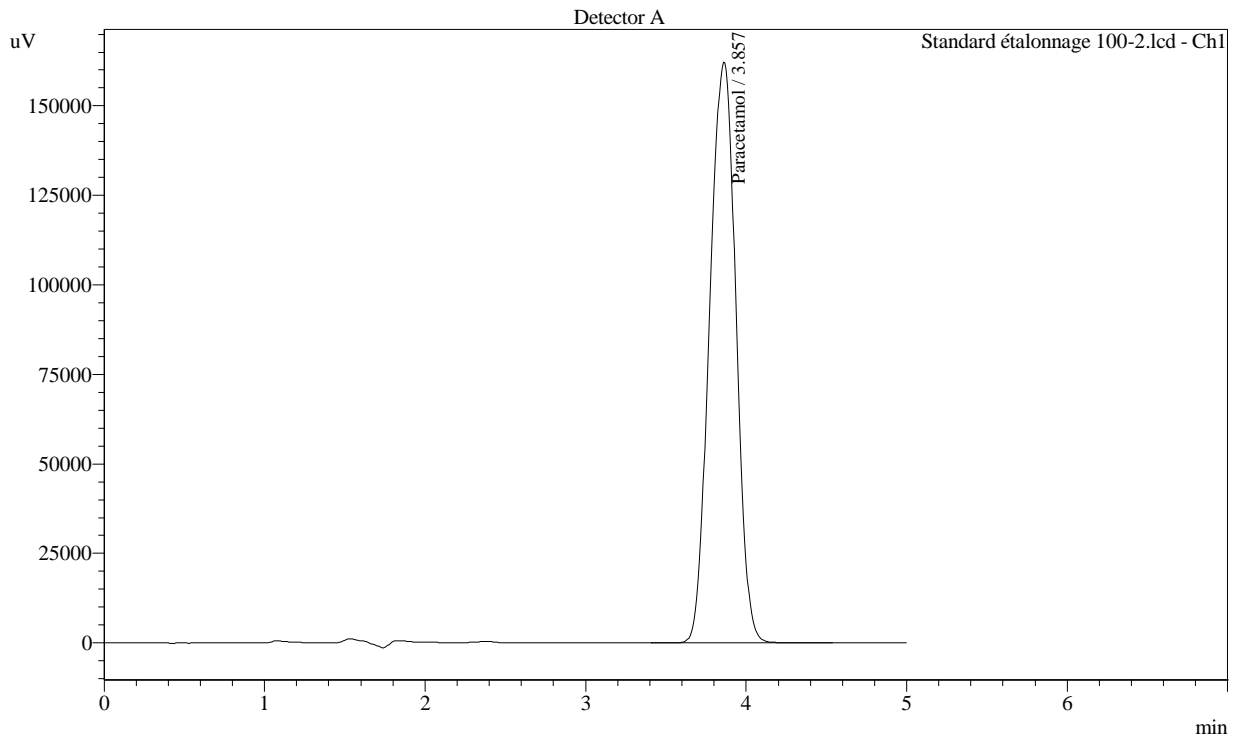
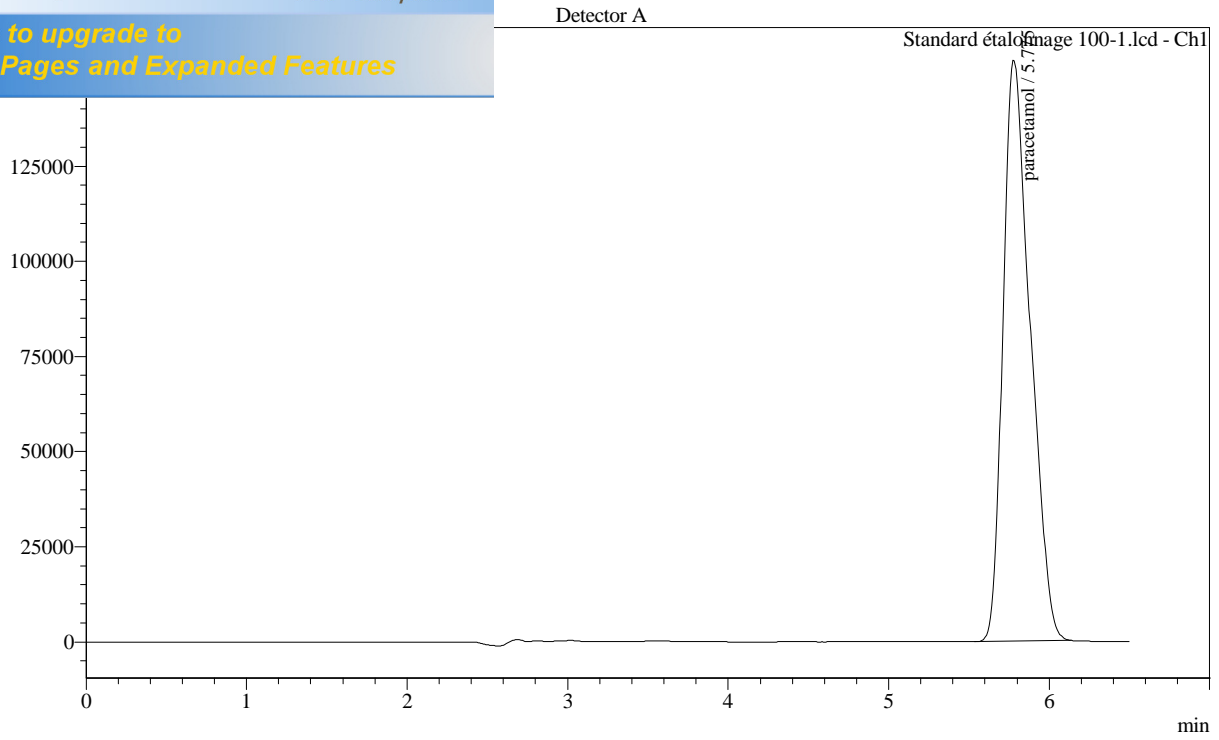
[Click Here to upgrade to
Unlimited Pages and Expanded Features](#)

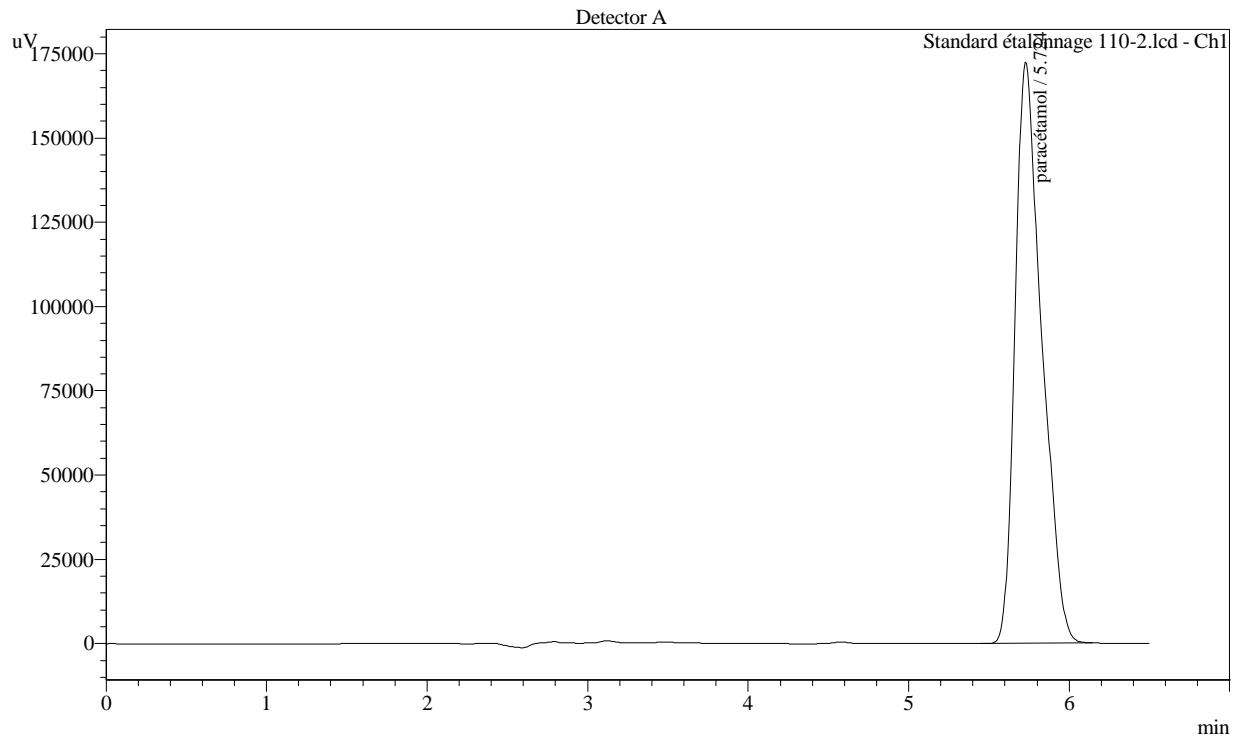
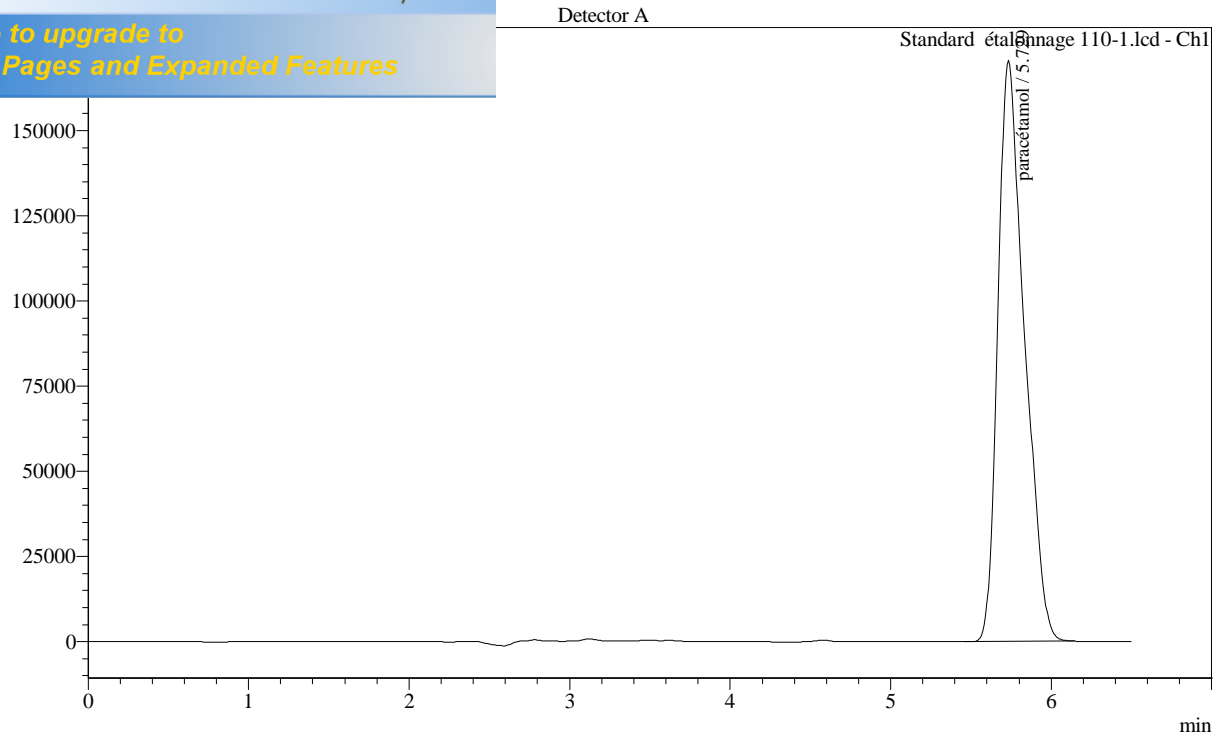
Sample Information

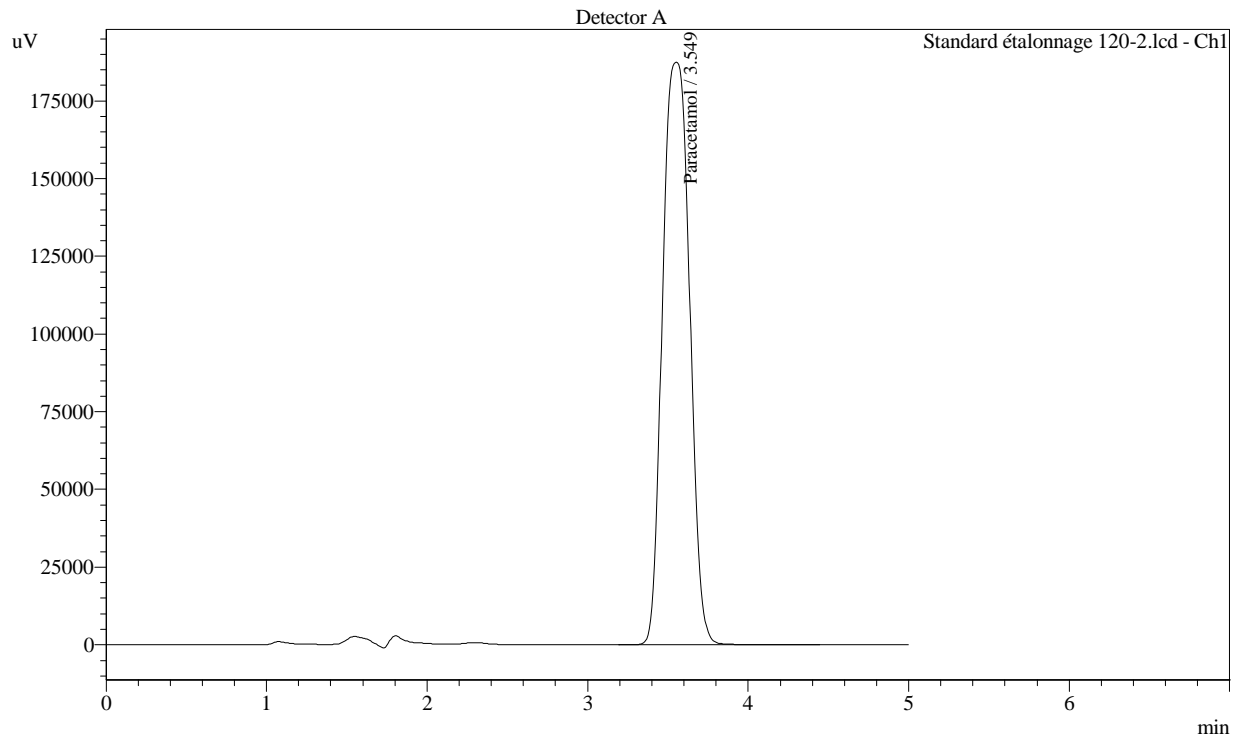
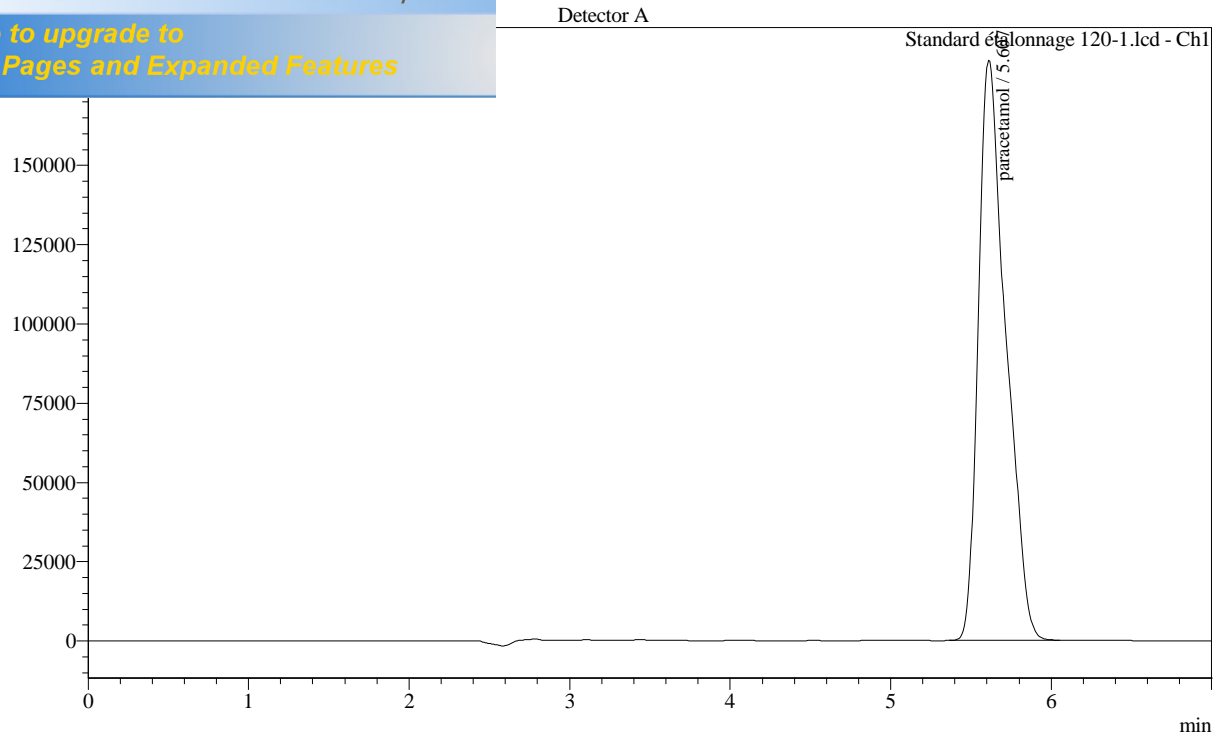
Sample Name : STD001
Sample ID : série 3
Tray# : 11
Vail# : 1
Injection Volume : 20 uL
Data Filename : Standard étalonnage 80-1.lcd
Method Filename : Paracetamol.lcm
Batch Filename : paracetamol3.lcb
Report Filename : Default.lcr
Date Acquired : 26/07/2017 14:29:47
Data Processed : 26/07/2017 16:48:44

Summary(Concentration)







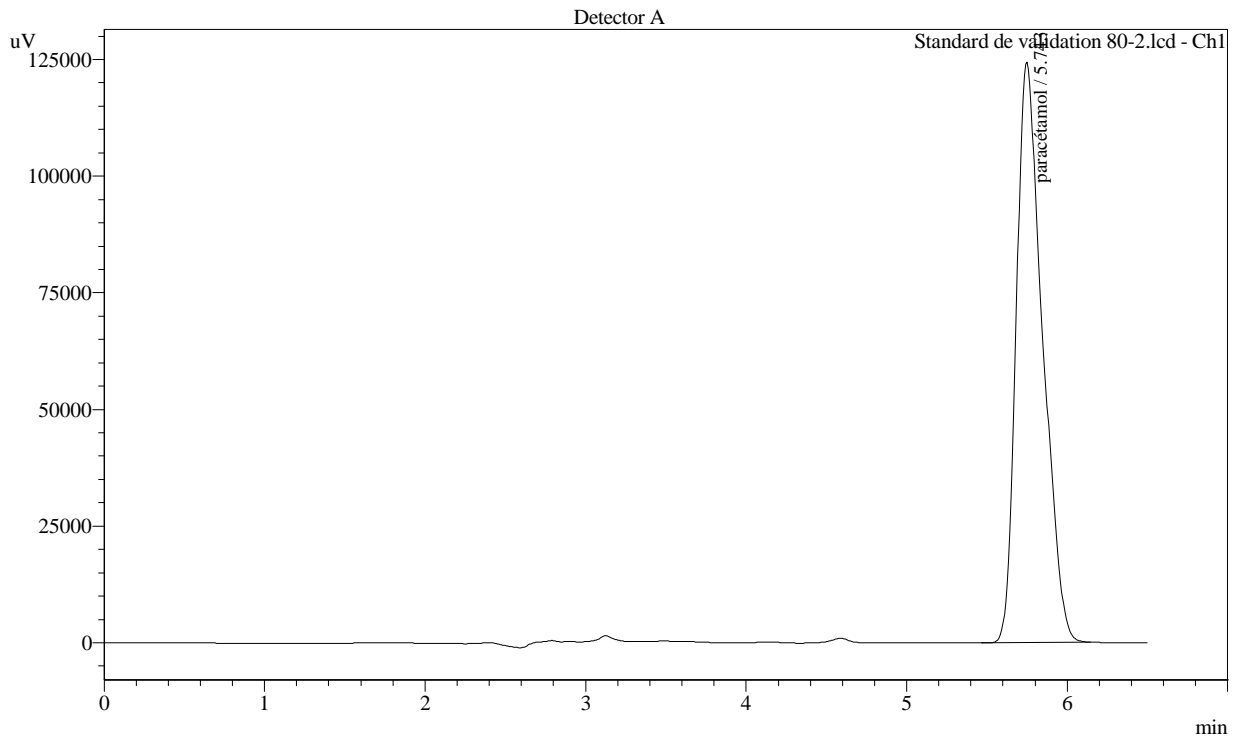
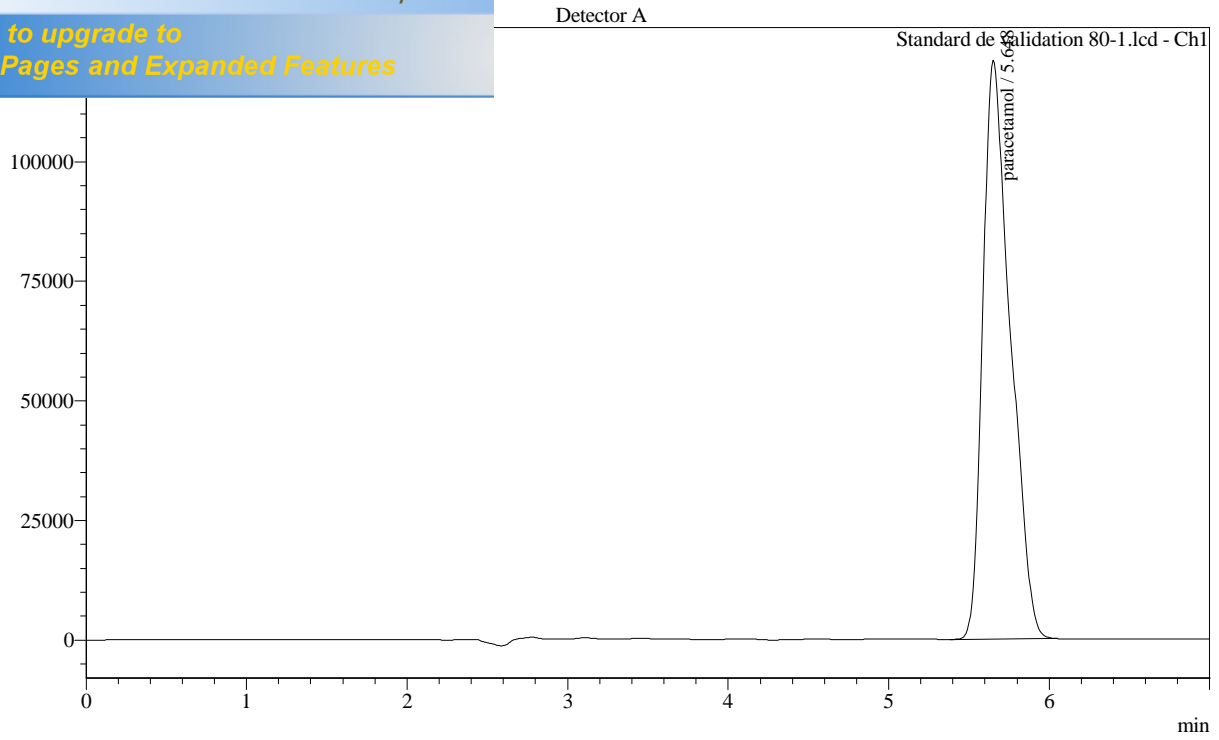


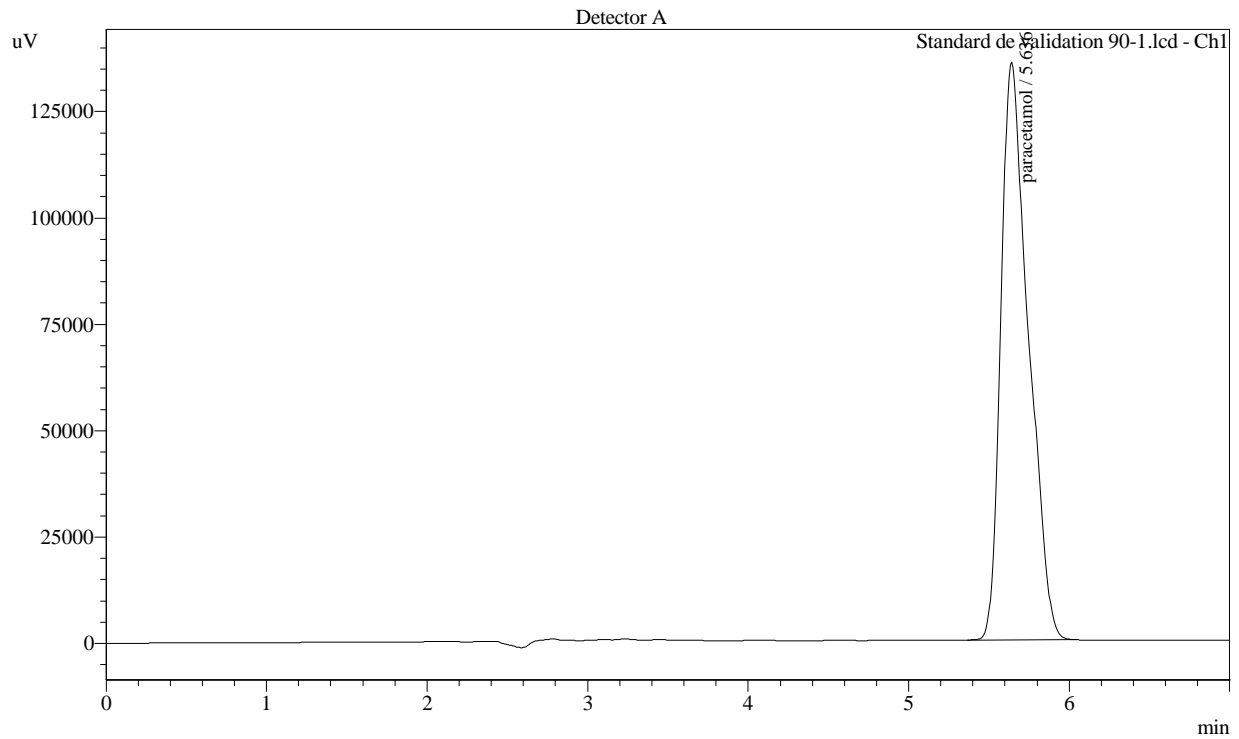
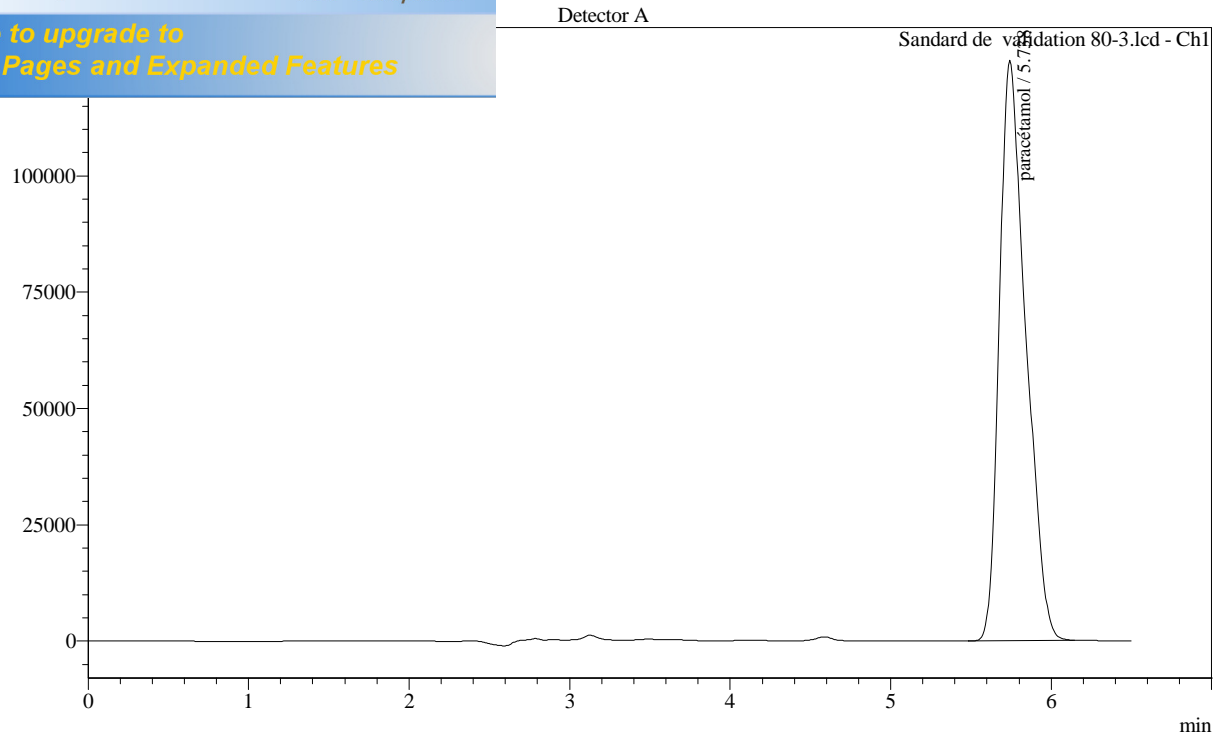


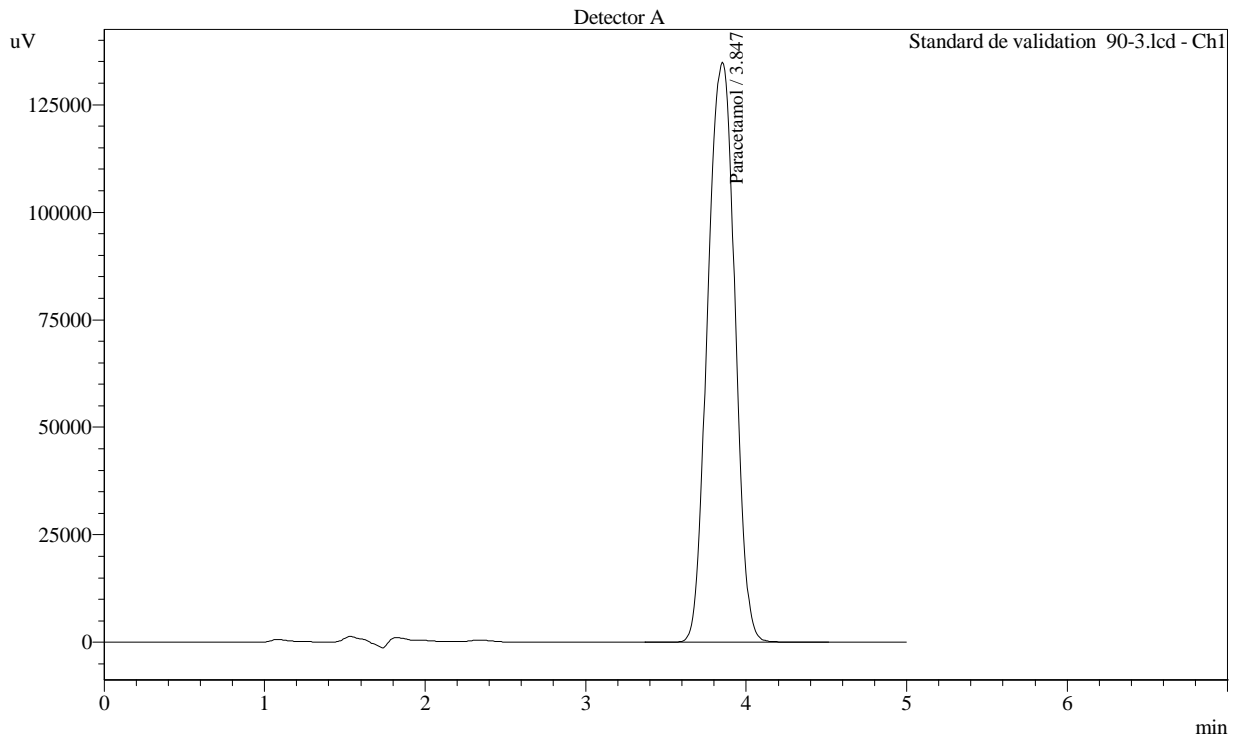
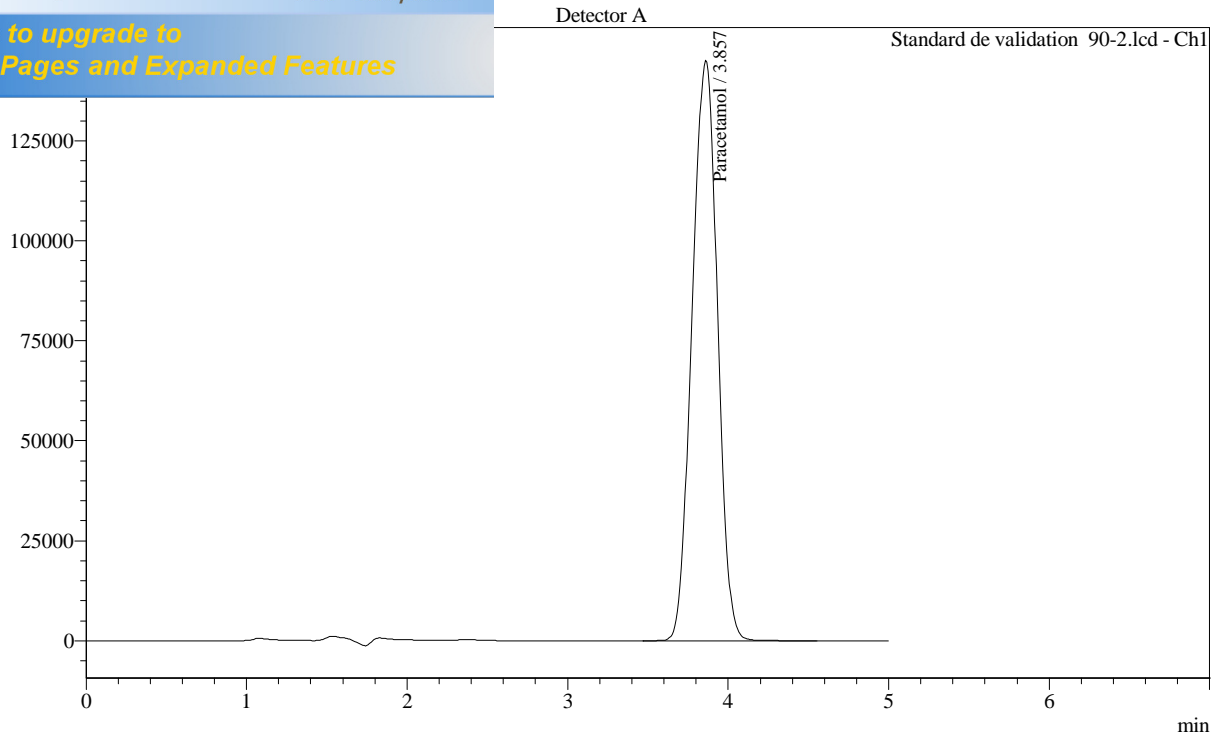
PDF Complete

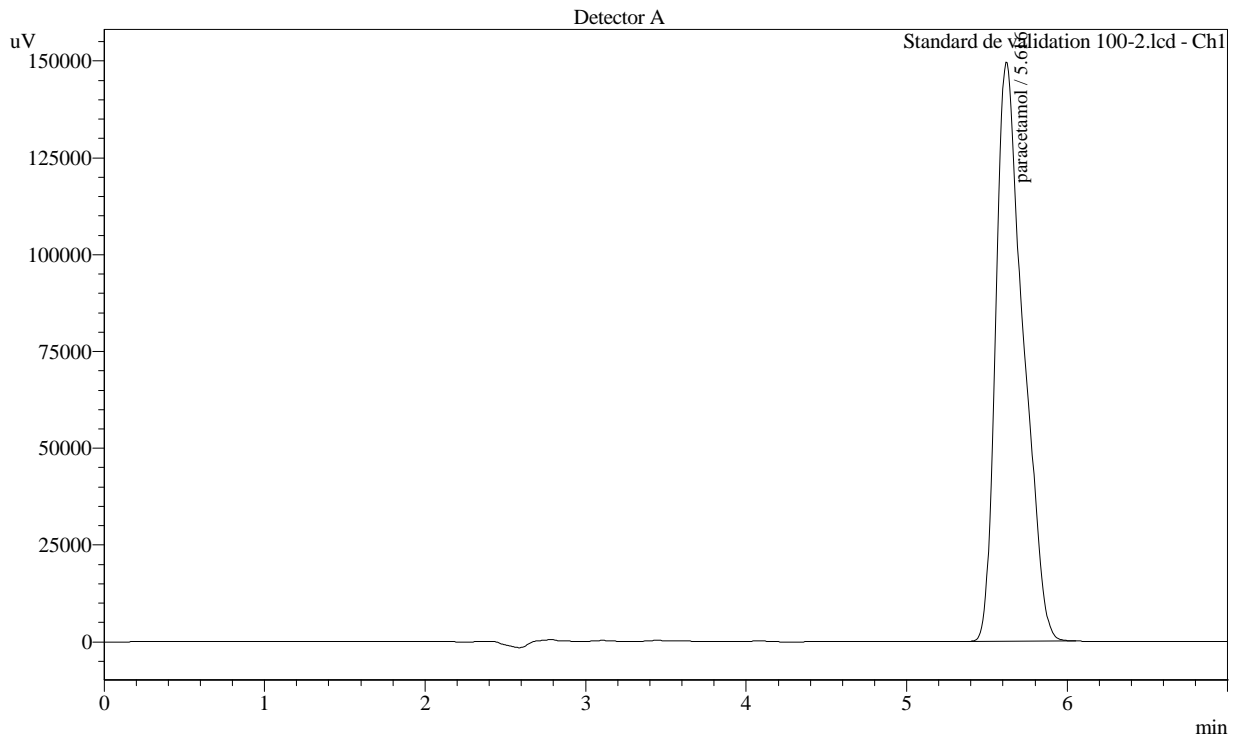
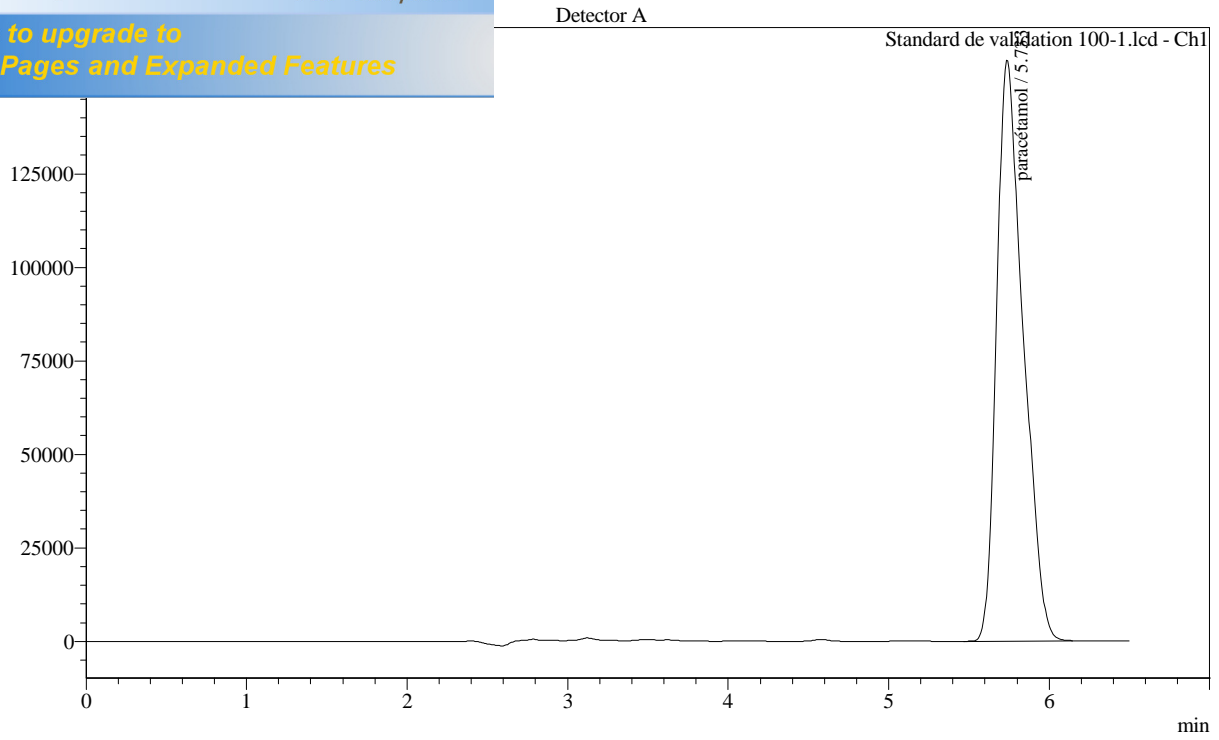
Your complimentary use period has ended.
Thank you for using PDF Complete.

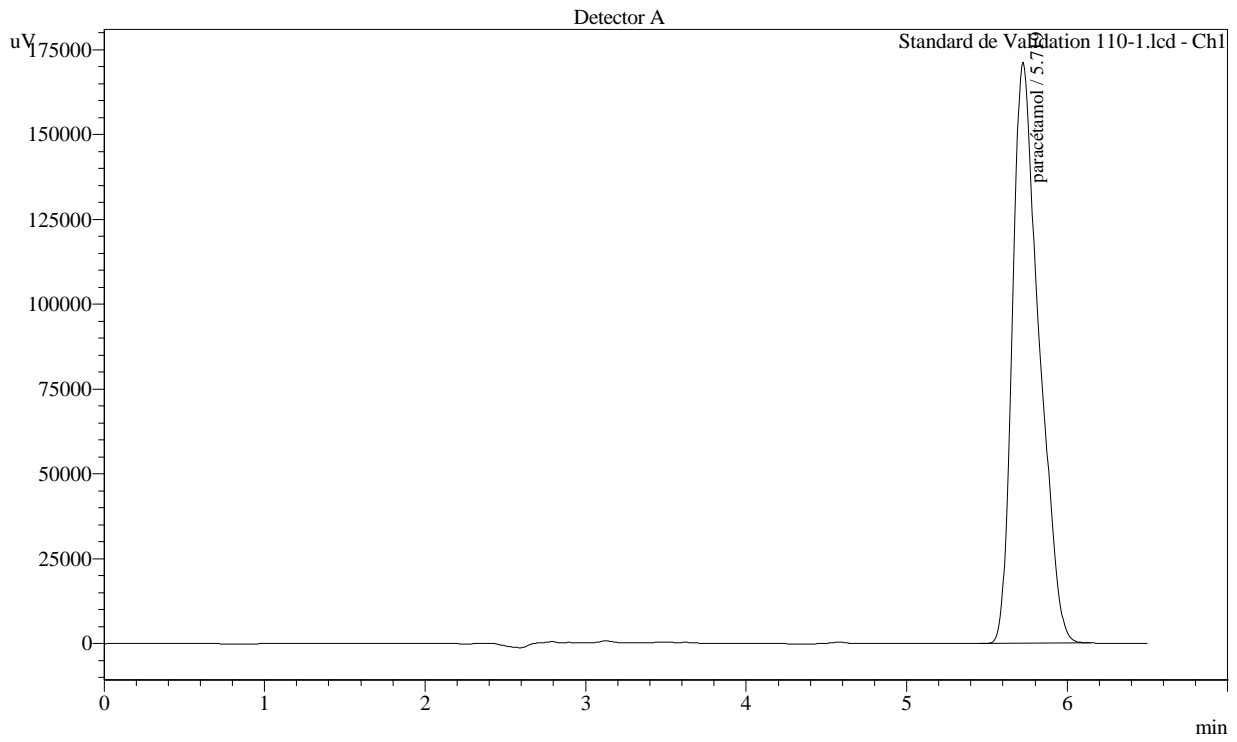
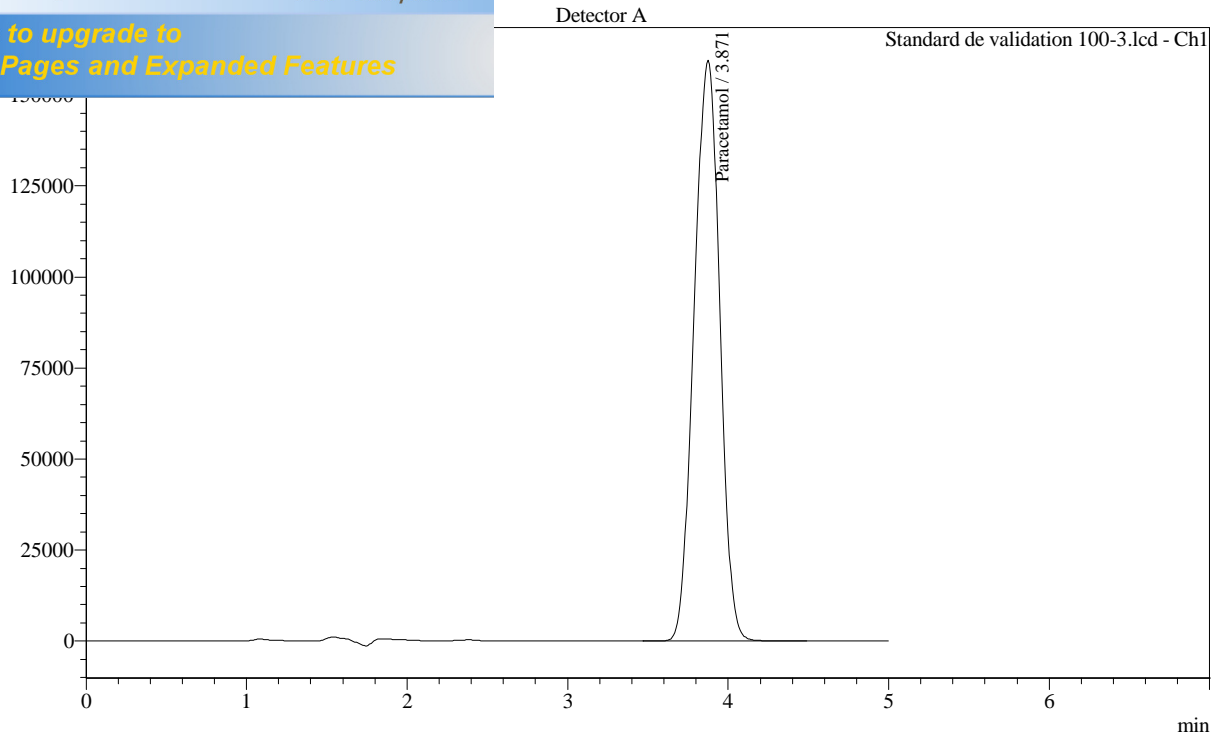
[Click Here to upgrade to Unlimited Pages and Expanded Features](#)

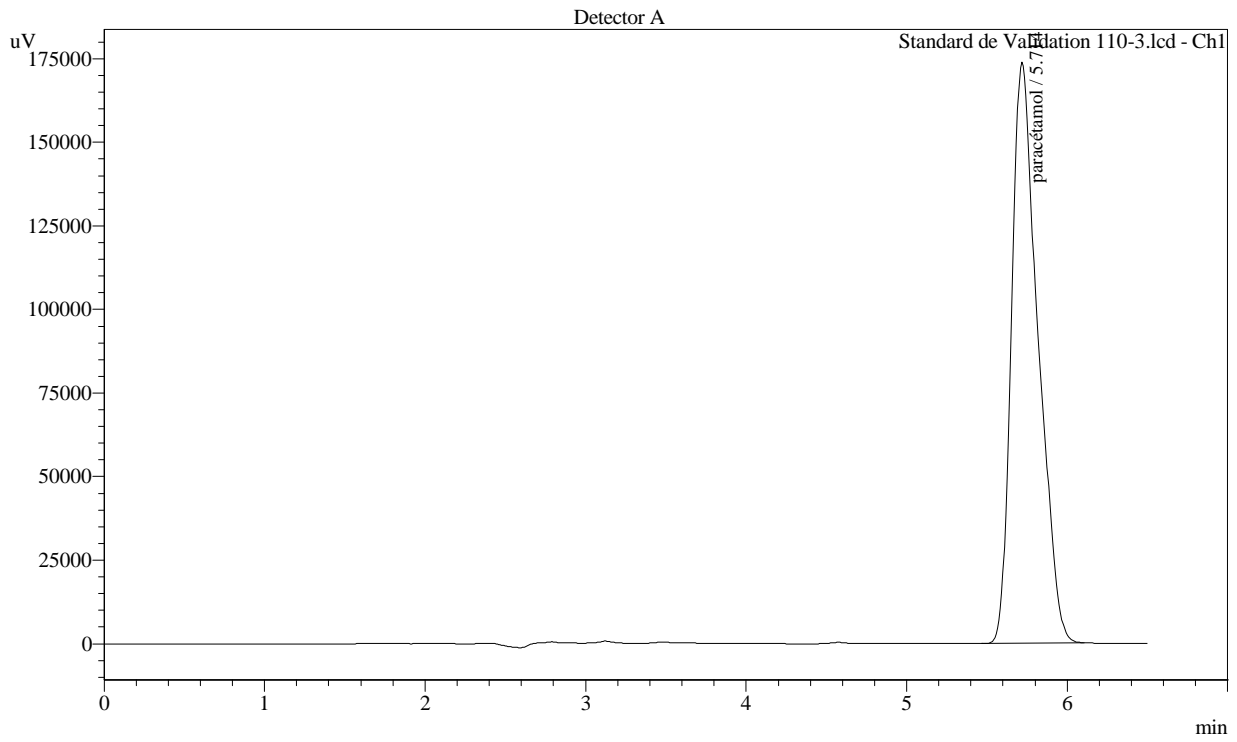
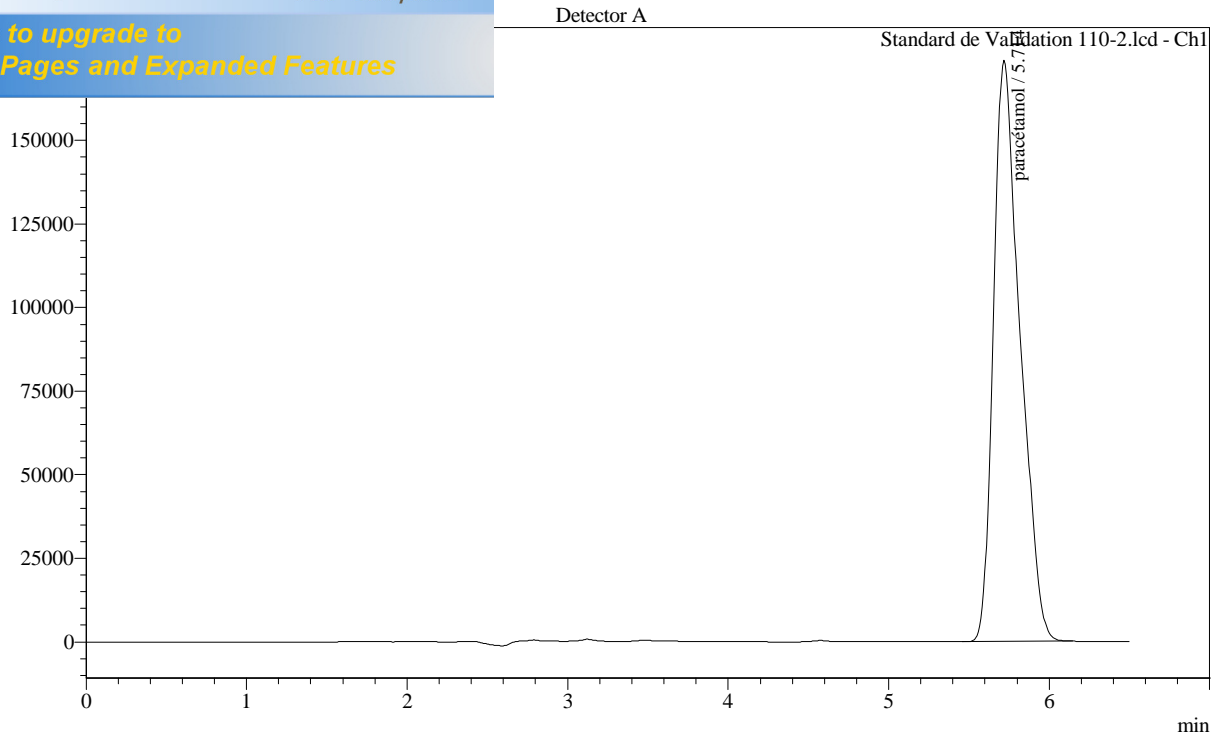


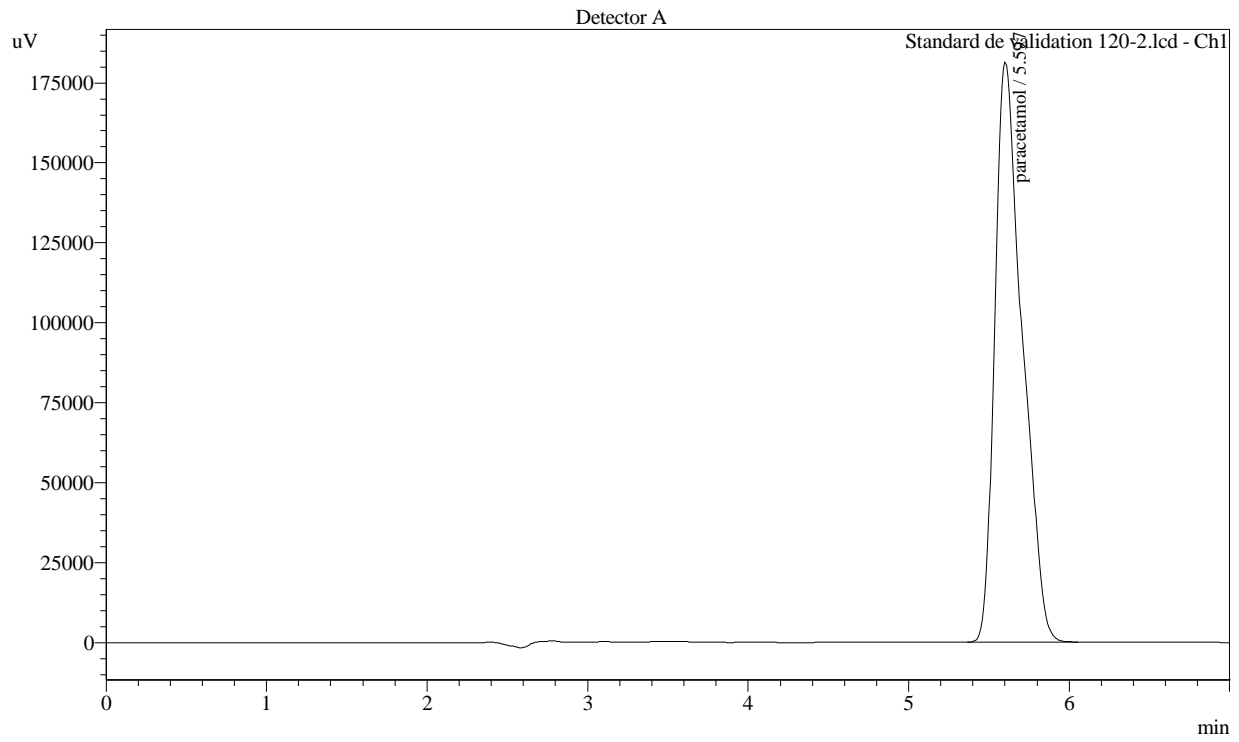
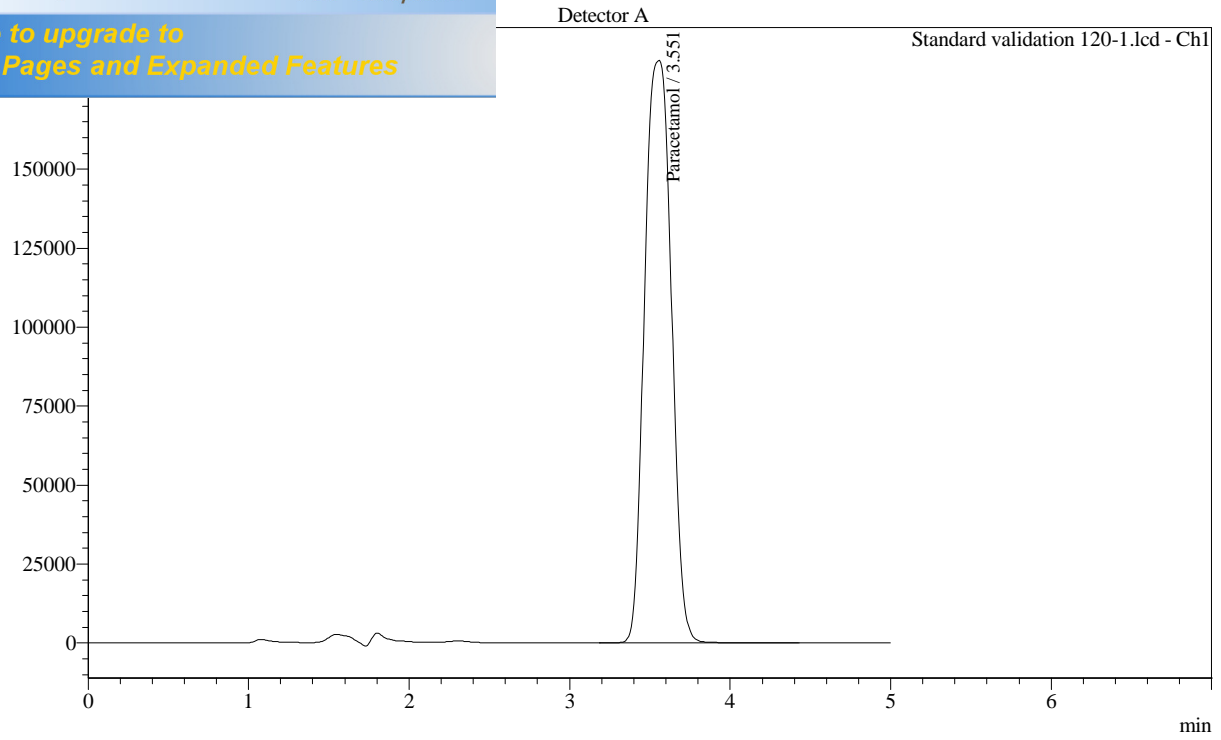






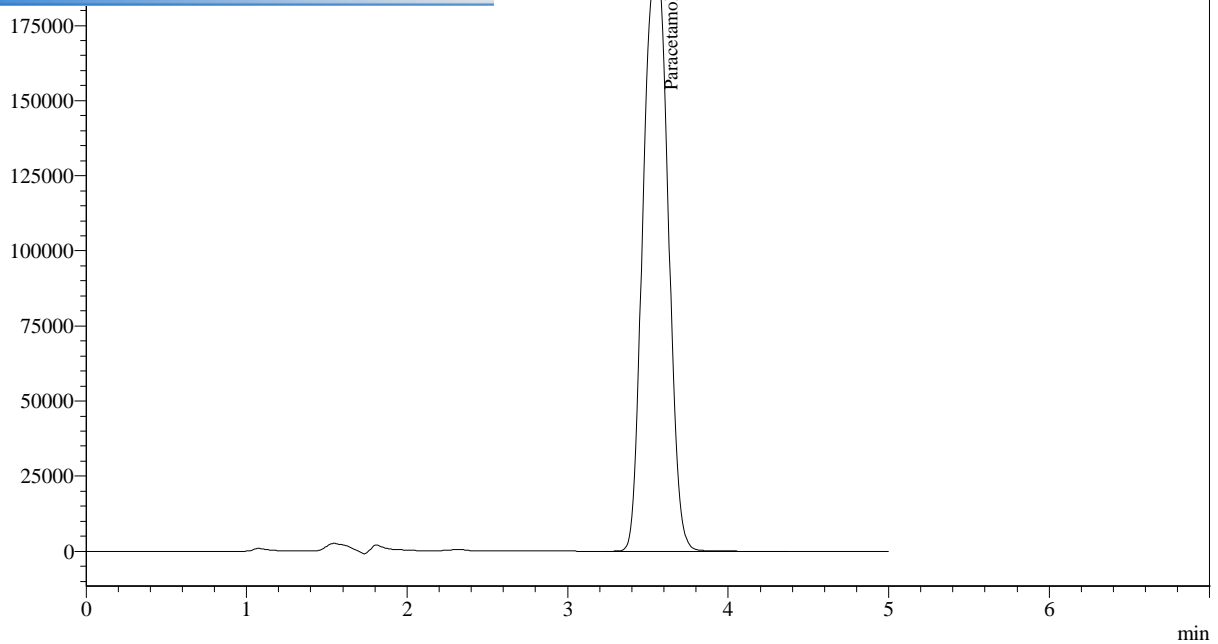






Detector A

Standard de validation 120-3.lcd - Ch1



<< Detector A >>

Title	Sample Name	Sample ID	paracetamol
Standard étalonnage 80-1.lcd	STD001	série 3	1415387
Standard étalonnage 80-2.lcd	paracétamol	Série 1	1435967
Standard étalonnage 90-1.lcd	paracétamol sér	STD	1618211
Standard étalonnage 90-2.lcd	paracétamol sér	STD	1612965
Standard étalonnage 100-1.lcd	paracétamol	Série 3	1791022
Standard étalonnage 100-2.lcd	paracétamol sér	STD	1845679
Standard étalonnage 110-1.lcd	paracétamol	Série 1	1958476
Standard étalonnage 110-2.lcd	paracétamol	Série 1	1989133
Standard étalonnage 120-1.lcd	STD009	série 3	2174748
Standard étalonnage 120-2.lcd	paracétamol sér	STD	2191095
Standard de validation 80-1.lcd	STD003	série 3	1441215
Standard de validation 80-2.lcd	paracétamol	Série 1	1415943
Standard de validation 80-3.lcd	paracétamol	Série 1	1423466
Standard de validation 90-1.lcd	STD005	série 3	1615849
Standard de validation 90-2.lcd	paracétamol sér	STD	1592945
Standard de validation 90-3.lcd	paracétamol sér	STD	1591489
Standard de validation 100-1.lcd	paracétamol	Série 1	1782632
Standard de validation 100-2.lcd	STD008	série 3	1774223
Standard de validation 100-3.lcd	paracétamol sér	STD	1770314
Standard de Validation 110-1.lcd	paracétamol	Série 1	1971616
Standard de Validation 110-2.lcd	paracétamol	Série 1	1996564
Standard de Validation 110-3.lcd	paracétamol	Série 1	1994673
Standard validation 120-1.lcd	paracétamol sér	STD	2134224
Standard de validation 120-2.lcd	STD012	série 3	2147373
Standard de validation 120-3.lcd	paracétamol sér	STD	2113879
Average			1791964
%RSD			14.766
Maximum			2191095
Minimum			1415387
Standard Deviation			264599

<< Detector B >>

Title	Sample Name	Sample ID	TYR	PHE	EI
Standard étalonnage 80-1.lcd	STD001	série 3	0	0	0
Standard étalonnage 80-2.lcd	paracétamol	Série 1	0	0	0
Standard étalonnage 90-1.lcd	paracétamol sér	STD	0	0	0
Standard étalonnage 90-2.lcd	paracétamol sér	STD	0	0	0
Standard étalonnage 100-1.lcd	paracétamol	Série 3	0	0	0
Standard étalonnage 100-2.lcd	paracétamol sér	STD	0	0	0
Standard étalonnage 110-1.lcd	paracétamol	Série 1	0	0	0
Standard étalonnage 110-2.lcd	paracétamol	Série 1	0	0	0
Standard étalonnage 120-1.lcd	STD009	série 3	0	0	0
Standard étalonnage 120-2.lcd	paracétamol sér	STD	0	0	0



PDF Complete

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

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

		Sample ID	TYR	PHE	EI
		série 3	0	0	0
		Série 1	0	0	0
		Série 1	0	0	0
Standard de validation 90-1.lcd	STD005	série 3	0	0	0
Standard de validation 90-2.lcd	paracétamol sér	STD	0	0	0
Standard de validation 90-3.lcd	paracétamol sér	STD	0	0	0
Standard de validation 100-1.lcd	paracétamol	Série 1	0	0	0
Standard de validation 100-2.lcd	STD008	série 3	0	0	0
Standard de validation 100-3.lcd	paracétamol sér	STD	0	0	0
Standard de Validation 110-1.lcd	paracétamol	Série 1	0	0	0
Standard de Validation 110-2.lcd	paracétamol	Série 1	0	0	0
Standard de Validation 110-3.lcd	paracétamol	Série 1	0	0	0
Standard validation 120-1.lcd	paracétamol sér	STD	0	0	0
Standard de validation 120-2.lcd	STD012	série 3	0	0	0
Standard de validation 120-3.lcd	paracétamol sér	STD	0	0	0
Average			0	0	0
%RSD			0.000	0.000	0.000
Maximum			0	0	0
Minimum			0	0	0
Standard Deviation			0	0	0



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

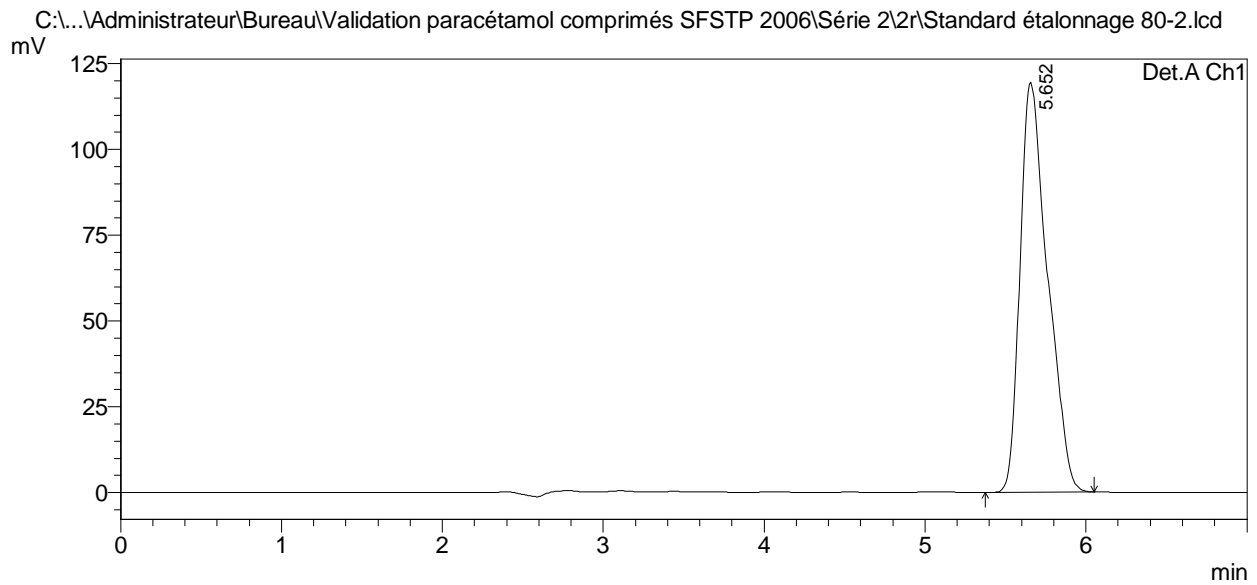
[Click Here to upgrade to
Unlimited Pages and Expanded Features](#)

Resolution Analysis Report =====

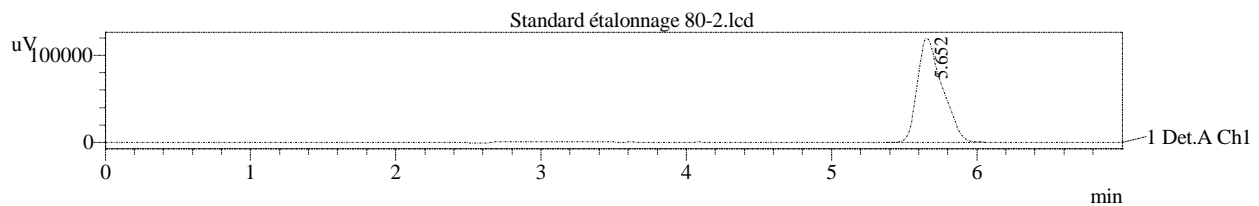
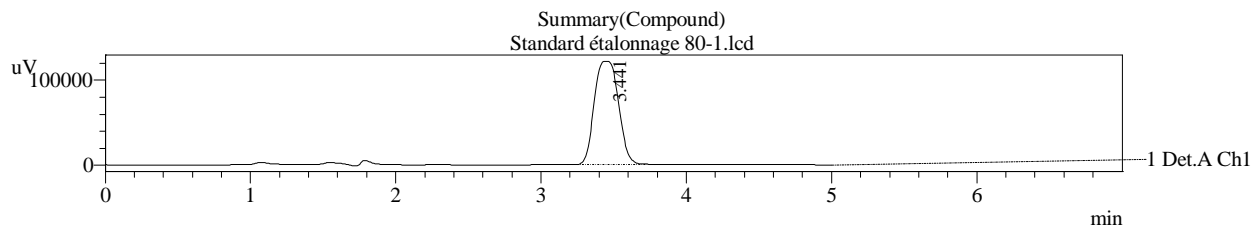
C:\...\Administrateur\Bureau\Validation paracétamol comprimés SFSTP 2006\Série 2\2r\Standard étalonnage 80-2.lcd

Acquired by : Admin
Sample Name : STD002
Sample ID : série 3
Tray# : 11
Vial # : 2
Injection Volume : 20 uL
Data File Name : Standard étalonnage 80-2.lcd
Method File Name : Paracetamol.lcm
Batch File Name : paracetamol3.lcb
Report File Name : Default.lcr
Data Acquired : 26/07/2017 14:37:16
Data Processed : 26/07/2017 16:15:39

<Chromatogram>



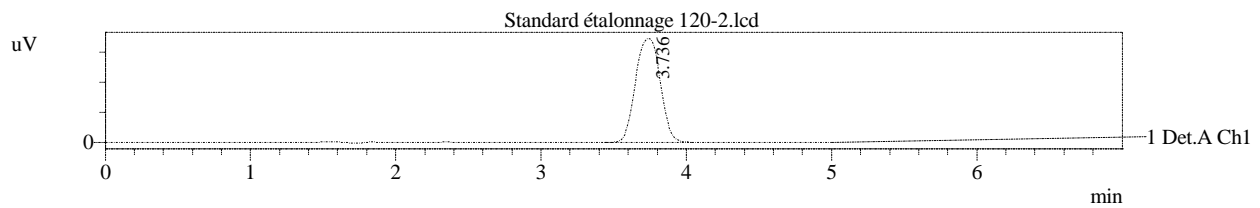
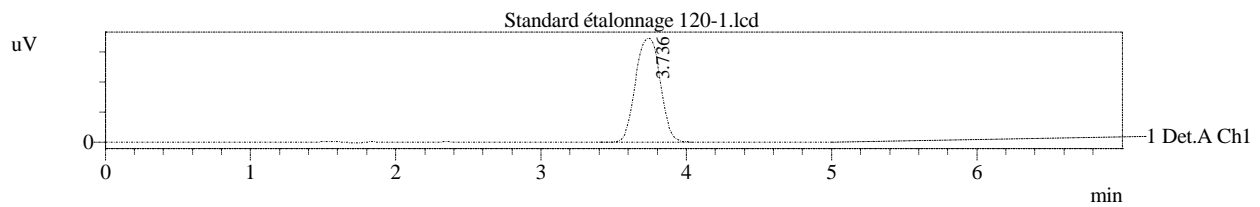
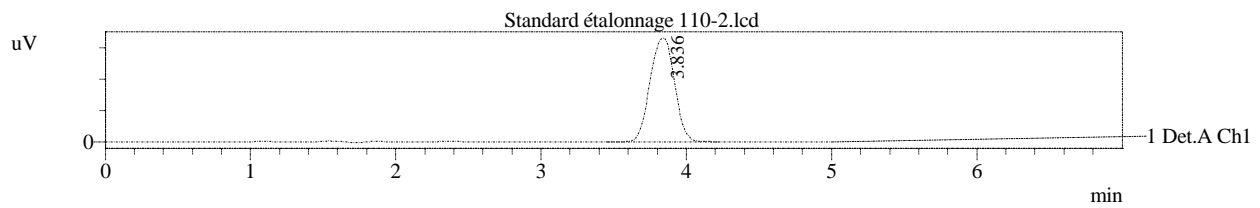
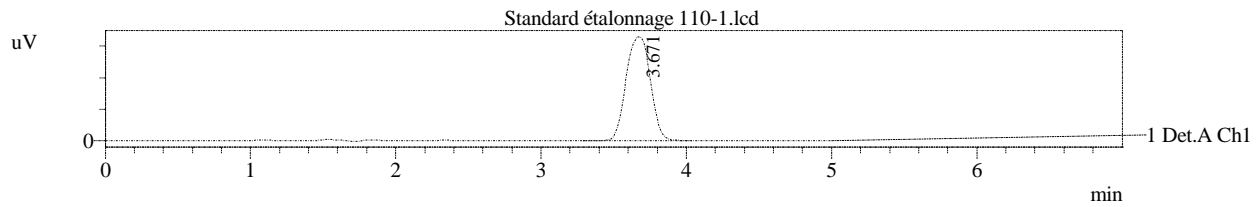
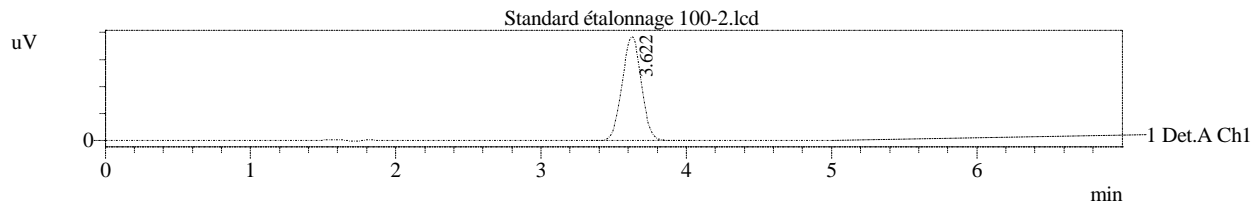
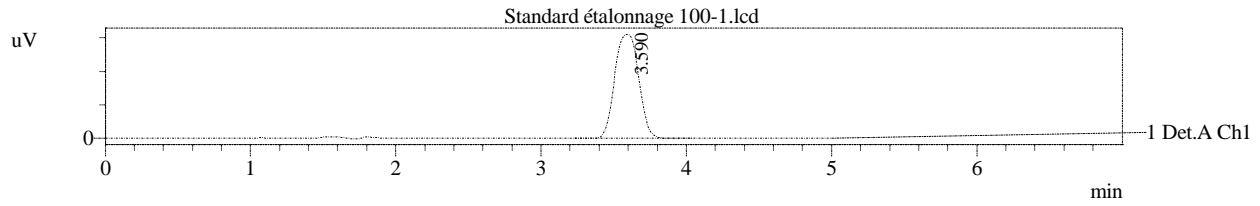
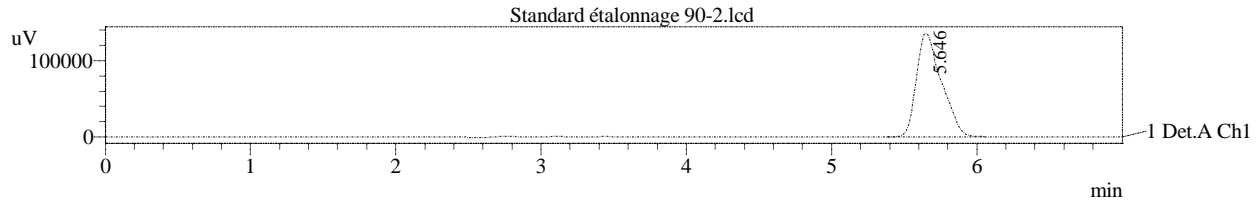
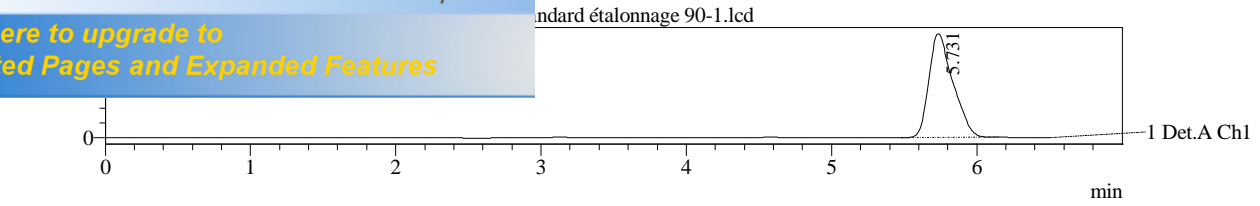
1 Det.A Ch1/245nm





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

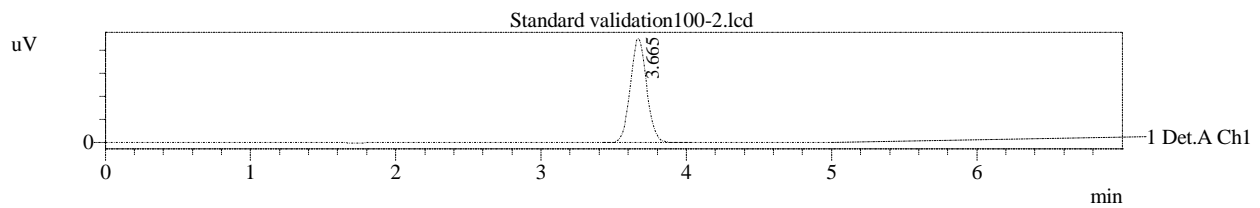
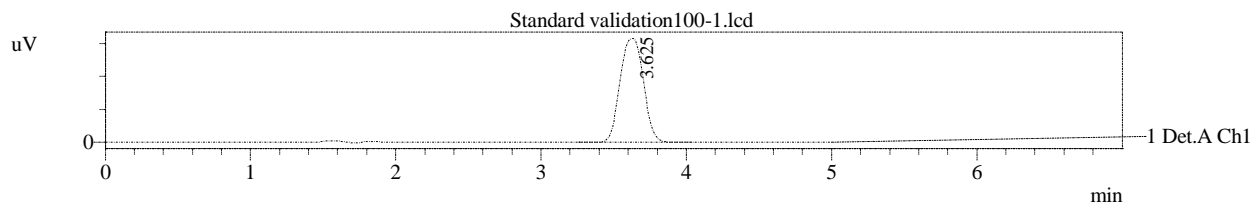
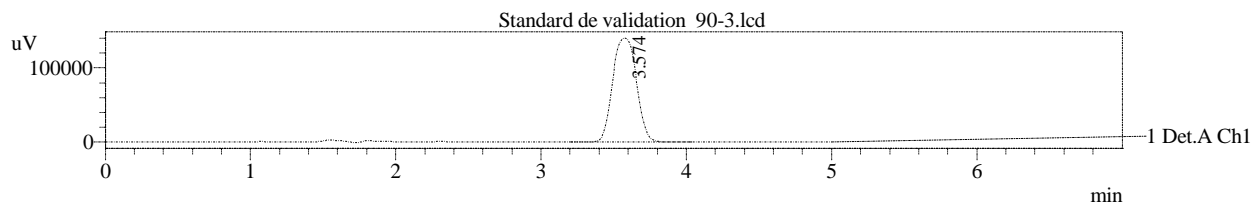
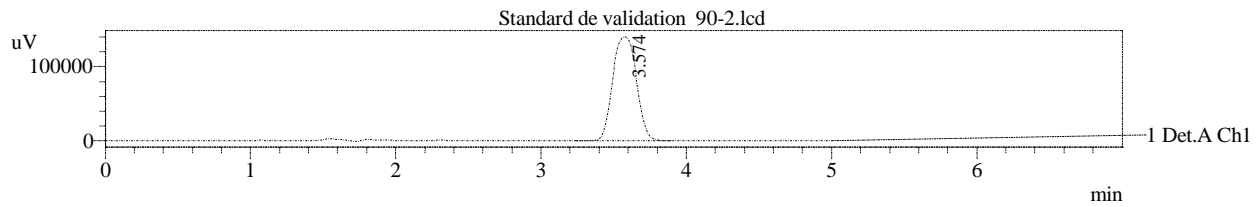
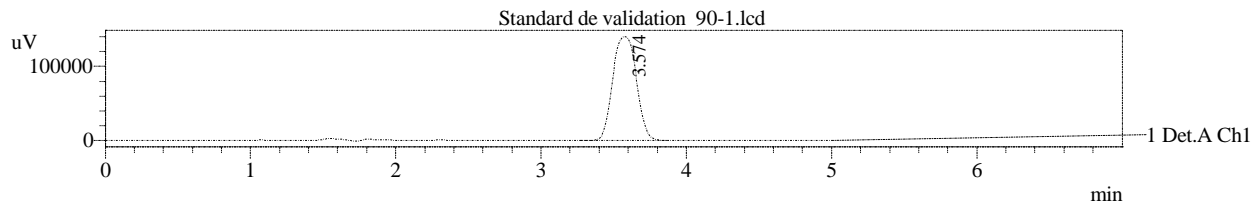
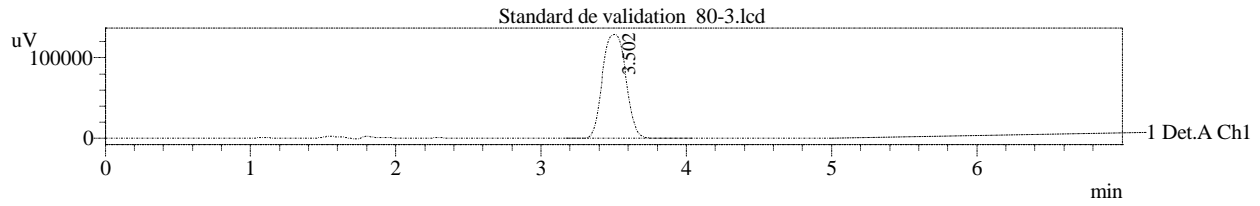
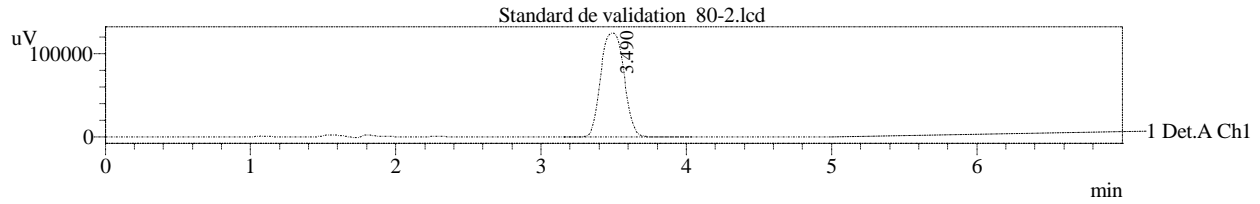
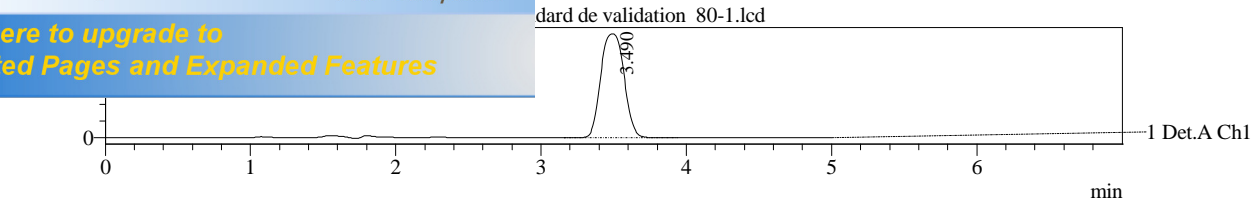
Click Here to upgrade to Unlimited Pages and Expanded Features





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

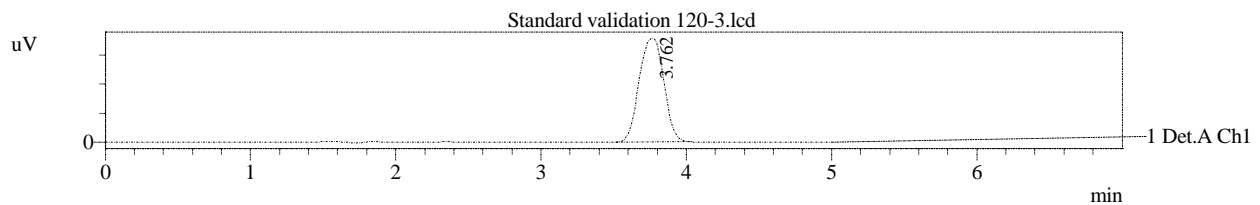
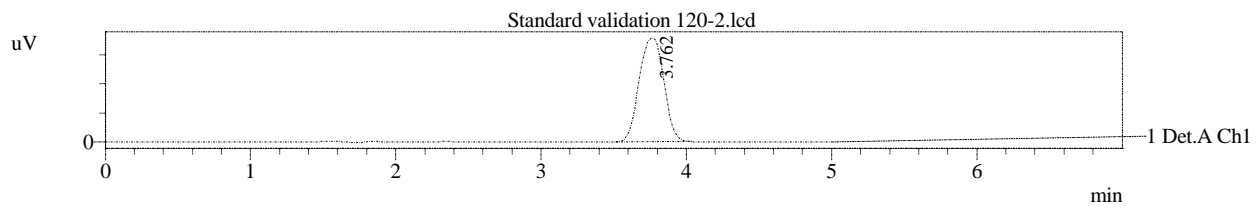
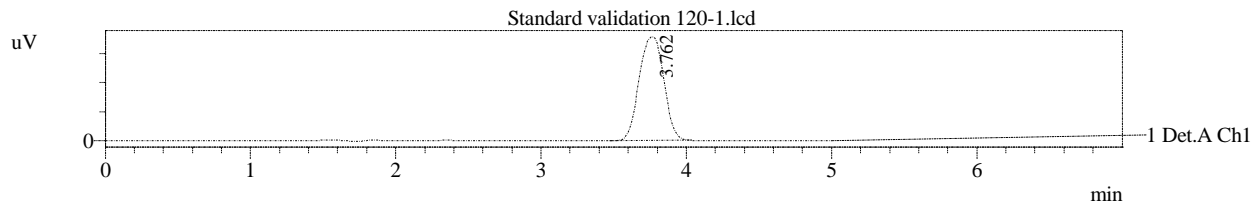
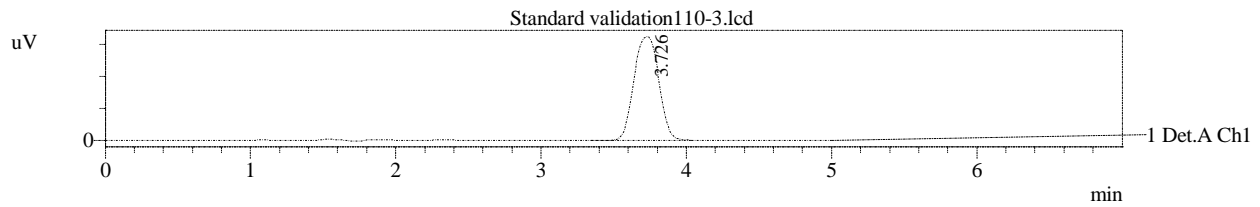
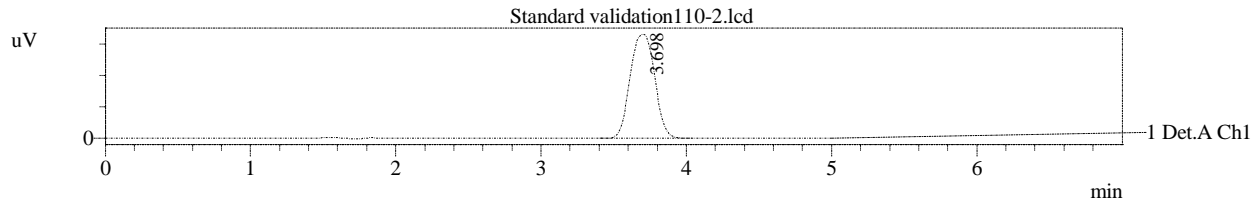
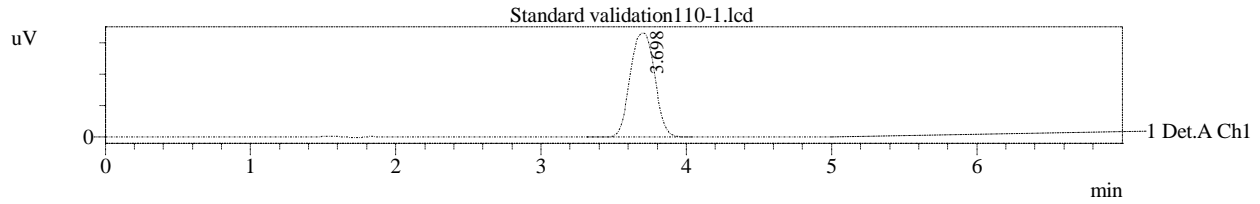
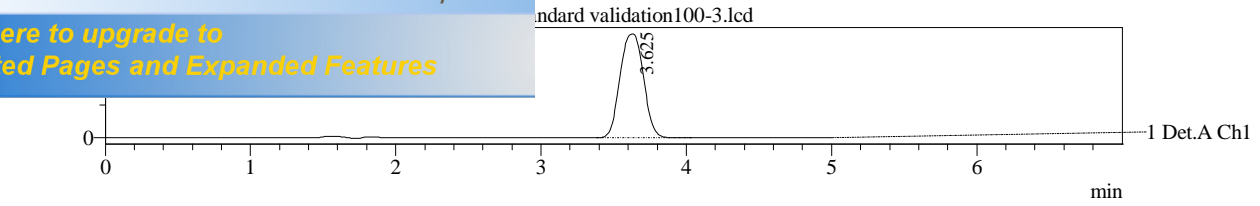
Click Here to upgrade to Unlimited Pages and Expanded Features





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

Click Here to upgrade to Unlimited Pages and Expanded Features



<< Detector A >>

ID#1 Compound Name: Paracetamol

Title	Area	Height
Standard étalonnage 80-1.lcd	1397134	121380
Standard étalonnage 80-2.lcd	1421015	119420
Standard étalonnage 90-1.lcd	1620968	141470
Standard étalonnage 90-2.lcd	1624908	136249
Standard étalonnage 100-1.lcd	1777195	155366



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

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

		Height
		192710
		165016
		165752
Standard étalonnage 120-1.lcd	2043877	172597
Standard étalonnage 120-2.lcd	2043818	172595
Standard de validation 80-1.lcd	1384589	124577
Standard de validation 80-2.lcd	1385217	124588
Standard de validation 80-3.lcd	1439651	129294
Standard de validation 90-1.lcd	1587729	140228
Standard de validation 90-2.lcd	1589644	140282
Standard de validation 90-3.lcd	1592197	140341
Standard validation100-1.lcd	1764862	157876
Standard validation100-2.lcd	1760718	225387
Standard validation100-3.lcd	1763292	157829
Standard validation110-1.lcd	1939190	165367
Standard validation110-2.lcd	1938923	165361
Standard validation110-3.lcd	1918280	162067
Standard validation 120-1.lcd	2108946	178718
Standard validation 120-2.lcd	2106322	178634
Standard validation 120-3.lcd	2106322	178634
Average	1757424	156470
%RSD	13.848	16.089
Maximum	2108946	225387
Minimum	1384589	119420
Standard Deviation	243371	25175

<< Detector B >>

ID#1 Compound Name: TYR

Title	Area	Height
Standard étalonnage 80-1.lcd	0	0
Standard étalonnage 80-2.lcd	0	0
Standard étalonnage 90-1.lcd	0	0
Standard étalonnage 90-2.lcd	0	0
Standard étalonnage 100-1.lcd	0	0
Standard étalonnage 100-2.lcd	0	0
Standard étalonnage 110-1.lcd	0	0
Standard étalonnage 110-2.lcd	0	0
Standard étalonnage 120-1.lcd	0	0
Standard étalonnage 120-2.lcd	0	0
Standard de validation 80-1.lcd	0	0
Standard de validation 80-2.lcd	0	0
Standard de validation 80-3.lcd	0	0
Standard de validation 90-1.lcd	0	0
Standard de validation 90-2.lcd	0	0
Standard de validation 90-3.lcd	0	0
Standard validation100-1.lcd	0	0
Standard validation100-2.lcd	0	0
Standard validation100-3.lcd	0	0
Standard validation110-1.lcd	0	0
Standard validation110-2.lcd	0	0
Standard validation110-3.lcd	0	0
Standard validation 120-1.lcd	0	0
Standard validation 120-2.lcd	0	0
Standard validation 120-3.lcd	0	0
Average	0	0
%RSD	0.000	0.000
Maximum	0	0
Minimum	0	0
Standard Deviation	0	0

ID#2 Compound Name: PHE

Title	Area	Height
Standard étalonnage 80-1.lcd	0	0
Standard étalonnage 80-2.lcd	0	0
Standard étalonnage 90-1.lcd	0	0
Standard étalonnage 90-2.lcd	0	0
Standard étalonnage 100-1.lcd	0	0
Standard étalonnage 100-2.lcd	0	0
Standard étalonnage 110-1.lcd	0	0
Standard étalonnage 110-2.lcd	0	0
Standard étalonnage 120-1.lcd	0	0
Standard étalonnage 120-2.lcd	0	0
Standard de validation 80-1.lcd	0	0
Standard de validation 80-2.lcd	0	0
Standard de validation 80-3.lcd	0	0
Standard de validation 90-1.lcd	0	0



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

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

		Height
		0
		0
		0
Standard validation100-2.lcd	0	0
Standard validation100-3.lcd	0	0
Standard validation110-1.lcd	0	0
Standard validation110-2.lcd	0	0
Standard validation110-3.lcd	0	0
Standard validation 120-1.lcd	0	0
Standard validation 120-2.lcd	0	0
Standard validation 120-3.lcd	0	0
Average	0	0
%RSD	0.000	0.000
Maximum	0	0
Minimum	0	0
Standard Deviation	0	0

ID#3 Compound Name: EI

Title	Area	Height
Standard étalonnage 80-1.lcd	0	0
Standard étalonnage 80-2.lcd	0	0
Standard étalonnage 90-1.lcd	0	0
Standard étalonnage 90-2.lcd	0	0
Standard étalonnage 100-1.lcd	0	0
Standard étalonnage 100-2.lcd	0	0
Standard étalonnage 110-1.lcd	0	0
Standard étalonnage 110-2.lcd	0	0
Standard étalonnage 120-1.lcd	0	0
Standard étalonnage 120-2.lcd	0	0
Standard de validation 80-1.lcd	0	0
Standard de validation 80-2.lcd	0	0
Standard de validation 80-3.lcd	0	0
Standard de validation 90-1.lcd	0	0
Standard de validation 90-2.lcd	0	0
Standard de validation 90-3.lcd	0	0
Standard validation100-1.lcd	0	0
Standard validation100-2.lcd	0	0
Standard validation100-3.lcd	0	0
Standard validation110-1.lcd	0	0
Standard validation110-2.lcd	0	0
Standard validation110-3.lcd	0	0
Standard validation 120-1.lcd	0	0
Standard validation 120-2.lcd	0	0
Standard validation 120-3.lcd	0	0
Average	0	0
%RSD	0.000	0.000
Maximum	0	0
Minimum	0	0
Standard Deviation	0	0



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

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

Sample Information

Sample Name : paracetamol serie 1
Sample ID : STD
Tray# : 11
Vial# : 81
Injection Volume : 20 uL
Data Filename : Standard étalonnage 80-1.lcd
Method Filename : Paracetamol.lcm
Batch Filename : Série 03.lcb
Report Filename : Default.lcr
Date Acquired : 22/06/2017 23:59:24
Data Processed : 09/08/2017 23:13:41

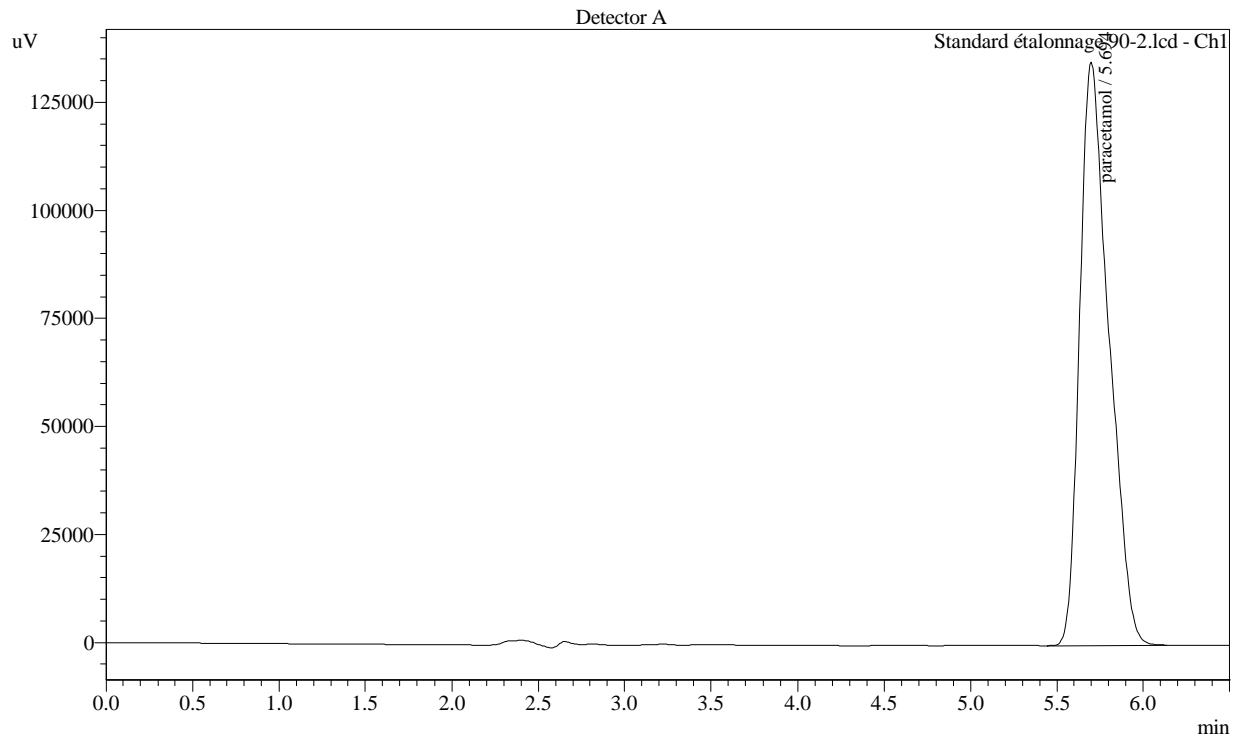
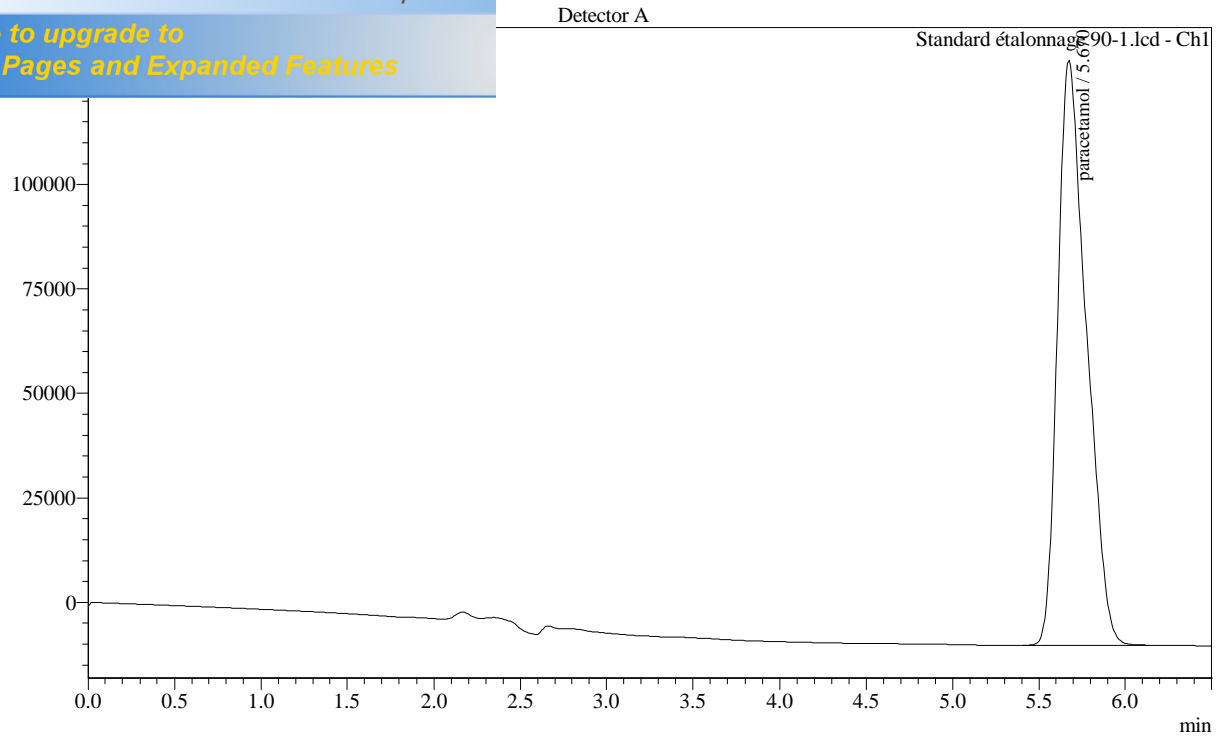
Summary(Concentration)

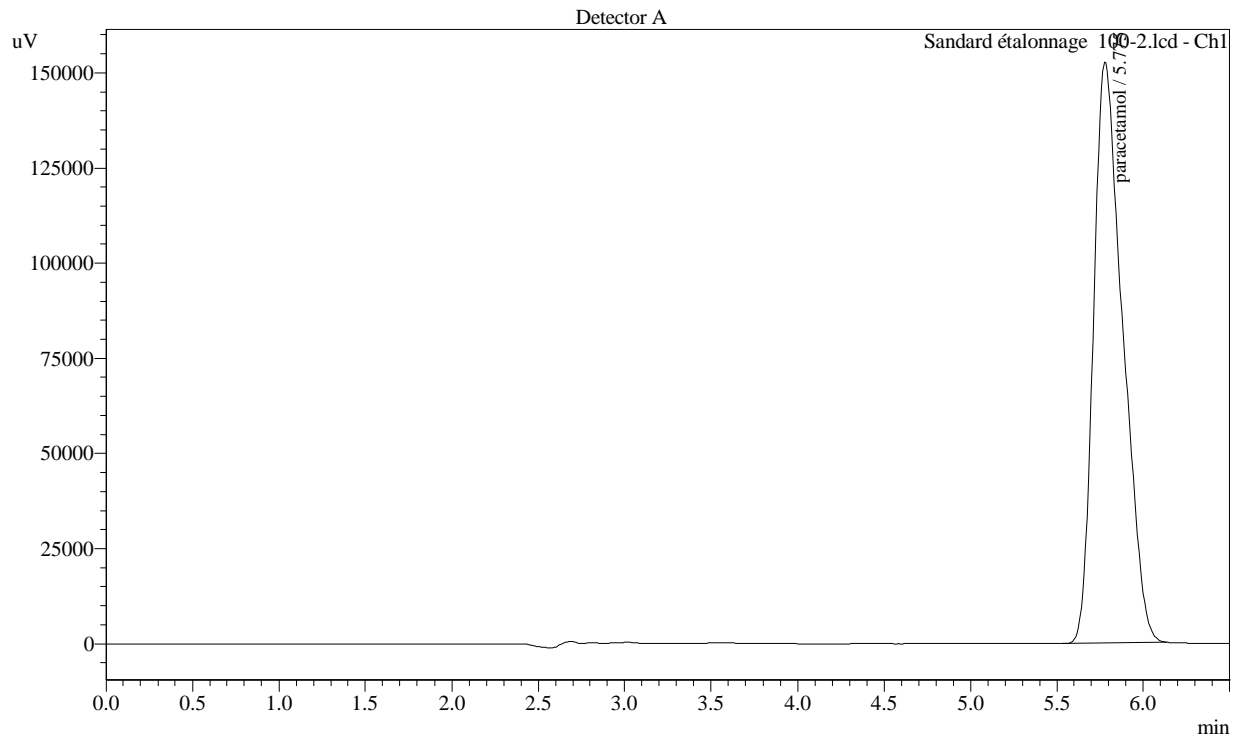
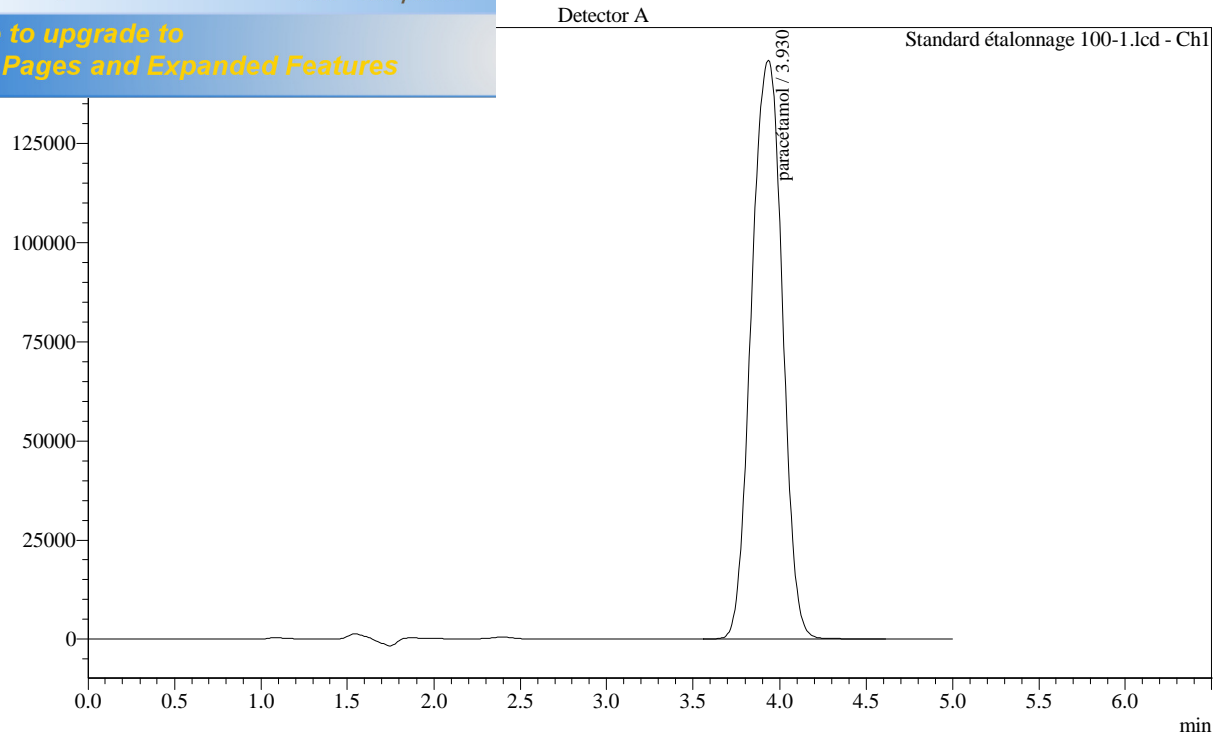


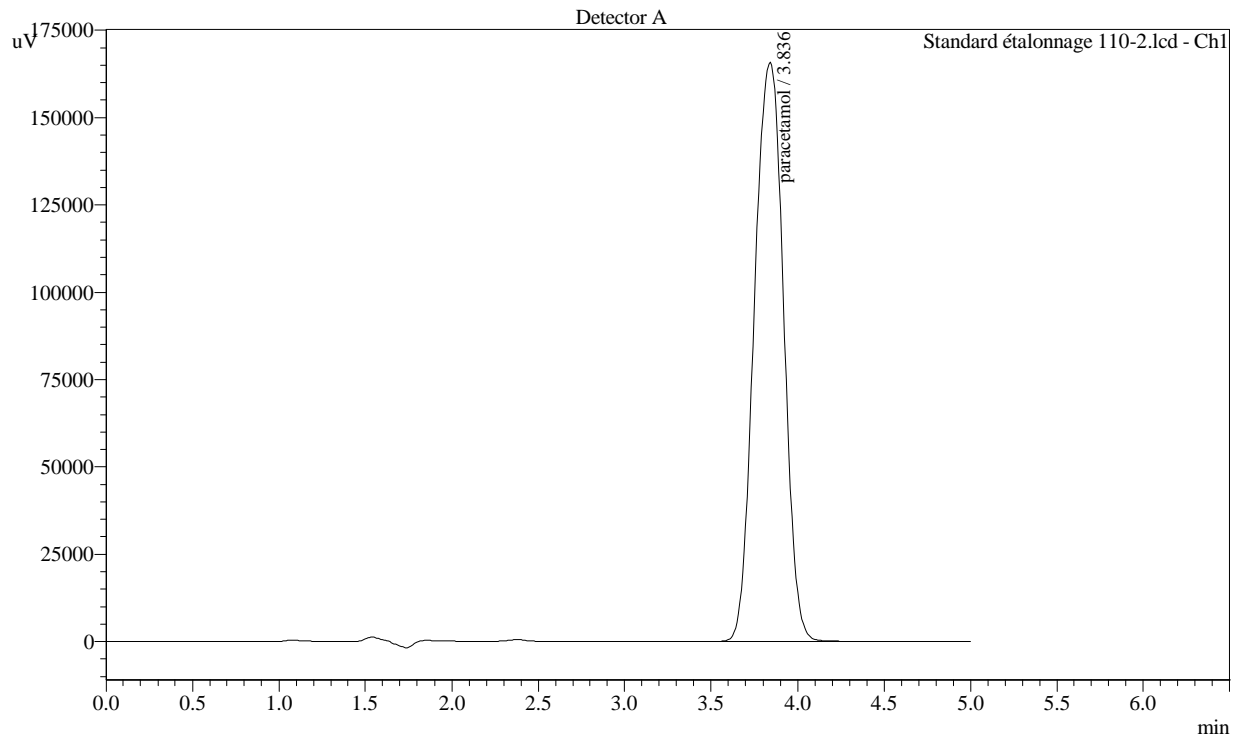
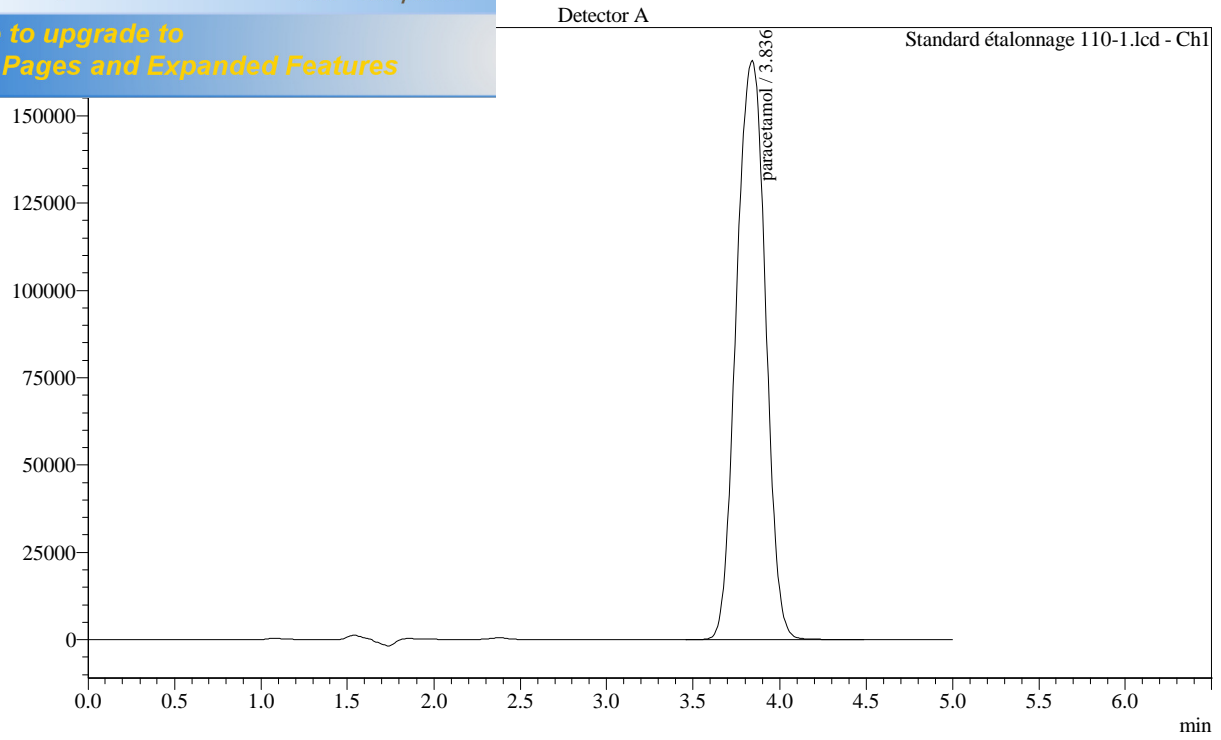
PDF Complete

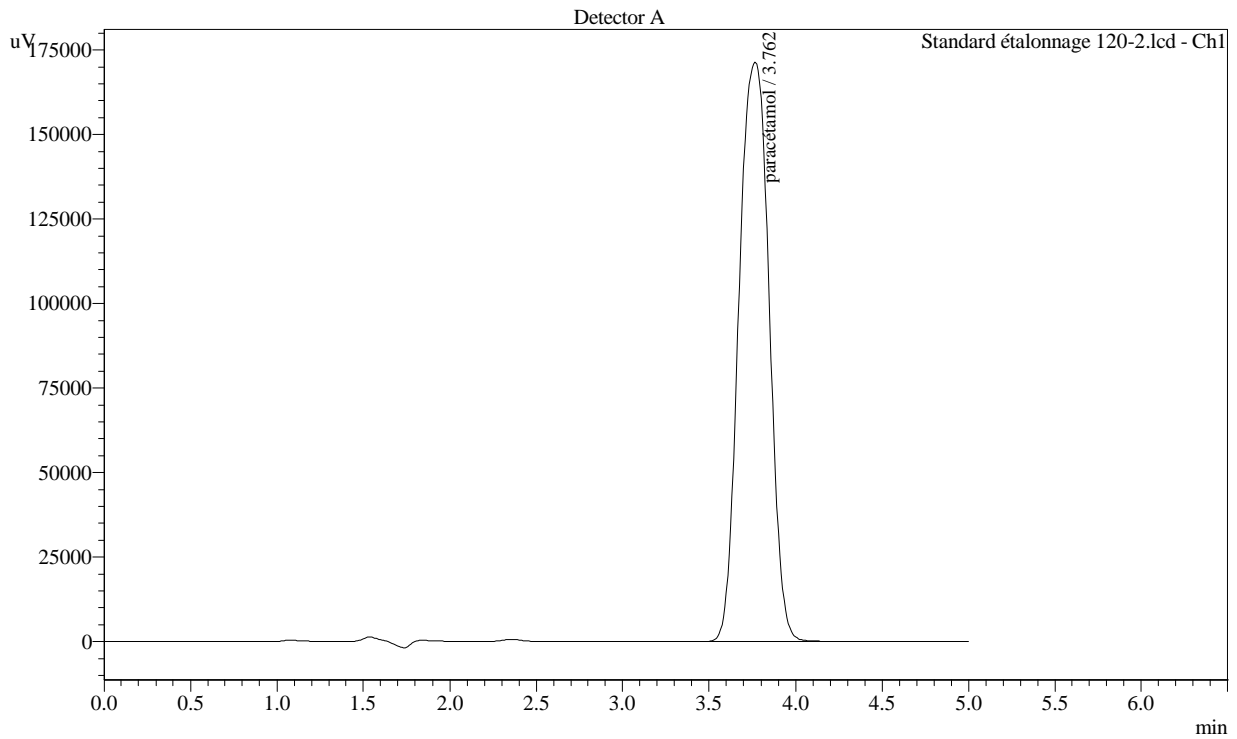
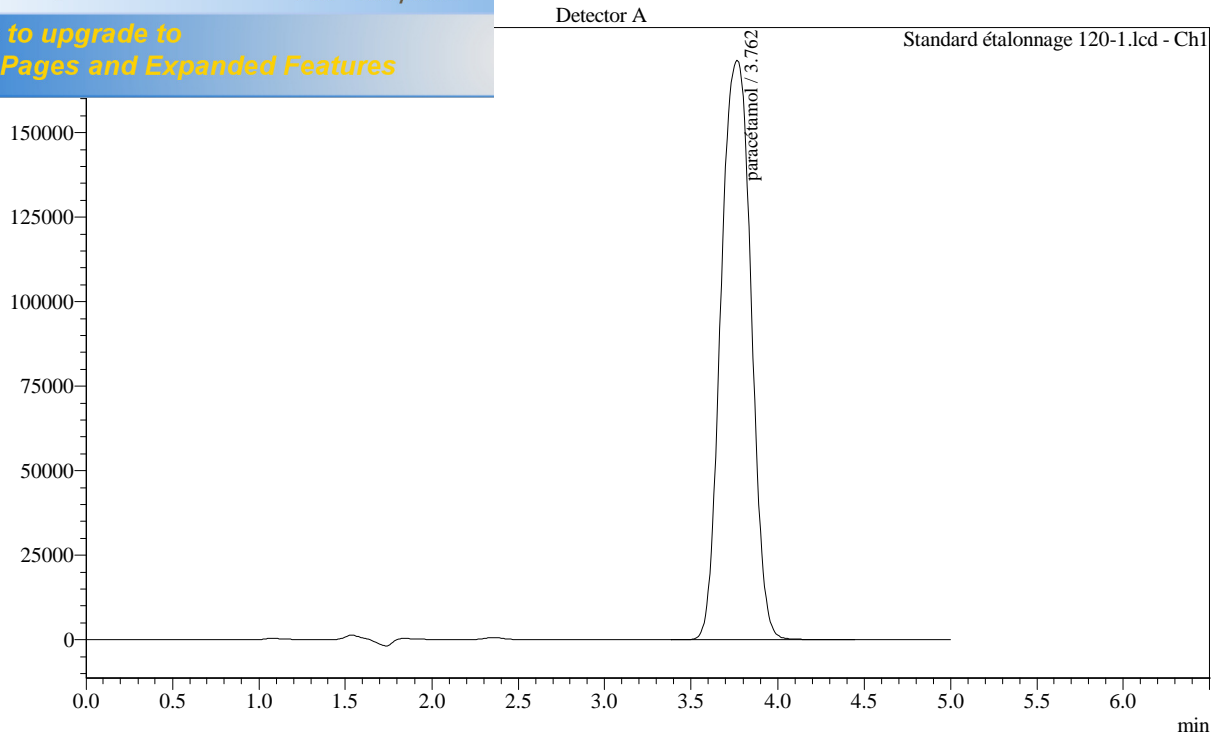
Your complimentary use period has ended.
Thank you for using PDF Complete.

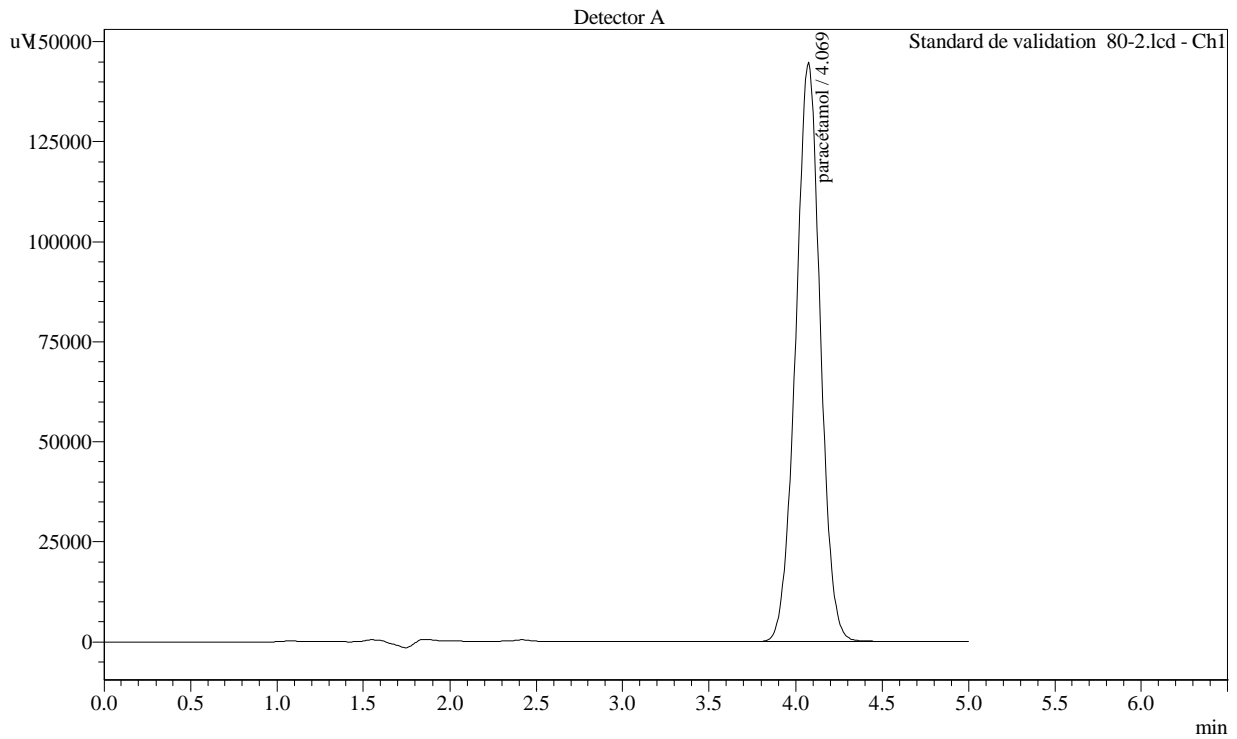
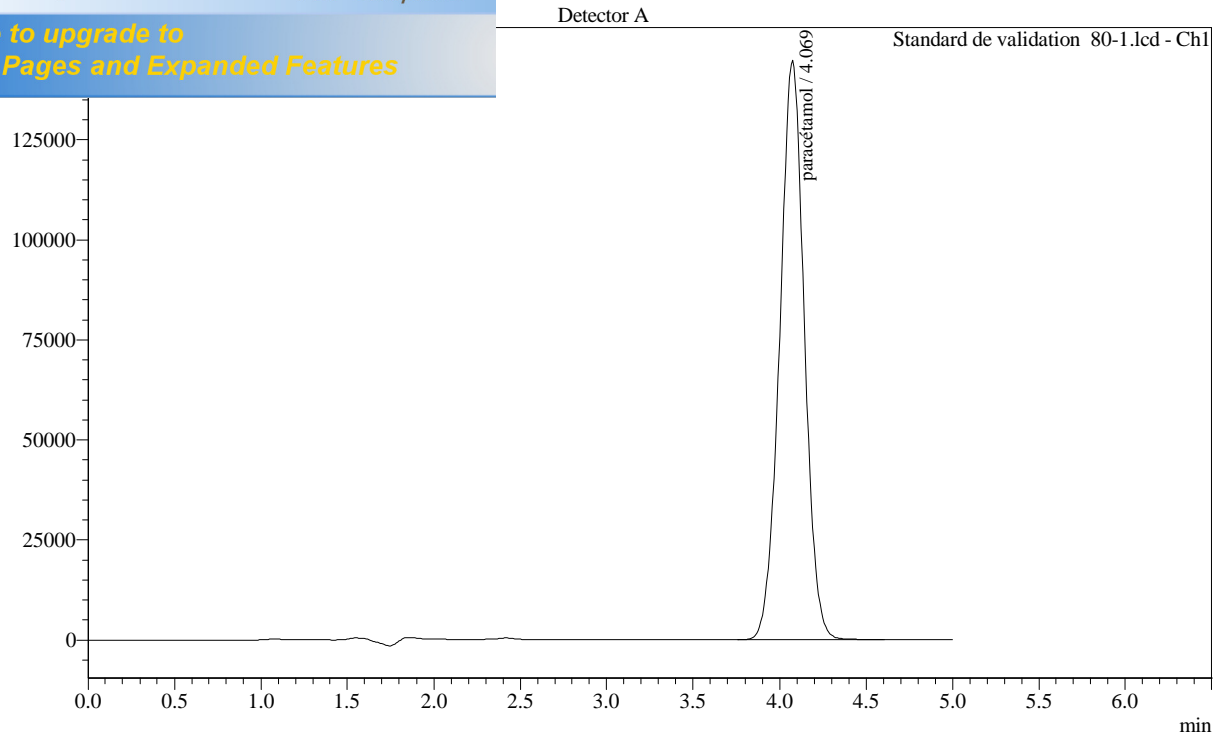
[Click Here to upgrade to Unlimited Pages and Expanded Features](#)



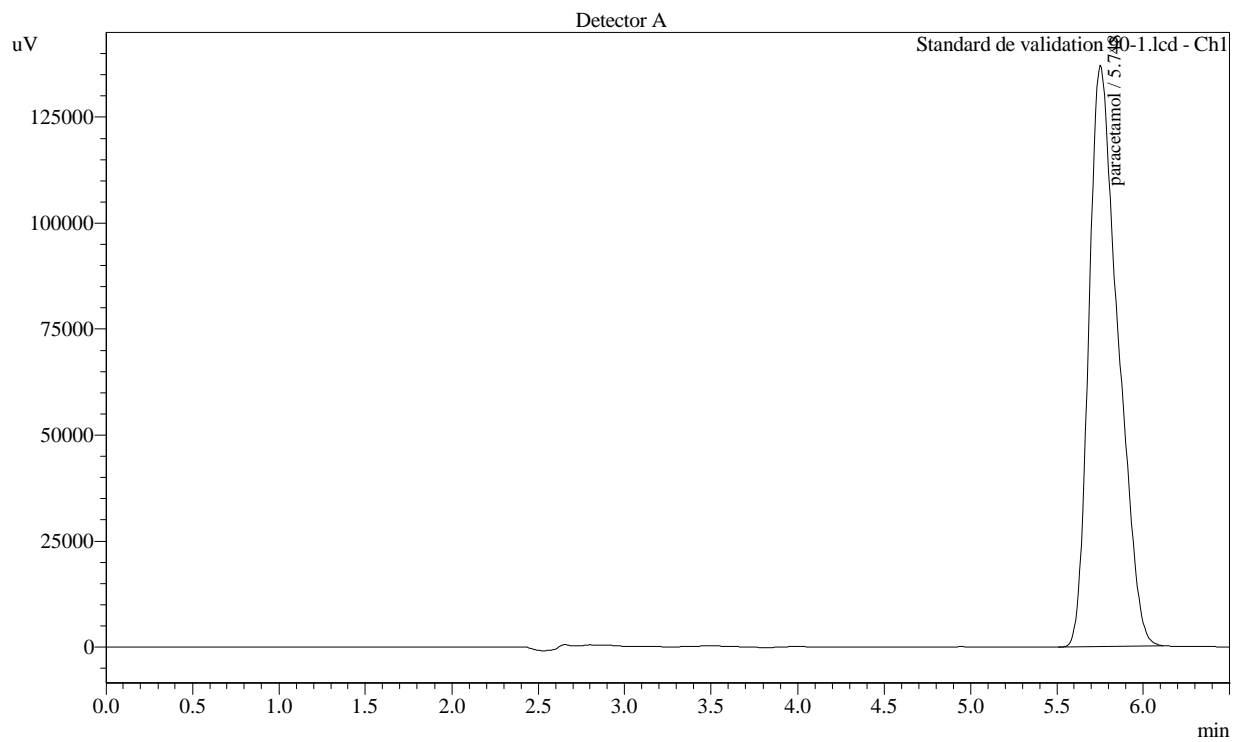
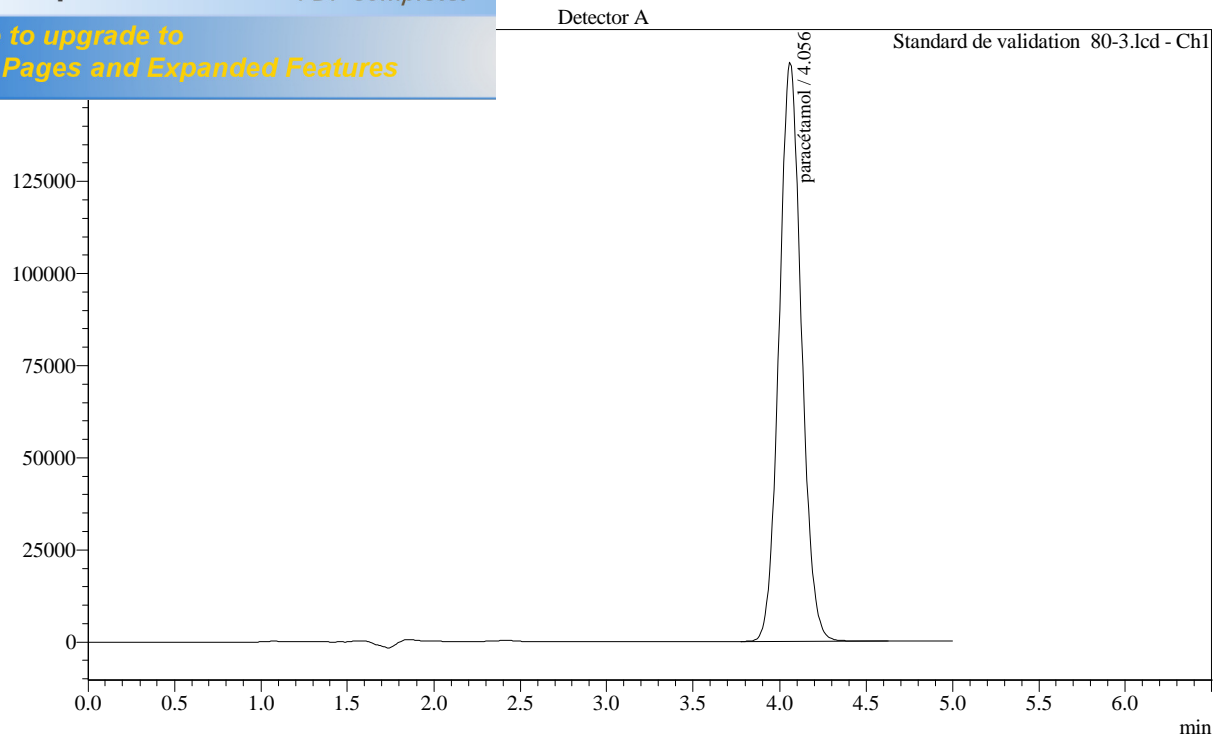








 **PDF Complete**
Your complimentary use period has ended.
Thank you for using PDF Complete.
[Click Here to upgrade to Unlimited Pages and Expanded Features](#)

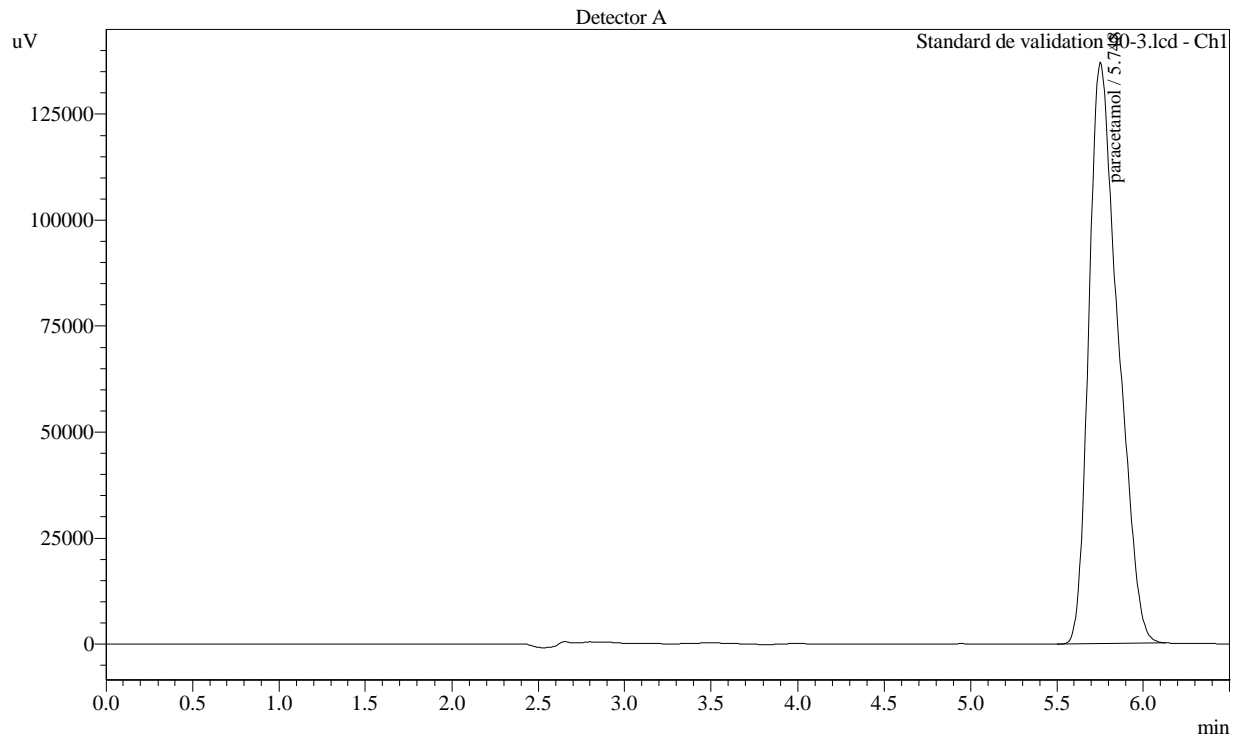
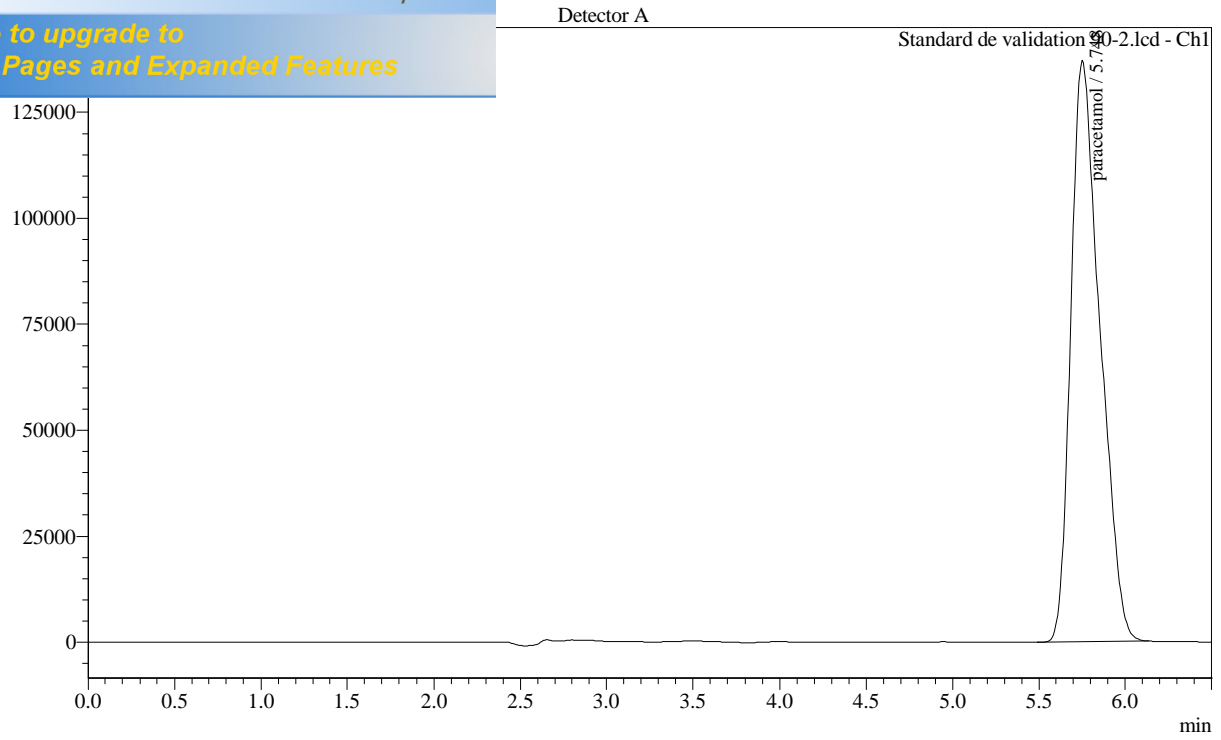


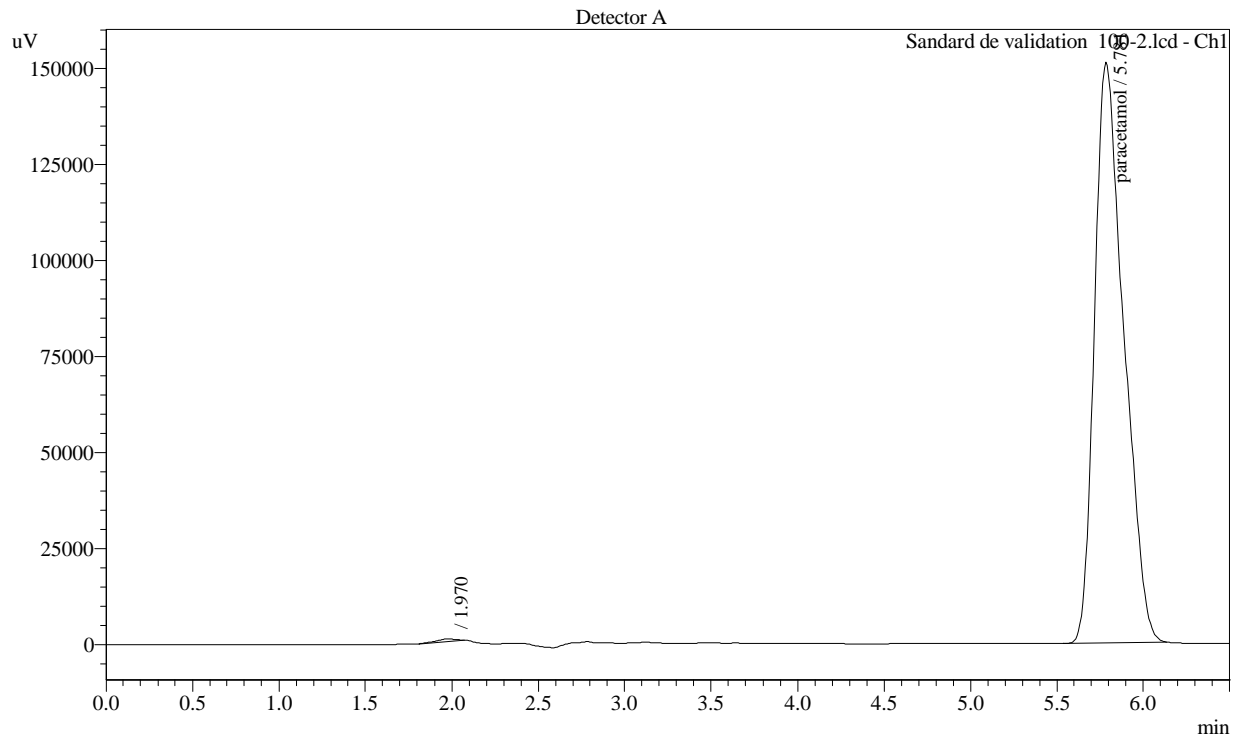
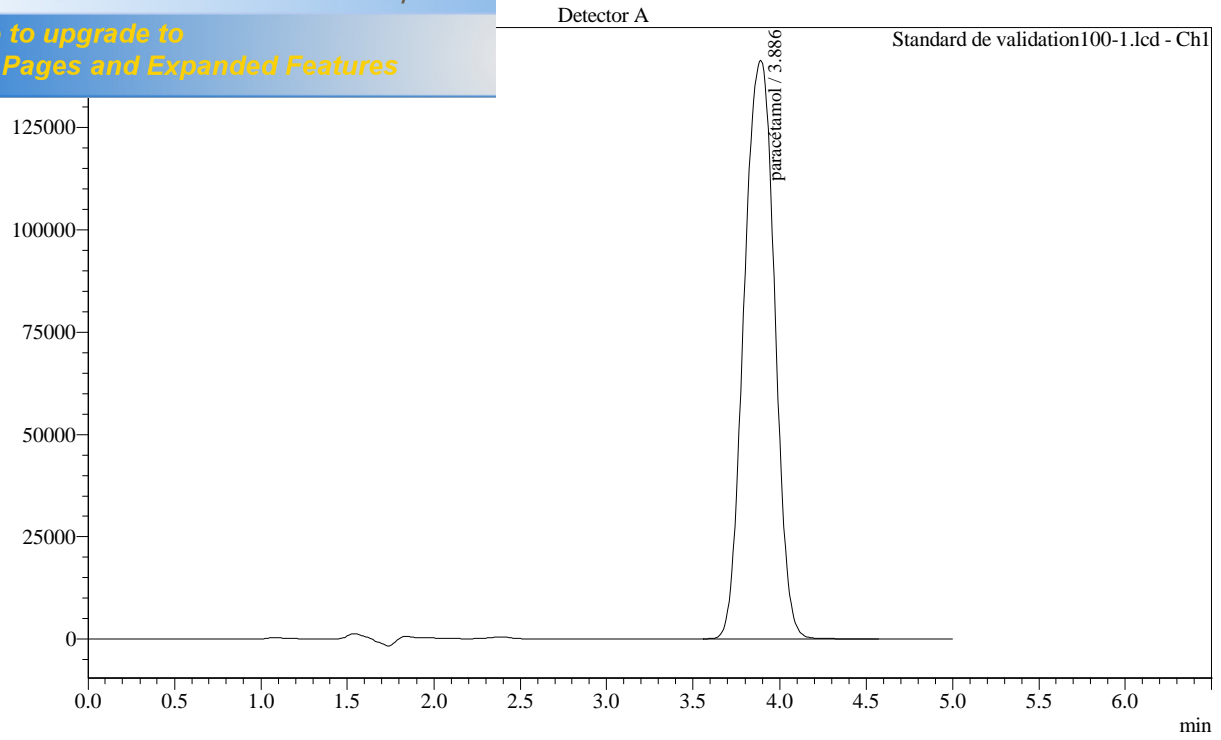


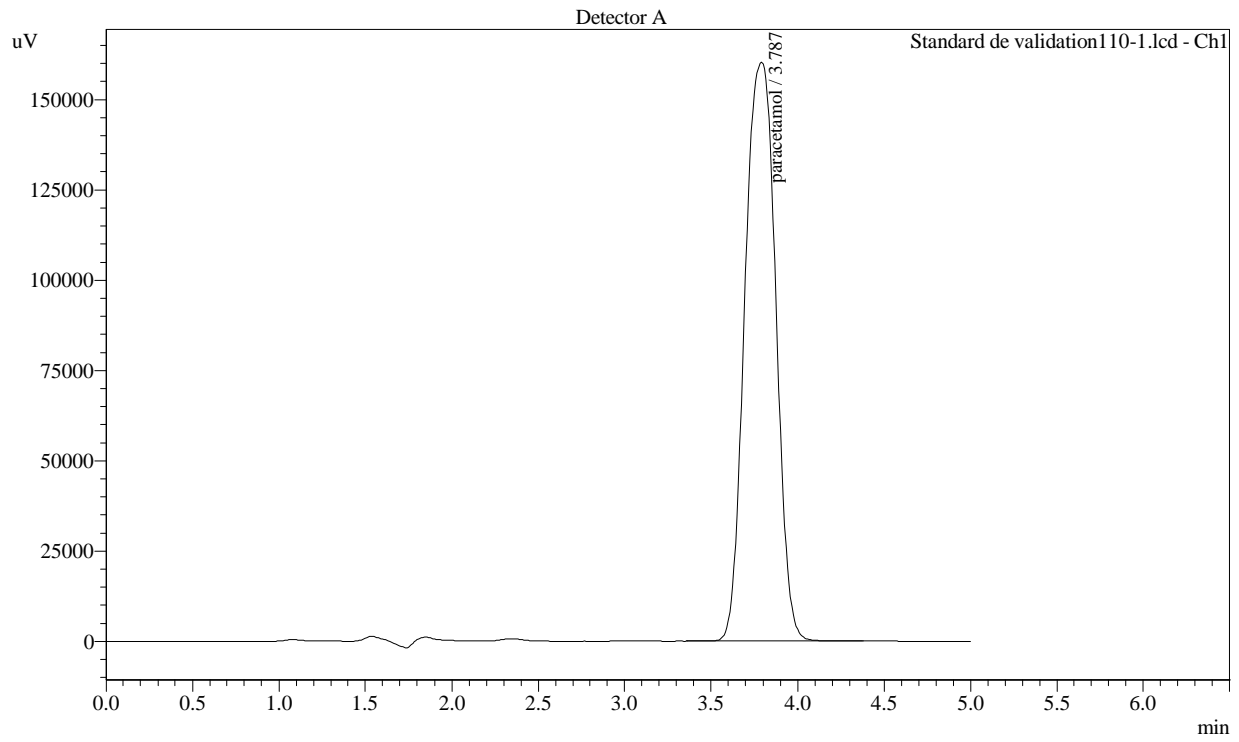
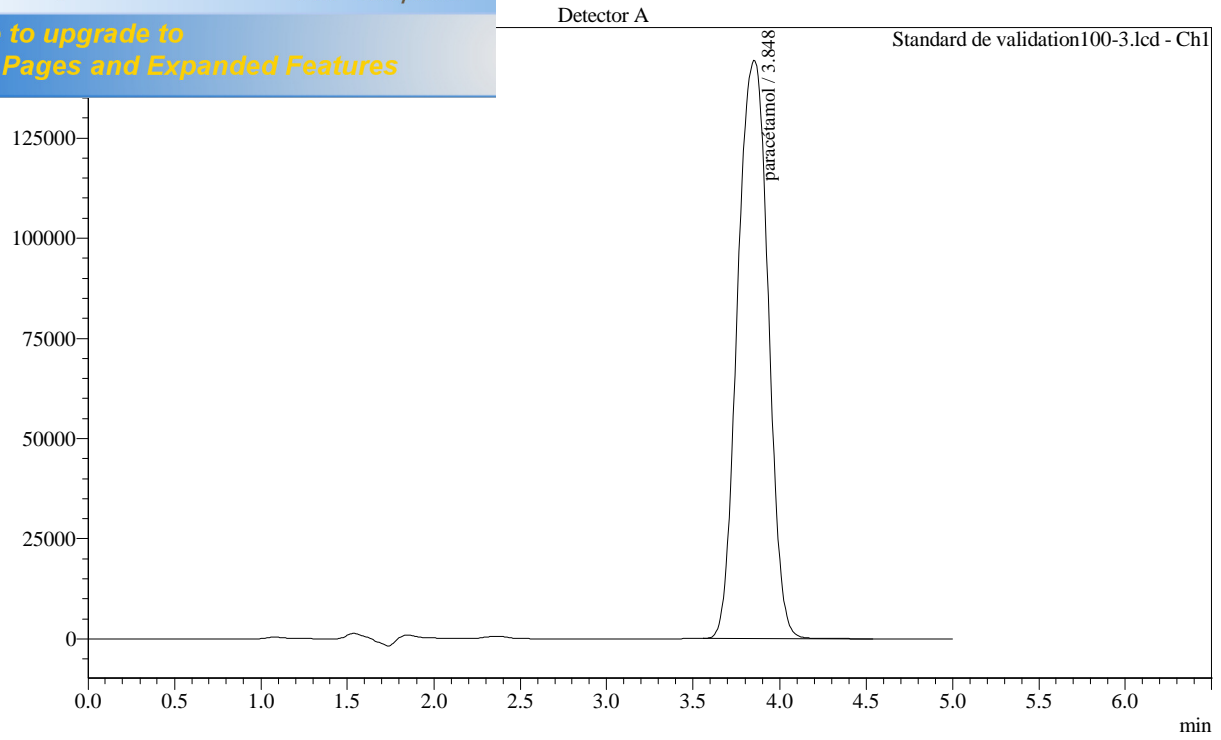
PDF Complete

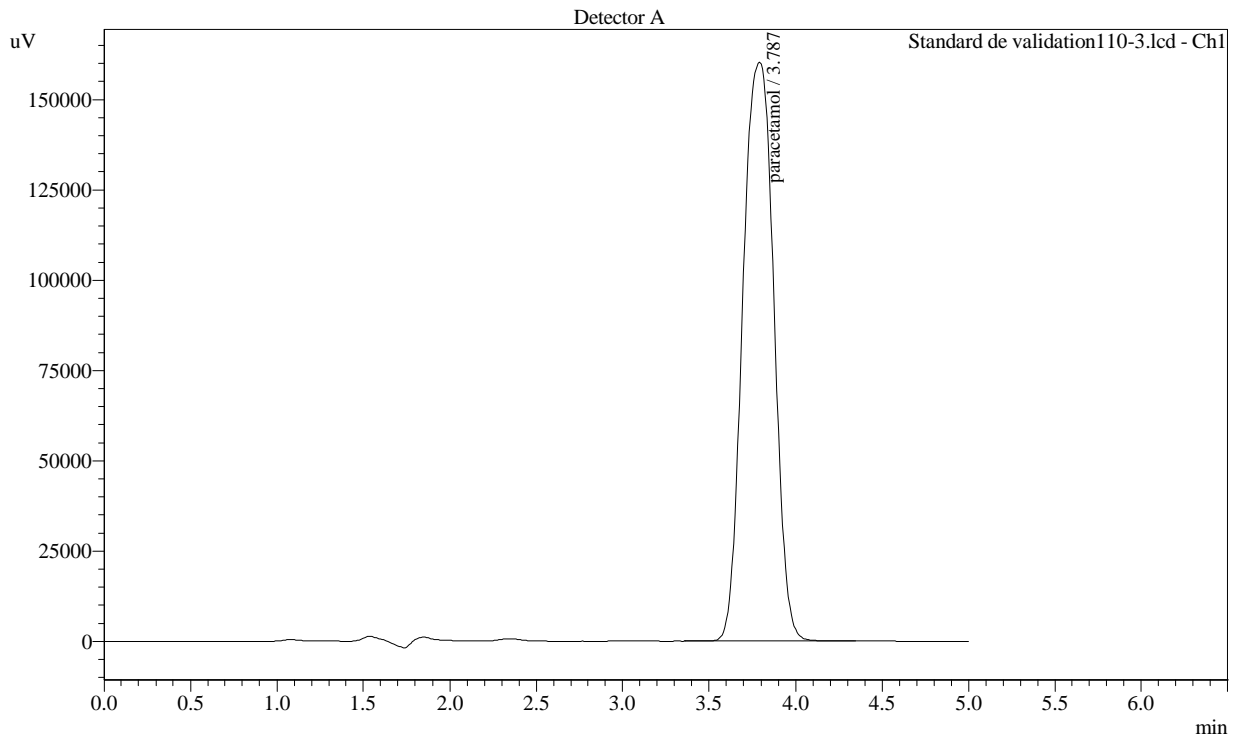
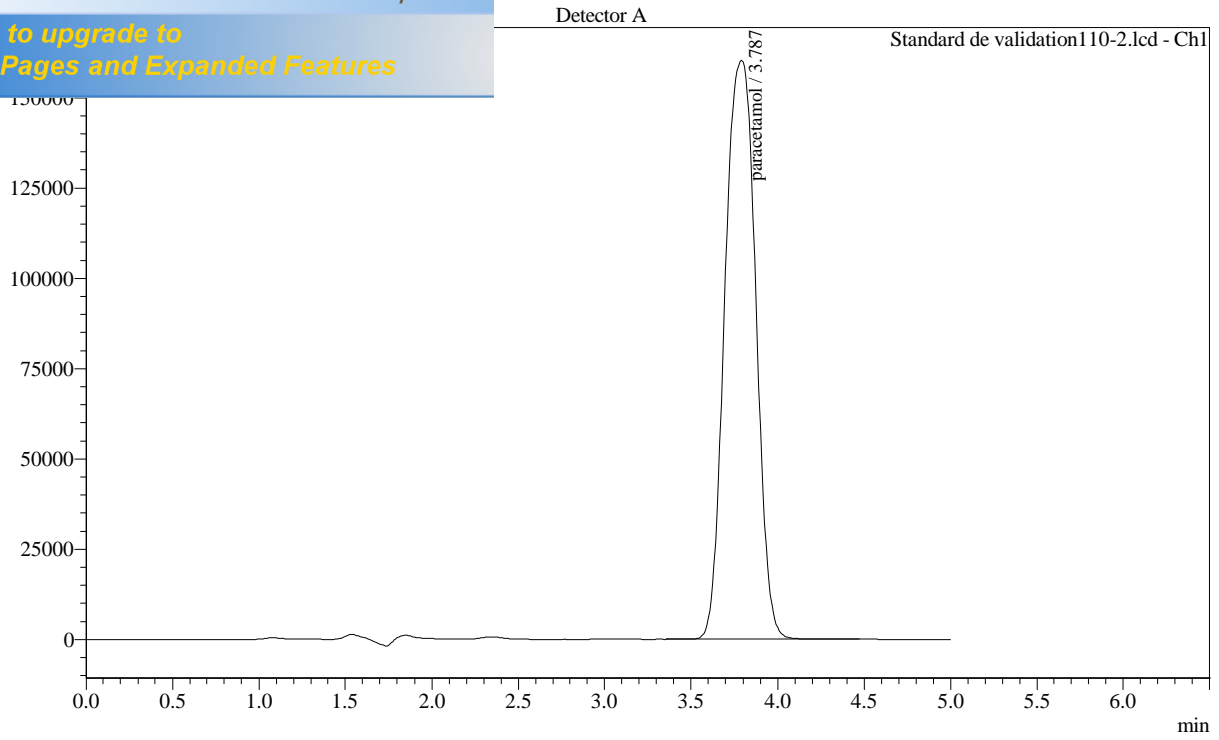
Your complimentary use period has ended.
Thank you for using PDF Complete.

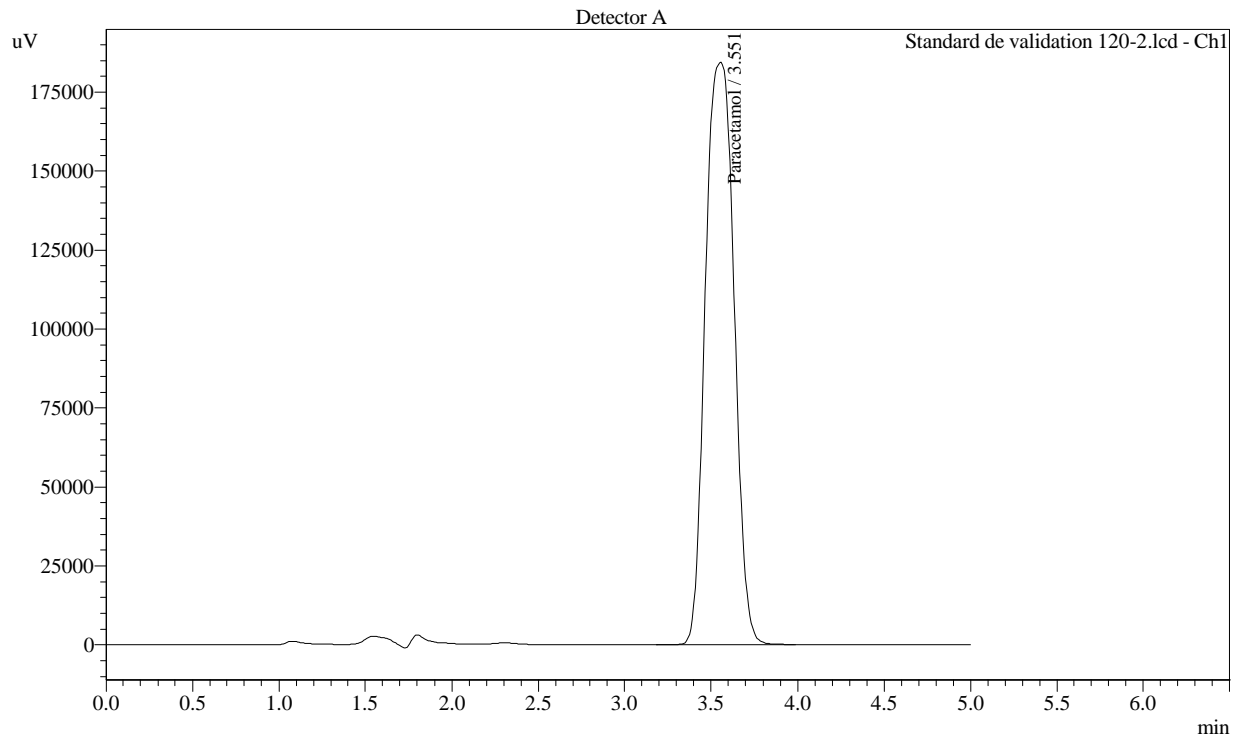
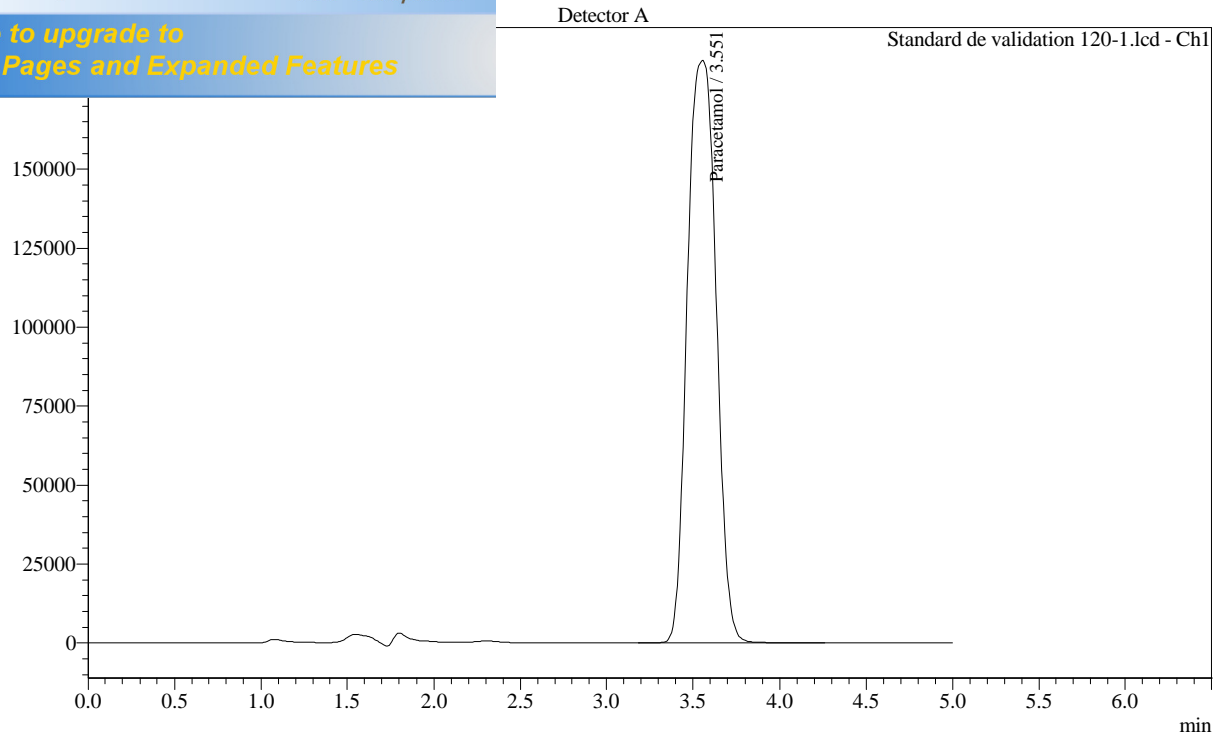
[Click Here to upgrade to Unlimited Pages and Expanded Features](#)





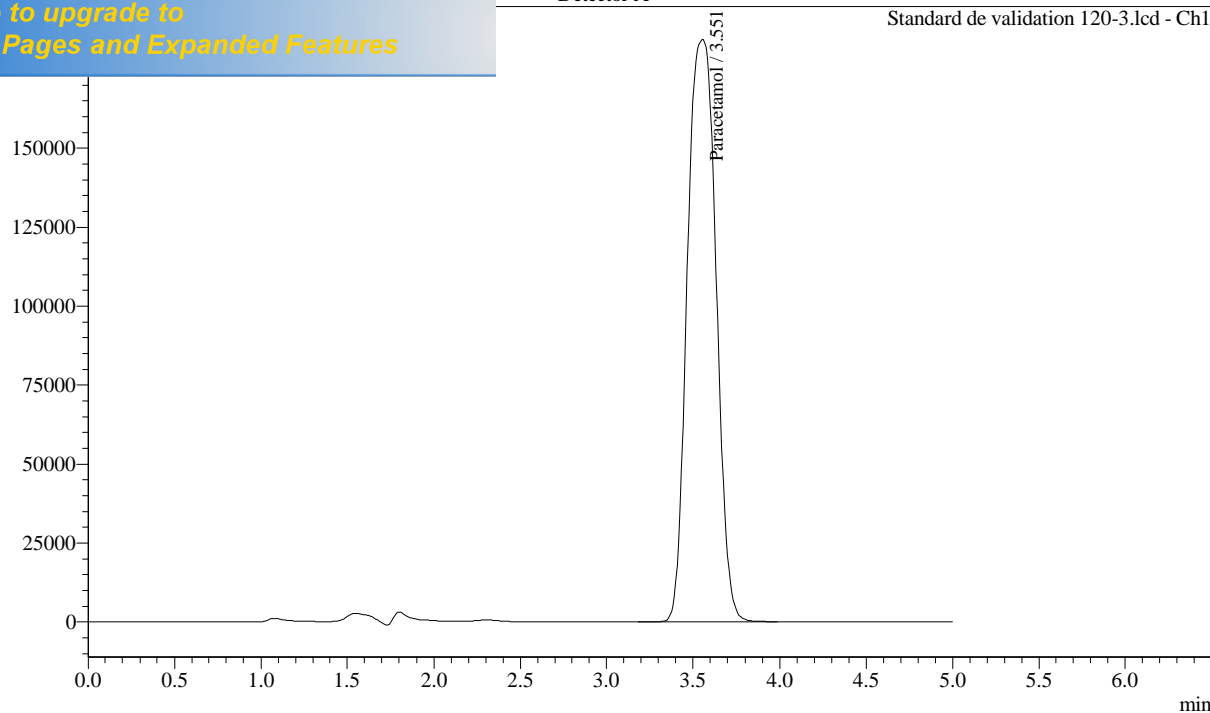






Detector A

Standard de validation 120-3.lcd - Ch1



<< Detector A >>

Title	Sample Name	Sample ID	paracétamol
Standard étalonnage 80-1.lcd	paracétamol sér	STD	1478605
Standard étalonnage 80-2.lcd	paracétamol sér	STD	1478523
Standard étalonnage 90-1.lcd	paracétamol	Série 3	1616989
Standard étalonnage 90-2.lcd	paracétamol	Série 3	1583753
Standard étalonnage 100-1.lcd	paracétamol sér	STD	1811890
Standard étalonnage 100-2.lcd	paracétamol	Série 3	1791022
Standard étalonnage 110-1.lcd	paracétamol sér	STD	1938606
Standard étalonnage 110-2.lcd	paracétamol sér	STD	1938546
Standard étalonnage 120-1.lcd	paracétamol sér	STD	2068827
Standard étalonnage 120-2.lcd	paracétamol sér	STD	2068558
Standard de validation 80-1.lcd	paracétamol sér	STD	1428133
Standard de validation 80-2.lcd	paracétamol sér	STD	1428467
Standard de validation 80-3.lcd	paracétamol sér	STD	1407432
Standard de validation 90-1.lcd	paracétamol	Série 3	1602591
Standard de validation 90-2.lcd	paracétamol	Série 3	1604616
Standard de validation 90-3.lcd	paracétamol	Série 3	1604075
Standard de validation 100-1.lcd	paracétamol sér	STD	1736075
Standard de validation 100-2.lcd	paracétamol	Série 3	1774602
Standard de validation 100-3.lcd	paracétamol sér	STD	1769643
Standard de validation 110-1.lcd	paracétamol sér	STD	1983468
Standard de validation 110-2.lcd	paracétamol sér	STD	1983806
Standard de validation 110-3.lcd	paracétamol sér	STD	1983222
Standard de validation 120-1.lcd	paracétamol sér	STD	2133800
Standard de validation 120-2.lcd	paracétamol sér	STD	2132087
Standard de validation 120-3.lcd	paracétamol sér	STD	2132087
Average			1779177
%RSD			13.785
Maximum			2133800
Minimum			1407432
Standard Deviation			245263

<< Detector B >>

Title	Sample Name	Sample ID	TYR	PHE	EI
Standard étalonnage 80-1.lcd	paracétamol sér	STD	0	0	0
Standard étalonnage 80-2.lcd	paracétamol sér	STD	0	0	0
Standard étalonnage 90-1.lcd	paracétamol	Série 3	0	0	0
Standard étalonnage 90-2.lcd	paracétamol	Série 3	0	0	0
Standard étalonnage 100-1.lcd	paracétamol sér	STD	0	0	0
Standard étalonnage 100-2.lcd	paracétamol	Série 3	0	0	0
Standard étalonnage 110-1.lcd	paracétamol sér	STD	0	0	0
Standard étalonnage 110-2.lcd	paracétamol sér	STD	0	0	0
Standard étalonnage 120-1.lcd	paracétamol sér	STD	0	0	0
Standard étalonnage 120-2.lcd	paracétamol sér	STD	0	0	0

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

		Sample ID	TYR	PHE	EI
		STD	0	0	0
		STD	0	0	0
		STD	0	0	0
Standard de validation 90-1.lcd	paracétamol	Série 3	0	0	0
Standard de validation 90-2.lcd	paracétamol	Série 3	0	0	0
Standard de validation 90-3.lcd	paracétamol	Série 3	0	0	0
Standard de validation100-1.lcd	paracétamol sér	STD	0	0	0
Standard de validation 100-2.lcd	paracétamol	Série 3	0	0	0
Standard de validation100-3.lcd	paracétamol sér	STD	0	0	0
Standard de validation110-1.lcd	paracétamol sér	STD	0	0	0
Standard de validation110-2.lcd	paracétamol sér	STD	0	0	0
Standard de validation110-3.lcd	paracétamol sér	STD	0	0	0
Standard de validation 120-1.lcd	paracétamol sér	STD	0	0	0
Standard de validation 120-2.lcd	paracétamol sér	STD	0	0	0
Standard de validation 120-3.lcd	paracétamol sér	STD	0	0	0
Average			0	0	0
%RSD			0.000	0.000	0.000
Maximum			0	0	0
Minimum			0	0	0
Standard Deviation			0	0	0

Résumé

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

Le but du présent travail est de valider une méthode de dosage du paracétamol dans des comprimés par Chromatographie Liquide à Haute Performance en utilisant le profil d'exactitude et l'intervalle de tolérance comme outils de décision de validation ; démarche harmonisée proposée par une commission SFSTP publiée en 2006 dans la revue pharmaceutique STP Pharma Pratique.

Nous avons commencé dans un premier temps par une étude bibliographique concernant le principe actif étudié et l'approche adoptée au cours de la validation de la méthode d'analyse.

Dans la partie pratique s'est concrétisée par l'élaboration d'un protocole de validation, objet de la suite du travail.

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

La technique développée s'est avérée spécifique, linéaire, sensible, exacte dans l'intervalle [80, 120] mg/ml avec un risque d'avoir au maximum de 5 % des futures mesures en dehors des limites d'acceptations fixées à [-5, +5] %. Cela démontre la validité de la méthode développée et son aptitude à être appliquée en routine pour le dosage du paracétamol dans les comprimés de 500 mg.

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

Abstract

Quality control of pharmaceutical products is a regulatory requirement that all pharmaceutical laboratories must meet. To do this, they use analytical methods that must be validated.

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

The aim of this work is to validate a method of assaying paracetamol in tablets by high performance liquid chromatography using the accuracy profile and tolerance interval as validation decision tools; a harmonized approach proposed by a SFSTP commission published in 2006 in the pharmaceutical journal STP Pharma Pratique.

We started with a bibliographic study of the active principle studied and the approach adopted during the validation of the analytical method. In the practical part, a validation protocol was developed, the object of the work.

At the beginning of the validation, we were able to demonstrate the selectivity of the analysis method based on the slope comparison test. Then, after carrying out the experiments on a calibration range and a validation range, we calculated the different statistical criteria of the different models generated in order to build the accuracy profiles.

The technique developed was specific, linear, sensitive, exact in the range [80, 120] mg / ml with a risk of having a maximum of 5% of future measurements outside the acceptance limits set at [-5, +5]%. This demonstrates the validity of the developed method and its suitability for routine use in the determination of paracetamol in 500 mg tablets.

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