



الجمهورية الجزائرية الشعبية الديمقراطية  
République Algérienne Démocratique et Populaire

-----oOo-----

وزارة التعليم العالي والبحث العلمي

Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique

-----oOo-----

Université Mouloud MAMMERY Tizi-Ouzou

Faculté de médecine

Département de Pharmacie

جامعة مولود معمري تيزي وزو

كلية الطب

الصيدلة

N° d'ordre:

MEMOIRE DE FIN D'ETUDES

En vue de l'obtention du Diplôme de Docteur en Pharmacie

Intitulé :

**Validation d'une méthode de dosage du  
Furosémide dans les comprimés par HPLC en  
vue de l'application aux adaptations de doses**

Présenté et soutenu publiquement

Le : 31/10/2020

Réalisé par:

M<sup>elle</sup> SALMI Asma

M<sup>elle</sup> YANINA Noussaiba

Composition du jury :

Pr M. MAMOU

MCA HU

UMMTO

Président

Dr H. BEN SI SAID

MAHU

UMMTO

Promoteur

Dr R.BRAHIMI

RESIDENT

UMMTO

Co-promoteur

Dr M. BOURSOUTI

ASSISTANT

UMMTO

Examineur

Année universitaire : 2019/2020.

## REMERCIEMENT

Nous tenons tout d'abord à remercier Dieu le tout puissant et miséricordieux, qui nous a donné la force et la patience d'accomplir ce modeste travail.

Nous désirons exprimer toutes nos reconnaissances à notre directeur du mémoire, Docteur BENSISAID Hassan. Nous le remercions de nous avoir encadrés, orienté, aidé et conseillé. Et notre Co-promoteur Dr BRAHIMI Rabah pour son aide précieuse.

Nous remercions très chaleureusement ; monsieur le Pr. M. MAMOU de nous avoir honoré en présidant le jury et d'avoir évalué ce modeste travail.

Nos remerciements s'adressent à Dr BOURSSOUTI. Non seulement pour le fait d'être parmi les membres du jury mais également pour ses efforts fournis lors de l'examen de notre travail de fin d'étude.

Nous remercions l'ensemble des membres de jury d'avoir accepté de se déplacer durant cette pandémie rien que pour nous honorer par leur présence ce jour de notre soutenance.

Nous adressons nos sincères remerciements à tous les professeurs, intervenants et toutes les personnes qui par leurs paroles, leurs écrits, leurs conseils et leurs critiques ont guidé nos réflexions et ont accepté de nous rencontrer et de répondre à nos questions durant nos recherches.

Un grand merci à toute l'équipe de chimie analytique de la faculté de médecine de l'université MOULOUD MAMMERI de TIZI OUZOU, pour l'environnement favorisant le bon déroulement de notre travail et à toute personne qu'on a omis de citer ayant contribué de près ou de loin à la réalisation de ce travail .

On n'oublie pas nos familles pour leur contribution, leur soutien et leur patience.

Enfin, nous adressons nos plus sincères remerciements à tous nos proches et amis, qui nous ont toujours encouragés au cours de la réalisation de ce mémoire.

À tous ces intervenants, nous présentons nos remerciements, notre respect et notre gratitude

## Dédicaces

*Toutes les lettres ne sauront trouver les mots qu'il faut... Tous les mots ne sauraient exprimer la gratitude, L'amour, le respect, la reconnaissance. Aussi, c'est tout simplement que Je dédie cette thèse...*

A mon très cher père **Yanina Boudjema** vous avez toujours été mon école de patience, de confiance et surtout d'espoir et d'amour. Vous êtes et vous resterez pour moi ma référence.

A celle qui m'a arrosé de tendresse et d'espoir, à la source d'amour incessible à la mère des sentiments fragiles qui m'a bénie par ses prières, ma mère **Yanina Ourdia**.

A mon support dans la vie qui a cru en moi et ma dirigé vers la gloire, ma seule et unique sœur **Roufeida**.

A Mon cher grand frère **Walid** et au petit Mohamed **Sadek** En signe de l'affection et du grand amour que je vous porte, les mots sont insuffisants pour exprimer ma profonde estime.

A ma grand-mère **Boukeffa Soltana** mes chers oncles **Nadir Youcef** et **Hichem** mes tantes **Massouda, Fatiha, Yamina, Naima, Malika, Yasmina, Nesrine, Sara** et **Rabaa** que ce modeste travail soit l'expression des vœux que vous n'avez cessé de formuler dans vos prières. Que dieu vous préserve santé et longue vie.

A ma famille paternelle mon oncle **Said** mes tentes **Mebkhouta** et **Torkia** qu'il me soit permis aujourd'hui de vous assurer mon profond amour et ma grande reconnaissance j'implore dieu qu'il vous apporte le bonheur.

A la mémoire de mes grands-pères **Yanina Saadi** et **Yanina Mbarek** a mes grand-mères **Boussandala Malika** et **Achour Fatima** Puisse Dieu vous avoir en sa sainte miséricorde et que ce travail soit une prière pour vos âmes.

***A mes toutes mes adorables cousines et mes chers cousins.***

A mes amies : ***Asma, Fadila, Hadil, Hadjer, Sabrina et Yasmine*** qui font partie de ses personnes rares par leurs gentillesse, leur tendresse et leurs grands cœurs qu'elles trouvent ici le témoignage de tout mon amour et toute ma reconnaissance pour leur inlassable soutien.

***À MADAME La pharmacienne Rabia Fazia***

***À TOUTE LA PROMO PHARMACIE 2020***

***À Tous mes enseignants du primaire jusqu'à la fin de mon cursus universitaire.***

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

***NOUSSAIBA***

## Dédicaces

*Je dédie ce modeste travail accompagné d'un profond amour :*

*À la mémoire de ma grande mère maternelle (**MA**) et mon grand-père paternelle (**Amar**) puisse Dieu vous avoir en sa sainte miséricorde et que ce travail soit une prière pour vos âmes.*

*À la plus douce et la plus merveilleuse de toutes les mères. À une personne qui m'a tout donné sans compter. Aucun hommage ne saurait transmettre à sa juste valeur ; l'amour, le dévouement et le respect que je te porte. Sans toi, je ne serai rien, mais grâce à toi je suis pharmacienne **chère mère** .*

*À celui qui m'a aidé à découvrir le savoir, ce trésor inépuisable. Tu as été le meilleur des pères, tu as su m'entourer d'attention, m'inculquer les valeurs nobles de la vie, m'apprendre le sens du travail, de l'honnêteté et de la responsabilité. Merci d'avoir été toujours là pour moi cher **père**.*

*À mon grand-père **Messaoud**, ma grande mère **Hadda** que DIEU les garde pour moi.*

*Aux plus belles sœurs au monde : **Maroua, Oualaa, Salma** et le petit prince de la famille **Omar Ghaïth** votre amour m'a toujours poussé vers le meilleur .*

*À mes oncles : **Rachid, Nabil, Rabeh et Mustapha** et leurs femmes qui sont ma force dans cette vie.*

*Mes tantes : **Hakima et Malike** qui ont été toujours là pour me soutenir et me diriger vers la bonne voie.*

*À mes autres oncles et tantes qui font partie intégrante de ma famille que j'aime trop.*

*À Mes petits cousins et cousines à qui je souhaite tout le bonheur du monde.*

*À mes amies et consœurs : **Hadjer, Lina, Rania et Yasmine**. Je vous aime énormément .*

*À tous ceux qui m'ont aidé soutenue, encouragé pendant mon cursus et les chères personnes que je n'ai pas mentionnées.*

**ASMA**

## Table des matières

|   |     |
|---|-----|
| Table des matières .....                  | i   |
| Liste des abréviations .....              | vii |
| Liste des figures .....                   | ix  |
| Listes des tableaux .....                 | x   |
| Introduction .....                        | 2   |
| Objectifs .....                           | 4   |
| Chapitre I : FUROSEMIDE.....              | 6   |
| 1. Définition .....                       | 7   |
| 2. Propriétés.....                        | 7   |
| 2 .1. Propriétés chimiques .....          | 7   |
| 2.1.1 Aspect organoleptique .....         | 7   |
| 2.1.2 Solubilité.....                     | 7   |
| 2 .2. Propriétés pharmacologiques.....    | 8   |
| 2.2.1 La pharmacocinétique.....           | 8   |
| 2.2.2 La pharmacodynamie .....            | 9   |
| 3. Les indications.....                   | 11  |
| 4. La posologie .....                     | 11  |
| 5. Les effets indésirables .....          | 12  |
| 6. Les contre-indications .....           | 13  |
| 7. Les interactions médicamenteuses ..... | 13  |
| 8. La toxicité.....                       | 14  |
| Chapitre II : .....                       | 15  |
| Forme pharmaceutique : Comprimé.....      | 15  |
| 1. Définition .....                       | 16  |
| 2. Différents aspects des comprimés ..... | 16  |

|       |  |    |
|-------|--|----|
| 2.1.  | Comprimés à libération conventionnelle.....          | 16 |
| 2.1.1 | Comprimés nus ou non enrobés.....                    | 16 |
| 2.1.2 | Comprimés enrobés .....                              | 16 |
| 2.2.  | Comprimés à libération modifiée.....                 | 17 |
| 2.1.1 | Comprimés à libération prolongée .....               | 17 |
| 2.1.2 | Comprimés à libération retardée.....                 | 17 |
| 2.1.3 | Comprimés à libération accélérée.....                | 17 |
| 2.1.4 | Comprimés à utiliser dans la cavité buccale.....     | 18 |
| 3.    | Caractéristiques organoleptiques des comprimés ..... | 18 |
| 3.1   | Formes et dimensions.....                            | 18 |
| 3.2   | Couleurs et marquage.....                            | 18 |
| 3.3   | Structure .....                                      | 19 |
| 4.    | Composition des comprimés .....                      | 19 |
| 4.1   | Principe actif .....                                 | 19 |
| 4.2   | Excipient .....                                      | 19 |
| 5.    | Fabrication des comprimés.....                       | 20 |
| 6.    | Contrôles .....                                      | 20 |
| 6.1   | Apparence visuelle.....                              | 21 |
| 6.2   | Uniformité de teneur et de masse .....               | 21 |
| 6.3   | Résistance à la rupture .....                        | 21 |
| 6.4   | Friabilité.....                                      | 21 |
| 6.5   | Temps de désagrégation ou de délitement .....        | 21 |
| 6.6   | L'essai de dissolution .....                         | 21 |
| 7.    | Avantages et inconvénients .....                     | 22 |
| 8.    | Comprimé du furosémide.....                          | 22 |
| 9.    | Adaptation posologique.....                          | 23 |
| 9.1.  | Adaptation posologique en pédiatrie.....             | 23 |

|  |    |
|--|----|
| 9.2. Adaptation des formes sèches : .....              | 23 |
| Chapitre III : validation analytique.....              | 25 |
| 1. Définition .....                                    | 26 |
| 2. But de la validation .....                          | 26 |
| 3. Règlementations .....                               | 27 |
| 3.1 Documents ISO : .....                              | 27 |
| 3.2. Guidelines ICH:.....                              | 27 |
| 3.3 FDA.....   | 27 |
| 3.4 SFSTP : .....                                      | 27 |
| 4. Cycle de vie d'une méthode analytique .....         | 28 |
| 5. Quelles procédures analytiques à valider ? .....    | 29 |
| 6. Les critères de validation.....                     | 30 |
| 6.1 La spécificité .....                               | 31 |
| 6.2 La linéarité .....                                 | 31 |
| 6.3 Exactitude .....                                   | 31 |
| 6.4 La justesse.....                                   | 32 |
| 6.5 La fidélité .....                                  | 32 |
| 6.6 La limite de détection .....                       | 33 |
| 6.7 La limite de quantification .....                  | 33 |
| 6.8 La Robustesse .....                                | 33 |
| 6.9 Stabilité de la solution .....                     | 33 |
| 7. Les critères de choix de la validation .....        | 33 |
| 8. Les Etapes de validation.....                       | 34 |
| 9. Protocoles en phase de validation .....             | 34 |
| 10. Etude statistique de la validation analytique..... | 37 |
| 10.1. La spécificité .....                             | 37 |
| 10.2. Fonction de réponse .....                        | 39 |

|          |  |    |
|----------|--|----|
| 10.3.    | Alignement des observations.....                           | 40 |
| 10.4.    | Prédiction inverse.....                                    | 41 |
| 10.5.    | Calcul de la justesse et de la fidélité intermédiaire..... | 42 |
| 10.5.1.  | Modèle.....  | 42 |
| 10.5.2.  | Calcul de la justesse.....                                 | 44 |
| 10.5.3.  | Fidélité intermédiaire.....                                | 44 |
| 10.6.    | Calcul de l'exactitude.....                                | 44 |
| 10.7.    | Linéarité de la justesse.....                              | 45 |
| 10.8.    | Erreur totale et profil de l'erreur totale.....            | 45 |
| 10.8.1.  | Calcul de l'intervalle de tolérance.....                   | 46 |
| 10.8.2.  | Profil d'exactitude et décision.....                       | 47 |
| 10.9.    | Limites de quantification.....                             | 48 |
|          | Matériels et Méthodes.....                                 | 50 |
| 1.       | Matériels :.....   | 51 |
| 1. 1.    | Appareillages :.....                                       | 51 |
| 1. 2.    | Verreries et autres :.....                                 | 52 |
| 1. 3.    | Matière première.....                                      | 52 |
| 1. 4.    | Réactif.....   | 53 |
| 2.       | Méthode.....   | 53 |
| 2. 1.    | Méthodologie de la validation analytique.....              | 53 |
| 2. 2.    | Choix du Protocol de validation.....                       | 53 |
| 2. 3.    | Le choix des paramètres de la validation.....              | 54 |
| 2. 3. 1. | Domaine d'application et les niveaux de concentration..... | 54 |
| 2. 3. 2. | Limites d'acceptabilité ( $\lambda$ ).....                 | 54 |
| 2. 3. 3. | Probabilité de confiance ( $\beta$ ).....                  | 54 |
| 2. 3. 4. | Conditions expérimentales.....                             | 54 |
| 2. 3. 5. | Préparation de la feuille de calcul.....                   | 57 |

|   |    |
|---|----|
| Résultats .....   | 58 |
| 1. Spécificité et effet matrice.....  | 59 |
| 1. 1. Comparaison des chromatogrammes .....   | 59 |
| 1. 2. Confirmation de la spécificité sur les deux gammes d'étalonnage et de validation<br>61    |    |
| 1. 3. Vérification de l'absence d'effet matrice et d'erreur systématique .....                  | 63 |
| 2. Fonction de réponse .....  | 63 |
| 2. 1. Critères de choix de la fonction de réponse.....  | 68 |
| 3. Alignement des observations .....  | 70 |
| 4. Prédications inverses.....   | 72 |
| 5. Justesse.....  | 72 |
| 6. Fidélité.....  | 73 |
| 7. Exactitude.....  | 74 |
| 8. Erreur totale.....   | 76 |
| 9. Intervalle de tolérance .....  | 77 |
| 10. Profil d'exactitude.....  | 79 |
| 11. Linéarité.....  | 79 |
| 12. Limites de quantification .....   | 81 |
| Discussion.....   | 83 |
| 1. Spécificité.....   | 84 |
| 1. 1. Comparaison des chromatogrammes .....   | 84 |
| 1. 2. Confirmation de la spécificité sur les deux gammes d'étalonnage et de validation<br>..... | 84 |
| 1. 3. Comparaison des deux pentes des deux droites de régression.....                           | 84 |
| 2. Le choix de la fonction de réponse.....  | 85 |
| 3. Critères de performance de la fonction de réponse choisie.....                               | 85 |
| 3. 1. Justesse .....  | 85 |
| 3. 2. Fidélité.....   | 85 |

|   |    |
|---|----|
| 3. 3. Erreur totale.....  | 86 |
| 3. 4.Profil d'exactitude.....                                     | 86 |
| 3. 5.Limites de quantification et intervalle de validité<br>..... | 86 |
| 3. 6.Linéarité .....  | 86 |
| 4. Synthèse des résultats.....                                    | 87 |
| Conclusion.....   | 89 |

## Liste des abréviations

AINS : Anti-inflammatoire Non Stéroïdien

AMM : Autorisation de Mise sur le Marché

BPF : Bonnes Pratiques de Fabrication

C18 : Octadecylsilane

cm : Centimètre

CMC : Carboxyméthylcellulose

DDL : Degré De Liberté

DL<sub>50</sub> : Dose létale à 50%

FDA : Food and Drug Administration

HPLC : High Performance Liquid Chromatography

ICH : International Conférence on Harmonisation

IEC : Inhibiteur de l'enzyme de conversion

ISO : International Organisation For Standardisation

LLOQ : Limite de Quantification basse

LQ : Limite de Quantification

mg : milligramme

mm : Millimètre

ml : millilitre

PA : Principe actif

PVP : Polyvidone

RCP : Résumé des Caractéristiques du Produit

SCR : Substance Chimique de Référence

SE : Standard d'Etalonnage

SFSTP : Société Française des Sciences Techniques et Pharmaceutiques

STP : Surveillance Thérapeutique Pharmacologique

SV : Standard de Validation

ULOQ : Limite de Quantification haute

UV : Ultra-Violet

$\mu\text{m}$  : micromètre

$\lambda$  : La longueur d'onde

## Liste des figures

|   |    |
|---|----|
| Figure 1: l'action salidiurétique du furosémide (8) .....   | 10 |
| Figure 2: l'action antihypertenseur du furosémide (9) .....   | 11 |
| Figure 3: Les effets indésirables du furosémide (4, 8).....   | 12 |
| Figure 4: Fabrication des comprimés non enrobés par compression .....   | 20 |
| Figure 5: Cycle de vie d'une méthode analytique (2).....  | 29 |
| Figure 6: Logigramme permettant de sélectionner un protocole de validation (2).....                                   | 36 |
| Figure 7: Interférences à effet additif ou multiplicatif .....  | 38 |
| Figure 8: Chromatogramme du standard d'étalonnage, niveau 100% .....  | 59 |
| Figure 9: Chromatogramme du standard de validation, niveau 100% .....   | 59 |
| Figure 10 : Chromatogramme du diluant non chargé de PA.....   | 60 |
| Figure 11: Chromatogramme du diluant avec placebo non chargée de PA.....  | 60 |
| Figure 12: courbes d'étalonnages obtenues avec la fonction $y=ax+b$ .....   | 64 |
| Figure 13: courbes d'étalonnage obtenues avec la fonction $\text{Ln } y=f(\text{Ln } x)$ .....                        | 66 |
| Figure 14 : Courbes d'étalonnages obtenues avec la fonction $\sqrt{y}=f(\sqrt{x})$ .....                              | 67 |
| Figure 15: courbes d'étalonnages obtenues avec la fonction $y=ax$ .....   | 68 |
| Figure 16: Profil d'erreur relative totale .....  | 77 |
| Figure 17: Profil d'exactitude .....  | 79 |
| Figure 18: Profil de la régression linéaire entre les concentrations prédites et les concentrations introduites. .... | 81 |

## Listes des tableaux

|  |    |
|--|----|
| Tableau I: Propriétés chimiques du furosémide .....  | 8  |
| Tableau II: Les interactions médicamenteuses du furosémide.....  | 13 |
| Tableau III: La DL <sub>50</sub> des différents espèces .....  | 14 |
| Tableau IV: Avantages et inconvénients des comprimés.....  | 22 |
| Tableau V: Critères de validation en fonction du type de procédure à valider .....   | 30 |
| Tableau VI: Choix du nombre de standards d'étalonnage et de validation en fonction du protocole choisi .....                 | 37 |
| Tableau VII: Exemples des fonctions de réponses.....   | 39 |
| Tableau VIII: règles d'alignement pour différentes fonctions de réponses .....   | 41 |
| Tableau IX: calcul des prédictions inverses pour différentes fonctions de réponses .....                                     | 41 |
| Tableau X: Calcul des prédictions inverses pour la droite ayant subi une transformation logarithmique ou racine carrée ..... | 42 |
| Tableau XI : Appareillages utilisés dans ce présent travail.....   | 51 |
| Tableau XII: Verreries et autres matériel utilisés dans ce travail .....   | 52 |
| Tableau XIII: Matières premières utilisés dans ce travail.....   | 52 |
| Tableau XIV: Réactifs utilisés dans ce présent travail.....  | 53 |
| Tableau XV: Masses correspondantes pour chaque niveau de concentration des standards d'étalonnage .....                      | 55 |
| Tableau XVI: Masses correspondantes pour chaque niveau de concentration des standards de validation.....                     | 56 |
| Tableau XVII: Conditions chromatographiques de la méthode de dosage .....  | 57 |
| Tableau XVIII: Les résultats de la superposition des quatre chromatogrammes.....   | 60 |
| Tableau XIX: résultats obtenus sur la gamme sans matrice.....  | 61 |
| Tableau XX : comparaison de la pente et l'ordonnée à l'origine avec 0 sur la gamme sans matrice.....                         | 62 |
| Tableau XXI : résultats obtenus sur la gamme avec matrice .....  | 62 |
| Tableau XXII: comparaison de la pente et l'ordonnée à l'origine avec 0 sur la gamme sans matrice.....                        | 63 |
| Tableau XXIII : comparaison des deux pentes .....  | 63 |
| Tableau XXIV: Résultats obtenus pour la fonction $y = ax + b$ .....  | 64 |
| Tableau XXV: résultats obtenus avec la fonction $\ln y = f(\ln x)$ .....   | 65 |
| Tableau XXVI: Résultats obtenus pour la fonction $\sqrt{y} = f(\sqrt{x})$ .....  | 66 |
| Tableau XXVII: Résultats obtenus pour la fonction $y = ax$ .....   | 67 |
| Tableau XXVIII: Critères de choix de la fonction de réponse.....   | 69 |
| Tableau XXIX: Tableau d'alignement des réponses observées avec les trois séries de validation.....                           | 71 |
| Tableau XXX: Prédiction inverses obtenus avec les SV .....   | 72 |
| Tableau XXXI: Calcul de la justesse pour chaque niveau des SV.....   | 73 |
| Tableau XXXII: Calcul de fidélité pour chaque niveau des SV .....  | 73 |
| Tableau XXXIII: Résultats du calcul de l'exactitude relative. ....   | 75 |
| Tableau XXXIV: Calcul de l'erreur totale pour chaque niveau de concentration des SV.....                                     | 76 |
| Tableau XXXV: Calcul des limites de tolérance pour chaque niveau de concentration .....                                      | 78 |

|  |    |
|--|----|
| Tableau XXXVI: Calcul des différents paramètres de la linéarité.....   | 80 |
| Tableau XXXVII: calcul de la limite de quantification .....  | 82 |
| Tableau XXXVIII: Signification des résultats de la comparaison des pentes et des ordonnées à l'origine ..... | 84 |
| Tableau XXXIX: Signification des résultats des deux pentes et deux ordonnées à l'origine entre elle .....    | 84 |

# **Introduction**

## Introduction

Les diurétiques de l'anse notant le furosémide, sont les plus puissants de leur classe thérapeutique, indiqués principalement dans le traitement des œdèmes de différentes origines aussi dans le traitement des hypertensions modérés (1).

Les comprimés du furosémide disponibles sur marché sont de doses limitées et non adaptées au vécu particulier de tous les malades, en fonction de l'âge, du poids et de l'état physiologique et physiopathologique de ces derniers. Afin d'atteindre un meilleur effet thérapeutique venant d'une posologie effective on a recours à des adaptations posologiques du comprimé du furosémide, notamment pour les enfants qui forment une population hétérogène et ne peuvent être considérés simplement comme « de petits adultes », ce qui implique le besoin d'une large gamme de doses faibles pour les comprimés ; néanmoins il n'existe pas un dosage adapté à eux, pour cela les cliniciens optent à la prescription des comprimés du furosémide après adaptation posologique en collaboration avec des galénistes.

Cette adaptation consiste à fractionner le comprimé du furosémide pour cibler la dose souhaitée, une méthode de dosage des comprimés du furosémide a été mise au point et une validation de cette dernière pour un intervalle élargi comprenant ces faibles doses fait l'objet de notre travail.

Avant la mise en routine de toute méthode d'analyse, elle doit faire l'objet d'une validation analytique qui repose sur un ensemble de mesures expérimentales et de tests statistiques conformément aux textes réglementaires en vigueur.

Dans le but d'aider concrètement les industriels du médicament à appliquer les recommandations réglementaires, des commissions techniques de la Société Française des Sciences et Techniques Pharmaceutiques ont élaboré plusieurs guides, le dernier publié en 2006 porte sur le profil d'exactitude et le calcul de l'erreur totale. Ce guide constitue le support de notre validation (2).

Afin de répondre clairement à la problématique posée et de valider la méthode du dosage du furosémide par HPLC pour un intervalle élargi, notre manuscrit est réparti en deux :

La première partie concerne une revue de la littérature ou partie théorique, elle est subdivisée en trois chapitres :

- Dans le premier chapitre, nous traiteront les principales propriétés physicochimiques, pharmacologiques et toxicologiques du Furosémide.

- Le Furosémide étant dosé dans la forme pharmaceutique « comprimé », le deuxième chapitre traitera brièvement cette forme galénique.
- Le troisième chapitre est dédié à la validation analytique dans ses aspects réglementaires et protocoles expérimentaux.

La seconde partie de ce manuscrit est réservée à la partie expérimentale, nous présenterons dans un premier temps le matériel et les méthodes du travail, puis nous exposerons nos résultats suivis des discussions et nous terminerons avec une conclusion quant à la validité de la méthode de dosage du furosémide dans les comprimés de 40 mg.

**Objectifs**

L'objectif principal de notre étude est de valider une méthode de dosage par chromatographie liquide haute performance (HPLC) avec un intervalle élargi qui permet une analyse quantitative du Furosémide dans les comprimés afin les utiliser en contrôle des adaptations galéniques .

Outre cet objectif principal, un objectifs secondaire est défini :

Etablir un protocole de dosage utilisable en routine pour la vérification de la teneur des adaptations galéniques .

# Partie théorique

Chapitre I :

**FUROSEMIDE**

Les diurétiques (salidiurétiques) sont des substances qui agissent directement sur les reins par l'inhibition de la réabsorption d'eau et de NaCl, augmentant ainsi l'émission d'urine (la diurèse).

Le furosémide appartient à cette classe, prescrit en cas d'œdème résultant d'un désordre des liquides corporelles d'origine hépatique, cardiaque et rénale et également pour maîtriser la pression artérielle, il est utilisé seul ou associé à d'autre médicament appartenant ou pas à la même classe thérapeutique.

## 1. Définition

C'est un dérivé sulfanyl-anthranilique, donc sulfamidé, mais se distingue de tous les autres sulfamides par la puissance de son action diurétique – qui le fait classer à part.

Salidiurétique non mercuriel et non thiazidique d'action rapide, puissante et brève.

Il agit principalement sur la portion ascendante *de* l'anse de Henlé, mais, aussi, en d'autres points du néphron (1, 3).

## 2. Propriétés

### 2.1. Propriétés chimiques

Les propriétés chimiques du Furosémide sont illustrées dans le tableau I.

#### 2.1.1 Aspect organoleptique

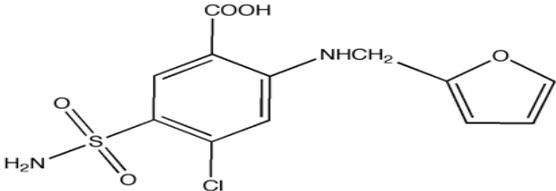
Le furosémide se présente sous forme de poudre cristalline inodore blanche ou presque blanche et pratiquement insipide (3, 4).

#### 2.1.2 Solubilité

Sa solubilité est presque nulle dans l'eau mais elle est modérée dans l'alcool (assez soluble dans l'éthanol à 96 pour cent).

Le furosémide est légèrement soluble dans l'éther et à peine dans le chloroforme bien qu'il se dissolve largement dans les solutions alcalines diluées (d'hydroxyde) ainsi que l'acétone et le diméthylformamide (4).

Tableau I:Propriétés chimiques du furosémide (4)

| DCI                        | FUROSEMIDE   |
|----------------------------|--|
| Nom chimique selon l'IUPAC | Acide 4-chloro- <i>N</i> -furfuryl-sulfamoylanthranilique                          |
| Formule chimique brute     | $C_{12}H_{11}ClN_2O_5S$  |
| Masse molaire              | 330,8 g/mol  |
| Formule développée         |  |
| Point de fusion            | 202 à 205 °C (avec décomposition)  |
| Constant d'acidité         | Acide faible de $pK = 3,9$   |

## 2.2. Propriétés pharmacologiques

### 2.2.1 La pharmacocinétique

- **Absorption**

Le furosémide est absorbé rapidement, après une prise orale, mais son absorption est incomplète donnant une biodisponibilité de l'ordre de 50% ceci au niveau du tractus gastro-intestinal(4, 5).

- **Distribution**

Le furosémide se lie fortement aux protéines plasmatiques (liaison de 96 à 98%).

Avec un Volume de distribution de  $V_d = 0.150$  l/kg (6).

- **Métabolisme**

Une petite fraction de la dose du médicament est métabolisée par clivage de la chaîne latérale au niveau hépatique et rénale c'est une glucuroconjugaison (6).

- **Elimination**

L'élimination est surtout rénale avec un temps de demi-vie d'élimination  $T_{1/2} = 1h$ .

Jusqu'à  $\frac{2}{3}$  de la dose du furosémide ingérée est excrétée dans l'urine, ceci s'accomplit par une filtration glomérulaire et une sécrétion tubulaire dans la partie proximale du tube.

Plus accessoirement biliaire : Le dernier tiers de la dose est excrété dans les fèces (5, 7).

### 2.2.2 La pharmacodynamie

- **Action salidiurétique**

Le furosémide agit principalement au niveau de la branche ascendante de l'anse de Henlé en provoquant un blocage du système de cotransport  $Na^+/K^+/2Cl^-$  au pôle luminal des cellules tubulaires, ceci est schématisé dans la figure 1 ci-dessous, cette action croît proportionnellement aux doses administrées et persiste en cas d'insuffisance rénale.

Il agit sur tout le néphron ; en augmentant le flux sanguin rénal dans la zone corticale du rein, ce qui contribue à réduire la réabsorption d'eau et d'électrolytes par la portion proximale des tubules (6, 7).

Le furosémide n'inhibe pas l'anhydrase carbonique et n'est pas un antagoniste de l'aldostérone. Son action diurétique est indépendante des modifications de l'équilibre acido-basique du corps(3).

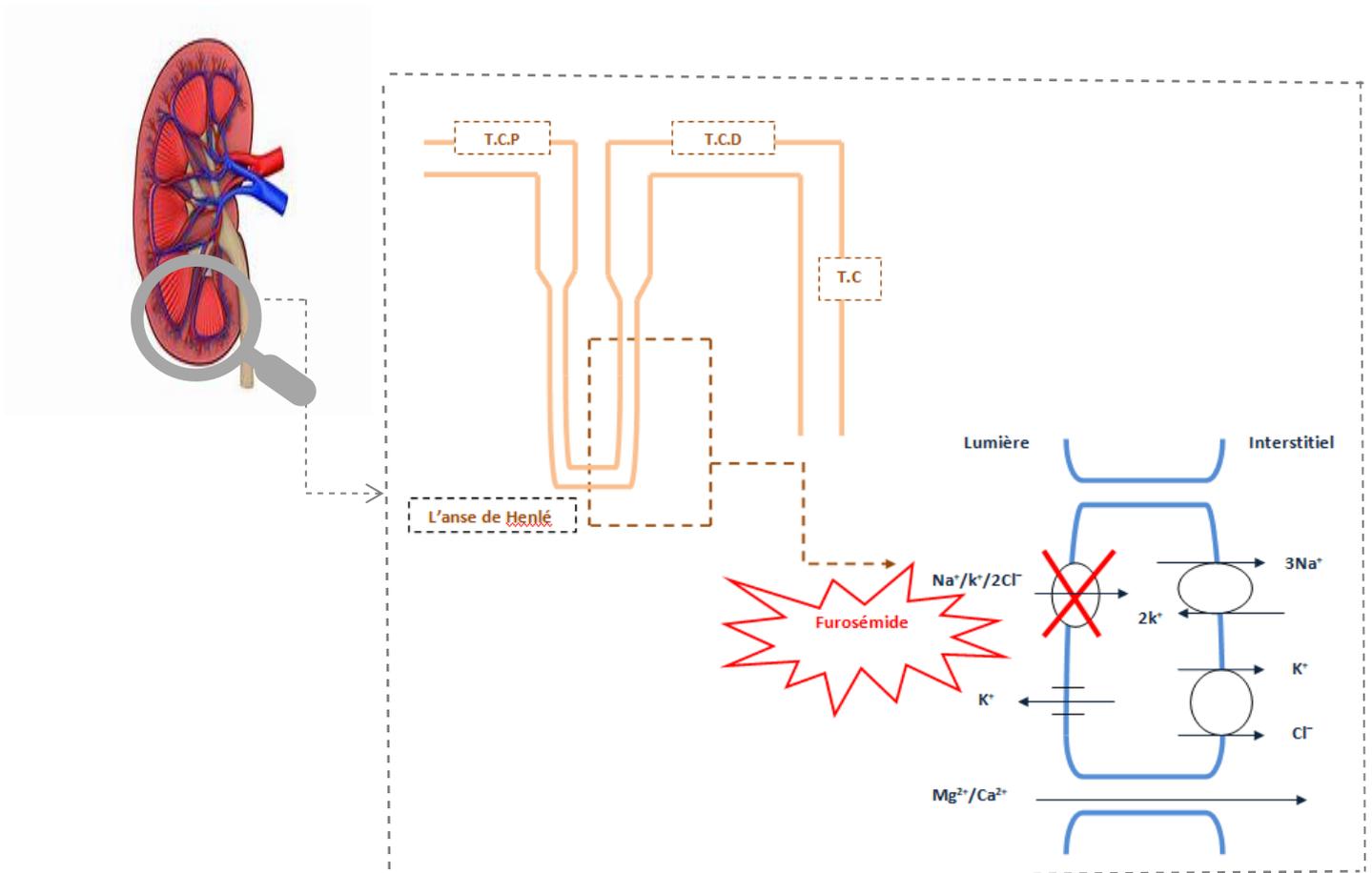


Figure 1: l'action salidiurétique du furosémide (8)

- **Action antihypertensive et autres actions**

Le furosémide possède une action hémodynamique se caractérisant par la diminution de la pression capillaire pulmonaire avant même l'apparition de toute diurèse, et par l'augmentation de la capacité de stockage du lit vasculaire veineux (6).

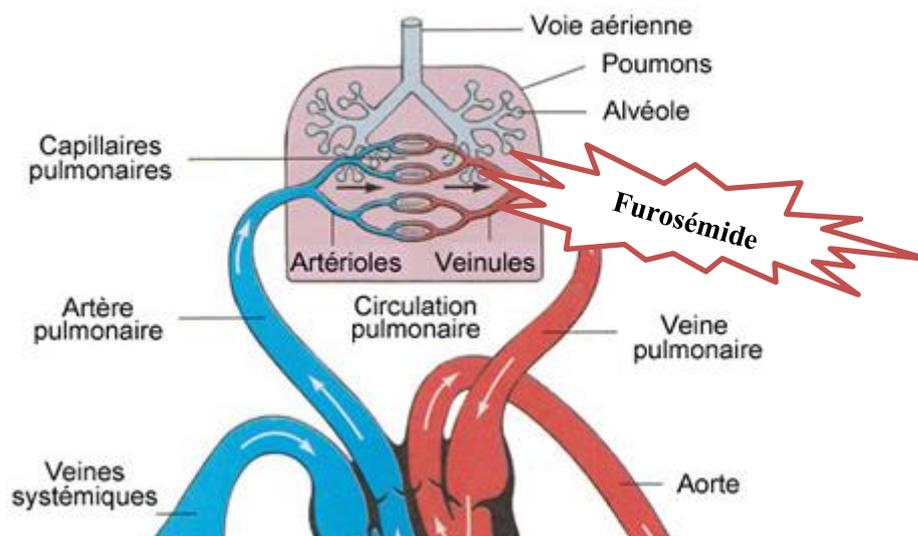


Figure 2: l'action antihypertenseur du furosémide (9)

### 3. Les indications

Le furosémide est indiqué pour le traitement d'œdème associé à

- L'insuffisance cardiaque ;
- La cirrhose du foie ;
- La néphrose et la néphrite chronique.

Il est indiqué aussi dans le traitement d'hypertension modéré ou dans les cas plus graves en association avec un autre antihypertenseur(5).

### 4. La posologie

En cas d'œdème :

Pour adultes :

La dose initiale habituelle est de 40 à 80 mg par voie orale administrée en une seule fois, de préférence le matin. En cas d'absence de diurèse, augmenter la posologie par paliers de 40 mg.

Enfants :

Les enfants devant recevoir du furosémide doivent être choisis soigneusement et le traitement par voie orale, doit être amorcé en milieu hospitalier sous étroite surveillance accompagnée de mesures fréquentes des électrolytes sériques. Avec une dose orale unique devrait se situer entre 0,5 et 1 mg/kg.

La dose quotidienne orale (administrée en doses fractionnées espacées de 6 à 12 heures) ne doit pas dépasser 2 mg/kg. Il faut, dès que faire se peut, recourir à un schéma posologique intermittent dans lequel l'intervalle sans médicament est le plus long possible, et la dose efficace, le plus faible possible(5).

En cas d'hypertension :

Chez l'adulte la dose initiale, qui est aussi la dose d'entretien, est de 40 mg deux fois par jour.

L'ajout de furosémide au schéma thérapeutique de patients recevant d'autres antihypertenseurs nécessite une réduction de la dose de ces derniers(5).

## 5. Les effets indésirables

Les effets indésirables du furosémide sont :

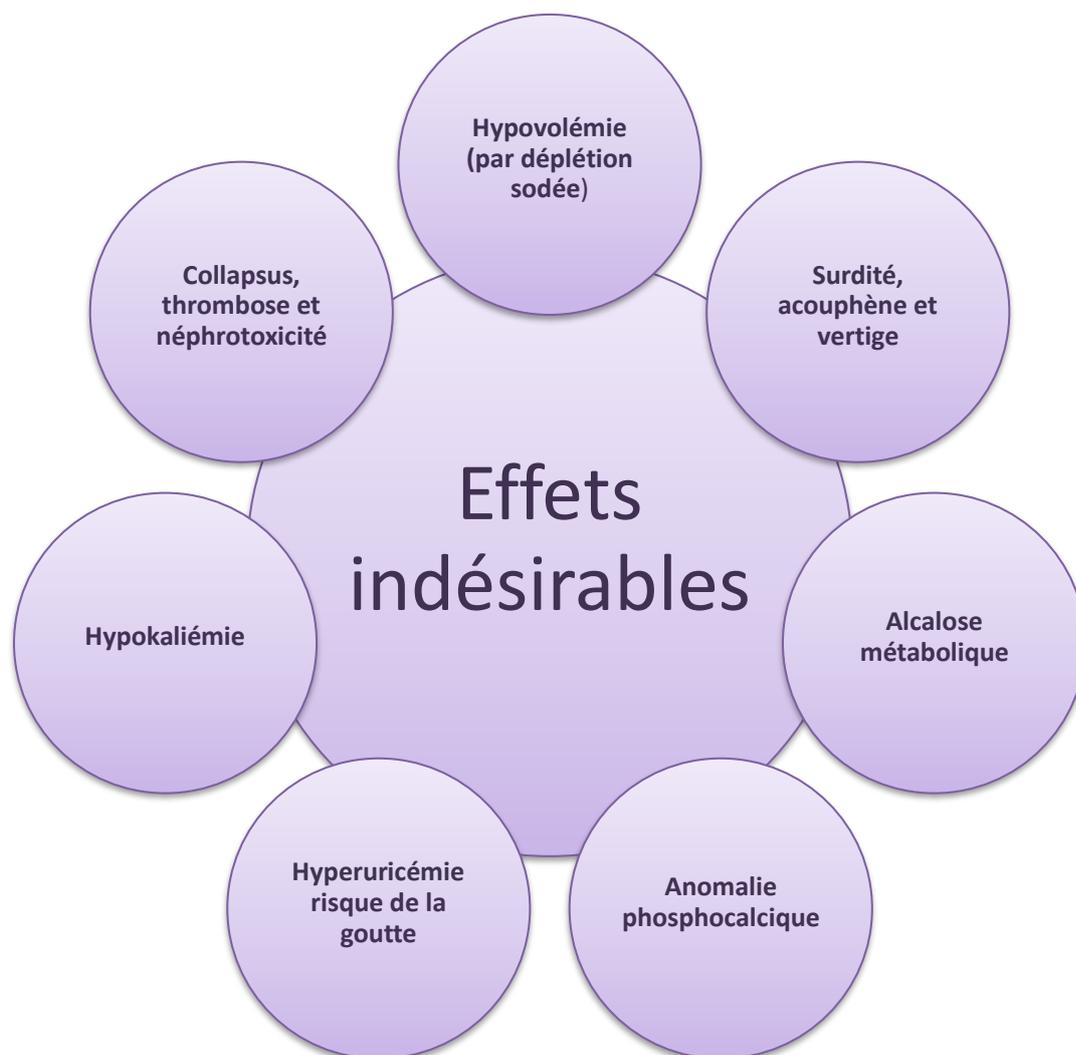


Figure 3: Les effets indésirables du furosémide (4, 8)

## 6. Les contre-indications

- Cirrhose du foie ;
- Insuffisance rénale ;
- L'hyponatémie, l'hypokaliémie, l'hypovolémie, la déshydratation et l'hypotension graves ;
- Patients dont le débit de filtration glomérulaire est supérieur à 20 ml/min, car ces derniers sont exposés à un risque de déplétion hydroélectrolytique extrêmement grave.
- Une hypersensibilité au furosémide (5).

## 7. Les interactions médicamenteuses

Les interaction médicamenteuses du furosémide sont démontrés dans le tableau II suivant

Tableau II: Les interactions médicamenteuses du furosémide (4)

| Médicament  | Effet   |
|---|---|
| <b>AINS</b>   | Insuffisance rénale fonctionnelle   |
| <b>Les antibiotiques oto toxique</b>                    | Augmente le risque de l'ototoxicité   |
| <b>Lithium</b>  | Augmente le risque de la neurotoxicité et cardiotoxicité                    |
| <b>Les laxatifs, glucocorticoïdes, la carbénoxolone</b> | Allongement du TQ, torsade de point par déplétion du K <sup>+</sup>         |
| <b>Antidiabétique</b>                                   | Diminution de l'effet hypoglycémiant  |
| <b>IEC</b>  | Intensification de l'effet antihypertenseur                                 |
| <b>Indométacine</b>                                     | Réduction des effets du furosémide  |
| <b>Anticonvulsivant</b>                                 | Diminution de l'effet diurétique du furosémide                              |
| <b>Warfarine</b>  | Augmentation de l'effet de la warfarine                                     |
| <b>Théophylline</b>                                     | Augmentation de l'effet de la théophylline                                  |
| <b>Tubocurarine/ myorelaxants dérivés du curare</b>     | Le furosémide diminue la capacité des artères à réagir aux amines pressives |

## 8. La toxicité

Tableau III: La DL<sub>50</sub> des différents espèces

| Espèce animale | DL <sub>50</sub> (voie orale) |
|----------------|-------------------------------|
| Souris         | 2,108 g/kg                    |
| Rat            | 2,20 g/kg                     |

### L'intoxication aiguë

Chez la souris et le rat, une augmentation marquée du tonus musculaire, un ptosis prononcé, des spasmes musculaires graves et des convulsions cloniques aiguës.

### L'intoxication chronique

Au cours des premières semaines de traitement 50 % de rat recevant une dose de 200 mg/kg ont éprouvé des effets toxiques, à savoir : écoulement oculaire, léthargie, anorexie, dyspnée et perte de poids (4).

Chapitre II :  
Forme  
pharmaceutique :  
Comprimé

## 1. Définition

Selon la pharmacopée européenne les comprimés sont des préparations de consistance solide contenant une unité de prise d'un ou plusieurs principes actifs. Ils sont obtenus en agglomérant par compression un volume constant de particules. Ils sont destinés à la voie orale. Certains sont avalés ou croqués, d'autres sont dissous ou désagrégés dans l'eau avant administration. Certains, enfin doivent séjourner dans la cavité buccale pour y libérer le principe actif. Plusieurs catégories peuvent être distinguées (10).

## 2. Différents aspects des comprimés

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

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

### 2.1. Comprimés à libération conventionnelle

Les formes à libération conventionnelle (immédiate) sont des formes pour lesquelles la libération du principe actif n'a pas fait l'objet d'une modification délibérée résultant de la mise en œuvre d'une formulation particulière et/ou d'un procédé de fabrication spécial. Le profil de dissolution du principe actif dépend essentiellement de ses propriétés intrinsèques (11).

#### 2.1.1 Comprimés nus ou non enrobés

Les comprimés nus, ou comprimés non enrobés, sont des préparations solides simplement constitués d'un mélange de poudre comprimée, sans ajout de couche d'enrobage(12).

Les comprimés nus peuvent être simples ou multicouches, Les premières couches résultent d'une seule compression et les autres de compressions successives (11).

#### 2.1.2 Comprimés enrobés

Ce sont des comprimés dont la surface est recouverte d'une ou plusieurs couches de mélanges de substances diverses, telles que les résines, gommes, gélatine, sucres, substances plastifiantes, polyols, cires, colorant.

Si le comprimé est recouvert d'une couche fine, il est dit comprimé pelliculé. Alors que si la couche est épaisse et composée de sucre, il est dit comprimé dragéifié (12).

## **2.2. Comprimés à libération modifiée**

Les comprimés à libération modifiée sont des comprimés, enrobés ou non, qui sont préparés avec des excipients spéciaux ou par des procédés particuliers, ou les deux, visant à modifier la vitesse, le lieu où le moment de libération de la (ou des) substance(s) active(s).

Ce sont des préparations dont la vitesse de libération du (ou des) principe(s) actif(s) est inférieure ou supérieure à celle qu'assurerait la forme à libération conventionnelle administrée par la même voie (11).

### **2.1.1 Comprimés à libération prolongée**

Ils sont des comprimés pour lesquels les concentrations du PA sont maintenues la plus constante possible dans l'organisme grâce à un système contrôlant sa vitesse de libération.

Le PA peut être inclus dans un excipient insoluble dans les liquides de l'organisme qui forme ainsi une matrice à partir de laquelle le PA sera libéré lentement.

La dose de principe actif total y est toujours plus élevée que dans une forme à libération conventionnelle (11-13).

### **2.1.2 Comprimés à libération retardée**

Les comprimés à libération retardée sont des formes galéniques où le principe actif est libéré à un moment ou un lieu différent par rapport à la forme conventionnelle administrée par la même voie.

C'est le cas notamment des comprimés gastros résistants qui sont généralement obtenus en les recouvrant d'un enrobage gastro résistant (11).

### **2.1.3 Comprimés à libération accélérée**

Les comprimés à libération accélérée sont des préparations dont la vitesse de libération de la substance active est plus rapide que celle de la forme à libération conventionnelle destinée à la même voie d'administration. Elles sont généralement administrées après mise en solution.

La libération peut être accélérée en augmentant la vitesse de désagrégation

On trouve :

- Les comprimés dispersibles ;
- Les comprimés solubles ;
- Les comprimés effervescents ;
- Les comprimés orodispersibles ;

- Les lyophilisats oraux (11, 13).

#### **2.1.4 Comprimés à utiliser dans la cavité buccale**

Les comprimés à utiliser dans la cavité buccale sont le plus souvent des comprimés non enrobés. Leur formule est établie de façon à permettre une libération lente et une action locale de la ou des substances actives, ou la libération et l'absorption de la (ou des) substance(s) active(s) dans une partie définie de la cavité buccale (11).

### **3. Caractéristiques organoleptiques des comprimés**

Le comprimé doit être identifiable afin d'éviter toute confusion chez les patients mais également le personnel soignant. Le risque iatrogène est augmenté en cas de polymédication et/ou déconditionnement des médicaments. Chaque comprimé est caractérisé visuellement par sa forme et ses dimensions sa couleur, son marquage et sa structure(14).

#### **3.1 Formes et dimensions**

Un comprimé correspond en général à « un cylindre droit dont les faces inférieures et supérieures peuvent être plates ou convexes et les bords biseautés ». En effet, lors de la production de comprimés par compression, la matrice et les poinçons définissent la forme du comprimé.

A noter que la surface externe du comprimé (en contact avec le milieu extérieur et fluides biologiques) peut avoir une influence sur la libération du principe actif (14).

#### **3.2 Couleurs et marquage**

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

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

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

Le marquage des comprimés peut se faire à l'aide de motifs en relief, de gravures, ou des impressions. Les comprimés sécables présentent une ou plusieurs barres de cassure assurant la division des comprimés en fractions uniformes (14).

### 3.3 Structure

En fonction des contraintes de formulation et du profil de libération souhaité, les comprimés peuvent présenter des structures variées, un comprimé peut être nu ou enrobé. L'enrobage a pour but de masquer le goût ou l'odeur désagréable, protéger le principe actif, contrôler la libération du principe actif, améliorer l'esthétique du comprimé et/ou faciliter l'identification (14).

## 4. Composition des comprimés

### 4.1 Principe actif

Le principe actif (PA), ou substance active, est la molécule présente dans le médicament qui lui confère ses propriétés thérapeutiques, diagnostiques ou préventives. Il est utilisé en vue de restaurer, corriger ou modifier des fonctions physiologiques en exerçant une action pharmaceutique, immunologique ou métabolique (12, 15).

### 4.2 Excipient

Les excipients sont des matières premières destinées à entrer dans la composition des préparations pharmaceutiques qui doivent être inertes vis-à-vis du PA mais influencent les propriétés du comprimé. Ils correspondent soit à une entité chimique définie, soit à un mélange plus ou moins complexe, d'origine synthétique ou naturelle (12, 15).

Nature des Excipients et pourcentages moyens :

- Diluant(s) environ 20-90%. Ce sont des excipients de charge : lactose, phosphate calcique, carbonate de calcium, sorbitol, mannitol.
- Liant(s) environ 5-10% On recherche les propriétés anti adhérente (ne colle pas aux parois de la machine), antifricition (évite forces de frottement et grippage) et antistatique (contre l'électricité statique) : Gomme, gélatine, amidon, stéarate de magnésium, talc
- Lubrifiant : facilitent l'écoulement dans la trémie. Environ 0,5 -1 % Silice colloïdale
- Désagrégeant(s) ou délitant(s) environ 5-10% amidon de maïs, de blé de riz ; carboxyméthyl d'amidon, carboxyméthylcellulose (CMC), polyvidone (PVP)
- Colorants - Aromatisants, masqueurs d'amertume (16, 17).

## 5. Fabrication des comprimés

En ce qui concerne les comprimés, leur fabrication nécessite la réalisation de plusieurs étapes appelées opérations unitaires.

Le nombre d'opérations unitaires va dépendre entre autres du type de comprimé à fabriquer, du mode de fabrication et des matières premières utilisées.

Généralement, la fabrication est composée de trois grandes étapes qui sont : le mélange des poudres de matières premières (pour assurer une association homogène), la granulation (à fin d'augmenter la densité qui assure un bon écoulement de la matière et évite la ségrégation du mélange) et la compression qui peut être suivie ou non d'une étape d'enrobage (14).

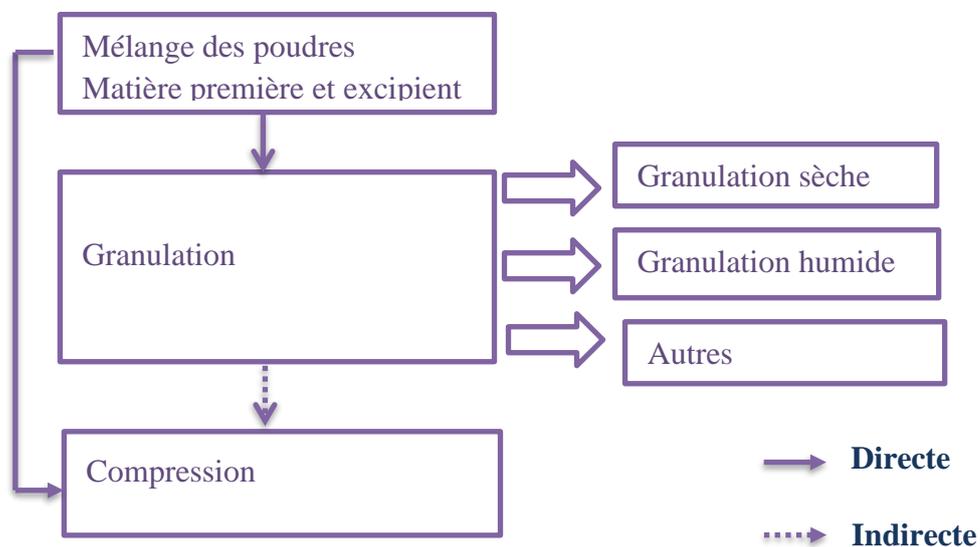


Figure 4: Fabrication des comprimés non enrobés par compression

## 6. Contrôles

Afin d'assurer la qualité des comprimés, des essais sont réalisés sur les matières premières utilisées pour leur fabrication (contrôle de l'identité et de la pureté des PA et des adjuvants) et sur les phases intermédiaires en cours de fabrication. Ainsi, des contrôles sont effectués sur le grain à comprimer et sur les comprimés au cours de la compression.

Parmi les contrôles effectués (15, 18) :

### **6.1 Apparence visuelle**

C'est un test physique subjectif (qualitatif) : la surface du comprimé est observée et tout défaut est identifié (15).

### **6.2 Uniformité de teneur et de masse**

Ce contrôle a pour but de s'assurer qu'au cours de la fabrication, la répartition du mélange initial en unités de prise a été suffisamment précise. On distingue : l'uniformité de teneur et la variation de masse.

L'uniformité de masse se fait par une pesée des comprimés fabriqués, calcul de la moyenne et l'écartype des pesées et vérifier l'inclusivité des résultats dans les intervalles d'acceptations (+/- X%). Celui de la teneur est un dosage de la substance active sur chaque comprimé(15).

### **6.3 Résistance à la rupture**

La cohésion des poudres est déterminée par des essais de résistance à la rupture. La dureté des comprimés est essentiellement déterminée par des essais de résistance diamétrale par l'application d'une force F jusqu'à rupture du comprimé (15).

### **6.4 Friabilité**

Les comprimés sont placés dans un appareil qui va leur faire subir des collisions et des chutes pendant un temps déterminé. Les comprimés sont pesés avant et après l'essai. La friabilité est exprimée en pourcentage de perte de masse par rapport à la masse initiale de comprimés (15).

### **6.5 Temps de désagrégation ou de délitement**

Il s'agit de la détermination du temps de désintégration des comprimés dans un milieu liquide sous agitation. La désintégration est atteinte lorsqu'il n'y a plus de résidu solide(15).

### **6.6 L'essai de dissolution**

C'est un test pharmaco-technique destinée à déterminer la plus au moins grande aptitude des formes galéniques à laisser passer en solution en milieu déterminé le ou les principe(s) actif(s) qu'elles conditionnent. Le passage en solution est apprécié par la présence du PA dans des échantillons prélevés du milieu de dissolution à un intervalle de temps différents.

Un test approprié peut être effectué pour démontrer la libération appropriée de la (des) substance(s) active(s), par exemple l'un des tests décrits dans le test de dissolution pour le dosage des solides formulaires (19).

## 7. Avantages et inconvénients

La forme comprimé a de multiples avantages et inconvénients ; résumés ci-dessous tableau IV

Tableau IV: Avantages et inconvénients des comprimés (15, 16)

| Étape       | Avantage   | Inconvénient  |
|-------------|--|---|
| Fabrication | <ul style="list-style-type: none"> <li>-Conversation facilitée (les matières premières sont dans un milieu sec et condensé).</li> <li>-Utilisation de substances peu ou non-hydrosolubles.</li> <li>-Masquage du goût désagréable des matières premières grâce à l'enrobage.</li> <li>-Prix de revient peu élevé (exception faite des lyophilisats).</li> <li>-Procédés de fabrication connus et contrôlés par les industriels.</li> </ul> | <ul style="list-style-type: none"> <li>- Étapes du développement pharmaceutique délicates.</li> <li>-Grande variété de poudres pharmaceutiques pouvant être utilisées</li> <li>- Pas de principe actif liquide</li> <li>- Nécessité d'utiliser de nombreux excipients qui peuvent présenter des effets secondaires (EEN)</li> </ul> |
| Utilisation | <ul style="list-style-type: none"> <li>-Dosage par unité de prise précis.</li> <li>-Emploi facile : solidité suffisante pour le transport et le conditionnement</li> <li>-faciles à avaler.</li> </ul>   | <ul style="list-style-type: none"> <li>-Possible irritation de la muqueuse du tractus gastro-intestinal du patient.</li> <li>- Dosage fixe ne pouvant pas être modifié au cours du temps</li> </ul>   |

## 8. Comprimé du furosémide

Le produit fini du furosémide est de petits comprimés, sécables, de forme ronde, de couleur blanche, sous le nom déposé « LASILIX 40 mg » conditionné dans des boîte de 30 comprimés.

## 9. Adaptation posologique

Fait partie de la Surveillance Thérapeutique Pharmacologique (STP) chez les sujets concernés par des variations individuelles physiologiques ou pathologiques. Elle consiste à adapter la prescription à l'état du patient au lieu d'appliquer les doses standards. Cette adaptation peut se faire soit en réduisant la dose journalière soit en espaçant les prises ou les deux (20).

### 9.1. Adaptation posologique en pédiatrie

Les enfants forment une population hétérogène, Leur organisme est en développement dont les transformations physiologiques au cours de la croissance modifient le devenir de nombreux médicaments dans l'organisme (pharmacocinétique ; l'immaturation des fonctions d'élimination chez le nouveau-né ou l'accélération du métabolisme hépatique chez le nourrisson) et la réponse à certains médicaments (pharmacodynamie ; toxicité des os ; de cerveau), cette spécificité pharmacologique ayant des conséquences sur le choix de traitement et la posologie.

Les posologies à employer sont souvent mal définies du fait de :

- Les données des études cliniques de la population pédiatrique sont souvent quantitativement et qualitativement insuffisantes.
- La plupart des prescriptions sont hors AMM pédiatrique ce qui entraîne un risque de diminution de la sécurité, de la qualité et de l'efficacité du traitement et d'augmentation des effets indésirables.
- La plupart des médicaments commercialisés n'existent que sous forme solide (forme sèche), et ces formes galéniques sont souvent inadaptées pour les enfants qui ne peuvent pas avaler de comprimés ou de gélules et le fait de changer la forme galénique d'un médicament est une source d'erreurs supplémentaire

Il est impossible d'adopter un facteur de correction constant par rapport à la posologie employée chez l'adulte car il n'existe pas un simple rapport de proportionnalité entre l'enfant et l'adulte puisque les différents paramètres pharmacocinétiques subissent des variations plus ou moins rapides qui ne se font pas de manière progressive et linéaire en fonction de l'âge (21).

Les dosages les plus précis sont déterminés à partir de l'âge mais aussi du poids de l'enfant. Il arrive qu'on utilise la surface corporelle, elle permet une meilleure corrélation avec beaucoup de phénomènes physiologiques.

### 9.2. Adaptation des formes sèches :

Les formes solides orales (comprimés, gélules) représentent la forme galénique majoritaire chez l'adulte. Or, les comprimés et les gélules sont souvent disponibles à des dosages non appropriés

en pédiatrie ; leur taille n'est également pas adaptée à l'enfant de moins de 5 ans qui ne peut ni les avaler ni les croquer et le risque de fausse route n'est pas négligeable lié à une immaturité de la déglutition. Piler des comprimés ou ouvrir des gélules est alors le seul recours possible.

Ces pratiques sont très fréquentes en pédiatrie et suscitent de nombreuses controverses (21, 22).

L'utilisation d'une forme solide adulte chez un enfant passera donc par une transformation de la forme galénique ; un comprimé broyé, une gélule ouverte ou diluée avec d'autres substances auxiliaires. Ce qui peut entraîner de profonds retentissements, notamment une modification de la vitesse d'absorption et de la biodisponibilité qui doit être étudiée pour garantir au malade le même bénéfice thérapeutique pour une même dose de principe actif administré par une même voie (22).

Le fractionnement d'un comprimé pour obtenir une dose utilisable chez l'enfant est délicat et ne permet d'obtenir que des dosages approximatifs, éventuellement acceptable pour des médicaments à marge thérapeutique large, donc Le comprimé est la forme la moins adaptée au petit enfant. Dans la majorité des cas, le RCP ne contient pas de mention pédiatrique. Les comprimés utilisés en pédiatrie contiennent des doses trop élevées en principe actif et sont la plupart du temps coupés. Malheureusement les dispositifs spécifiques pour cette opération sont très peu utilisés alors qu'ils permettent une précision acceptable de ce fait

Le personnel infirmier ne devrait pas être en situation de broyer ou fractionner un comprimé pour l'administrer car la fraction réellement absorbée par l'enfant est inconnue (21, 23).

# Chapitre III :

## validation analytique

## 1. Définition

Selon la norme ISO 17025 : la validation est : «la confirmation par examen et la démonstration par preuves que les performances de la méthode permettent de répondre aux exigences de l'usage auquel elle est destinée. Elle est basée sur une analyse statistique de plusieurs paramètres. » (24)

Selon la 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. »(25).

Selon la FDA : « Valider une méthode consiste à démontrer, avec un degré de confiance élevé et sous une forme documentée, que la méthode permet d'obtenir un résultat analytique qui atteint les spécifications à l'avance. »(26).

Selon ICH Q2A : 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 » (27).

## 2. But de la validation

Dans un environnement hautement réglementé comme celui du médicament, des méthodes d'analyse fiables sont requises pour assurer la conformité avec les réglementations nationales et internationales.

Elle permet de donner aux autorités compétentes les garanties que chaque mesure qui sera réalisée ultérieurement en routine, une fois la procédure validée, sera suffisamment proche de la « vérité » inconnue de l'échantillon ou du moins comprise dans une limite acceptable et démontrer que la méthode convient aux usages auxquels on la destine.

En vérité le but principal est de minimiser le risque tant au niveau du producteur que du futur consommateur. Par conséquent, l'objectif de la validation n'est pas simplement d'obtenir des estimateurs du biais et de la fidélité. Toutefois, il n'en reste pas moins que ces paramètres sont des éléments indispensables à l'établissement des garanties précitées (2, 28).

### 3. Règlementations

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

#### 3.1 Documents ISO :

- 17025 « exigences générales concernant la compétence des laboratoires d'étalonnages et d'essais » .
- 5725 « exactitude (justesse et fidélité) des résultats et méthodes de mesure ».

#### 3.2. Guidelines ICH:

Q2 « Analytical Validation »:

Q2(R1): «Validation of Analytical procedure: Text and methodology »: la version actuelle de l'étape 4 de la directive parental datant du 27 October 1994 (directive complémentaire sur la méthodologie datant du 6 November 1996 en November 2005)

Q2(R2): « Analytical procedure développement and revision of Q2(R1) analytical validation »

#### 3.3 FDA

«Guidance for Industry - Analytical Procedures and Methods - Chemistry, Manufacturing, and Controls Documentation» (Draft, August 2000)

#### 3.4 SFSTP :

Guide de validation analytique (Rapport d'une commission SFSTP) 1992 : Méthodologie et Exemples d'application ;

SFSTP : « Méthodes chromatographiques de dosage dans les milieux biologiques : stratégie de validation. Rapport d'une commission SFSTP » 1997

SFSTP : « Validation des procédures analytiques quantitatives : Harmonisation des démarches »

- Partie I - Généralités (2003)
- Partie II – Statistiques (2006)
- Partie III : exemples d'application (2006) (29)

#### 4. Cycle de vie d'une méthode analytique

Une méthode analytique est un moyen visant à exprimer concrètement un besoin bien défini, ou encore c'est la réponse matérialisée à un problème donné.

Comme tout processus, les méthodes d'analyse naissent, évoluent et disparaissent

Ce périple peut être résumé sous la forme d'un cycle de vie qui peut se décomposer en six grandes phases généralement successives comme illustrées dans la figure 5 :

- Une phase de sélection où le type de la validation et des conditions opératoires initiales sont définis ;
- Une phase de Développement (optimisation) au moyen de plans d'expériences ;
- Une phase de Validation (Validation Interne/Externe) ;
- Une phase d'application en routine (Usage en routine) ;

Une phase de revalidation : après un certain temps d'utilisation, on peut être amené à apporter des améliorations (2).

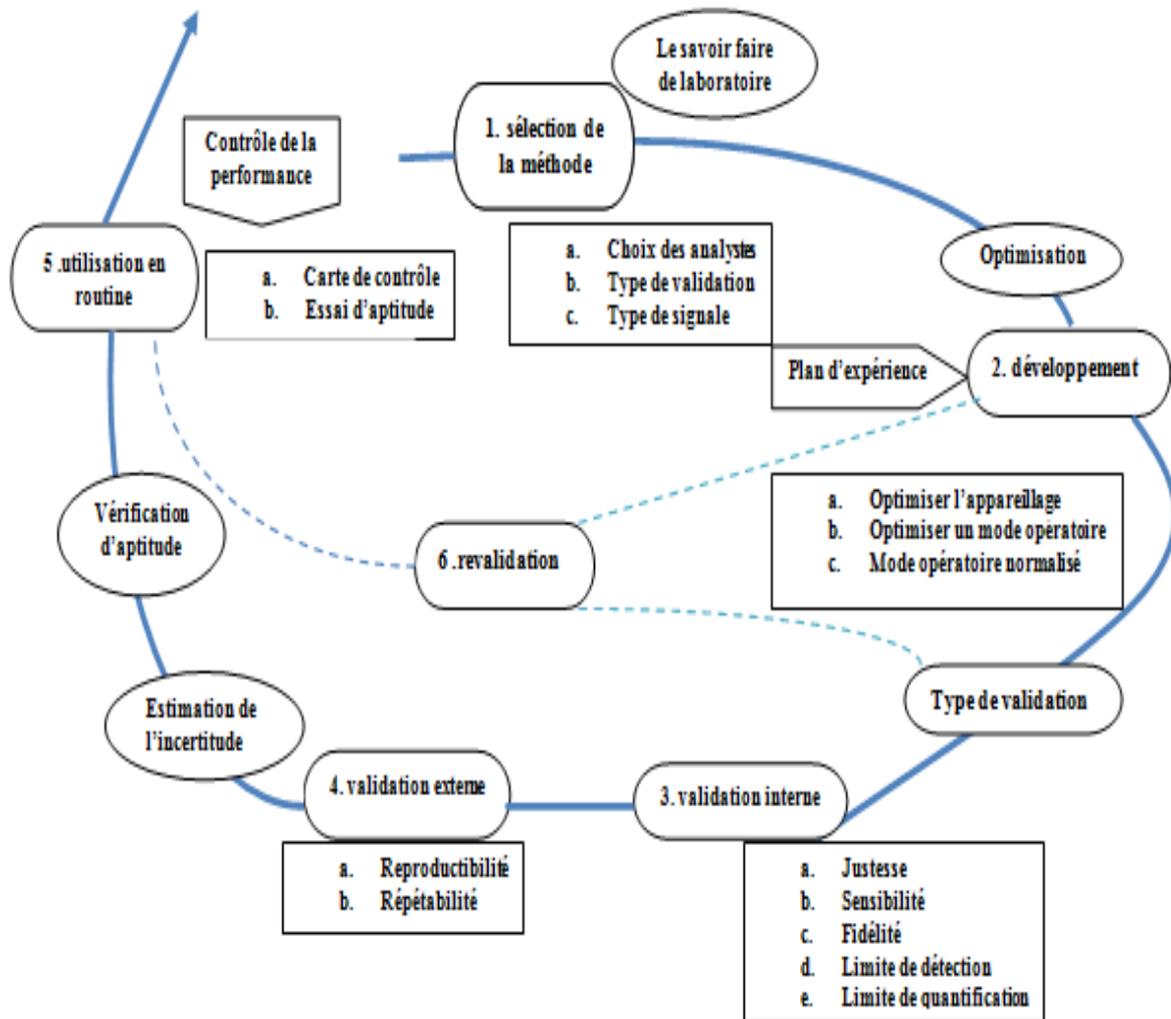


Figure 5: Cycle de vie d'une méthode analytique (2)

## 5. Quelles procédures analytiques à valider ?

Le laboratoire doit valider :

- Les méthodes non normalisées ;
- Les méthodes conçues/développées par le laboratoire ;
- Les méthodes normalisées employées en dehors de leur domaine d'application prévu ;
- Les amplifications ou modifications de méthodes normalisées ;
- Et aussi une méthode alternative par rapport à une méthode de référence.

Les procédures analytiques de la Pharmacopée Européenne et de la Pharmacopée Américaine doivent être considérées comme validées (30).

En ce qui concerne la revalidation :

L'ICH Q2(R1) préconise une revalidation dans les cas suivants :

- Modification de la voie de synthèse de la substance pharmaceutique.
- Modification de la composition du produit fini.
- Modification de la procédure analytique.
- Modification des conditions opératoires.
- Déplacement des automates.

## 6. Les critères de validation

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.

Critères de validation en fonction du type de procédure à valider (d'après les recommandations de la Conférence Internationale d'Harmonisation) illustrés dans le tableau V ci-dessous :

Tableau V: Critères de validation en fonction du type de procédure à valider (28)

| Type de procédure à valider / Critères | Identification | Dosage d'impureté | Test limite d'impureté | Analyse quantitative |
|--|----------------|-------------------|------------------------|----------------------|
| • Exactitude                           | • ( - )        | • ( + )           | • ( - )                | • ( + )              |
| • Fidélité                             | • ( - )        | • ( + )           | • ( - )                | • ( + )              |
| • Répétabilité                         | • ( - )        | • ( + )           | • ( - )                | • ( + )              |
| • Fidélité intermédiaire               | • ( - )        | • ( + )           | • ( - )                | • ( + )              |
| • Spécificité                          | • ( + )        | • ( + )           | • ( + )                | • ( + )              |
| • Limite de détection                  | • ( - )        | • ( - )           | • ( + )                | • ( - )              |
| • Limite de quantification             | • ( - )        | • ( + )           | • ( - )                | • ( - )              |
| • Linéarité                            | • ( - )        | • ( + )           | • ( - )                | • ( + )              |
| • Intervalle de dosage                 | • ( - )        | • ( + )           | • ( - )                | • ( + )              |

(-): Signifie que le critère n'est normalement pas évalué ;

(+): Signifie que le critère est normalement évalué.

## 6.1 La spécificité

La spécificité d'une méthode ou une procédure analytique est sa capacité à permettre une évaluation univoque de la substance à examiner en présence d'autres composants éventuellement présents. Ces composés comprennent principalement les impuretés, les produits de dégradation et la matrice.

La SFSTP qualifie une méthode d'analyse qu'elle est « spécifique » lorsqu'elle permet de garantir que le signal mesuré provient seulement de la substance à analyser ou qu'elle permet de mesurer quantitativement un paramètre physicochimique ou un groupement fonctionnel d'une ou de plusieurs substances dans l'échantillon (2).

Pour les techniques chromatographiques, on parle plutôt de la sélectivité que spécificité.

La sélectivité de la méthode de dosage dépend principalement de :

La qualité de séparation chromatographique et la sélectivité intrinsèque du mode de détection.

La spécificité se fonde sur une absence d'interférences. Les interférences sont une des grandes causes d'erreur de justesse. Lorsqu'il s'agit de la spécificité et des interférences, on a à faire avec des erreurs systématiques (directement liées à la méthode) pouvant être expliqués par divers mécanismes chimiques, physiques, physico-chimiques ou biologiques qui sont à la source d'interférences spécifiquement liées à un type de méthode (28).

## 6.2 La linéarité

Établissement qu'il existe une relation linéaire entre les quantités retrouvées (ou quantifiées) dans des échantillons et leurs valeurs de référence. La linéarité de la méthode ne doit pas être confondue avec la linéarité de la fonction de réponse de l'appareillage de mesure qui caractérise la seule réponse instrumentale lors de l'étalonnage et qui n'est pas indispensable pour obtenir une quantification exacte (31).

## 6.3 Exactitude

L'exactitude exprime l'étroitesse de l'accord entre le résultat d'essai et la valeur de référence acceptée, aussi appelée « valeur conventionnellement vraie ». L'étroitesse de l'accord ainsi observée est la résultante de la somme des erreurs systématique et aléatoire, en d'autres termes l'erreur totale liée au résultat. Par conséquent, l'exactitude est l'expression de la somme de la justesse et de la fidélité (2).

Selon ICH l'exactitude d'une procédure analytique exprime l'étroitesse de l'accord entre la valeur qui est acceptée comme conventionnellement vraie, ou comme valeur de référence, et la valeur trouvée.

#### **6.4 La justesse**

La justesse (biais) 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). Signalons encore que la justesse a été également appelée « exactitude » ou « exactitude de la moyenne ». Cet usage n'est toutefois pas recommandé (2).

#### **6.5 La fidélité**

Étroitesse de l'accord entre les valeurs mesurées obtenues par des mesurages répétés du même objet ou d'objets similaires dans des conditions spécifiées. La fidélité peut être évaluée à trois niveaux : la répétabilité, la fidélité intermédiaire (intra-laboratoire) et la reproductibilité (inter-laboratoires) (31).

La fidélité traduit uniquement la distribution des erreurs aléatoires et n'a aucune relation avec la valeur vraie ou spécifiée. La mesure de fidélité est calculée à partir de l'écart type des résultats d'essais.

- 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 (2).

## 6.6 La limite de détection

La limite de détection d'une procédure d'analyse est la plus petite quantité à examiner dans un échantillon pouvant être détectée, mais non quantifiée comme une valeur exacte dans les conditions expérimentales décrites de la procédure (2).

## 6.7 La limite de quantification

La limite de quantification est la plus petite quantité de l'analyse dans échantillon pouvant être dosée dans les conditions expérimentales décrites avec une exactitude définie (2).

## 6.8 La Robustesse

La sensibilité d'une méthode d'analyse aux variations des conditions d'expérience qui peut s'exprimer par une liste des échantillons, des analytes, des conditions d'entreposage, des conditions d'environnement et/ou de préparation de l'échantillon pour lesquels la méthode peut être appliquée telle quelle ou moyennant certaines modifications mineures, généralement, on l'évalue à l'aide d'un plan d'expérience (28).

## 6.9 Stabilité de la solution

Un échantillon de la substance à analyser est étudié sur plusieurs jours dans le but d'apprécier son comportement dans le temps et dans des conditions définies qui sont le plus souvent fonction de la pratique courante du laboratoire (32).

Ce paramètre n'est pas obligatoire pour valider une méthode analytique cependant il apporte des informations importantes et utiles. Le guide ICH déclare que cette étude doit être faite lors de développement de la méthode et non lors de la validation (33).

## 7. Les critères de choix de la validation

Selon les méthodes analytiques étudiées, quantitatives ou qualitatives, il sera associé, à chaque caractéristique de performance, un ou des paramètres qui seront l'expression de la grandeur à estimer à partir de la série de mesures (34).

L'objectif d'une bonne procédure analytique est de pouvoir quantifier le plus exactement possible chacune des quantités inconnues, en calculant la différence entre le résultat rendu ( $x$ ) et la « vraie valeur » inconnue de l'échantillon et qu'elle soit petite ou du moins inférieure à une limite d'acceptation ( $\lambda$ ), donc la validité de la méthode sera statuée par rapport à cet intervalle d'acceptabilité qui peut être variable selon les exigences de l'analyste ou la finalité de la

procédure analytique, laquelle est liée aux exigences communément admises par la pratique professionnelle (par exemple : 1 ou 2% sur des matières premières, 5% sur des spécialités pharmaceutiques, 15% en bioanalyse, environnement, etc.) (2).

On peut aussi qualifier la procédure d'acceptable en calculant l'intervalle de confiance  $\beta$  qui permet d'évaluer la proportion attendue de mesures dans des limites d'acceptation et pour cela la valeur calculée doit être suffisamment proche de la vraie valeur inconnue, l'intervalle de confiance est un outil offrant la garantie que la plupart des futures mesures seront dans les limites d'acceptation donc c'est un bon outil de décision (2).

## 8. Les Etapes de validation

1. Disposer du mode opératoire et définir l'analyte ;
2. Définir le domaine de validation (gamme de concentrations) et l'objectif attendu de la méthode sous la forme d'un intervalle d'acceptabilité ;
3. Sélectionner des échantillons de validation dont les valeurs de référence sont connues ;
4. Choisir un plan d'expérience de validation ;
5. Pour les méthodes indirectes, choisir du plan d'expérience d'étalonnage ;
6. Collecter les données ;
7. Pour les méthodes indirectes, calculer les concentrations retrouvées par étalonnage inverse ;
8. Calculer les critères de validation à partir des concentrations retrouvées : principalement les écarts-types de fidélité intermédiaire et des biais de justesse ;
9. Calculer les intervalles de tolérance et construire le profil d'exactitude ;
10. Interpréter les résultats et décider si la méthode est valide ou non (28).

## 9. 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. Selon les référentiels, les principaux objectifs de la phase de validation sont de :

- Démontrer la spécificité (sélectivité) ;
- Valider la fonction de réponse (ou modèle d'étalonnage utilisé en routine) ;
- Estimer la fidélité (répétabilité et fidélité intermédiaire) ;
- Estimer la justesse ;
- Estimer l'exactitude ;
- Valider les seuils de quantification ;
- Valider l'intervalle de dosage ;
- Vérifier la linéarité de la procédure analytique (2).

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 évaluer les différentes fonctions de réponse  $y = f(x)$  afin d'effectuer les prédictions inverses.
- Standards de validation (SV) : doivent toujours être réalisés avec la matrice, 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 supérieures 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 6 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 (2).

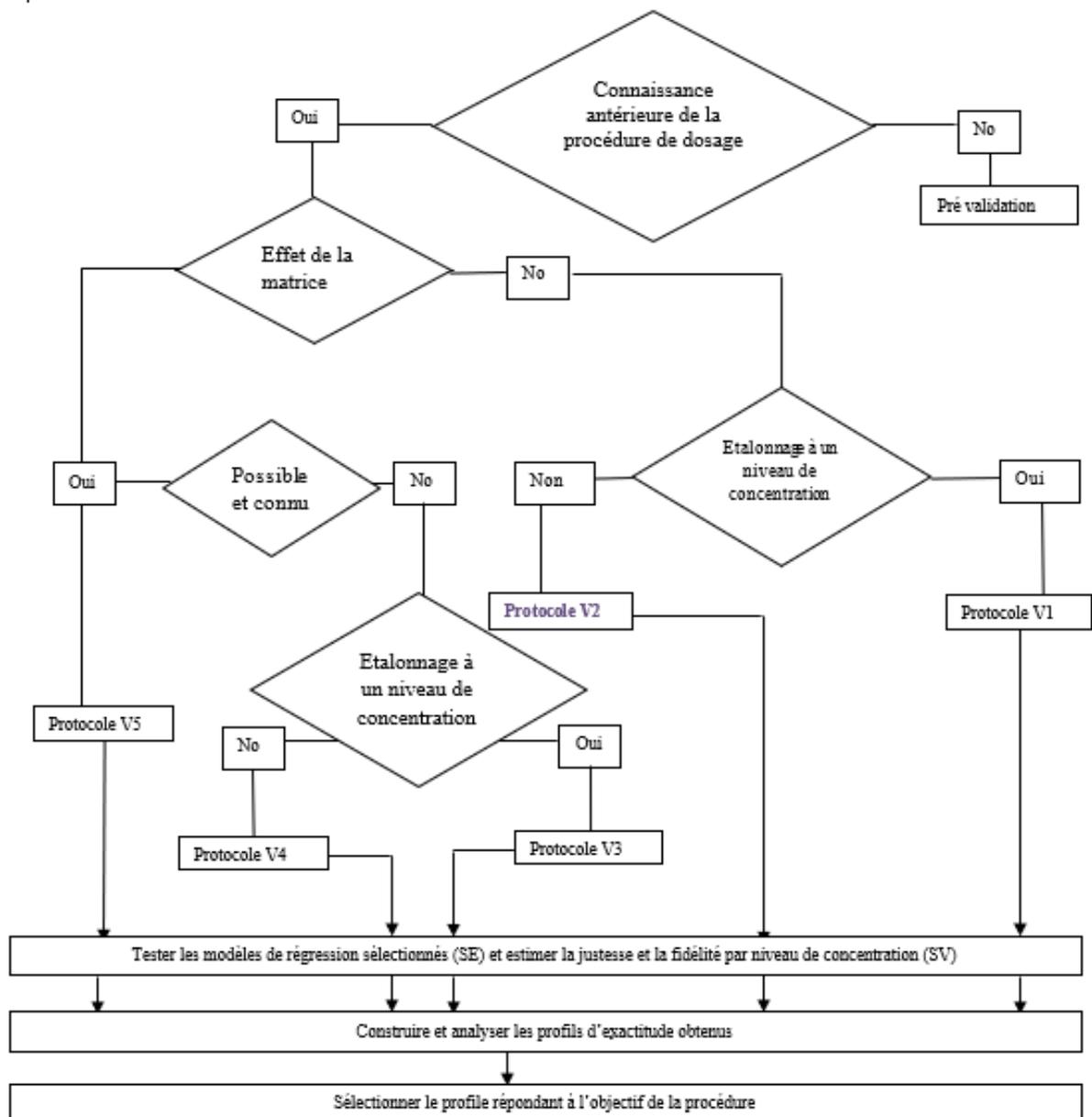


Figure 6: Logigramme permettant de sélectionner un protocole de validation (2)

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

Tableau VI: Choix du nombre de standards d'étalonnage et de validation en fonction du protocole choisi

| Standards                         | Niveau de concentration | Protocole |    |    |    |    |
|-----------------------------------|-------------------------|-----------|----|----|----|----|
|                                   |                         | V1        | V2 | V3 | V4 | V5 |
| SE. Etalonnage<br>Sans la matrice | Bas                     |           | 2  |    | 2  |    |
|                                   | Médian                  | 2         | 2  | 2  | 2  |    |
|                                   | Haut                    | 2         | 2  | 2  | 2  |    |
| SE. Etalonnage<br>Avec la matrice | Bas                     |           |    |    | 2  | 2  |
|                                   | Médian                  |           |    | 2  | 2  | 2  |
|                                   | Haut                    |           |    | 2  | 2  | 2  |
|                                   | Additif                 |           |    |    |    | 2  |
| SV. Validation<br>Avec la matrice | Bas                     | 3         | 3  | 3  | 3  | 3  |
|                                   | 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 |

## 10. Etude statistique de la validation analytique

### 10.1. La spécificité

En chimie analytique, la cause principale d'un manque de spécificité est la présence d'interférences, Sur le plan pratique, les interférences entraînent deux conséquences : une surestimation / une sous-estimation de la concentration de l'échantillon. Dans les deux cas, elles occasionnent donc un biais de justesse.

Pour démontrer on propose de représenter graphiquement l'effet du manque de spécificité en considérant la droite de justesse.

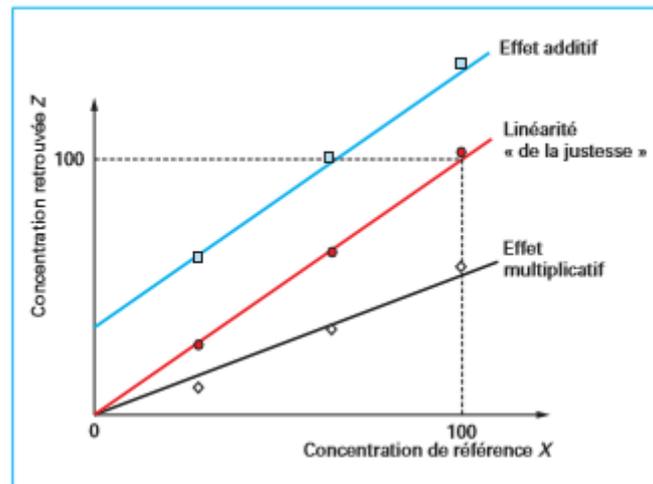


Figure 7: Interférences à effet additif ou multiplicatif (35)

La figure 7 illustre cette droite de justesse selon trois situations hypothétiques

- les cercles pleins  $\longrightarrow$  une droite confondue avec la première bissectrice ; la spécificité est parfaite ;
- les carrés  $\longrightarrow$  un décalage systématique des concentrations retrouvées ; c'est l'effet additif.
- les losanges  $\longrightarrow$  une autre situation dans laquelle le biais est proportionnel à la concentration ; c'est l'effet multiplicatif.

En conservant nos notations, à savoir X la valeur de référence et Z la concentration retrouvée par étalonnage inverse, ces trois droites correspondent aux équations suivantes :

- absence d'effet :  $Z = X$
- effet multiplicatif :  $Z = b_1 X$
- effet additif :  $Z = b_0 + X$

Mais, on peut aussi supposer qu'il existe des situations où ces effets se combinent :

- combinaison des effets :  $Z = b_0 + b_1 X$  (35).

## 10.2. 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  $\varepsilon \sim N(0, \sigma^2)$  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 que l'erreur résiduelle soit minimisée.

Deux familles de fonctions se dégagent de cet ensemble : les fonctions dites linéaires en leurs paramètres et les fonctions non linéaires.

Une fonction est dite linéaire si elle est une combinaison linéaire de ses paramètres.

On peut noter que la fonction quadratique, bien que sa représentation graphique ne soit pas droite, est effectivement linéaire en ses paramètres. Si ce n'est pas le cas, comme dans le cas des fonctions logistiques, la fonction est dite non linéaire en ses paramètres. La façon d'ajuster ces fonctions de réponse dépend de cette distinction (35).

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

Tableau VII: Exemples des fonctions de réponses

| Type                                      | Equation   | Paramètres                            | La linéarité |
|---|--|---------------------------------------|--------------|
| <b>Droit passant par l'origine</b>        | $Y = \beta X$  | $\beta$                               | Oui          |
| <b>Droite</b>                             | $Y = \alpha + \beta X$   | $\alpha, \beta$                       | Oui          |
| <b>Fonction quadratique</b>               | $Y = \alpha + \beta X + \gamma X^2$  | $\alpha, \beta, \gamma$               | Oui          |
| <b>Fonction logistique à 4 paramètres</b> | $Y = \alpha + \frac{\delta - \alpha}{1 + \left(\frac{x}{\gamma}\right)^\beta}$                   | $\alpha, \beta, \gamma, \delta$       | Non          |
| <b>Fonction logistique à 5 paramètres</b> | $Y = \alpha + \frac{\delta - \alpha}{\left[1 + \left(\frac{x}{\gamma}\right)^\beta\right]^\psi}$ | $\alpha, \beta, \gamma, \delta, \psi$ | Non          |

Très vraisemblablement, la plupart des méthodes physicochimiques auront recours à la droite (passant par 0 ou non) (35).

Le calcul des estimations des coefficients du modèle d'étalonnage peut faire appel aux diverses techniques statistiques classiques. La méthode la plus accessible est celle des moindres carrés.

- La méthode des moindres carrés :

La méthode des moindres carrés est la méthode de calcul la plus utilisée pour l'estimation des paramètres d'un modèle à deux variables ayant un lien de causalité entre elles.

Cette méthode de calcul consiste à estimer les paramètres de la droite d'étalonnage en minimisant la somme des différences entre les valeurs observées et les valeurs prédites correspondantes, soit la somme des résidus  $E$  :

$$Y = X + E \dots\dots\dots \text{Réponse observée}$$

$$E = Y - X \dots\dots\dots \text{Résidu}$$

Les résidus pouvant être positifs ou négatifs, ils sont élevés au carré pour le calcul de leur somme afin d'éviter leur contrebalancement.

L'équation de la droite pour laquelle la somme de ces carrés est minimale permet d'obtenir des valeurs prédites au plus proche des vraies valeurs (32).

### 10.3. Alignement des observations

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

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

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

Ainsi l'alignement des  $n_{ij}$  répétitions du niveau de concentration  $j$  de la série  $i$  s'effectue comme suit :(35)

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

Tableau VIII: règles d'alignement pour différentes fonctions de réponses (35)

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

#### 10.4. Prédiction inverse

Avant d'effectuer les prédictions inverses, c'est-à-dire calculer des concentrations en retour avec la fonction de réponse, il est préférable de s'assurer qu'au sein d'un niveau de concentration, les concentrations sont toutes identiques. Si ce n'est pas le cas, il vaut alors mieux les aligner comme décrit dans la section précédente.

Les prédictions inverses pour les différents modèles de régression s'obtiennent comme suit tableau IX :

Tableau IX: calcul des prédictions inverses pour différentes fonctions de réponses

| Fonction de réponse                 | Concentration calculée   |
|-------------------------------------|--|
| <b>Droite passant par l'origine</b> | $x_{ijk,calc} = \frac{y_{ijk}}{\hat{\beta}_i}$   |
| <b>Droite</b>                       | $x_{ijk,calc} = \frac{y_{ijk} - \hat{\alpha}_i}{\hat{\beta}_i}$  |
| <b>Fonction quadratique</b>         | $x_{ijk,calc} = \frac{-\hat{\beta}_i + \sqrt{\hat{\beta}_i^2 - 4\hat{\gamma}_i(\hat{\alpha}_i - y_{ijk})}}{2\hat{\gamma}_i}$ |
| <b>Logistique à 4 paramètres</b>    |  |

|                                  |  |
|----------------------------------|--|
|                                  | $x_{ijk,calc} = \hat{\gamma}_i \left( \frac{\hat{\delta}_i - \hat{\alpha}_i}{y_{ijk} - \hat{\alpha}_i} - 1 \right)^{\frac{1}{\hat{\beta}_i}}$                                    |
| <b>Logistique à 5 paramètres</b> | $x_{ijk} = \hat{\gamma}_i \left[ \left( \frac{\hat{\delta}_i - \hat{\alpha}_i}{y_{ijk} - \hat{\alpha}_i} \right)^{\frac{1}{\hat{\psi}_i}} - 1 \right]^{\frac{1}{\hat{\beta}_i}}$ |

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 X: Calcul des prédictions inverses pour la droite ayant subi une transformation logarithmique ou racine carrée (35)

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

## 10.5. Calcul de la justesse et de la fidélité intermédiaire

### 10.5.1. 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  $k^{\text{ième}}$  concentration calculée du niveau  $j$  de la  $i^{\text{ème}}$  série,

$\mu_j$  est la moyenne des concentrations calculées du niveau de concentration  $j$ ,

$\alpha_{ij}$  est au niveau  $j$  l'écart entre la moyenne de la  $i^{\text{ème}}$  série et la moyenne  $\mu_j$ ;  $\alpha_{ij}$  est considéré comme une variable aléatoire ayant une distribution normale de moyenne 0 et de variance  $\sigma_{Bj}^2$ ;

$\epsilon_{ijk}$  est l'erreur expérimentale, considéré comme une variable aléatoire ayant une distribution normale de moyenne 0 et de variance  $\sigma_{wj}^2$ . L'erreur expérimentale est supposée indépendante de la série.

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

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

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

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

Où

$MSM_j$  et  $MSE_j$  : Maximum de vraisemblances pour chaque niveau de concentration  $j$  ;

$\bar{x}_{ij,calc}$  : Moyenne des concentrations calculées au niveau  $j$  ;

$\bar{x}_{j,calc}$  : Moyenne des concentrations calculées au niveau  $j$  ;

$x_{ijk,calc}$  : Concentrations calculées au niveau  $j$  de la série  $i$  répétition  $k$  ;

$n$  : Nombre de répétition ;

$p$  : Nombre de séries.

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

Si  $MSE_j < MSM_j$  alors : (35).

$$\sigma_{wj}^2 = MSE_j$$

$$\sigma_{Bj}^2 = \frac{MSM_j - MSE_j}{n}$$

Si non :

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

$$\sigma_{Bj}^2 = 0$$

### 10.5.2. Calcul de la 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 (35) :

$$\text{Biais}_j = \hat{\mu}_j - \bar{x}_j$$

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

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

### 10.5.3. Fidélité intermédiaire

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 (35) :

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

$$\text{Fidélité intermédiaire : } \hat{\sigma}_{\text{IP},j}^2 = \hat{\sigma}_{\text{w},j}^2 + \hat{\sigma}_{\text{B},j}^2$$

### 10.6. 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 :

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

L'exactitude de la mesure en valeur relative (pour chaque modèle et chaque observation) est :

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

L'erreur maximale relative, non signée, observée pour chaque modèle sur l'ensemble des séries donne une idée sur l'efficacité relative des différents modèles ainsi que l'impact du choix de la fonction de réponse sur l'exactitude des résultats.

L'exactitude des résultats, comme l'erreur maximale observée, nous donne des indications sur les résultats obtenus dans les expériences de validation (35).

### 10.7. Linéarité de la justesse

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 =  $f(\text{concentration introduite})$ ), pas aux réponses (signal =  $f(\text{concentration introduite})$ ). C'est un prérequis à l'estimation de la justesse.

A l'inverse, l'existence d'une relation linéaire entre la concentration estimée et la concentration introduite n'implique pas que la méthode soit juste(35).

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

Chaque mesure est en vérité le reflet de la vraie valeur, du biais de la méthode et de sa fidélité, ce qui donne l'équation suivante :

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



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



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

Il est fondamental d'estimer l'erreur totale pour juger la validité d'une méthode et aussi pour évaluer l'aptitude de la procédure analytique à produire des résultats exacts.

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

L'erreur maximale observée sur un grand nombre d'observations est 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 est donc bien un bon indicateur de l'exactitude, c'est la raison pour laquelle nous proposons ce critère pour une première évaluation simple de la procédure analytique (35).

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

Le rôle de l'intervalle de Tolérance repose principalement sur la garantie ou la représentation de ce que la même procédure analytique pourra donner comme résultats dans le futur.

L'estimation des paramètres  $\mu_j, \sigma_{B,j}, \sigma_{w,j}^2$  (justesse et fidélité) à chaque niveau de concentration  $j$  suivie par évaluation de la proportion attendue d'observation dans les limites d'acceptation prédéfinies  $[-\lambda, \lambda]$  c'est-à-dire l'intervalle de tolérance qui sera calculé avec les standards de validation à chaque niveau de concentration envisagé. Pratiquement, il se calcule comme suit en valeur absolue.

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

Où :

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

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

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

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

Le même intervalle en échelle relative devient :

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

Deux termes sont contenus dans l'intervalle de tolérance : la justesse et 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. Cependant l'intervalle de tolérance intègre

en plus de ces deux derniers une dimension supplémentaire, celle de chance/risque pour des résultats futurs, conditionnellement à des résultats passés.

La méthode peut dès lors être considérée comme exacte au niveau de chance  $\beta$  pour le niveau de concentration en question, si l'intervalle de tolérance est inclu dans les limites

$[-\gamma, \gamma]$  définies a priori en fonction des objectifs de la méthode (35).

### 10.8.2. Profil d'exactitude et décision

#### 10.8.2.1. Calcul

Le profil d'exactitude de la méthode s'obtient en reliant d'une part les bornes  $L_j$  entre elles ( $L_1 \rightarrow L_2 \rightarrow \dots \rightarrow L_m$ ) (35)

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

Et d'autre part les bornes  $U_j$  entre elles ( $U_1 \rightarrow U_2 \rightarrow \dots \rightarrow U_m$ )

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

#### 10.8.2.2. Le choix de la fonction de réponse

L'utilisation de certaines fonctions ne permet pas à la procédure analytique d'atteindre ses objectifs vus que pour certaines concentrations, les limites de tolérances sortent des limites d'acceptation.

Par ailleurs, parmi les fonctions de réponses acceptables, on pourra remarquer que certaines fournissent des résultats meilleurs que d'autres. Ce seront ces dernières qui devront être retenues.

Pour l'ensemble de ces modèles, le coefficient de détermination  $R^2$  est toujours supérieur à 0.99 et pas en rapport avec la qualité des résultats et par conséquent il n'est pas une indication fiable de la qualité des résultats que la procédure rendra.

Comme indiqué à plusieurs reprises ci-dessus, le profil d'exactitude, qui est le reflet direct de ce que la procédure analytique est capable, permet de juger l'adéquation de différentes pratiques et permet de prendre des décisions (35).

### 10.9. Limites de quantification

Le profil d'exactitude, construit à partir des intervalles des mesures attendues, permet donc de décider des niveaux de concentration Au-dessus de la, l'analyste peut garantir que la méthode quantifiera de façon acceptable les échantillons reçus, et garantir principalement une procédure apte à fournir des résultats dans les limites d'acceptation.

Ainsi, par définition, quand elle se produit, l'intersection entre le profil d'exactitude et les limites d'acceptation définissent les limites de quantification basse (LLOQ) et haute (ULOQ) de la procédure. Entre ces deux limites, il y a bien sûr l'intervalle de dosage. De la sorte, les limites de quantification sont bien les valeurs extrêmes qui peuvent être quantifiées avec une exactitude définie.

La LQ peut être obtenue exactement si on connaît l'abscisse de ce point d'intersection entre la limite de tolérance et la limite d'acceptabilité. Cependant, il faut faire attention car, les points sont reliés par des segments de droites alors qu'il faudrait utiliser des segments d'hyperboles du fait que ce sont des valeurs relatives à la concentration de référence. Pour éviter une sous-estimation de la LQ, il faut donc conduire les calculs sur les valeurs absolues (35).

# La Partie pratique

# Matériels et Méthodes

L'objectif du présent travail est de valider une méthode de dosage d'un PA « FUROSEMIDE » dans des comprimés dosés à 40 mg sur un intervalle allant de 5 jusqu'à 50mg/l par chromatographie liquide à haute performance.

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

## 1. Matériels :

### 1. 1. Appareillages :

Tableau XI : Appareillages utilisés dans ce présent travail

| Désignation                         |                            | Spécification                | Usage                                  |
|-------------------------------------|----------------------------|------------------------------|--|
| <b>HPLC<br/>SHIMADZU<br/>(LC20)</b> | Pompe                      | Lc 20 at                     | Dosage (obtention des chromatogrammes) |
|                                     | Injecteur automatique      | SIL 20 A                     |  |
|                                     | Contrôleur                 | CBM-20                       |  |
|                                     | Compartiment de la colonne | CTO-20 A                     |  |
|                                     | Colonne SHIMADZU           | C18 (25 cm)                  |  |
|                                     | Détecteur                  | Spectrophotomètre UV visible |  |
|                                     | Logiciel d'exposition      | LC-solution                  |  |
| <b>Distillateur</b>                 |                            | NUVE                         | Eau distillée                          |
| <b>Sonicateur</b>                   |                            | Avantage-LAB                 | Solubilisation                         |

|                               |                       |                               |
|-------------------------------|-----------------------|-------------------------------|
| <b>Agitateurs magnétiques</b> | NAHITA Model690-1     | Homogénéisation des solutions |
| <b>Balances analytiques</b>   | KERN<br>METLER TOLEDO | Pesée                         |
| <b>pH-mètre</b>               | METLER TOLEDO         | Préparation du tampon         |
| <b>Etuve</b>                  | MEMMERT               | Séchage                       |

### 1. 2. Verreries et autres :

Tableau XII: Verreries et autres matériel utilisés dans ce travail

| Verreries  | Autres   |
|--|--|
| <ul style="list-style-type: none"> <li>• Fioles jaugées 50ml, 100ml, 200ml, 1000ml, 2000ml</li> <li>• Béchers Eprouvette :1000ml</li> <li>• Pipettes graduées : 20ml</li> <li>• Pipettes jaugées : 5ml</li> <li>• Entonnoirs</li> <li>• Vials</li> </ul> | <ul style="list-style-type: none"> <li>• Poires</li> <li>• Pissettes</li> <li>• Spatules</li> <li>• Papier aluminium</li> <li>• Des flacons pour phase mobile</li> </ul> |

### 1. 3. Matière première

Tableau XIII: Matières premières utilisés dans ce travail

| Matières premières                     | Fournisseurs   |
|--|--|
| Furosémide ; la substance de référence | Fourni par le laboratoire de chimie analytique faculté de médecine Tizi-Ouzou.   |
| Placebo                                | La composition de l'excipient :<br>Talc 1% =43,62mg/500ml ;<br>Amidon de Maïs, Cellulose Microcristalline et Stéarate de Mg de poids =1,44g/500ml. |

## 1. 4. Réactif

Tableau XIV: Réactifs utilisés dans ce présent travail

| Réactif                          | Spécification  |
|----------------------------------|--|
| Acide phosphorique               | SEIGMA-ALDRICH ; Lot :SZBB1380V ; P= 85-88%          |
| Acétonitrile                     | Riedel-de Haen ; Lot :STBG5620V ; P% >99,99.         |
| Eau distillée                    | Produit au sein du laboratoire analytique.           |
| Hydroxyde de sodium<br>NaOH      | AnnalaR NORMAPUR.                                    |
| NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> | BIOCHEM chemopharma ; Lot : B13472350-1104-1; P%≥ 99 |
| Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> | BIOCHEM chemopharma ; Lot :B10039324 ; P%≥ 99        |

## 2. Méthode

### 2. 1. Méthodologie de la validation analytique

Il existe de nombreux documents officiels décrivant les critères de validation à tester, mais ils ne proposent pas de protocole expérimental et se limitent le plus souvent aux concepts généraux. C'est pourquoi deux commissions SFSTP ont élaboré successivement des guides de validation (en 1992 pour les analyses des spécialités pharmaceutiques et en 1997 pour les analyses en milieu biologique) dans le but d'aider concrètement les industriels du médicament à appliquer les recommandations réglementaires. Si ces premiers guides ont largement contribué à faire appliquer et progresser les validations analytiques, ils présentent toutefois des faiblesses quant aux conclusions des tests réalisés et quant à l'aide à la prise de décision au regard de limites d'acceptation définies pour l'usage d'une procédure analytique. Sur ce, le présent travail est basé sur les recommandations de la commission SFSTP publiées en 2003 complétée 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 (35).

### 2. 2. Choix du Protocole de validation

Selon le logigramme de la figure 5 qui permet de sélectionner un protocole de validation et le tableau VI et sachant que : la procédure de dosage est connue ultérieurement, il n'y a pas d'effet

matrice et l'étalonnage ne se fait pas à un niveau de concentration, le protocole adopté dans notre étude est le V2 ; en utilisant 5 niveaux de concentration au lieu de trois pour les SE et les SV (35).

### **2. 3. Le choix des paramètres de la validation**

#### **2. 3. 1. Domaine d'application et les niveaux de concentration**

Le choix des niveaux de concentration pour le dosage d'une substance chimique (principe actif) dans le cadre du dosage des comprimés de furosémide.

Dans le présent travail, nous avons opté pour des niveaux de concentration qui englobent la plage des concentrations dissoutes d'un comprimé de 40mg lors de la validation selon le profil d'exactitude de la commission SFSTP (2006) ; de 10% jusqu'à 120% (Cmax) en passant par trois niveaux intermédiaires.

#### **2. 3. 2. Limites d'acceptabilité ( $\lambda$ )**

$\lambda = \pm 10\%$ , signifie que pour une teneur de 40mg/L le résultat sera compris au maximum entre 36 et 44 mg/L.

#### **2. 3. 3. Probabilité de confiance ( $\beta$ )**

$\beta = 90 \%$

#### **2. 3. 4. Conditions expérimentales**

##### **Le choix de la dilution**

Pour réaliser un dosage direct, effectuer des dilutions 1/5 à toutes les solutions mères de tous les niveaux de concentration des standards d'étalonnage et de validation (exemple : le niveau 100 % renferme 50 ml de diluant «NaOH» pour 25 mg du principe actif « furosémide »). Cette dilution a été sélectionnée pour des raisons de concentration adéquate à celle du comprimé et pour une meilleure lecture des résultats.

- **Le choix du diluant**

Selon la pharmacopée européenne, le furosémide se dissout dans des solvants alcalins ; c'est pour cela, on a utilisé l'hydroxyde de sodium, dosé à 0,1M.

- **Préparation des solutions**

##### **A. Préparation du diluant**

Dans une fiole jaugée de 1L, mettre 4g des pastilles de NaOH. Ajouter un volume de l'eau distillée, agiter jusqu'à la dissolution totale du NaOH puis compléter au trait de jauge avec le même solvant.

## B. Préparation des standards d'étalonnage

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

### - Préparation des solutions mères

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

### - Préparation des solutions filles

- Effectuer une dilution à 1/5<sup>ème</sup> en prélevant 5ml à partir de chacune des solutions mères obtenues, à l'aide d'une pipette jaugée de 5ml, dans des fioles de 25ml complétées au trait de jauge avec le diluant afin d'obtenir nos solutions filles

Tableau XV: Masses correspondantes pour chaque niveau de concentration des standards d'étalonnage

| Niveau | Masse correspondante |
|--------|----------------------|
| 125%   | 50mg                 |
| 100%   | 40mg                 |
| 50%    | 20mg                 |
| 25%    | 10mg                 |
| 12,5%  | 5mg                  |

## C. Préparation des standards de validation

### - Préparation des solutions mères

- Dans des fioles jaugées de 50 ml, peser les différentes masses correspondantes à chaque niveau de concentration du furosémide, dissoudre dans des volumes suffisants du diluant,

mettre à l'ultrason pour une dissolution totale puis compléter au trait de jauge avec le même diluant.

- **Préparation des solutions filles**

- Prélever 5ml à partir de chacune des solutions mères obtenues, à l'aide d'une pipette jaugée de 5ml, dans des fioles de 50ml, ajouter 5ml d'une solution placebo déjà préparée et filtrée, complétées au trait de jauge avec le diluant afin d'obtenir nos solutions filles.

Tableau XVI: Masses correspondantes pour chaque niveau de concentration des standards de validation

| Niveau | Masse correspondante |
|--------|----------------------|
| 125%   | 50mg                 |
| 100%   | 40mg                 |
| 50%    | 20mg                 |
| 25%    | 10mg                 |
| 12,5%  | 5mg                  |

**D. Préparation du placebo :**

Dans une fiole jaugée de 100 ml peser 87 mg du placebo, dissoudre dans un volume suffisant de diluant, ajuster jusqu'au trait de jauge puis filtrer à l'aide d'un papier filtre.

**E. Préparation de la phase mobile :**

Dans un erlenmeyer de 1L, peser 4.5g  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  et 9g  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ , compléter avec l'eau distillée jusqu'au trait de jauge. A l'aide d'un ph mètre, vérifier le ph ajusté avec d'acide phosphorique jusqu'à obtention de  $\text{pH}=5.01$ . A partir de cette solution on a versé 250ml dans une éprouvette de 1000ml, ainsi que 750ml d'acétonitrile.

- **Conditions chromatographiques**

Tableau XVII: Conditions chromatographiques de la méthode de dosage

|                    |   |
|--------------------|---|
| Colonne            | Diamètre (4,6 mm)<br>Longueur (15 cm)<br>Taille des particules (5 µm)<br>Phase stationnaire : Gel de silice octadecylesilyle (C18)                                  |
| Détection          | Spectrophotomètre UV-visible : longueur d'onde $\lambda=270\text{nm}$   |
| Volume d'injection | 20µl  |
| Temps d'analyse    | 7min  |
| Débit              | 0,8 ml/min  |
| Température        | Ambiante  |
| Phase mobile       | Mélange de :<br>- 75% de tampon phosphaté ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ et $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ ajusté avec l'acide phosphorique) à pH=5<br>- 25% d'acétonitrile |

**2. 3. 5. Préparation de la feuille de calcul**

En utilisant le logiciel Excel de Microsoft office 2019 enregistré, installé sur le système d'exploitation Windows 10 authentique.

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

# Résultats

## 1. Spécificité et effet matrice

### 1.1. Comparaison des chromatogrammes

Comparaison du chromatogramme du principe actif seul et celui du placebo chargé d'un même niveau de concentration (niveau 40mg/ml : 100%) ainsi que leur blancs (diluant seul et diluant avec placebo) illustrées dans les figures suivantes :

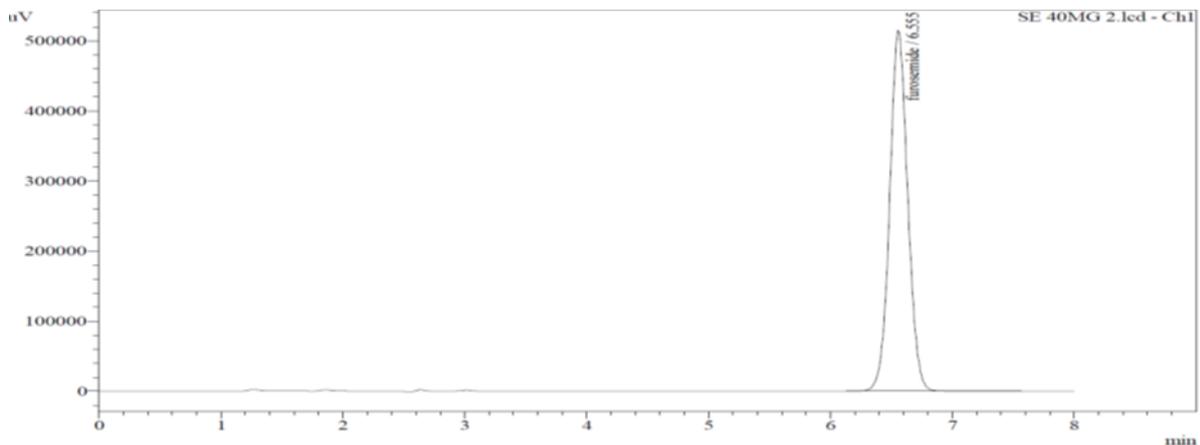


Figure 8: Chromatogramme du standard d'étalonnage, niveau 100%

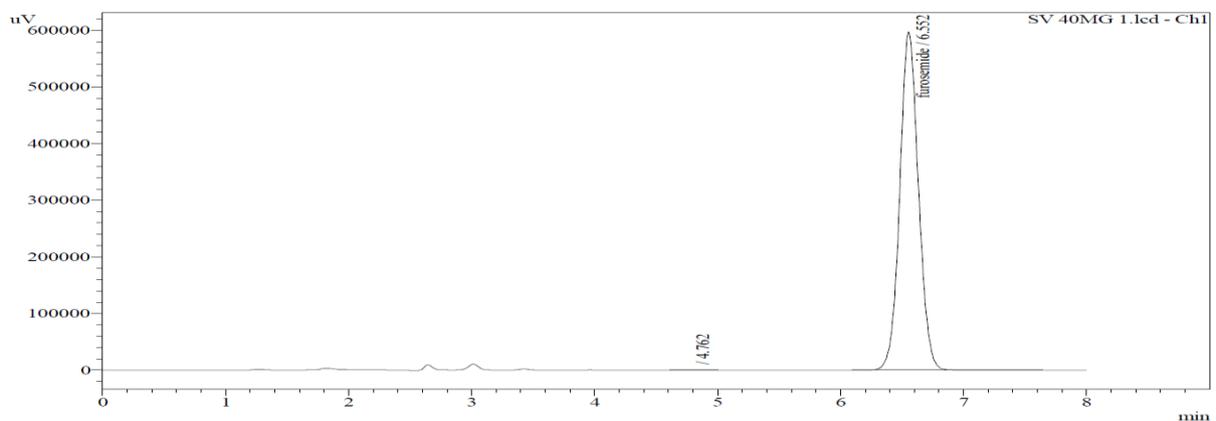


Figure 9: Chromatogramme du standard de validation, niveau 100%

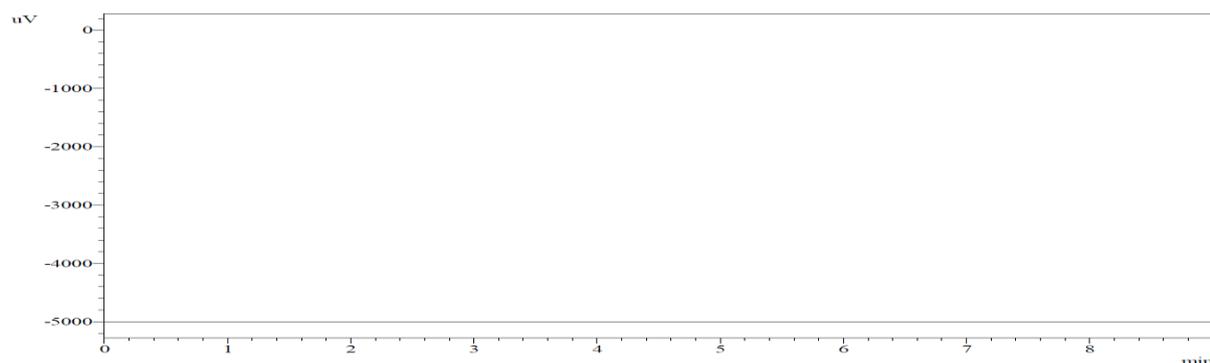


Figure 10 : Chromatogramme du diluant non chargée de PA

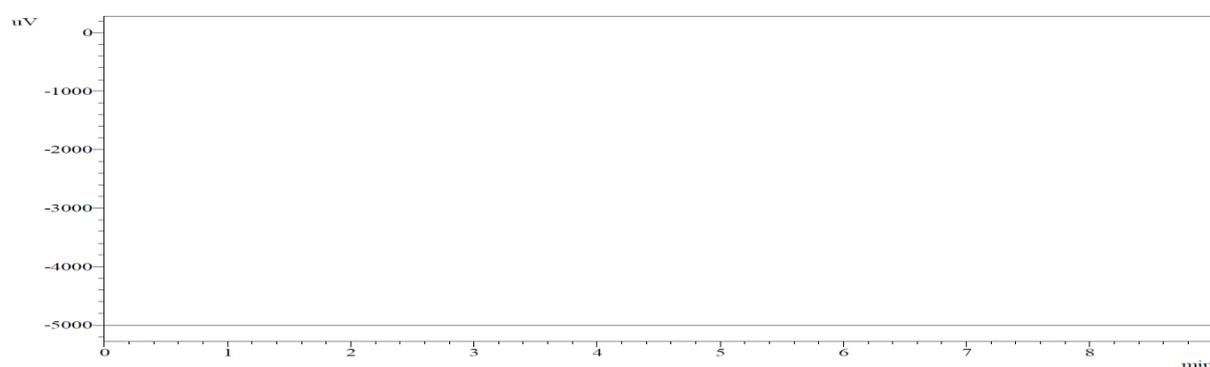


Figure 11: Chromatogramme du diluant avec placebo non chargée de PA

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

Tableau XVIII: Les résultats de la superposition des quatre chromatogrammes

| Solutions                              | Temps de rétention (min) | Superposition |
|--|--------------------------|---------------|
| Diluant non chargée de PA              | Absence                  |               |
| Diluant avec placebo non chargée de PA |                          |               |
| Standard de validation                 | 6.552                    | Conforme      |
| Standard d'étalonnage                  | 6.555                    |               |

## 1. 2. 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 et la droite obtenue sur la gamme avec matrice sont évalués dans les tableaux suivants :

Tableau XIX: résultats obtenus sur la gamme sans matrice

| <b>Gamme sans matrice</b>          |   |                               |  |                          |                   |                |
|------------------------------------|---|-------------------------------|--|--------------------------|-------------------|----------------|
| <b>Niveaux</b>                     | 1 <sup>ère</sup> répétition de chaque série | Masses introduites en mg (Xi) | Réponses instrumentales : aire des pics (Yi) | Réponses calculées (Y*i) | $(Y_i - Y^*_i)^2$ | $(X_i - X')^2$ |
| <b>5mg/100ml</b>                   | 1   | 4,99                          | 701696                                       | 581886,2                 | 14354382069       | 401,5          |
|                                    | 2   | 5,02                          | 686827                                       | 585582,9                 | 10250368649       | 400,4          |
|                                    | 3   | 5,02                          | 688406                                       | 585582,9                 | 10572590771       | 400,4          |
| <b>10mg/100ml</b>                  | 1   | 9,99                          | 1204588                                      | 1241213,8                | 1341446936        | 226,3          |
|                                    | 2   | 10,04                         | 1150615                                      | 1248607,1                | 9602453472        | 224,6          |
|                                    | 3   | 10,00                         | 1302119                                      | 1243326,2                | 3456599006        | 225,8          |
| <b>20mg/100ml</b>                  | 1   | 19,98                         | 2690009                                      | 2559868,9                | 16936457275       | 25,6           |
|                                    | 2   | 20,09                         | 2688325                                      | 2574655,5                | 12920746992       | 24,4           |
|                                    | 3   | 20,01                         | 2598981                                      | 2564093,6                | 1217129196        | 25,2           |
| <b>40mg/100ml</b>                  | 1   | 39,95                         | 4567186                                      | 5197179,0                | 396891215673      | 222,6          |
|                                    | 2   | 40,18                         | 4405012                                      | 5226752,4                | 675257268960      | 229,4          |
|                                    | 3   | 40,02                         | 4659896                                      | 5205628,6                | 297824027333      | 224,5          |
| <b>50mg/100ml</b>                  | 1   | 49,94                         | 7228087                                      | 6515834,1                | 507304172500      | 620,4          |
|                                    | 2   | 50,22                         | 6908325                                      | 6552800,8                | 126397444521      | 634,5          |
|                                    | 3   | 50,02                         | 6929336                                      | 6526396,0                | 162360619606      | 624,4          |
| <b>Pente</b>                       |   | <b>132023,9</b>               |  |                          |                   |                |
| <b>Ordonnée à l'origine</b>        |   | <b>-77441,3</b>               |  |                          |                   |                |
| <b>SCE/(n-2)</b>                   |   | <b>172822070996,9</b>         |  |                          |                   |                |
| <b>Erreur pente</b>                |   | <b>6190,2</b>                 |  |                          |                   |                |
| <b>Erreur ordonnée à l'origine</b> |   | <b>188496,5</b>               |  |                          |                   |                |

Tableau XX : comparaison de la pente et l'ordonnée à l'origine avec 0 sur la gamme sans matrice

|   |                          |  |                                     |
|---|--------------------------|--|-------------------------------------|
| <b>Comparaison de la pente avec 0</b>               | <b>t calculé</b>         | <b>21,3277642</b>                            | <b>Différence significative</b>     |
|   | $t^{\circ}(\alpha ; 13)$ | 1,770933396                                  |                                     |
|   | <b>Condition</b>         | $t \text{ calculé} > t^{\circ}(\alpha ; 13)$ |                                     |
| <b>Comparaison de l'ordonnée à l'origine avec 0</b> | <b>t calculé</b>         | <b>0,410836807</b>                           | <b>Différence non significative</b> |
|   | $t^{\circ}(\alpha ; 13)$ | 1,770933396                                  |                                     |
|   | <b>Condition</b>         | $t \text{ calculé} < t^{\circ}(\alpha ; 13)$ |                                     |

Tableau XXI : résultats obtenus sur la gamme avec matrice

| <b>Gamme sans matrice</b> |  |                               |  |                          |                   |                |
|---------------------------|--|-------------------------------|--|--------------------------|-------------------|----------------|
| <b>Niveaux</b>            | 1 <sup>ère</sup> répétitions de chaque série | Masses introduites en mg (Xi) | Réponses instrumentales : aire des pics (Yi) | Réponses calculées (Y*i) | $(Y_i - Y^*_i)^2$ | $(X_i - X')^2$ |
| <b>5mg/100ml</b>          | 1  | 5,00                          | 778134                                       | 709156,5                 | 4757900052,5      | 403,3          |
|                           | 2  | 5,02                          | 738913                                       | 711377,0                 | 758228633,3       | 402,6          |
|                           | 3  | 5,02                          | 756985                                       | 711633,3                 | 2056779480,4      | 402,5          |
| <b>10mg/100ml</b>         | 1  | 10,02                         | 1266941                                      | 1352698,0                | 7354264790,3      | 226,8          |
|                           | 2  | 10,04                         | 1292280                                      | 1354235,3                | 3838463618,0      | 226,4          |
|                           | 3  | 10,04                         | 1306478                                      | 1354747,8                | 2329971420,8      | 226,3          |
| <b>20mg/100ml</b>         | 1  | 20,05                         | 2698643                                      | 2636877,3                | 3815006726,9      | 25,3           |
|                           | 2  | 20,07                         | 2679116                                      | 2639951,9                | 1533825921,0      | 25,1           |
|                           | 3  | 20,08                         | 2648707                                      | 2640976,8                | 59756084,9        | 25,0           |
| <b>40mg/100ml</b>         | 1  | 40,10                         | 5055901                                      | 5205235,8                | 22300869806,2     | 225,4          |
|                           | 2  | 40,14                         | 5395727                                      | 5211385,1                | 33981950990,5     | 226,8          |
|                           | 3  | 40,16                         | 4997848                                      | 5213434,8                | 46477679957,3     | 227,3          |
| <b>50mg/100ml</b>         | 1  | 50,12                         | 6552508                                      | 6489415,0                | 3980725809,3      | 626,9          |
|                           | 2  | 50,18                         | 6539750                                      | 6497101,6                | 1818883101,7      | 629,9          |
|                           | 3  | 50,20                         | 6519959                                      | 6499663,8                | 411893379,8       | 630,9          |

|                                    |                      |
|------------------------------------|----------------------|
| <b>Pente</b>                       | <b>128110,5</b>      |
| <b>Ordonnée à l'origine</b>        | <b>68518,8</b>       |
| <b>SCE/(n-2)</b>                   | <b>10421246136,4</b> |
| <b>Erreur pente</b>                | <b>1516,7</b>        |
| <b>Erreur ordonnée à l'origine</b> | <b>46280,8</b>       |

Tableau XXII: comparaison de la pente et l'ordonnée à l'origine avec 0 sur la gamme sans matrice

|   |                          |  |                                     |
|---|--------------------------|--|-------------------------------------|
| <b>Comparaison de la pente avec 0</b>               | <b>t calculé</b>         | <b>84,46919999</b>                           | <b>Différence significative</b>     |
|   | $t^{\circ}(\alpha ; 13)$ | 1,770933396                                  |                                     |
|   | <b>Condition</b>         | $t \text{ calculé} > t^{\circ}(\alpha ; 13)$ |                                     |
| <b>Comparaison de l'ordonnée à l'origine avec 0</b> | <b>t calculé</b>         | 1,480501493                                  | <b>Différence non significative</b> |
|   | $t^{\circ}(\alpha ; 13)$ | 1,770933396                                  |                                     |
|   | <b>Condition</b>         | $t \text{ calculé} < t^{\circ}(\alpha ; 13)$ |                                     |

### 1. 3. Vérification de l'absence d'effet matrice et d'erreur systématique

Tableau XXIII : comparaison des deux pentes

|   |                          |  |                                     |
|---|--------------------------|--|-------------------------------------|
| <b>Comparaison des deux pentes des deux droites de régression</b>           | <b>t calculé</b>         | <b>0,614040082</b>                           | <b>Différence non significative</b> |
|   | $t^{\circ}(\alpha ; 26)$ | 1,70561792                                   |                                     |
|   | <b>Condition</b>         | $t \text{ calculé} < t^{\circ}(\alpha ; 26)$ |                                     |
| <b>Comparaison des ordonnées à l'origine des deux droites de régression</b> | <b>t calculé</b>         | <b>0,752003411</b>                           | <b>Différence non significative</b> |
|   | $t^{\circ}(\alpha ; 26)$ | 1,70561792                                   |                                     |
|   | <b>Condition</b>         | $t \text{ calculé} < t^{\circ}(\alpha ; 26)$ |                                     |

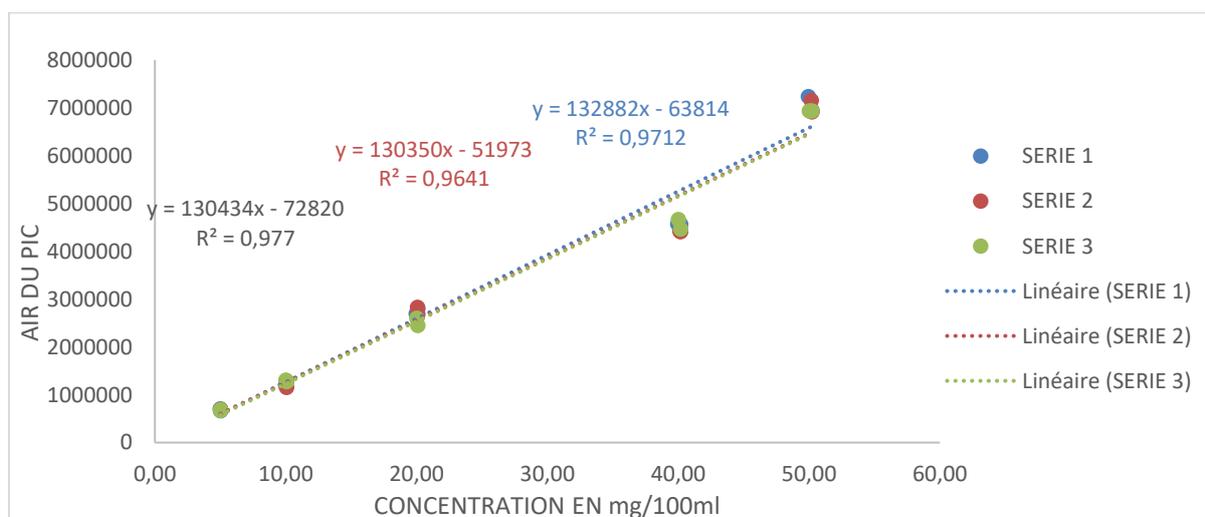
## 2. Fonction de réponse

La relation existante entre l'aire du pic (réponse instrumentale) et la masse introduite dans les standards d'étalonnage (concentration), obtenue sur chacune des trois séries, est représentée pour cinq modèles mathématiques comme suit

- Modèle :  $y = ax + b$

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

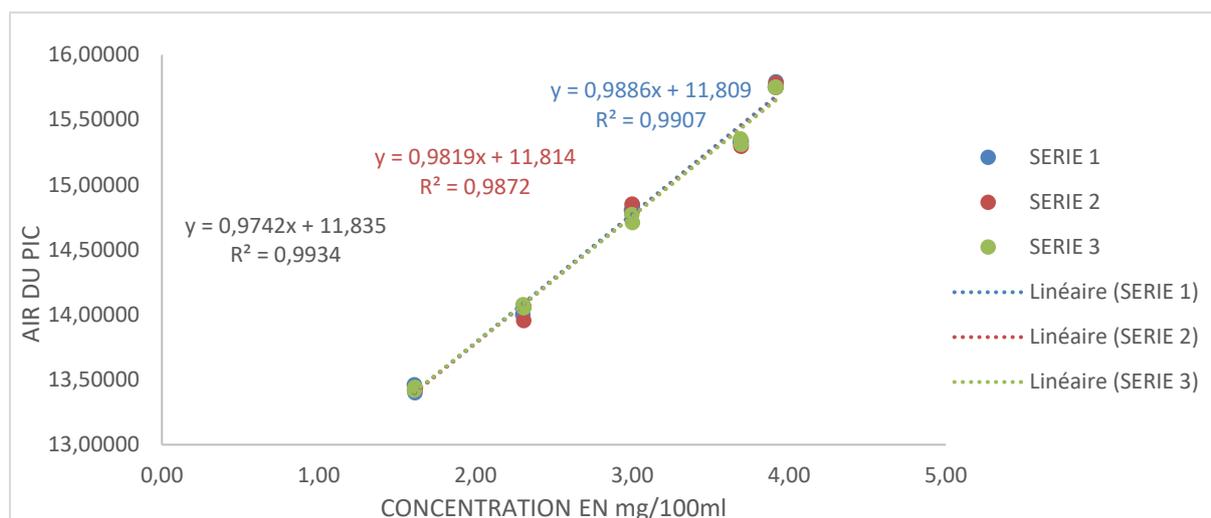
| Niveaux               | Répétitions | Séries (Jours)                |                |                               |                |                               |                |
|-----------------------|-------------|-------------------------------|----------------|-------------------------------|----------------|-------------------------------|----------------|
|                       |             | 1                             |                | 2                             |                | 3                             |                |
|                       |             | Masse in-<br>troduite<br>(mg) | Aire du<br>pic | Masse in-<br>troduite<br>(mg) | Aire du<br>pic | Masse in-<br>troduite<br>(mg) | Aire du<br>pic |
| 5mg/100ml             | 1           | 4,99                          | 701696         | 5,02                          | 686827         | 5,00                          | 673049         |
|                       | 2           | 5,02                          | 661005         | 5,02                          | 677393         | 5,02                          | 688406         |
| 10mg/100ml            | 1           | 9,99                          | 1204588        | 10,04                         | 1150615        | 10,00                         | 1302119        |
|                       | 2           | 10,04                         | 1274670        | 10,03                         | 1281674        | 10,04                         | 1269562        |
| 20mg/100ml            | 1           | 19,98                         | 2690009        | 20,09                         | 2688325        | 20,01                         | 2598981        |
|                       | 2           | 20,09                         | 2802304        | 20,06                         | 2823134        | 20,09                         | 2445862        |
| 40mg/100ml            | 1           | 39,95                         | 4567186        | 40,18                         | 4405012        | 40,02                         | 4659896        |
|                       | 2           | 40,18                         | 4562807        | 40,13                         | 4416755        | 40,18                         | 4461873        |
| 50mg/100ml            | 1           | 49,94                         | 7228087        | 50,22                         | 6908325        | 50,02                         | 6929336        |
|                       | 2           | 50,22                         | 6943121        | 50,16                         | 7153487        | 50,22                         | 6929475        |
| <b>Pente</b>          |             | <b>132881,8445</b>            |                | <b>130349,7935</b>            |                | <b>130433,9814</b>            |                |
| <b>Ord. L'origine</b> |             | <b>-63814,0875</b>            |                | <b>-51973,36691</b>           |                | <b>-72819,67483</b>           |                |

Figure 12: courbes d'étalonnages obtenues avec la fonction  $y = ax + b$

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

Tableau XXV: résultats obtenus avec la fonction  $\text{Ln } y=f(\text{Ln } x)$ 

| Niveaux               | Répétitions | Séries (Jours)                          |                          |   |                          |   |                          |
|-----------------------|-------------|---|--------------------------|---|--------------------------|---|--------------------------|
|                       |             | 1                                       |                          | 2                                       |                          | 3                                       |                          |
|                       |             | Masse in-<br>troduite<br>(Ln x)<br>(mg) | Aire du<br>pic (Ln<br>y) | Masse in-<br>troduite<br>(Ln x)<br>(mg) | Aire du<br>pic (Ln<br>y) | Masse in-<br>troduite<br>(Ln x)<br>(mg) | Aire du<br>pic (Ln<br>y) |
| <b>5mg/100ml</b>      | 1           | 1,61                                    | 13,46                    | 1,61                                    | 13,44                    | 1,61                                    | 13,42                    |
|                       | 2           | 1,61                                    | 13,40                    | 1,61                                    | 13,43                    | 1,61                                    | 13,44                    |
| <b>10mg/100ml</b>     | 1           | 2,30                                    | 14,00                    | 2,31                                    | 13,96                    | 2,30                                    | 14,08                    |
|                       | 2           | 2,31                                    | 14,06                    | 2,31                                    | 14,06                    | 2,31                                    | 14,05                    |
| <b>20mg/100ml</b>     | 1           | 2,99                                    | 14,81                    | 3,00                                    | 14,80                    | 3,00                                    | 14,77                    |
|                       | 2           | 3,00                                    | 14,85                    | 3,00                                    | 14,85                    | 3,00                                    | 14,71                    |
| <b>40mg/100ml</b>     | 1           | 3,69                                    | 15,33                    | 3,69                                    | 15,30                    | 3,69                                    | 15,35                    |
|                       | 2           | 3,69                                    | 15,33                    | 3,69                                    | 15,30                    | 3,69                                    | 15,31                    |
| <b>50mg/100ml</b>     | 1           | 3,91                                    | 15,75                    | 3,92                                    | 15,78                    | 3,91                                    | 15,75                    |
|                       | 2           | 3,92                                    | 15,79                    | 3,92                                    | 15,75                    | 3,92                                    | 15,75                    |
| <b>Pente</b>          |             | <b>0,988595139</b>                      |                          | <b>0,981936528</b>                      |                          | <b>0,974226248</b>                      |                          |
| <b>Ord. L'origine</b> |             | <b>11,80860859</b>                      |                          | <b>11,81432309</b>                      |                          | <b>11,83513193</b>                      |                          |

Figure 13: courbes d'étalonnage obtenues avec la fonction  $\text{Ln } y=f(\text{Ln } x)$ 

- Modèle :  $\sqrt{y} = f(\sqrt{x})$

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

| Niveaux           | répétitions | Séries (Jours)                       |                            |                                      |                            |                                      |                            |
|-------------------|-------------|--------------------------------------|----------------------------|--------------------------------------|----------------------------|--------------------------------------|----------------------------|
|                   |             | 1                                    |                            | 2                                    |                            | 3                                    |                            |
|                   |             | Masse introduite ( $\sqrt{x}$ ) (mg) | Aire du pic ( $\sqrt{y}$ ) | Masse introduite ( $\sqrt{x}$ ) (mg) | Aire du pic ( $\sqrt{y}$ ) | Masse introduite ( $\sqrt{x}$ ) (mg) | Aire du pic ( $\sqrt{y}$ ) |
| <b>5mg/100ml</b>  | 1           | 2,23                                 | 837,67                     | 2,24                                 | 828,75                     | 2,24                                 | 820,40                     |
|                   | 2           | 2,24                                 | 813,02                     | 2,24                                 | 823,04                     | 2,24                                 | 829,70                     |
| <b>10mg/100ml</b> | 1           | 3,16                                 | 1097,54                    | 3,17                                 | 1072,67                    | 3,16                                 | 1141,10                    |
|                   | 2           | 3,17                                 | 1129,01                    | 3,17                                 | 1132,11                    | 3,17                                 | 1126,75                    |
| <b>20mg/100ml</b> | 1           | 4,47                                 | 1640,12                    | 4,48                                 | 1639,61                    | 4,47                                 | 1612,14                    |
|                   | 2           | 4,48                                 | 1674,01                    | 4,48                                 | 1680,22                    | 4,48                                 | 1563,93                    |
| <b>40mg/100ml</b> | 1           | 6,32                                 | 2137,10                    | 6,34                                 | 2098,81                    | 6,33                                 | 2158,68                    |
|                   | 2           | 6,34                                 | 2136,07                    | 6,33                                 | 2101,61                    | 6,34                                 | 2112,31                    |
| <b>50mg/100ml</b> | 1           | 7,07                                 | 2634,98                    | 7,09                                 | 2674,60                    | 7,07                                 | 2632,36                    |
|                   | 2           | 7,09                                 | 2688,51                    | 7,08                                 | 2628,37                    | 7,09                                 | 2632,39                    |
| <b>Pente</b>      |             | <b>361,2944151</b>                   |                            | <b>356,6324198</b>                   |                            | <b>355,7188808</b>                   |                            |

|                       |                     |                    |                    |
|-----------------------|---------------------|--------------------|--------------------|
| <b>Ord. L'origine</b> | <b>-3,721598745</b> | <b>5,339173006</b> | <b>5,752988246</b> |
|-----------------------|---------------------|--------------------|--------------------|

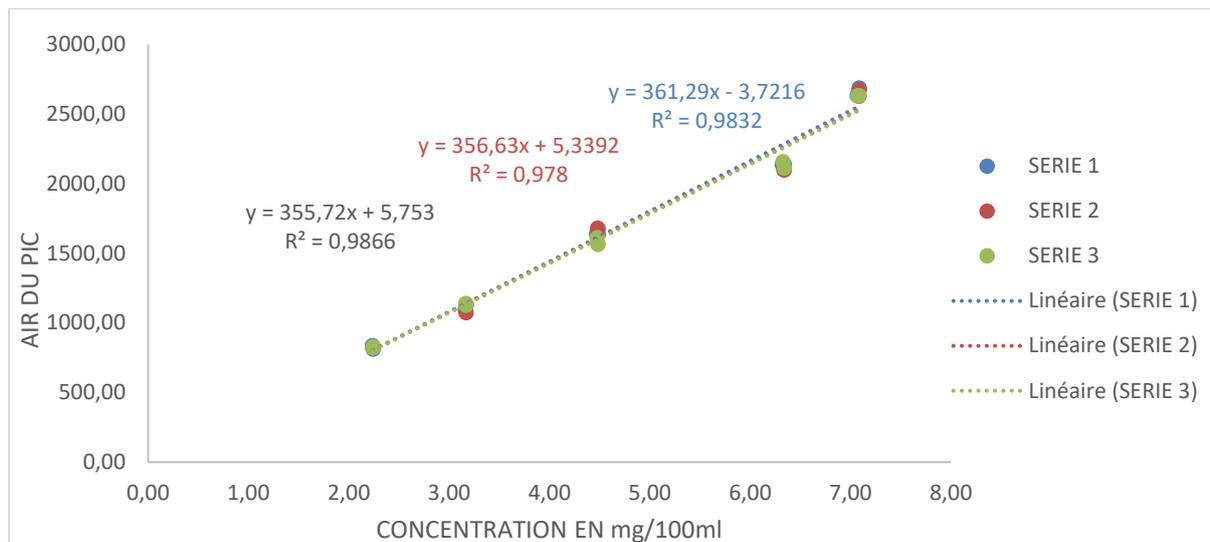


Figure 14 : Courbes d'étalonnages obtenues avec la fonction  $\sqrt{y}=f(\sqrt{x})$

- Modèle  $y = ax$  ajustée en utilisant uniquement le niveau 5

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

| Niveaux               | Répétitions | Séries (Jours)        |             |                       |             |                       |             |
|-----------------------|-------------|-----------------------|-------------|-----------------------|-------------|-----------------------|-------------|
|                       |             | 1                     |             | 2                     |             | 3                     |             |
|                       |             | Masse introduite (mg) | Aire du pic | Masse introduite (mg) | Aire du pic | Masse introduite (mg) | Aire du pic |
| <b>50mg/100ml</b>     | 1           | 49,94                 | 6943121,00  | 50,22                 | 7153487     | 50,02                 | 6929336     |
|                       | 2           | 50,22                 | 7228087,00  | 50,16                 | 6908325     | 50,22                 | 6929475     |
| <b>Pente</b>          |             | <b>141485,70</b>      |             | <b>140085,79</b>      |             | <b>138256,29</b>      |             |
| <b>Ord. L'origine</b> |             | 0                     |             | 0                     |             | 0                     |             |

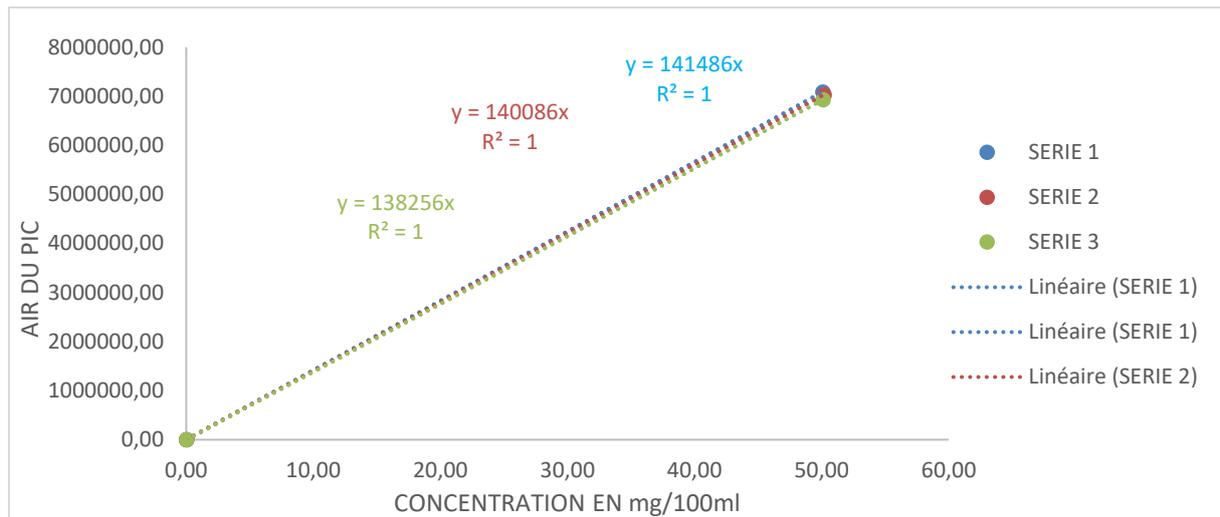


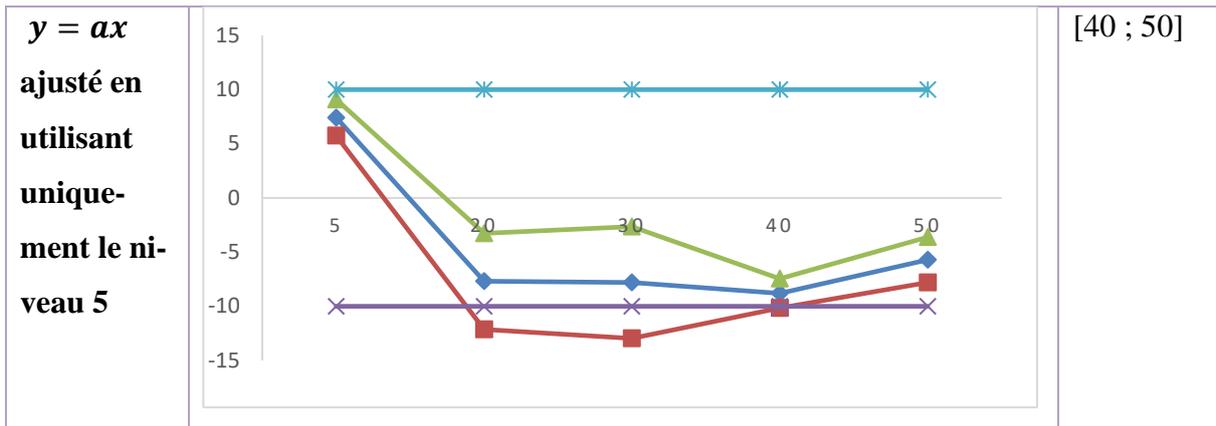
Figure 15: courbes d'étalonnages obtenues avec la fonction  $y=ax$

### 2.1. Critères de choix de la fonction de réponse

Les différents modèles de régression testés dans notre travail aboutissent aux profils d'exactitudes élucidés dans le tableau suivant :

Tableau XXVIII: Critères de choix de la fonction de réponse

| Modèle de fonction de réponse | Profil d'exactitude   | Inter-<br>valle de dosage<br>(mg/100) |
|-------------------------------|---|---------------------------------------|
| $y = ax + b$                  | <p>Detailed description of the graph for <math>y = ax + b</math>: The graph plots five metrics against dosage levels (5, 10, 40, 50 mg/100). The 'Limite d'acceptation basse' (purple 'x') is constant at -10. The 'Limite d'acceptation haute' (cyan asterisk) is constant at 10. The 'Limite intervalle tolérance basse' (red squares) starts at ~23 at dosage 5, drops to -1 at 10, reaches a minimum of -5 at 40, and rises to -1 at 50. The 'Biais (%)' (blue diamonds) starts at ~23 at dosage 5, drops to 3 at 10, 1 at 40, and rises to 2 at 50. The 'Limite intervalle tolérance haute' (green triangles) starts at ~26 at dosage 5, drops to 8 at 10, 6 at 40, and rises to 4 at 50.</p>  | <p>[8,98 ; 50]</p>                    |
| $\ln y = f(\ln x)$            | <p>Detailed description of the graph for <math>\ln y = f(\ln x)</math>: The graph plots five metrics against dosage levels (5, 10, 20, 50 mg/100). The 'Limite d'acceptation basse' (purple 'x') is constant at -10. The 'Limite d'acceptation haute' (cyan asterisk) is constant at 10. The 'Limite intervalle tolérance basse' (red squares) starts at ~13 at dosage 5, drops to -7 at 10, reaches a minimum of -10 at 20, rises to -4 at 50. The 'Biais (%)' (blue diamonds) starts at ~16 at dosage 5, drops to 1 at 10, -1 at 20, and rises to 2 at 50. The 'Limite intervalle tolérance haute' (green triangles) starts at ~19 at dosage 5, drops to 8 at 10, 8 at 20, and rises to 4 at 50.</p>  | <p>[8,73 ; 50]</p>                    |
| $\sqrt{y} = f(\sqrt{x})$      | <p>Detailed description of the graph for <math>\sqrt{y} = f(\sqrt{x})</math>: The graph plots five metrics against dosage levels (5, 10, 20, 40, 50 mg/100). The 'Limite d'acceptation basse' (purple 'x') is constant at -10. The 'Limite d'acceptation haute' (cyan asterisk) is constant at 10. The 'Limite intervalle tolérance basse' (red squares) starts at ~14 at dosage 5, drops to -5 at 10, reaches a minimum of -6 at 20, rises to -2 at 40, and rises to 0 at 50. The 'Biais (%)' (blue diamonds) starts at ~17 at dosage 5, drops to 1 at 10, 1 at 20, -1 at 40, and rises to 3 at 50. The 'Limite intervalle tolérance haute' (green triangles) starts at ~19 at dosage 5, drops to 6 at 10, 7 at 20, 2 at 40, and rises to 5 at 50.</p> | <p>[7,73 ; 50]</p>                    |



Les résultats qui seront désormais élucidés sont basés sur le modèle mathématique choisi, en l'occurrence la fonction de réponse :  $\sqrt{y} = a\sqrt{x} + b$ , sachant que ce sont les mêmes étapes aussi suivies avec les autres modèles.

### 3. Alignement des observations

L'alignement appliqué aux réponses obtenues, selon le modèle d'étalonnage choisi  $\sqrt{y} = f(\sqrt{x})$ , 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 XXIX: Tableau d'alignement des réponses observées avec les trois séries de validation.

| Niveaux               | Répétitions | Séries (Jours)        |                         |                   |                       |                         |                   |                       |                         |                   | moyenne des PE(mg) |
|-----------------------|-------------|-----------------------|-------------------------|-------------------|-----------------------|-------------------------|-------------------|-----------------------|-------------------------|-------------------|--------------------|
|                       |             | 1                     |                         |                   | 2                     |                         |                   | 3                     |                         |                   |                    |
|                       |             | Masse introduite (mg) | Réponses instrumentales | Réponses alignées | Masse introduite (mg) | Réponses instrumentales | Réponses alignées | Masse introduite (mg) | Réponses instrumentales | Réponses alignées |                    |
| <b>5mg/100ml</b>      | 1           | 2,24                  | 882,11904               | 881,45486         | 2,24                  | 859,60049               | 858,46713         | 2,24                  | 870,04885               | 868,75961         | <b>2,24</b>        |
|                       | 2           | 2,24                  | 869,26233               | 869,72862         | 2,24                  | 858,48704               | 858,46889         | 2,23                  | 866,69891               | 867,63549         |                    |
|                       | 3           | 2,23                  | 870,50388               | 871,45514         | 2,24                  | 862,82211               | 862,64455         | 2,23                  | 865,74246               | 866,67904         |                    |
| <b>10mg/100ml</b>     | 1           | 3,17                  | 1125,58474              | 1124,64545        | 3,17                  | 1136,78494              | 1135,18212        | 3,17                  | 1143,01269              | 1141,18943        | <b>3,16</b>        |
|                       | 2           | 3,16                  | 1166,11663              | 1166,77607        | 3,16                  | 1128,20698              | 1128,18131        | 3,16                  | 1143,62188              | 1144,94640        |                    |
|                       | 3           | 3,16                  | 1150,15521              | 1151,50049        | 3,16                  | 1125,93872              | 1125,68761        | 3,16                  | 1112,59022              | 1113,91475        |                    |
| <b>20mg/100ml</b>     | 1           | 4,48                  | 1642,75470              | 1641,42635        | 4,48                  | 1636,80054              | 1634,53381        | 4,48                  | 1627,48487              | 1624,90639        | <b>4,47</b>        |
|                       | 2           | 4,47                  | 1595,53095              | 1596,46353        | 4,47                  | 1615,83663              | 1615,80032        | 4,47                  | 1597,82258              | 1599,69574        |                    |
|                       | 3           | 4,47                  | 1573,14208              | 1575,04460        | 4,47                  | 1589,41656              | 1589,06143        | 4,47                  | 1581,84354              | 1583,71671        |                    |
| <b>40mg/100ml</b>     | 1           | 6,33                  | 2248,53308              | 2246,65451        | 6,34                  | 2322,87042              | 2319,66479        | 6,34                  | 2235,58672              | 2231,94020        | <b>6,33</b>        |
|                       | 2           | 6,32                  | 2235,98860              | 2237,30746        | 6,33                  | 2301,64658              | 2301,59525        | 6,32                  | 2207,01835              | 2209,66740        |                    |
|                       | 3           | 6,32                  | 2249,33079              | 2252,02136        | 6,33                  | 2309,75410              | 2309,25188        | 6,32                  | 2228,22665              | 2230,87570        |                    |
| <b>50mg/100ml</b>     | 1           | 7,08                  | 2559,78671              | 2557,68640        | 7,08                  | 2557,29349              | 2553,70949        | 7,09                  | 2553,42104              | 2549,34411        | <b>7,07</b>        |
|                       | 2           | 7,07                  | 2569,43554              | 2570,91008        | 7,07                  | 2582,85714              | 2582,79974        | 7,07                  | 2575,45938              | 2578,42110        |                    |
|                       | 3           | 7,07                  | 2566,51067              | 2569,51882        | 7,08                  | 2567,33247              | 2566,77097        | 7,07                  | 2592,37189              | 2595,33361        |                    |
| <b>Pente</b>          |             | <b>361,2944151</b>    |                         |                   | <b>356,6324198</b>    |                         |                   | <b>355,7188808</b>    |                         |                   |                    |
| <b>Ord. l'origine</b> |             | <b>-3,721598745</b>   |                         |                   | <b>5,339173006</b>    |                         |                   | <b>5,752988246</b>    |                         |                   |                    |

#### 4. Prédiction inverses

Le calcul des concentrations prédites dites en retour est basé sur le model d'étalonnage choisi les résultats sont présentés dans le tableau ci-dessous :

Tableau XXX: Prédiction inverses obtenus avec les SV

| Niveaux    | Répétitions | Séries (Jours)    |                          |                   |                          |                   |                          |
|------------|-------------|-------------------|--------------------------|-------------------|--------------------------|-------------------|--------------------------|
|            |             | 1                 |                          | 2                 |                          | 3                 |                          |
|            |             | Réponses alignées | Prédiction inverses (mg) | Réponses alignées | Prédiction inverses (mg) | Réponses alignées | Prédiction inverses (mg) |
| 5mg/100ml  | 1           | 881,45            | 6,00                     | 858,47            | 5,72                     | 868,76            | 5,89                     |
|            | 2           | 869,73            | 5,84                     | 858,47            | 5,72                     | 867,64            | 5,87                     |
|            | 3           | 871,46            | 5,87                     | 862,64            | 5,78                     | 866,68            | 5,86                     |
| 10mg/100ml | 1           | 1124,65           | 9,75                     | 1135,18           | 10,04                    | 1141,19           | 10,19                    |
|            | 2           | 1166,78           | 10,50                    | 1128,18           | 9,91                     | 1144,95           | 10,26                    |
|            | 3           | 1151,50           | 10,22                    | 1125,69           | 9,87                     | 1113,91           | 9,70                     |
| 20mg/100ml | 1           | 1641,43           | 20,73                    | 1634,53           | 20,87                    | 1624,91           | 20,72                    |
|            | 2           | 1596,46           | 19,62                    | 1615,80           | 20,39                    | 1599,70           | 20,08                    |
|            | 3           | 1575,04           | 19,09                    | 1589,06           | 19,72                    | 1583,72           | 19,68                    |
| 40mg/100ml | 1           | 2246,65           | 38,80                    | 2319,66           | 42,11                    | 2231,94           | 39,17                    |
|            | 2           | 2237,31           | 38,47                    | 2301,60           | 41,46                    | 2209,67           | 38,39                    |
|            | 3           | 2252,02           | 38,98                    | 2309,25           | 41,73                    | 2230,88           | 39,13                    |
| 50mg/100ml | 1           | 2557,69           | 50,26                    | 2553,71           | 51,06                    | 2549,34           | 51,13                    |
|            | 2           | 2570,91           | 50,78                    | 2582,80           | 52,23                    | 2578,42           | 52,31                    |
|            | 3           | 2569,52           | 50,73                    | 2566,77           | 51,59                    | 2595,33           | 53,00                    |

#### 5. Justesse

La justesse est exprimée en biais absolu, biais relatif en sus du taux de recouvrement pour chaque niveau de concentration théorique des standards de validation comme indiqué dans le tableau suivant

Tableau XXXI: Calcul de la justesse pour chaque niveau des SV

| Niveaux  | <i>5mg/100 ml</i> | <i>10mg/100ml</i> | <i>20mg/100ml</i> | <i>40mg/100ml</i> | <i>50mg/100ml</i> |
|--|-------------------|-------------------|-------------------|-------------------|-------------------|
| <b>Concentration moyenne théorique (mg/ml)</b> | 5,00              | 10,01             | 20,02             | 40,03             | 50,04             |
| <b>Concentration moyenne retrouvé (mg/ml)</b>  | 5,84              | 10,05             | 20,10             | 39,80             | 51,45             |
| <b>Biais absolu</b>                            | 0,84              | 0,04              | 0,09              | -0,23             | 1,42              |
| <b>Biais relatif (%)</b>                       | <i>16,70</i>      | <i>0,41</i>       | <i>0,43</i>       | <i>-0,57</i>      | <i>2,83</i>       |
| <b>Taux de recouvrement (%)</b>                | <i>116,70</i>     | <i>100,41</i>     | <i>100,43</i>     | <i>99,43</i>      | <i>102,83</i>     |

## 6. Fidélité

La fidélité en ses deux conditions de répétabilité et de fidélité intermédiaire est exprimée en écarts types relativisés en coefficients de variation par suite de l'étude de la variance du modèle choisi qui a donné les résultats suivants dans le tableau ci-dessous :

Tableau XXXII: Calcul de fidélité pour chaque niveau des SV

| Niveaux                                      | <i>5mg/100ml</i> | <i>10mg/100ml</i> | <i>20mg/100ml</i> | <i>40mg/100ml</i> | <i>50mg/100ml</i> |
|--|------------------|-------------------|-------------------|-------------------|-------------------|
| <b>Concentration moyenne retrouvé (mg/L)</b> | 5,84             | 10,05             | 20,10             | 39,80             | 51,45             |
| <b>SCE résiduelle</b>                        | 0,02             | 0,48              | 2,62              | 0,73              | 2,63              |
| <b>SCE totale</b>                            | 0,06             | 0,55              | 3,03              | 18,12             | 6,39              |
| <b>SCE inter séries</b>                      | 0,04             | 0,07              | 0,41              | 17,38             | 3,76              |
| <b>Ecart type de répétabilité</b>            | 0,05             | 0,28              | 0,66              | 0,35              | 0,66              |
| <b>Ecart type inter séries</b>               | 0,00             | 0,00              | 0,00              | 0,00              | 0,00              |

|   |      |      |      |      |      |
|---|------|------|------|------|------|
| <b>Ecart type de fidélité intermédiaire</b> | 0,05 | 0,28 | 0,66 | 0,35 | 0,66 |
| <b>CV de répétabilité</b>                   | 0,91 | 2,81 | 3,29 | 0,88 | 1,29 |
| <b>CV de fidélité intermédiaire</b>         | 0,91 | 2,81 | 3,29 | 0,88 | 1,29 |

## 7. Exactitude

Le tableau suivant élucide pour chaque concentration des standards de validation son exactitude relative .

Tableau XXXIII: Résultats du calcul de l'exactitude relative.

| Niveaux           | Répétitions | Séries (Jour)                       |                                  |                         |                                     |                                  |                         |                                     |                                  |                         |
|-------------------|-------------|-------------------------------------|----------------------------------|-------------------------|-------------------------------------|----------------------------------|-------------------------|-------------------------------------|----------------------------------|-------------------------|
|                   |             | 1                                   |                                  |                         | 2                                   |                                  |                         | 3                                   |                                  |                         |
|                   |             | Concentration introduite (mg/100ml) | Concentration prédite (mg/100ml) | Exactitude relative (%) | Concentration introduite (mg/100ml) | Concentration prédite (mg/100ml) | Exactitude relative (%) | Concentration introduite (mg/100ml) | Concentration prédite (mg/100ml) | Exactitude relative (%) |
| <b>5mg/100ml</b>  | 1           | 5,01                                | 6,00                             | -16,50                  | 5,02                                | 5,72                             | -12,31                  | 5,02                                | 5,89                             | -14,71                  |
|                   | 2           | 5,00                                | 5,84                             | -14,48                  | 5,00                                | 5,72                             | -12,56                  | 4,99                                | 5,87                             | -14,97                  |
|                   | 3           | 4,99                                | 5,87                             | -14,92                  | 5,01                                | 5,78                             | -13,37                  | 4,99                                | 5,86                             | -14,78                  |
| <b>10mg/100ml</b> | 1           | 10,02                               | 9,75                             | 2,77                    | 10,04                               | 10,04                            | -0,01                   | 10,04                               | 10,19                            | -1,46                   |
|                   | 2           | 10,00                               | 10,50                            | -4,76                   | 10,01                               | 9,91                             | 0,96                    | 9,98                                | 10,26                            | -2,65                   |
|                   | 3           | 9,98                                | 10,22                            | -2,34                   | 10,01                               | 9,87                             | 1,45                    | 9,98                                | 9,70                             | 2,88                    |
| <b>20mg/100ml</b> | 1           | 20,05                               | 20,73                            | -3,31                   | 20,07                               | 20,87                            | -3,82                   | 20,08                               | 20,72                            | -3,08                   |
|                   | 2           | 19,99                               | 19,62                            | 1,92                    | 20,02                               | 20,39                            | -1,84                   | 19,97                               | 20,08                            | -0,55                   |
|                   | 3           | 19,97                               | 19,09                            | 4,57                    | 20,02                               | 19,72                            | 1,54                    | 19,97                               | 19,68                            | 1,47                    |
| <b>40mg/100ml</b> | 1           | 40,10                               | 38,80                            | 3,35                    | 40,14                               | 42,11                            | -4,67                   | 40,16                               | 39,17                            | 2,54                    |
|                   | 2           | 39,98                               | 38,47                            | 3,92                    | 40,03                               | 41,46                            | -3,44                   | 39,94                               | 38,39                            | 4,04                    |
|                   | 3           | 39,94                               | 38,98                            | 2,45                    | 40,05                               | 41,73                            | -4,04                   | 39,94                               | 39,13                            | 2,06                    |
| <b>50mg/100ml</b> | 1           | 50,12                               | 50,26                            | -0,28                   | 50,18                               | 51,06                            | -1,72                   | 50,20                               | 51,13                            | -1,82                   |
|                   | 2           | 49,98                               | 50,78                            | -1,58                   | 50,04                               | 52,23                            | -4,20                   | 49,92                               | 52,31                            | -4,56                   |
|                   | 3           | 49,92                               | 50,73                            | -1,59                   | 50,06                               | 51,59                            | -2,96                   | 49,92                               | 53,00                            | -5,80                   |

## 8. Erreur totale

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

Tableau XXXIV: Calcul de l'erreur totale pour chaque niveau de concentration des SV

| Niveaux    | Répétitions | Séries (Jour)           |        |        | Erreur totale relative (%) |
|------------|-------------|-------------------------|--------|--------|----------------------------|
|            |             | 1                       | 2      | 3      |                            |
|            |             | Exactitude relative (%) |        |        |                            |
| 5mg/100ml  | 1           | -16,50                  | -12,31 | -14,71 | <b>17,61</b>               |
|            | 2           | -14,48                  | -12,56 | -14,97 |                            |
|            | 3           | -14,92                  | -13,37 | -14,78 |                            |
| 10mg/100ml | 1           | 2,77                    | -0,01  | -1,46  | 3,22                       |
|            | 2           | -4,76                   | 0,96   | -2,65  |                            |
|            | 3           | -2,34                   | 1,45   | 2,88   |                            |
| 20mg/100ml | 1           | -3,31                   | -3,82  | -3,08  | 3,71                       |
|            | 2           | 1,92                    | -1,84  | -0,55  |                            |
|            | 3           | 4,57                    | 1,54   | 1,47   |                            |
| 40mg/100ml | 1           | 3,35                    | -4,67  | 2,54   | 1,44                       |
|            | 2           | 3,92                    | -3,44  | 4,04   |                            |
|            | 3           | 2,45                    | -4,04  | 2,06   |                            |
| 50mg/100ml | 1           | -0,28                   | -1,72  | -1,82  | 4,12                       |
|            | 2           | -1,58                   | -4,20  | -4,56  |                            |
|            | 3           | -1,59                   | -2,96  | -5,80  |                            |

La figure suivante illustre la distribution de l'erreur totale relative sur les cinq niveaux de concentrations théoriques :

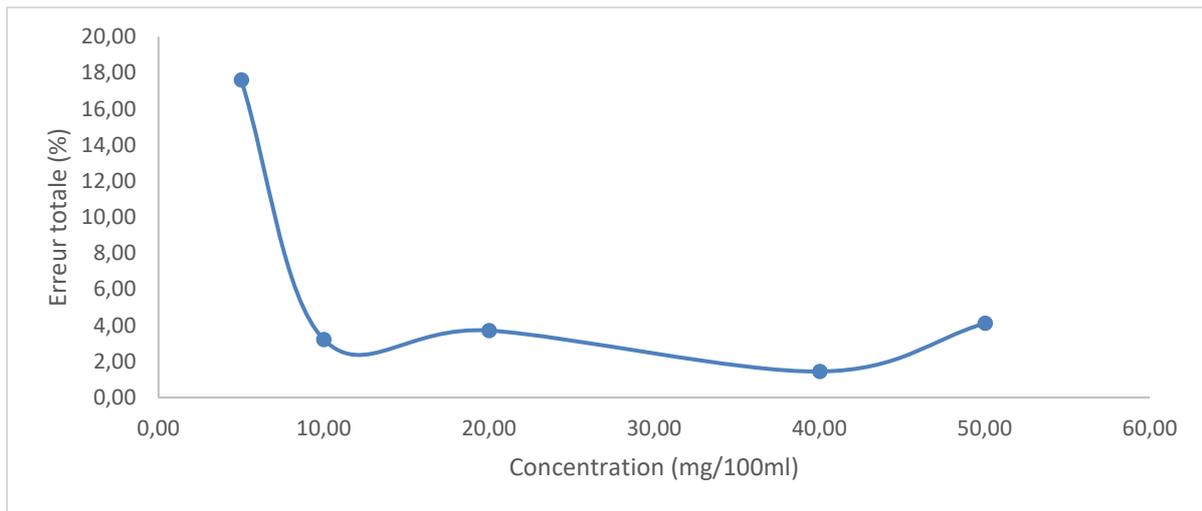


Figure 16: Profil d'erreur relative totale

## 9. Intervalle de tolérance

Le calcul des limites de l'intervalle de tolérance pour chaque niveau de concentration théorique est résumé dans le tableau suivant :

Tableau XXXV: Calcul des limites de tolérance pour chaque niveau de concentration

| Niveaux   | 5mg/100ml   | 10mg/100ml   | 20mg/100ml   | 40mg/100ml   | 50mg/100ml   |
|---|-------------|--------------|--------------|--------------|--------------|
| <b>Concentration moyenne théorique (mg/100ml)</b>         | <b>5,00</b> | <b>10,01</b> | <b>20,02</b> | <b>40,03</b> | <b>50,04</b> |
| <b>Nombre de séries (I)</b>                               | 3           |              |              |              |              |
| <b>Nombre de mesures par niveau (IK)</b>                  | 9           |              |              |              |              |
| <b>Nombre de répétitions (K)</b>                          | 3           |              |              |              |              |
| <b>Facteur de couverture de l'intervalle de tolérance</b> |             |              |              |              |              |
| <b>Rapport des variances (R)</b>                          | 0           | 0            | 0            | 0            | 0            |
| <b>Coefficient B<sup>2</sup></b>                          | 1           | 1            | 1            | 1            | 1            |
| <b>Nombre de degrés liberté</b>                           | 7,71        | 7,71         | 7,71         | 7,71         | 7,71         |
| <b>Probabilité tolérance (bêta)</b>                       | 90%         |              |              |              |              |
| <b>t Student bas</b>                                      | 1,89        | 1,89         | 1,89         | 1,89         | 1,89         |
| <b>t Student haut</b>                                     | 1,86        | 1,86         | 1,86         | 1,86         | 1,86         |
| <b>Facteur de couverture</b>                              | 1,97        | 1,97         | 1,97         | 1,97         | 1,97         |
| <b>Ecart-type de tolérance</b>                            | 0,06        | 0,30         | 0,70         | 0,37         | 0,70         |
| <b>Intervalle de tolérance</b>                            |             |              |              |              |              |
| <b>Limite de tolérance basse</b>                          | 5,73        | 9,46         | 18,73        | 39,08        | 50,08        |
| <b>Limite de tolérance haute</b>                          | 5,95        | 10,64        | 21,47        | 40,53        | 52,83        |
| <b>Limite intervalle tolérance relative basse</b>         | 14,48       | -5,44        | -6,43        | -2,38        | 0,08         |
| <b>Limite intervalle tolérance relative haute</b>         | 18,91       | 6,27         | 7,28         | 1,25         | 5,58         |

## 10. Profil d'exactitude

La figure ci-dessous dans laquelle l'axe horizontal représente les concentrations allant de 5 à 50 mg/100ml et l'axe vertical le biais relatif représente le profil d'exactitude :

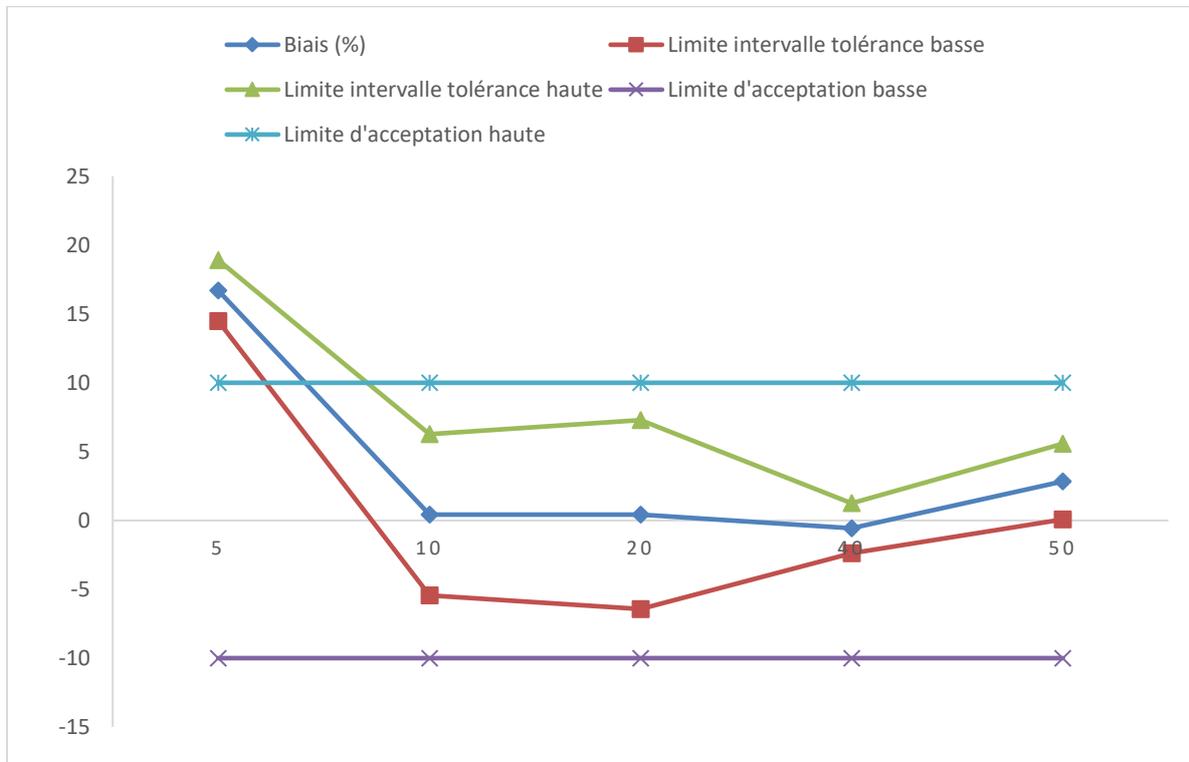


Figure 17: Profil d'exactitude

## 11. Linéarité

Le calcul des différents paramètres de la linéarité, nécessaires pour sa vérification est élucidé dans le tableau suivant

Tableau XXXVI: Calcul des différents paramètres de la linéarité

| Niveaux   | 1 <sup>ère</sup> ré-<br>pétition<br>de<br>chaque<br>série | Masse intro-<br>duite en mg<br>( $X_i$ ) | Prédic-<br>tion in-<br>verse<br>( $X_i^*$ ) | Concentra-<br>tion calculé<br>( $X_{i,calc}$ ) | ( $X_i^* - X_{i,calc}$ ) <sup>2</sup> | ( $X_i - X'$ ) <sup>2</sup> |
|---|---|--|---|--|---------------------------------------|-----------------------------|
| 5mg/100ml   | 1   | 5,01                                     | 6,00  | 5,50   | 0,26                                  | 402,86                      |
|   | 2   | 5,02                                     | 5,72  | 5,50   | 0,05                                  | 402,62                      |
|   | 3   | 5,02                                     | 5,89  | 5,50   | 0,15                                  | 402,54                      |
| 10mg/100ml  | 1   | 10,02                                    | 9,75  | 10,49  | 0,54                                  | 226,78                      |
|   | 2   | 10,04                                    | 10,04                                       | 10,50  | 0,22                                  | 226,42                      |
|   | 3   | 10,04                                    | 10,19                                       | 10,51  | 0,10                                  | 226,30                      |
| 20mg/100ml  | 1   | 20,05                                    | 20,73                                       | 20,48  | 0,07                                  | 25,35                       |
|   | 2   | 20,07                                    | 20,87                                       | 20,50  | 0,13                                  | 25,11                       |
|   | 3   | 20,08                                    | 20,72                                       | 20,51  | 0,04                                  | 25,03                       |
| 40mg/100ml  | 1   | 40,10                                    | 38,80                                       | 40,46  | 2,75                                  | 225,38                      |
|   | 2   | 40,14                                    | 42,11                                       | 40,50  | 2,59                                  | 226,82                      |
|   | 3   | 40,16                                    | 39,17                                       | 40,52  | 1,83                                  | 227,31                      |
| 50mg/100ml  | 1   | 50,12                                    | 50,26                                       | 50,44  | 0,03                                  | 626,83                      |
|   | 2   | 50,18                                    | 51,06                                       | 50,50  | 0,31                                  | 629,84                      |
|   | 3   | 50,20                                    | 51,13                                       | 50,52  | 0,37                                  | 630,85                      |
| <b>Pente</b>                                      |   | 0,9965                                   |   |  |                                       |                             |
| <b>Ordonnée à l'origine</b>                       |   | 0,5016                                   |   |  |                                       |                             |
| <b>SCE/(n-2)</b>                                  |   | 0,7260                                   |   |  |                                       |                             |
| <b>Erreur pente</b>                               |   | 0,0127                                   |   |  |                                       |                             |
| <b>Erreur ordonnée à l'origine</b>                |   | 0,3863                                   |   |  |                                       |                             |
| <b>Coefficient de détermination R<sup>2</sup></b> |   | 0,9979                                   |   |  |                                       |                             |
| <b>Comparaison de la pente avec 1</b>             |   | t calculé                                | <b>0,28</b>                                 |  | <b>Différence non significative</b>   |                             |
|   |   | t°( $\alpha$ ; 13)                       | 1,77  |  |                                       |                             |
|   |   | Condition                                | t calculé < t°( $\alpha$ ; 13)              |  |                                       |                             |

|   |                          |  |                                     |
|---|--------------------------|--|-------------------------------------|
| <b>Comparaison de l'ordonnée à l'origine avec 0</b> | t calculé                | <b>1,30</b>                                  | <b>Différence non significative</b> |
|   | $t^{\circ}(\alpha ; 13)$ | 1,77   |                                     |
|   | Condition                | $t \text{ calculé} < t^{\circ}(\alpha ; 13)$ |                                     |

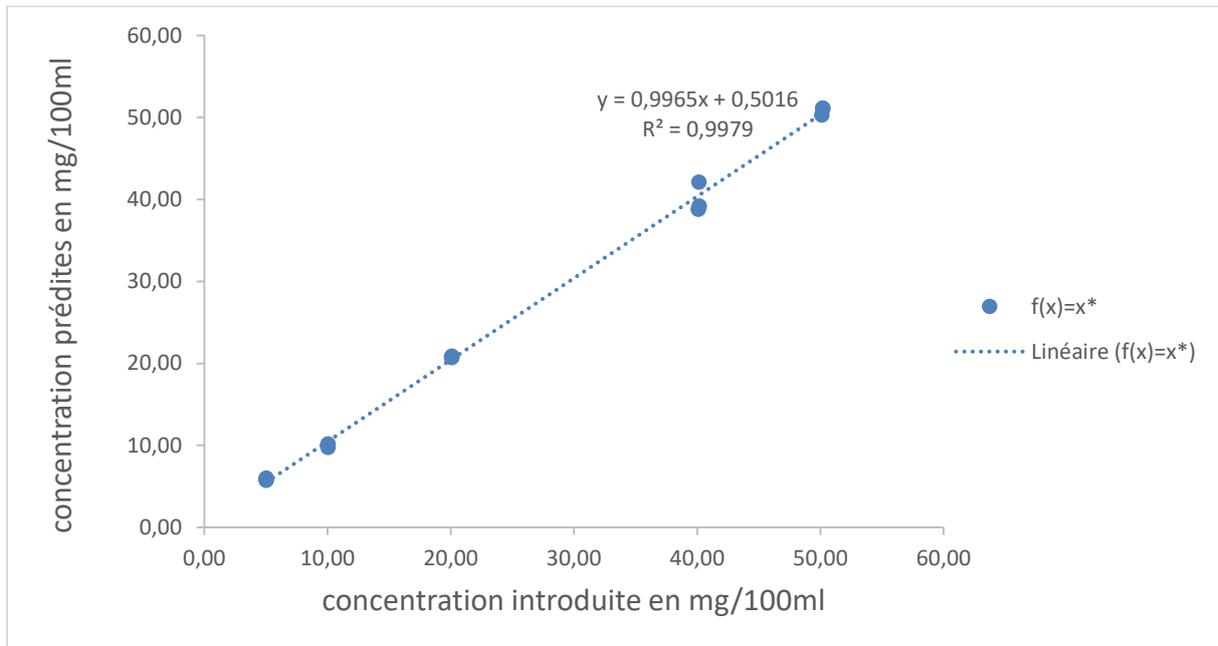


Figure 18: Profil de la régression linéaire entre les concentrations prédites et les concentrations introduites.

## 12. Limites de quantification

Les limites de quantification sont tirées du profil d'exactitude, elles représentent les points d'intersection du tracé des limites de tolérance avec les limites d'acceptabilité.

- Le calcul du premier point d'intersection (qui se situe entre le premier et le deuxième niveau de concentration) étant la limite de quantification basse est élucidé dans le tableau suivant :

Tableau XXXVII: calcul de la limite de quantification

| <b>Niveaux critiques</b>                           | <b>Niveau 1</b> | <b>Niveau 2</b> |
|--|-----------------|-----------------|
| <b>Concentration moyenne introduite (mg/100ml)</b> | 5,00            | 10,01           |
| <b>Limite d'intervalle de tolérance critique</b>   | 5,95            | 10,64           |
| <b>Limite d'acceptabilité critique</b>             | 5,50            | 11,01           |

| <b>Droite</b>                          | <b>Pente</b> | <b>Origine</b> |
|--|--------------|----------------|
| <b>Intervalle tolérance</b>            | 0,94         | 1,26           |
| <b>Limite d'acceptabilité critique</b> | 1,10         | 0,00           |

|                         |                             |
|-------------------------|-----------------------------|
| <b>LQ<sub>inf</sub></b> | <b><i>7,73 mg/100ml</i></b> |
|-------------------------|-----------------------------|

- Selon le profil d'exactitude, il n'y a pas de plus grande concentration pour laquelle les limites de tolérance sortent des limites d'acceptabilité (pas d'intersection) le résultat de la limite de quantification haute est donné comme étant la limite supérieure de l'intervalle de validation ( $LQ_{sup} = 50 \text{ mg/100ml}$ ).

# Discussion

## 1. Spécificité

### 1.1. Comparaison des chromatogrammes

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

- L'absence de pic au temps de rétention théorique dans le chromatogramme obtenu avec le diluant seul et le diluant avec placebo ;
- Les temps de rétention du pic du Furosémide dans le standard d'étalonnage et le standard de validation sont comparables.

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

La discussion des résultats obtenus est résumée dans le tableau XXXVIII ci-dessous

Tableau XXXVIII: Signification des résultats de la comparaison des pentes et des ordonnées à l'origine

| Test  | Gamme        | Résultat | Signification             |
|---|--------------|----------|---------------------------|
| Les pentes sont-elles comparables avec 0 ?                | Sans matrice | NON      | Pentes significatives     |
|   | Avec matrice | NON      |                           |
| Les ordonnées à l'origine sont-elles comparables avec 0 ? | Sans matrice | OUI      | La méthode est spécifique |
|   | Avec matrice | OUI      |                           |

### 1.3. Comparaison des deux pentes des deux droites de régression

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

Tableau XXXIX: Signification des résultats des deux pentes et deux ordonnées à l'origine entre elle

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

On peut dire qu'avec un risque de 10%, statistiquement la méthode est spécifique ainsi qu'une absence d'effet matrice et d'erreur systématique est confirmée.

## **2. Le choix de la fonction de réponse**

D'après les profils d'exactitude élucidés dans le tableau et les intervalles de validité (intervalle de dosage) de la méthode qui en découlent pour chaque modèle simulé et validé, on constate que le modèle de régression linéaire avec l'équation  $\sqrt{y}=a\sqrt{x}+b$  a donné l'intervalle de validité le plus large de 7,73 à 50 mg/100ml, ce qui nous permis de le sectionner comme le modèle qui convient le plus à notre méthode de dosage.

## **3. Critères de performance de la fonction de réponse choisie**

### **3.1. Justesse**

L'accord entre la valeur de la concentration moyenne prédite obtenue à partir des trois séries de validation et la valeur de la moyenne des concentrations théoriques considérées comme étant la valeur de référence est assez étroit pour les 4 niveaux supérieurs en tenant compte que les biais relatifs de ces derniers sont inférieurs à 5 %, donc la méthode est juste.

Exception faite pour le premier niveau qui a un biais relatif important.

### **3.2. Fidélité**

La dispersion des prédictions inverses des concentrations des trois séries de validation est assez étroite pour tous les niveaux de concentration, du fait que les coefficients de variation de la répétabilité et de la fidélité intermédiaire de tous les niveaux est inférieur à 5 %.

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

Cependant ces estimations de la fidélité et de la justesse ne sont pas une fin en soi, ils sont une étape intermédiaire obligatoire pour pouvoir évaluer si la procédure analytique va vraisemblablement pouvoir ou non quantifier avec une exactitude suffisante chacune des quantités inconnues, en d'autres termes elles ne renseignent pas sur la qualité des résultats et ne permettent pas de prendre une décision sur la validité de la méthode.

### 3. 3. Erreur totale

Selon le profil d'erreur totale élucidé dans la figure (16) on juge que le premier niveau de concentration (5 mg/100ml) sort de l'intervalle de validité puisqu'il présente une erreur totale relative qui dépasse les 10% fixés comme limite d'acceptabilité, cependant les autres niveaux seront inclus dans l'intervalle de validité. Et ceci est confirmé par l'erreur maximale observée pour le premier niveau lors du calcul d'exactitude relative qui est de l'ordre de 17.61% par rapport aux autres niveaux qui présentent des erreurs maximales < 4,12%.

Les résultats obtenus en termes de justesse, de fidélité et d'erreur totale pour le premier niveau de concentration peuvent être expliqués par le fait que l'erreur sur les prises d'essai et les dilutions est d'autant plus grande que la concentration du niveau est faible.

### 3. 4. Profil d'exactitude

En se référant au profil d'exactitude élucidé dans le tableau XXVIII, on considère que la méthode étudiée dans ce présent travail est valide pour l'intervalle de dosage où le profil d'exactitude est compris dans les limites d'acceptation de  $\pm 10\%$ , autrement dit du point d'intersection de la limite supérieur de l'intervalle de tolérance avec la limite d'acceptabilité jusqu'au niveau de concentration 50 mg/100ml, et cela en garantissant que seule 10 % des futures mesures d'échantillons inconnus peuvent avoir des résultats non fiables.

### 3. 5. Limites de quantification et intervalle de validité

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

L'intervalle de validité est [LQinf ; LQsup] ; selon les résultats, la méthode est tenue pour valide dans l'intervalle [7,73 mg/100ml ; 50 mg/100ml].

### 3. 6. Linéarité

La linéarité de la méthode est démontrée par corrélation des résultats obtenus (masses prédites) à des masses réellement introduites de PA dans les gammes des SV.

La droite de régression obtenue présente une équation de :  $y = 0,9965x - 0,5016$  avec :

Un coefficient de corrélation est acceptable ( $R^2 = 0,9979$ ), étant donné que les deux variables ne sont pas toutes les deux indépendantes, il ne peut confirmer à lui seul la validité de la linéarité.

Une pente statistiquement comparable à 1 au risque de 5 %, en l'occurrence la pente est significativement différente de 0, cela veut dire que la régression est significative entre la variable expliquée (concentration prédite) et la variable explicative (concentration introduite).

Une ordonnée à l'origine est statistiquement comparable avec 0 au risque de 5 %,

Sur ce, on conclut que la linéarité de la méthode de dosage est validée.

#### **4. Synthèse des résultats**

La spécificité, la linéarité et l'exactitude de la méthode de dosage du Furosémide dans les comprimés de 40 mg par HPLC mise au point ultérieurement sont démontrés dans l'intervalle de dosage [7.73 mg/100ml ; 50 mg/100ml] avec une probabilité de confiance de 90 % dans les limites d'acceptation définies  $\pm 10$  %. Autrement dit, 90% des futurs résultats fournis par la méthode analytique développée se situeront dans les limites d'acceptabilité et les limites de dosage.

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

L'utilisation de l'HPLC avec une détection dans le domaine de l'Ultraviolet comme méthode de dosage a permis d'obtenir des résultats plus exacts, plus précis et plus spécifiques (méthode séparative) dans un intervalle de dosage plus étendu qui permet la quantification des quantités plus faibles après adaptation posologique.

# Conclusion

## Conclusion

Le souci de cibler la dose adéquate pour les patients dont leurs états physiologiques ou physiopathologiques nécessitent de faibles doses oblige les cliniciens à opter à une adaptation par le fractionnement des comprimés bien que l'absence d'une méthode valide pour le contrôle de ces faibles doses dans des comprimés adaptés constitue un problème fréquemment rencontré .

La validation analytique d'une méthode de dosage constitue une étape indispensable d'un système exhaustif d'assurance qualité dans le domaine de l'industrie pharmaceutique ,pour cela des textes réglementaires très sévère et complexes s'imposent.

Ce présent travail avait pour objectif d'étudier la validation d'une méthode de dosage du Furosémide à un intervalle élargi par chromatographie liquide à haute performance en se basant sur la démarche élaborée par la commission SFSTP utilisant le profil d'exactitude et l'intervalle de tolérance comme outil de décision de la validation .

Cette étude s'est révélée concluante, et a permis de démontrer que les outils statistiques proposés par les guides de SFSTP 2003-2006 pouvaient être appliqués à la validation analytique pour le contrôle quantitatif des comprimés adaptés .

La méthode s'est révélée spécifique, linéaire, sensible, exacte dans l'intervalle [7,73 ; 50] mg/100ml pour le Furosémide à des limites d'acceptation fixées à +/- 10% ces résultats obtenus ont répondu à toutes les exigences et performances spécifiques élaborées dans cette approche harmonisée ; ce qui atteste de la validité de la méthode utilisée et son aptitude à être appliquée en routine par les laboratoires de contrôle qualité.

Après avoir réalisé ce travail, on a opté pour les recommandations suivantes :

- Une optimisation de la méthode de dosage et élargissement d'intervalle de dosage ;
- Généraliser ce protocole pour permettre son utilisation en routine ;
- Compléter le présent travail par des étude de stabilité.

# Références bibliographiques

## REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- (1). Moulin M, Coquerel A. Abrégé de Pharmacologie. Connaissances et Pratique. 2<sup>ème</sup> édition. Masson; 2007.
- (2). Hubert P, Nguyen-Huu J, LAURENTIE M, MERCIER N, MUZARD G. Validation Des procédures analytiques quantitatives harmonisation des démarches. STP Pharma pratiques. 2003;13(3):101-38.
- (3). Inc SC. MONOGRAPHIE DE PRODUIT Pr FUROSÉMIDE SPÉCIAL Furosémide injection USP 10mg/mL. 2012.
- (4). Inc s-aC. MONOGRAPHIE DE PRODUIT PrLASIX® SPÉCIAL comprimés de furosémide, norme du fabricant dosés à 500 mg 2018.
- (5). inc SH. MONOGRAPHIE DE PRODUIT Pr FUROSEMIDE (furosémide) Comprimés de 20mg, 40mg et 80mg Diuretique. 2015.
- (6). VIDAL. Vidal ; furosémide 40mg  
  
Available from: <https://eurekasante.vidal.fr/recherche/index/q:furosemide+40+mg/>
- (7). Tunis fdmd. Pharmacologie cardiovasculaire et respiratoire. 2016.
- (8). Lüllmann H, Mohr K, Hein L. Atlas de poche de pharmacologie: Lavoisier-Médecine sciences; 2016.
- (9). charon o. circulation du sang 2011. Available from: <https://www.docteurclic.com/encyclopedie/circulation-du-sang.aspx>.
- (10). pharmacopée européenne 7<sup>ème</sup> édition
- (11). Grenouilleau V. Modification galénique des formes orales sèches: amélioration des pratiques en gériatrie. Pharmaceut Sci. 2014.
- (12). MOUTON MC-V. Validation d'un process pharmaceutique appliqué à une forme orale solide: université de Lille; 2018-2019.
- (13). Dekyndt Brr. La libération modifiée de principes actifs, développement de deux approches 2015.
- (14). Vo M. Les comprimés, une forme d'avenir? : Université de Lorraine; 2015.
- (15). Yekpe K. Relier les attributs de matériaux et les paramètres de procédés de fabrication à un test de contrôle qualité, une application du concept du Quality by Design: Montpellier 1; 2014.

- (16). Brossard D, Charrueau C, Chaumeil J-C, Crauste-Manciet S, Le Hir A. Pharmacie Galénique: Bonnes Pratiques de Fabrication des Médicaments: Elsevier Masson; 2016.
- (17). Denine R. Cours de pharmacie galénique. édition OPU, Alger. 2008.
- (18). FRANCK KJ. Contrôle de qualité des comprimés non enrobés cas d'un générique et d'un princeps de doxycycline. 2008.
- (19). pharmacopée européenne 8<sup>ème</sup> édition.
- (20). Levy J. Adaptation posologique de médicaments prescrits en odontologie chez l'insuffisant rénal et l'insuffisant hépatique: Thèse d'exercice].[Nice]: Université de Nice Sophia Antipolis, UFR d'odontologie; 2013.
- (21). AJGRAIN Y. AY, LENOIR G. Pharmacologie et thérapeutique. 1997.
- (22). Dupont C. Les diarrhées aiguës de l'enfant: John Libbey Eurotext; 1999.
- (23). Milani G, Ragazzi M, Simonetti GD, Ramelli GP, Rizzi M, Bianchetti MG, et al. Superior palatability of crushed lercanidipine compared with amlodipine among children. British journal of clinical pharmacology. 2010;69(2):204-6.
- (24). Dachraoui M. Introduction à la norme ISO/CEI 17025 et guide de validation des méthodes d'analyse.
- (25). Bonnes pratiques de fabrication des produits pharmaceutiques : grands principes WHO Technical Report Series 986 [cited 2014]. Available from: [www.who.int/medicines/areas/quality\\_safety/quality\\_assurance/FR-TRS986annex2.pdf?ua=1#:~:text=de%20la%20qualité,-Validation.,escomptés%20\(voir%20aussi%20Homologation\).](http://www.who.int/medicines/areas/quality_safety/quality_assurance/FR-TRS986annex2.pdf?ua=1#:~:text=de%20la%20qualité,-Validation.,escomptés%20(voir%20aussi%20Homologation).)
- (26). Food U, Administration D. Guidance for industry: analytical procedures and methods validation: chemistry, manufacturing, and controls documentation. Center for Drug Evaluation and Research/Center for Biologics Evaluation and Research Estados Unidos de América. 2000.
- (27). Guideline IHT. Validation of analytical procedures: text and methodology. Q2 (R1). 2005;1(20):05.
- (28). M F. validation des méthodes d'analyse quantitative au moyen du profil d'exactitude. Technique de l'ingénieur 2013.
- (29). vial j, editor Journée de Formation Scientifique en Spectrométrie Atomique. Définition de la validation de méthode et outils associés; 2006; PARIS
- (30). Feinberg M, Laurentie M. Validation des méthodes d'analyse quantitative par le profil d'exactitude. Numéro special du cahier des techniques de l'Inra. 2010.

- (31). Feinberg M. Principes et vocabulaire pour la validation des méthodes Le Cahier des Techniques de l'Inra 2010.
- (32). Pinguet I. Validation analytique: application de la procédure SFSTP 2003-2006 au domaine de la phytothérapie. Sciences pharmaceutiques. 2015:P14.
- (33). Logeais M. Optimisation de la productivité des méthodes analytiques de contrôle d'un médicament 2013.
- (34). l'anses prerd. guide de validation des méthodes d'analyse. agence nationale de sécurité sanitaire alimentaire environnement travail, 2015.
- (35). Hubert P, Nguyen-Huu J, MUZARD G, VALAT L, BOULANGER B. Validation des procédures analytiques quantitatives: Harmonisation des démarches Partie II-Statistiques. STP pharma pratiques. 2006;16(1):30-60.

# Annexes

# Annexe I : La chromatographie liquide haute performance

|   |  |  |
|---|--|--|
| <p style="writing-mode: vertical-rl; transform: rotate(180deg);"><b>Définition</b></p>          | <p>La chromatographie liquide haute performance désignée par son abréviation CLHP – HPLC en anglais, constitue une technique analytique séparative très générale d'emploi, permettant l'identification, la séparation et le dosage des constituants des mélanges. Principalement employée dans le domaine de la chimie analytique comme outil scientifique majeur.</p> |  |
| <p style="writing-mode: vertical-rl; transform: rotate(180deg);"><b>Champ d'application</b></p> | <p>son champ d'application recouvre une grande partie du domaine de la chromatographie en phase gazeuse auquel s'ajoute celui de l'analyse des composés thermosensibles ou de masses moléculaires à la fois très grandes et même polaires.</p>   |  |

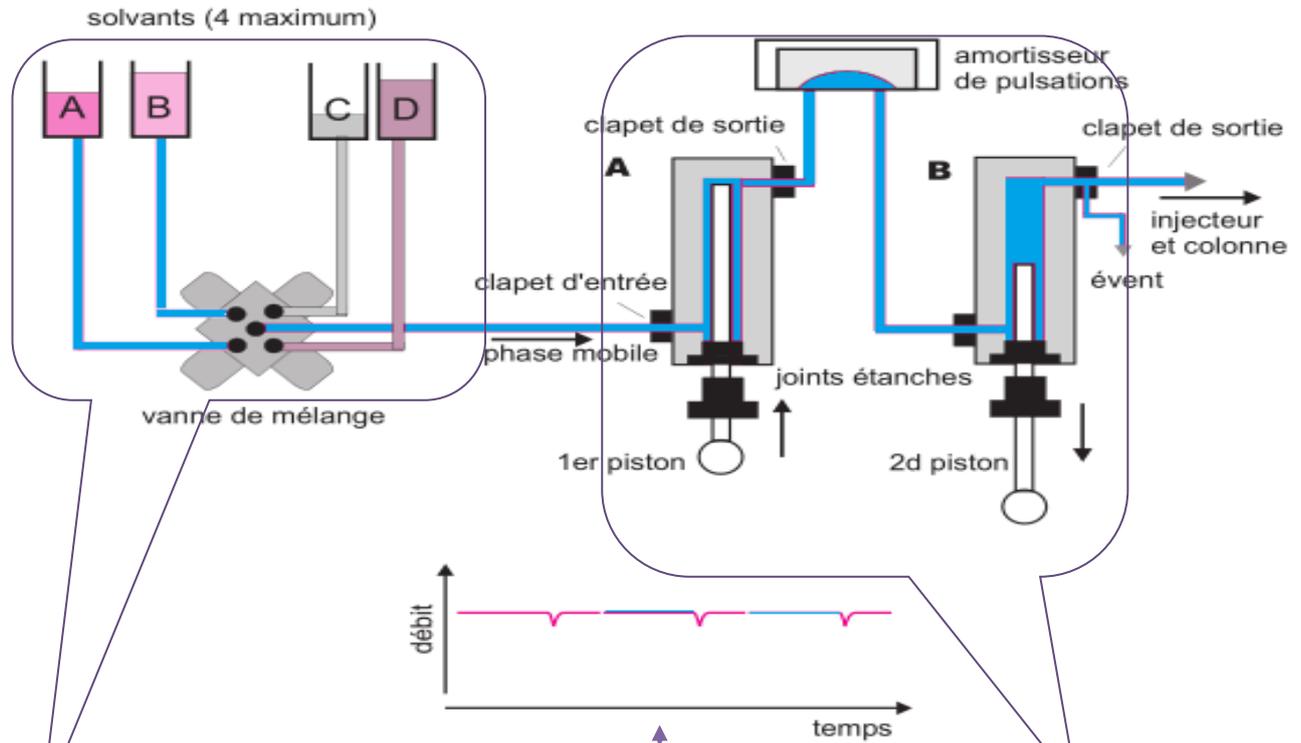
Son intérêt est majoré grâce à :

Son extrême sensibilité, à sa polyvalence, à la rapidité de mise au point des analyses nouvelles et aux possibilités d'automatisation

La possibilité d'agir de manière très précise sur la sélectivité entre les composés par le choix de la colonne et de la composition de l'éluant, c'est-à-dire en exploitant les interactions soluté/phase mobile/phase stationnaire

|  |   |
|--|---|
| <p style="writing-mode: vertical-rl; transform: rotate(180deg);"><b>Principe</b></p> | <p>Les séparations chromatographiques sont basées sur un transport forcé du liquide (phase mobile) transportant le mélange d'analytes à travers le milieu poreux et sur les différences dans les interactions des analytes avec la surface de ce milieu poreux, ce qui entraîne des temps de migration différents pour les composants du mélange. La présence de deux phases différentes est affirmée et il y a par conséquent une interface entre elles. L'une de ces phases assure le transport de l'analyte et est généralement appelée phase mobile, et l'autre est immobile et est typiquement appelée phase stationnaire.</p> <p>Un mélange de composants, communément appelés analytes, est injecté puis dispersé dans la phase mobile, qui est poussée par une pompe sous haute pression, ce qui permet un transport uniforme de ces analytes et leur répartition suivant leur affinité et leur interaction avec les phases mobile et stationnaire. (1, 2)</p> <p>Le temps de séjour de la molécule pendant son déplacement le long de la colonne chromatographique dépend de l'énergie d'interaction.</p> <p>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. (2)</p> |
|--|---|

Une installation de l'HPLC comporte divers modules spécialisés, qui se présentent dans des boîtiers distincts, ces modules sont reliés entre eux par l'intermédiaire de canalisations de très faible diamètre interne (0,1 mm) pour assurer la circulation de la phase mobile. Elles peuvent être en acier inoxydable ou autre.



#### Réservoirs de solvants :

Stockage d'une quantité suffisante de solvants HPLC pour un fonctionnement continu du système. Il peut être équipé d'un système de dégazage et filtres spéciaux pour isoler le solvant de l'influence de l'environnement.

#### Injecteur :

Permettant l'introduction du mélange d'analytes dans le flux de la phase mobile avant qu'il n'entre dans la colonne c'est-à-dire l'injection d'un volume précis de l'échantillon en tête de colonne qui doit se faire en un temps bref afin de perturber le moins possible le régime de circulation de la phase mobile qui doit être stable de la colonne au détecteur.

On utilise pour ce faire, une vanne haute pression à plusieurs voies, **manuelle** ou motorisée dans le cas des injecteurs automatiques, placée juste avant la colonne. (3, 1)

#### Pompe :

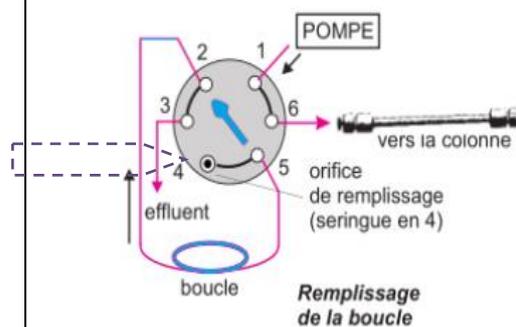
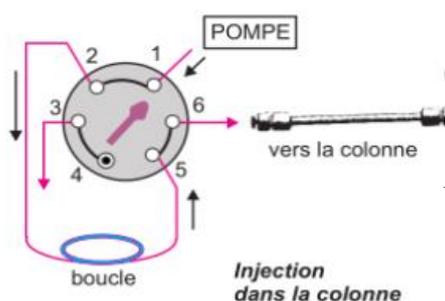
La pompe est pour forcer le passage de la phase mobile à travers la colonne dont le remplissage est très compact. Il en résulte une pression importante au niveau de l'injecteur qui dépend du débit imposé à la phase mobile ou de la viscosité ainsi que de la nature de la phase stationnaire. (3)

Elle assure le **débit constant et continu** de la phase mobile par le système ; la plupart des pompes modernes permettent le mélange contrôlé de différents solvants provenant de différents réservoirs. (1) Ces pompes débit-métriques comportent généralement deux pistons : en série (3)

Il s'agit d'une pièce de précision qui doit résister à des pressions très haute.

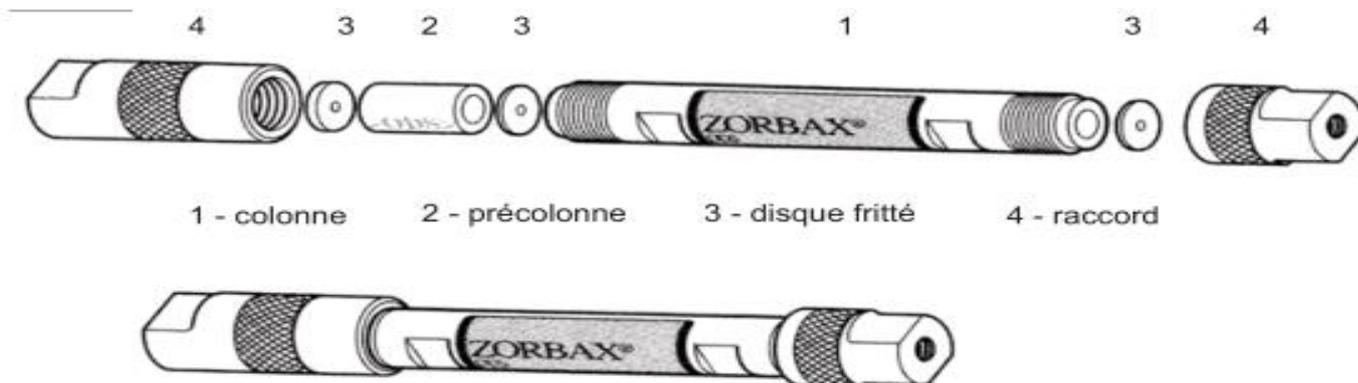
Elle fonctionne en deux temps :

► **Dans la position chargement**, où seule la communication entre pompe et colonne est assurée, l'échantillon est introduit à pression atmosphérique à l'aide d'une seringue dans un petit volume tubulaire appelé boucle. Celle-ci, dont il existe tout un choix de volumes, est soit extérieure, soit intégrée dans le corps de la vanne



► **Dans la position injection**, l'échantillon est inséré dans le flux de phase mobile par rotation de 60° d'un levier qui permet d'inverser le sens de circulation dans la boucle. Une bonne reproductibilité des volumes n'est atteinte que si la boucle a été totalement remplie par l'échantillon. Le volume prélevé avec la seringue est donc toujours supérieur à celui de la boucle.

### La colonne



C'est le cœur du système HPLC ; c'est le seul dispositif de l'HPCL qui sépare réellement un mélange injecté. Les matériaux de garnissage de la colonne sont les "milieux" qui produisent la séparation, et les propriétés de ces milieux sont de première importance pour des séparations réussies

Elle se présente comme un tube, le plus souvent en acier, dont la longueur et le diamètre présentent des différences selon les modèles. Sont de plus en plus supplantées par des colonnes de plus faibles diamètres, baptisées. Elle est souvent précédée d'une précolonne, dite colonne de garde, courte, remplie de la même phase stationnaire, ce qui sert à retenir certaines impuretés, on augmente ainsi la durée de vie de la colonne principale en préservant ses performances.

### La phase stationnaire :

La recherche d'une bonne résolution chromatographique et d'une efficacité élevée, a conduit à la création de phases stationnaires de nature et de structures variées.

#### - Phase normale (gel de silice)

#### - Phase inversée (silices greffées)

Le gel de silice ainsi modifié, devient assimilable à un liquide immobilisé et dont la polarité peut être ajustée avec précision, sont à l'origine de la chromatographie de partage à polarité de phase inversée, utilisée dans quasiment toutes les séparations.

### Détecteur :

Il s'agit d'un dispositif permettant l'enregistrement continu de données physiques spécifiques (parfois chimique) de l'effluent de la colonne.

### Détecteurs

D'absorption : UV, IR

Détecteurs spectroscopiques

De fluorescence

Réfractométrie

Polarographiques

Détecteurs électrochimiques (DEC)

Ampérométriques

Coulométriques

Potentiométriques

Conductimétrie

UV à barrette de diodes (DAD)

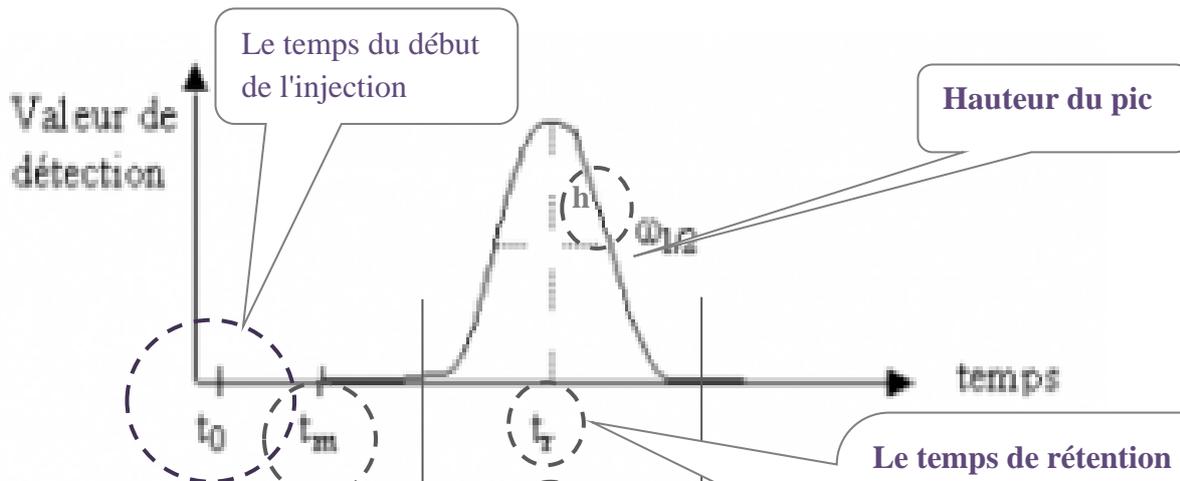
Évaporatif à diffusion de la lumière (DEDL)

Spectrométrie de masse

Détection spectrale avec couplage

Spectroscopie atomique

## Informations apportées par un chromatogramme



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

**La largeur du pic** à la base, mesurée à 13,5 pour cent de la hauteur du pic.

**Le temps de rétention** est le temps mis par un soluté pour traverser la colonne. Ce temps est caractéristique d'un soluté dans des conditions d'analyse donnée

**Le coefficient de partage k** à 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  $K$

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

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

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

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

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

**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  $N_{th}$

$$N = 16 \frac{t_r^2}{\omega^2} = 5,54 \frac{t_r^2}{\delta^2}$$

La hauteur équivalente à un plateau théorique : HEPT, qui est défini comme :  $HEPT = \frac{L}{N}$

$L$  : longueur de la colonne

**La sélectivité ( $\alpha$ )**  
Elle est définie comme le rapport des temps de rétention réduits  $\alpha = \frac{t_{rB}}{t_{rA}}$

**La résolution ( $R$ )**  
quantifie la qualité de la séparation en caractérisant le fait qu'il y ait ou non chevauchement de 2 pics contigus

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

## Annex II : Le protocole de dosage

Le protocole de dosage :

- Préparation du diluant
  - Dans une fiole jaugée de 1l, mettre 4g des pastilles de NaOH.
  - Ajouter un volume de l'eau distillée, agiter jusqu'à la dissolution totale du NaOH
  - Puis compléter au trait de jauge avec le même solvant.
  
- Préparation de la phase mobile :
  - Dans un erlenmeyer de 1L, peser 4.5g  $\text{Na}_2\text{HP}_4$  et 9g de  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ , compléter avec l'eau distillée jusqu'au trait de jauge.
  - A l'aide d'un pH-mètre, ajuster le ph avec d'acide phosphorique jusqu'à obtention de pH 5,01.
  - A partir de cette solution on a versé 250 ml dans une éprouvette de 1000ml, ainsi que 750ml d'Acétonitrile.
  
- Préparation des standards d'étalonnage
  - Dans des fioles jaugées de 50 ml, peser les différentes masses correspondantes à chaque niveau de concentration du furosémide ;
  - Dissoudre dans des volumes suffisants du diluant, mettre à l'ultrason pour une dissolution totale ;
  - Puis compléter au trait de jauge avec le même diluant ;
  - Effectuer une dilution à 1/5<sup>ème</sup> en prélevant 5ml à partir de chacune des solutions mères obtenues, à l'aide d'une pipette jaugée de 5ml, dans des fioles de 25ml complétées au trait de jauge avec le diluant afin d'obtenir les solutions filles
  
- Préparation de l'échantillon
  - Dans une fiole jaugée de 50 ml, peser une masse correspondante à la concentration du furosémide à doser située dans l'intervalle validé ;
  - Dissoudre dans un volume suffisant du diluant, mettre à l'ultrason pour une dissolution totale
  - Puis compléter au trait de jauge avec le même diluant.

- Prélever 10 ml de cette solution à l'aide d'une pipette jaugée de 10 ml, dans une fiole de 50 ml ;
- Puis compléter au trait de jauge avec le même diluant ;
- Verser l'échantillon dans des vials et l'injecter dans HPLC ;
- Lire les aires de pic et déduire la concentration de l'échantillon introduite à partir de la courbe d'étalonnage.

➤ Conditions chromatographiques

|                           |   |
|---------------------------|---|
| <b>Colonne</b>            | Diamètre (4,6 mm)<br>Longueur (15 cm)<br>Taille des particules (5 µm)<br>Phase stationnaire : Gel de silice<br>Octadecylesilyle (C18) |
| <b>Détection</b>          | Spectrophotomètre UV-visible :<br>Longueur d'onde $\lambda=270\text{nm}$  |
| <b>Volume d'injection</b> | 20µl  |
| <b>Temps d'analyse</b>    | 7min  |
| <b>Débit</b>              | 0,8 ml/min  |
| <b>Température</b>        | Ambiante  |
| <b>Phase mobile</b>       | Mélange de : <ul style="list-style-type: none"> <li>- 75% de tampon phosphaté à pH=5</li> <li>- 25% d'acétonitrile</li> </ul>         |

## Annexe III : Table de Student

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

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

- $a_1$  et  $a_2$  : pentes respectives des droites de régression  $D_1$  (obtenue à partir de la gamme standard) et  $D_2$  (obtenue à partir de la gamme placebo chargé).
- $\sigma_{a_1}^2$  et  $\sigma_{a_2}^2$  : variances respectives des pentes  $a_1$  et  $a_2$ .
- $\alpha$  : risque d'erreur acceptée (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).

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

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

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

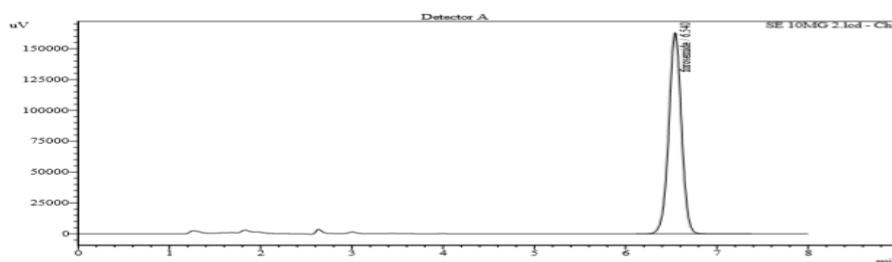
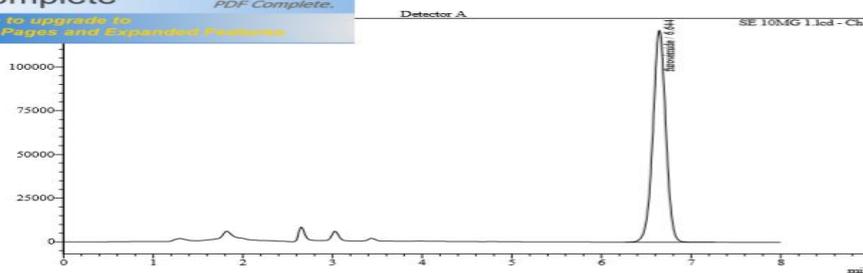
## Annex IV : Table de Fisher

Table de Fisher-Snedecor,  $\alpha = 5\%$  (95<sup>e</sup> centile)

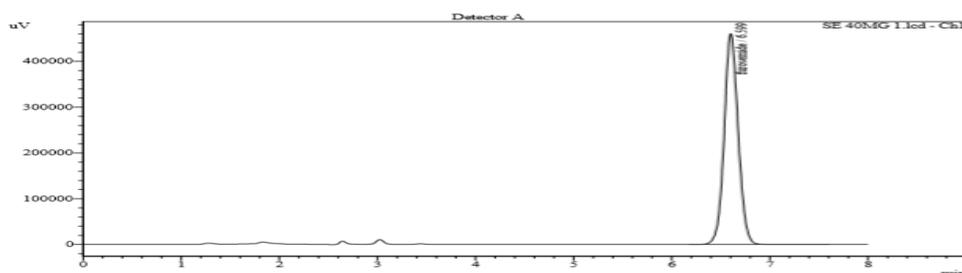
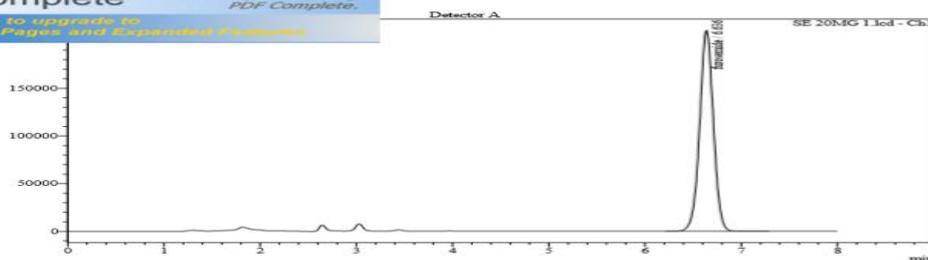
| $v_2$<br>(dén.) | $v_1$ (numérateur) |        |        |        |        |        |        |        |        |        |        |        |        |        |        |        |        |        |        |        |
|-----------------|--------------------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|
|                 | 1                  | 2      | 3      | 4      | 5      | 6      | 7      | 8      | 9      | 10     | 20     | 30     | 40     | 50     | 60     | 80     | 100    | 200    | 500    | 1 000  |
| 1               | 161.45             | 199.50 | 215.71 | 224.58 | 230.16 | 233.99 | 236.77 | 238.88 | 240.54 | 241.88 | 248.02 | 250.10 | 251.14 | 251.77 | 252.20 | 252.72 | 253.04 | 253.68 | 254.06 | 254.19 |
| 2               | 18.51              | 19.00  | 19.16  | 19.25  | 19.30  | 19.33  | 19.35  | 19.37  | 19.38  | 19.40  | 19.45  | 19.46  | 19.47  | 19.48  | 19.48  | 19.48  | 19.49  | 19.49  | 19.49  | 19.49  |
| 3               | 10.13              | 9.55   | 9.28   | 9.12   | 9.01   | 8.94   | 8.89   | 8.85   | 8.81   | 8.79   | 8.66   | 8.62   | 8.59   | 8.58   | 8.57   | 8.56   | 8.55   | 8.54   | 8.53   | 8.53   |
| 4               | 7.71               | 6.94   | 6.59   | 6.39   | 6.26   | 6.16   | 6.09   | 6.04   | 6.00   | 5.96   | 5.80   | 5.75   | 5.72   | 5.70   | 5.69   | 5.67   | 5.66   | 5.65   | 5.64   | 5.63   |
| 5               | 6.61               | 5.79   | 5.41   | 5.19   | 5.05   | 4.95   | 4.88   | 4.82   | 4.77   | 4.74   | 4.56   | 4.50   | 4.46   | 4.44   | 4.43   | 4.41   | 4.41   | 4.39   | 4.37   | 4.37   |
| 6               | 5.99               | 5.14   | 4.76   | 4.53   | 4.39   | 4.28   | 4.21   | 4.15   | 4.10   | 4.06   | 3.87   | 3.81   | 3.77   | 3.75   | 3.74   | 3.72   | 3.71   | 3.69   | 3.68   | 3.67   |
| 7               | 5.59               | 4.74   | 4.35   | 4.12   | 3.97   | 3.87   | 3.79   | 3.73   | 3.68   | 3.64   | 3.44   | 3.38   | 3.34   | 3.32   | 3.30   | 3.29   | 3.27   | 3.25   | 3.24   | 3.23   |
| 8               | 5.32               | 4.46   | 4.07   | 3.84   | 3.69   | 3.58   | 3.50   | 3.44   | 3.39   | 3.35   | 3.15   | 3.08   | 3.04   | 3.02   | 3.01   | 2.99   | 2.97   | 2.95   | 2.94   | 2.93   |
| 9               | 5.12               | 4.26   | 3.86   | 3.63   | 3.48   | 3.37   | 3.29   | 3.23   | 3.18   | 3.14   | 2.94   | 2.86   | 2.83   | 2.80   | 2.79   | 2.77   | 2.76   | 2.73   | 2.72   | 2.71   |
| 10              | 4.96               | 4.10   | 3.71   | 3.48   | 3.33   | 3.22   | 3.14   | 3.07   | 3.02   | 2.98   | 2.77   | 2.70   | 2.66   | 2.64   | 2.62   | 2.60   | 2.59   | 2.56   | 2.55   | 2.54   |
| 20              | 4.35               | 3.49   | 3.10   | 2.87   | 2.71   | 2.60   | 2.51   | 2.45   | 2.39   | 2.35   | 2.12   | 2.04   | 1.99   | 1.97   | 1.95   | 1.92   | 1.91   | 1.88   | 1.86   | 1.85   |
| 30              | 4.17               | 3.32   | 2.92   | 2.69   | 2.53   | 2.42   | 2.33   | 2.27   | 2.21   | 2.16   | 1.93   | 1.84   | 1.79   | 1.76   | 1.74   | 1.71   | 1.70   | 1.66   | 1.64   | 1.63   |
| 40              | 4.08               | 3.23   | 2.84   | 2.61   | 2.45   | 2.34   | 2.25   | 2.18   | 2.12   | 2.08   | 1.84   | 1.74   | 1.69   | 1.66   | 1.64   | 1.61   | 1.59   | 1.55   | 1.53   | 1.52   |
| 50              | 4.03               | 3.18   | 2.79   | 2.56   | 2.40   | 2.29   | 2.20   | 2.13   | 2.07   | 2.03   | 1.78   | 1.69   | 1.63   | 1.60   | 1.58   | 1.54   | 1.52   | 1.48   | 1.46   | 1.45   |
| 60              | 4.00               | 3.15   | 2.76   | 2.53   | 2.37   | 2.25   | 2.17   | 2.10   | 2.04   | 1.99   | 1.75   | 1.65   | 1.59   | 1.56   | 1.53   | 1.50   | 1.48   | 1.44   | 1.41   | 1.40   |
| 70              | 3.98               | 3.13   | 2.74   | 2.50   | 2.35   | 2.23   | 2.14   | 2.07   | 2.02   | 1.97   | 1.72   | 1.62   | 1.57   | 1.53   | 1.50   | 1.47   | 1.45   | 1.40   | 1.37   | 1.36   |
| 80              | 3.96               | 3.11   | 2.72   | 2.49   | 2.33   | 2.21   | 2.13   | 2.06   | 2.00   | 1.95   | 1.70   | 1.60   | 1.54   | 1.51   | 1.48   | 1.45   | 1.43   | 1.38   | 1.35   | 1.34   |
| 90              | 3.95               | 3.10   | 2.71   | 2.47   | 2.32   | 2.20   | 2.11   | 2.04   | 1.99   | 1.94   | 1.69   | 1.59   | 1.53   | 1.49   | 1.46   | 1.43   | 1.41   | 1.36   | 1.33   | 1.31   |
| 100             | 3.94               | 3.09   | 2.70   | 2.46   | 2.31   | 2.19   | 2.10   | 2.03   | 1.97   | 1.93   | 1.68   | 1.57   | 1.52   | 1.48   | 1.45   | 1.41   | 1.39   | 1.34   | 1.31   | 1.30   |
| 200             | 3.89               | 3.04   | 2.65   | 2.42   | 2.26   | 2.14   | 2.06   | 1.98   | 1.93   | 1.88   | 1.62   | 1.52   | 1.46   | 1.41   | 1.39   | 1.35   | 1.32   | 1.26   | 1.22   | 1.21   |
| 300             | 3.87               | 3.03   | 2.63   | 2.40   | 2.24   | 2.13   | 2.04   | 1.97   | 1.91   | 1.86   | 1.61   | 1.50   | 1.43   | 1.39   | 1.36   | 1.32   | 1.30   | 1.23   | 1.19   | 1.17   |
| 500             | 3.86               | 3.01   | 2.62   | 2.39   | 2.23   | 2.12   | 2.03   | 1.96   | 1.90   | 1.85   | 1.59   | 1.48   | 1.42   | 1.38   | 1.35   | 1.30   | 1.28   | 1.21   | 1.16   | 1.14   |
| 1 000           | 3.85               | 3.00   | 2.61   | 2.38   | 2.22   | 2.11   | 2.02   | 1.95   | 1.89   | 1.84   | 1.58   | 1.47   | 1.41   | 1.36   | 1.33   | 1.29   | 1.26   | 1.19   | 1.13   | 1.11   |
| 2 000           | 3.85               | 3.00   | 2.61   | 2.38   | 2.22   | 2.10   | 2.01   | 1.94   | 1.88   | 1.84   | 1.58   | 1.46   | 1.40   | 1.36   | 1.32   | 1.28   | 1.25   | 1.18   | 1.12   | 1.09   |

## Annexe V: Chromatogrammes

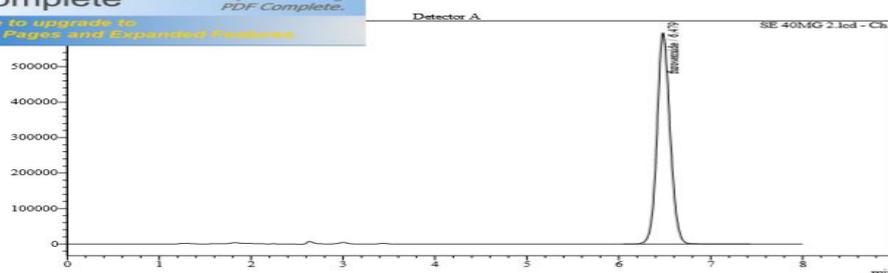
**PDF Complete**  
Your complimentary use period has ended.  
Thank you for using PDF Complete.  
[Click Here to upgrade to Unlimited Pages and Expanded Features.](#)

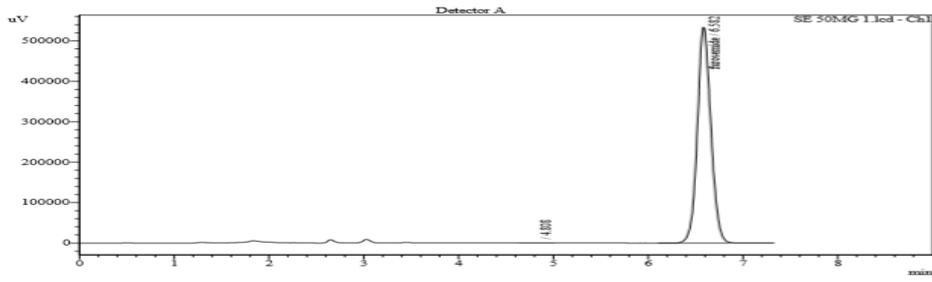


**PDF Complete**  
Your complimentary use period has ended.  
Thank you for using PDF Complete.  
[Click Here to upgrade to Unlimited Pages and Expanded Features.](#)

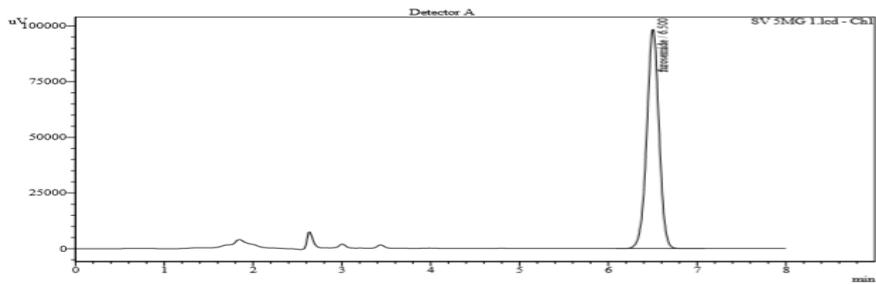
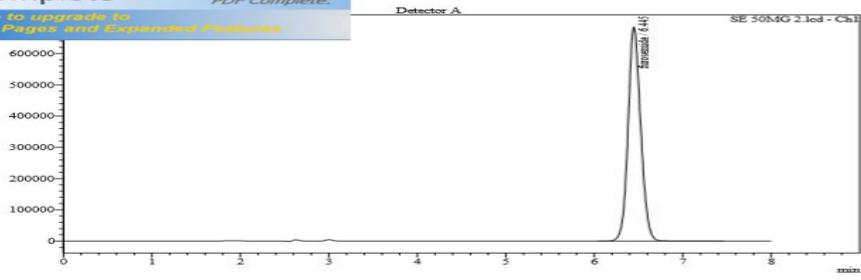


**PDF Complete**  
Your complimentary use period has ended.  
Thank you for using PDF Complete.  
[Click Here to upgrade to Unlimited Pages and Expanded Features.](#)

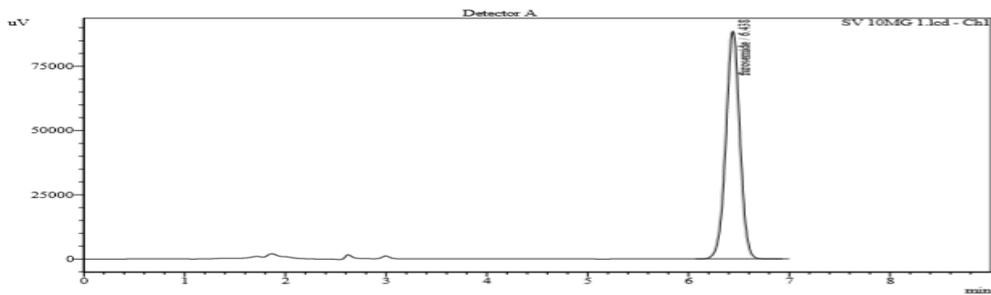
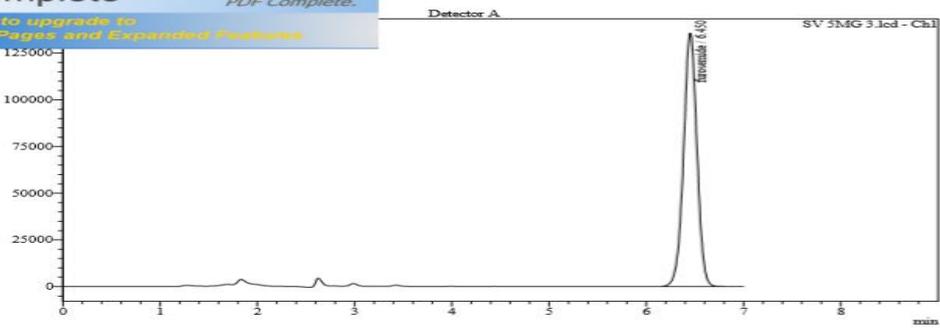




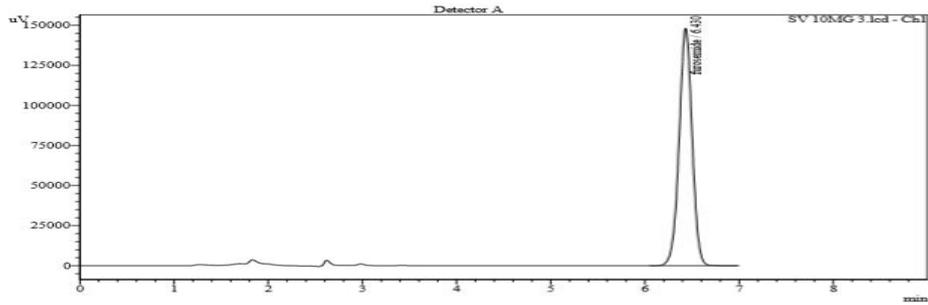
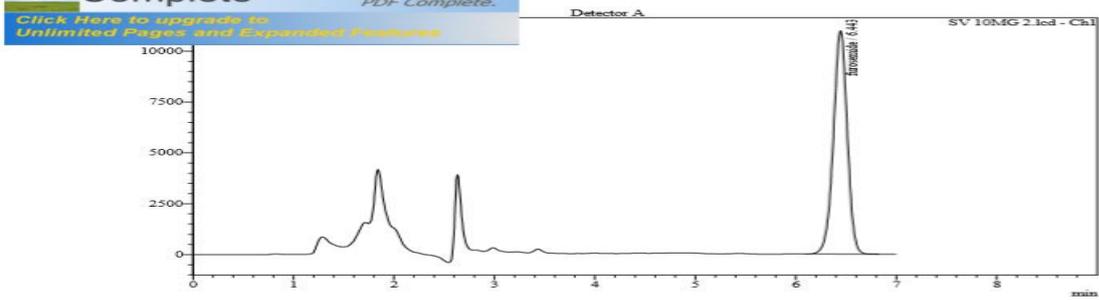
**PDF Complete**  
 Your complimentary use period has ended. Thank you for using PDF Complete.  
[Click Here to upgrade to Unlimited Pages and Expanded Features](#)



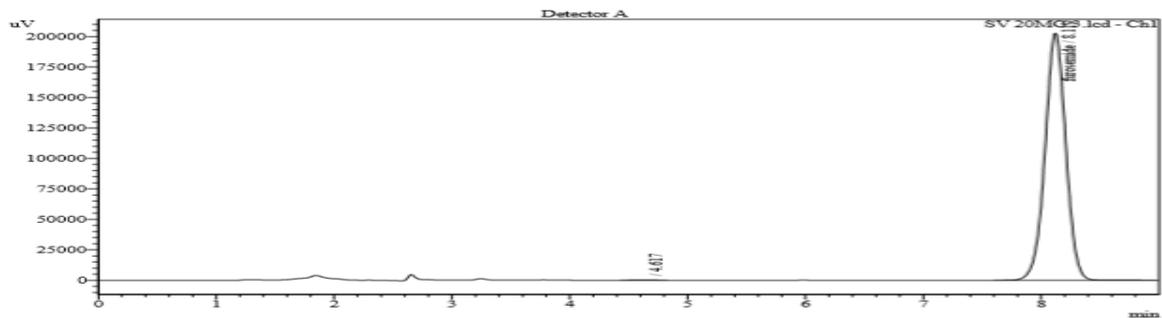
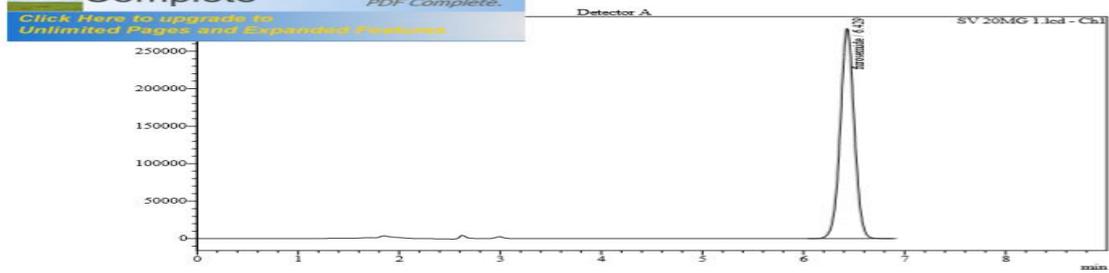
**PDF Complete**  
 Your complimentary use period has ended. Thank you for using PDF Complete.  
[Click Here to upgrade to Unlimited Pages and Expanded Features](#)



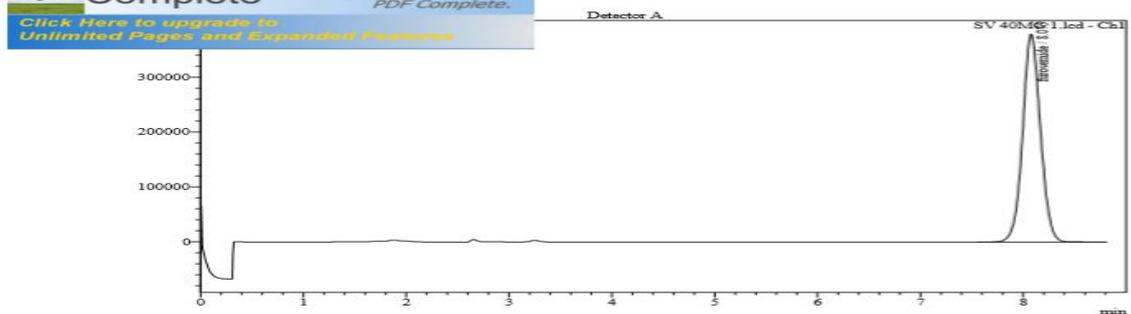
**PDF Complete**  
 Your complimentary use period has ended. Thank you for using PDF Complete.  
[Click Here to upgrade to Unlimited Pages and Expanded Features](#)

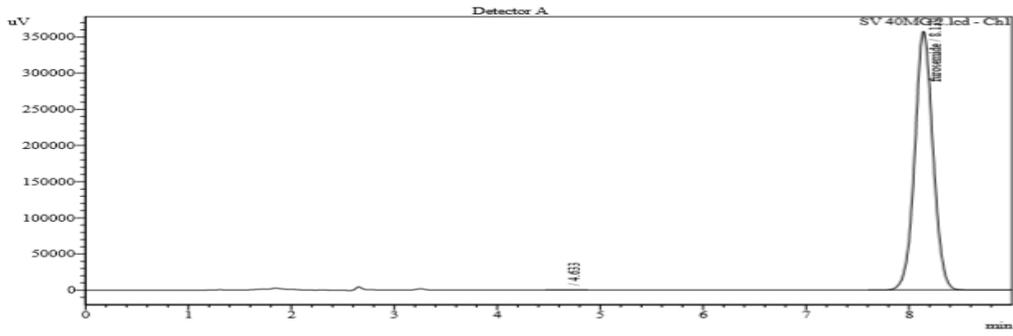


**PDF Complete**  
 Your complimentary use period has ended. Thank you for using PDF Complete.  
[Click Here to upgrade to Unlimited Pages and Expanded Features](#)

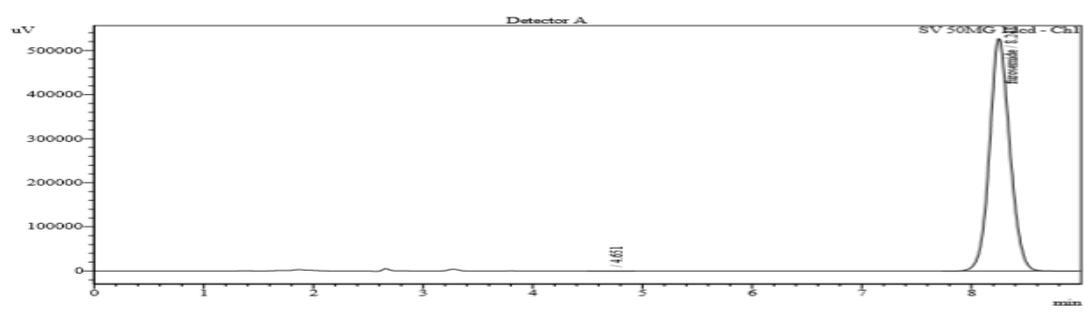
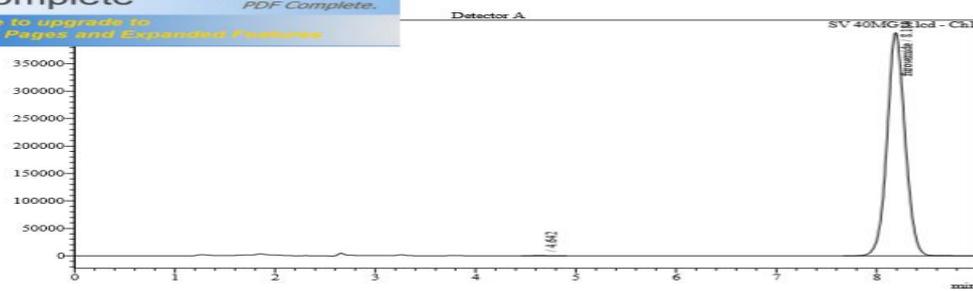


**PDF Complete**  
 Your complimentary use period has ended. Thank you for using PDF Complete.  
[Click Here to upgrade to Unlimited Pages and Expanded Features](#)

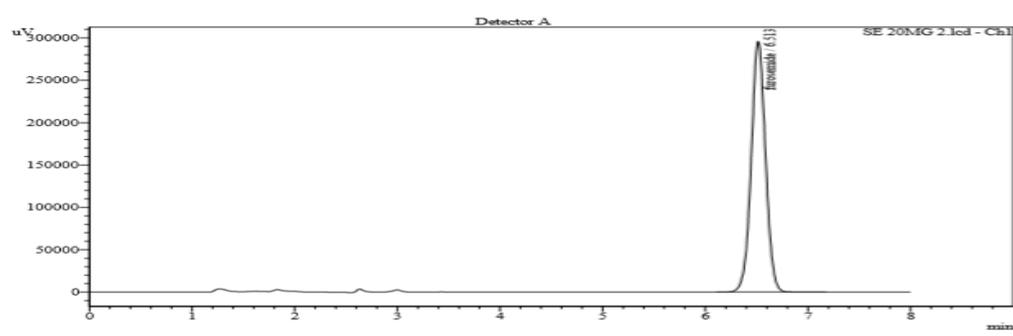
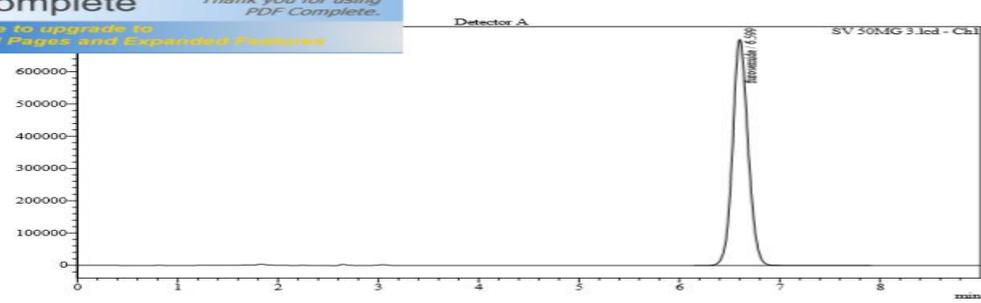




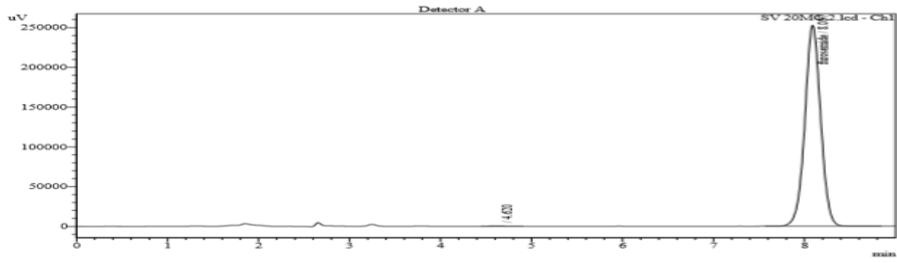
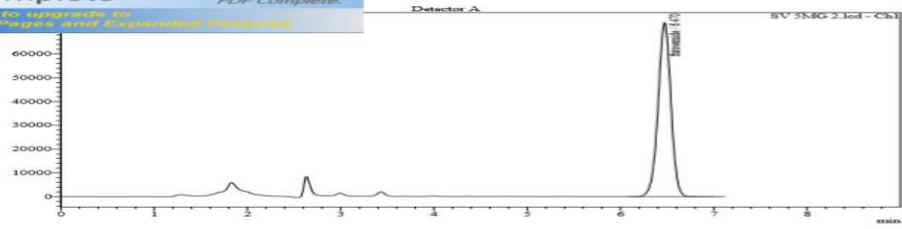
**PDF Complete**  
 Your complimentary use period has ended. Thank you for using PDF Complete.  
[Click Here to upgrade to Unlimited Pages and Expanded Features](#)



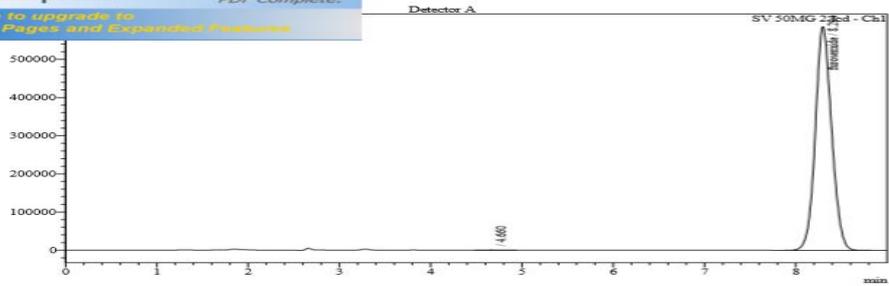
**PDF Complete**  
 Your complimentary use period has ended. Thank you for using PDF Complete.  
[Click Here to upgrade to Unlimited Pages and Expanded Features](#)



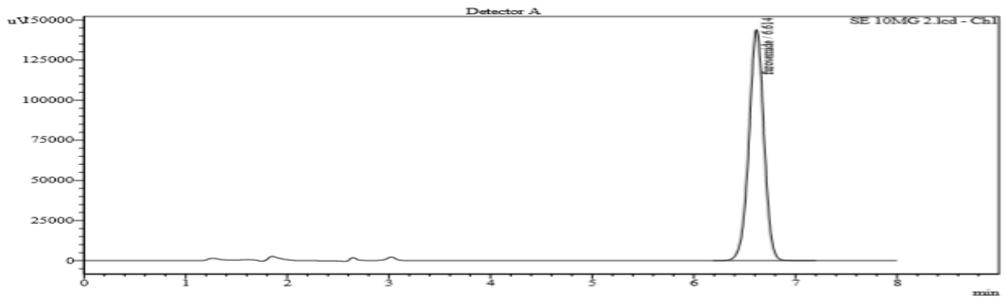
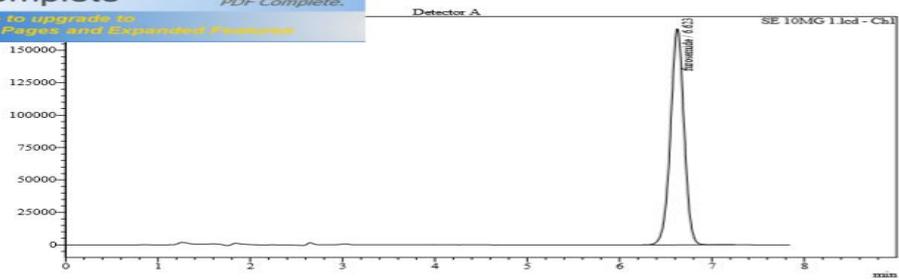
**PDF Complete**  
Your complimentary use period has ended. Thank you for using PDF Complete.  
[Click Here to upgrade to Unlimited Pages and Expanded Features](#)



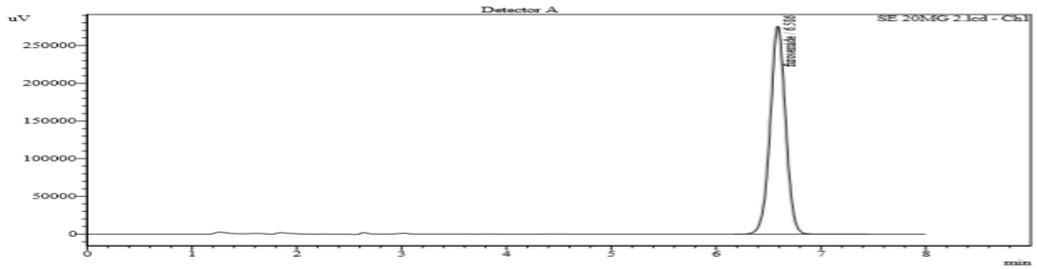
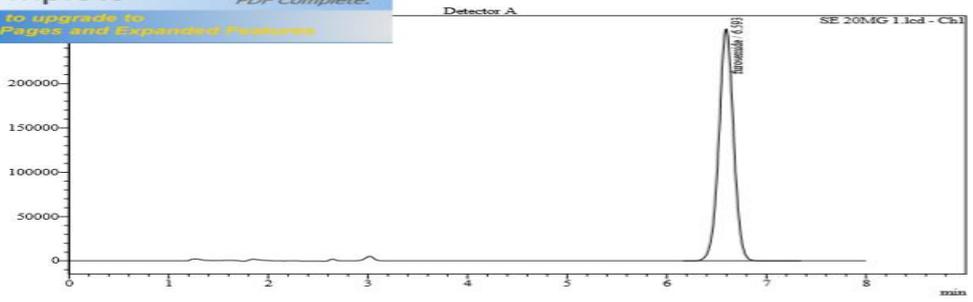
**PDF Complete**  
Your complimentary use period has ended. Thank you for using PDF Complete.  
[Click Here to upgrade to Unlimited Pages and Expanded Features](#)



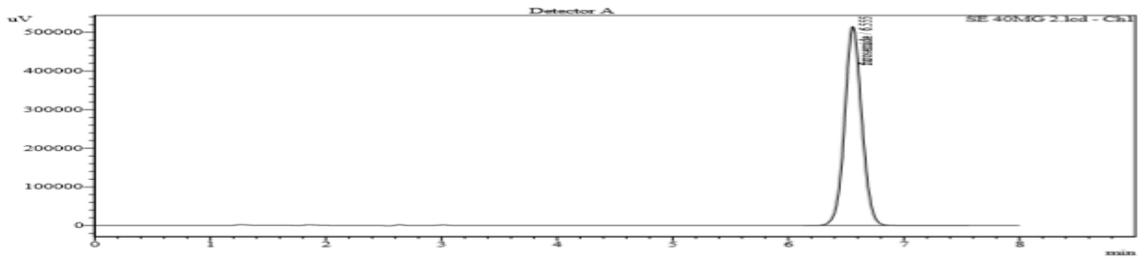
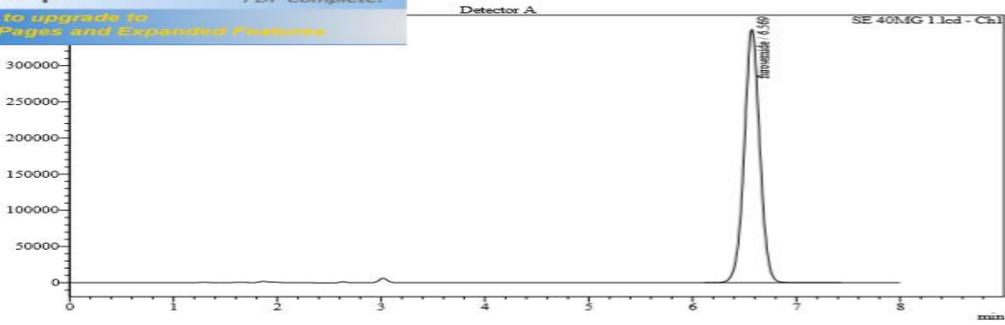
**PDF Complete**  
Your complimentary use period has ended. Thank you for using PDF Complete.  
[Click Here to upgrade to Unlimited Pages and Expanded Features](#)



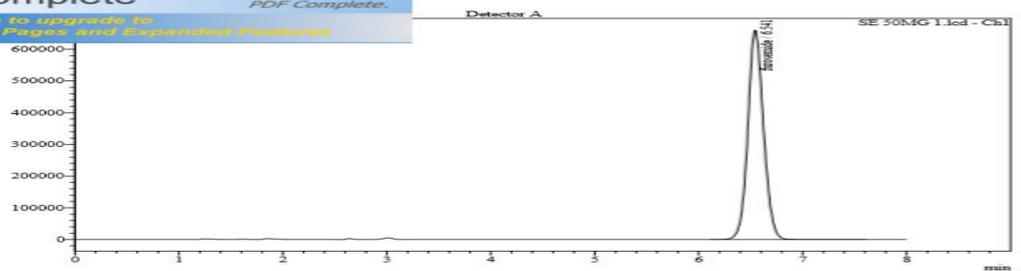
**PDF Complete**  
Your complimentary use period has ended. Thank you for using PDF Complete.  
[Click Here to upgrade to Unlimited Pages and Expanded Features](#)

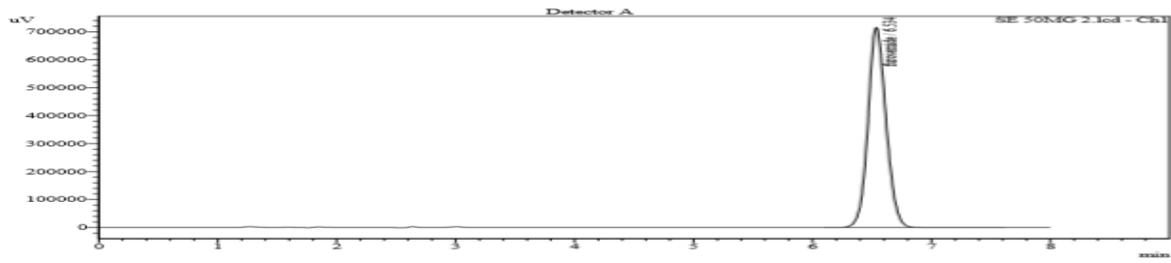


**PDF Complete**  
Your complimentary use period has ended. Thank you for using PDF Complete.  
[Click Here to upgrade to Unlimited Pages and Expanded Features](#)

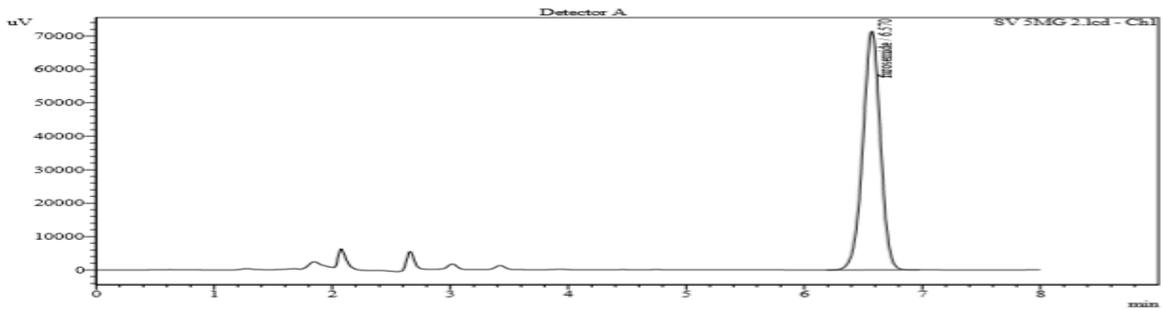
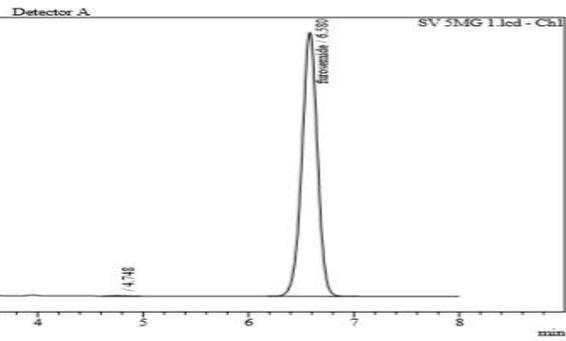


**PDF Complete**  
Your complimentary use period has ended. Thank you for using PDF Complete.  
[Click Here to upgrade to Unlimited Pages and Expanded Features](#)

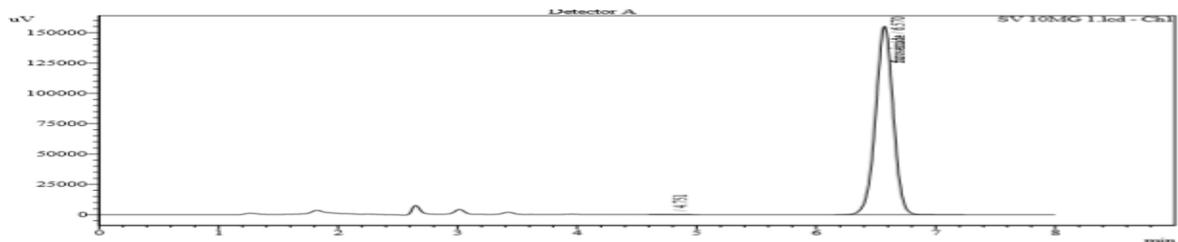
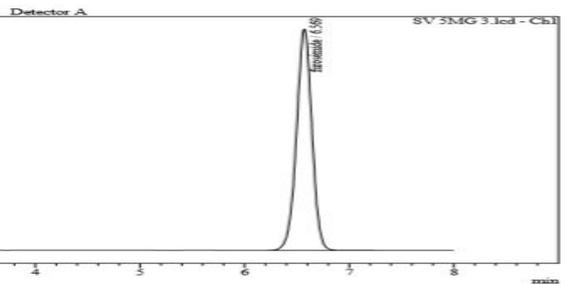




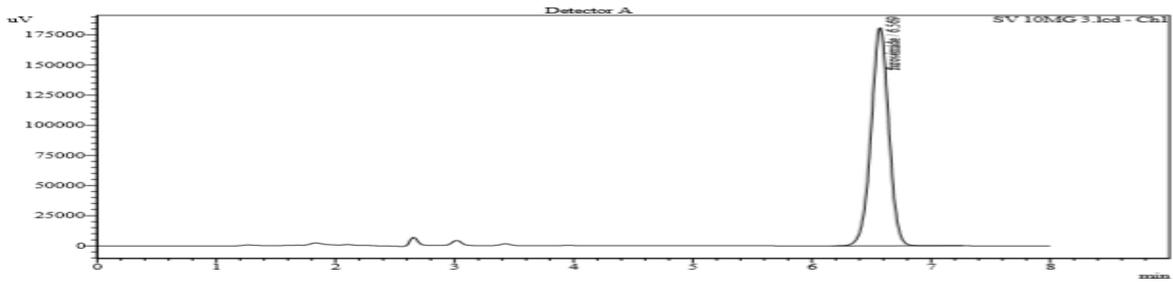
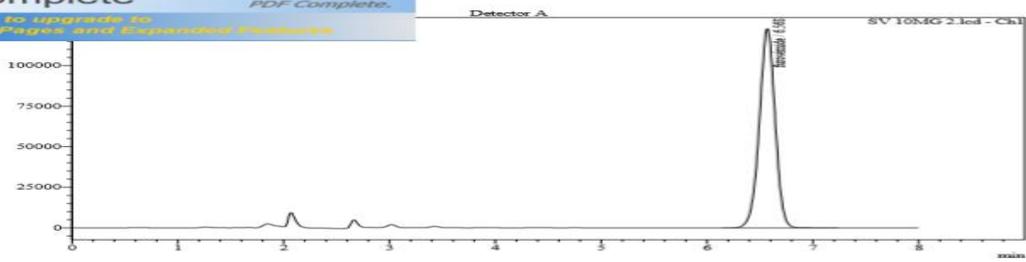
**PDF Complete**  
 Your complimentary use period has ended.  
 Thank you for using PDF Complete.  
 Click Here to upgrade to Unlimited Pages and Expanded Features



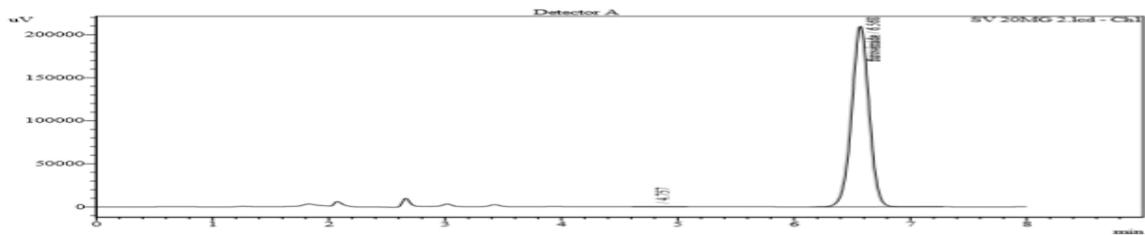
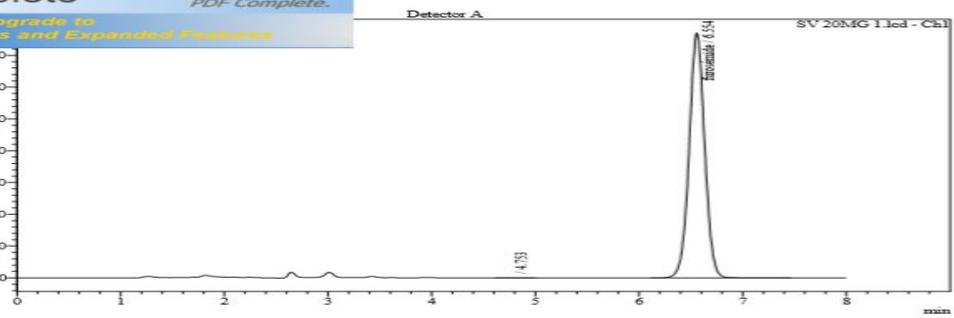
**PDF Complete**  
 Your complimentary use period has ended.  
 Thank you for using PDF Complete.  
 Click Here to upgrade to Unlimited Pages and Expanded Features



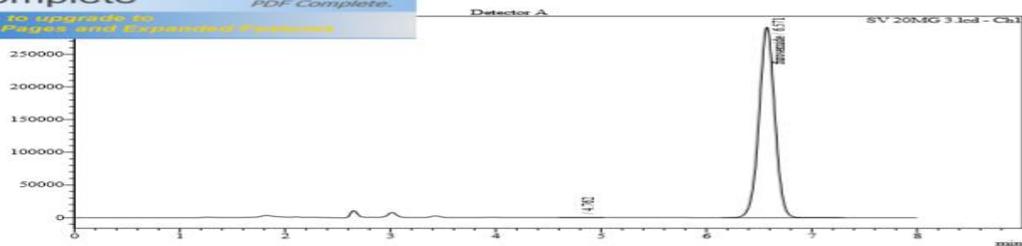
**PDF Complete**  
Your complimentary use period has ended. Thank you for using PDF Complete.  
[Click Here to upgrade to Unlimited Pages and Expanded Features](#)

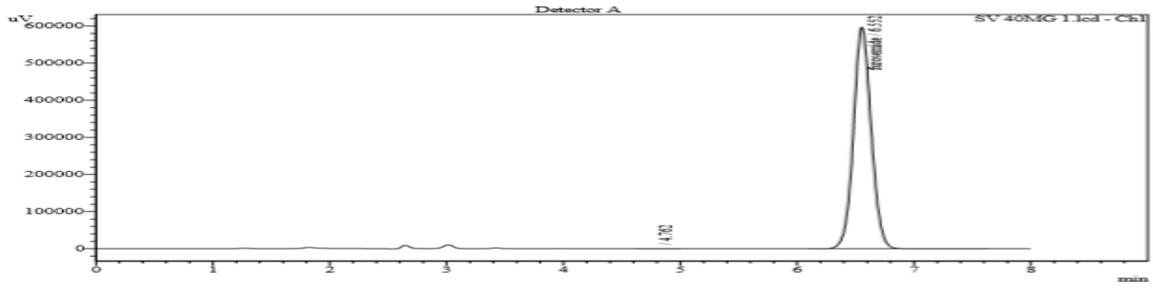


**PDF Complete**  
Your complimentary use period has ended. Thank you for using PDF Complete.  
[Click Here to upgrade to Unlimited Pages and Expanded Features](#)

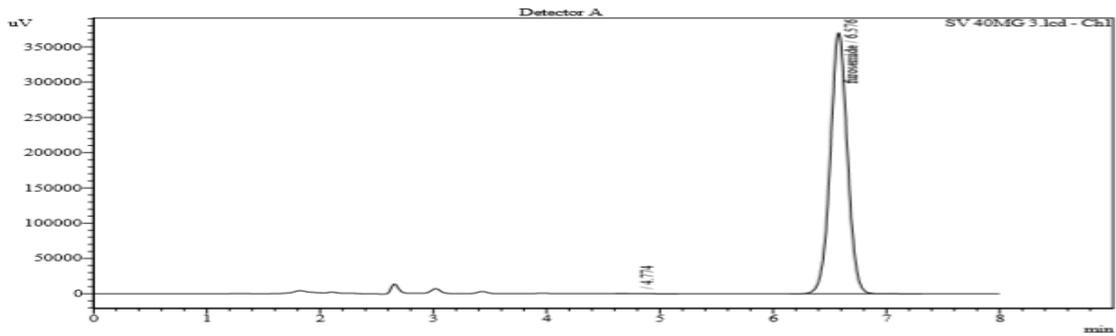
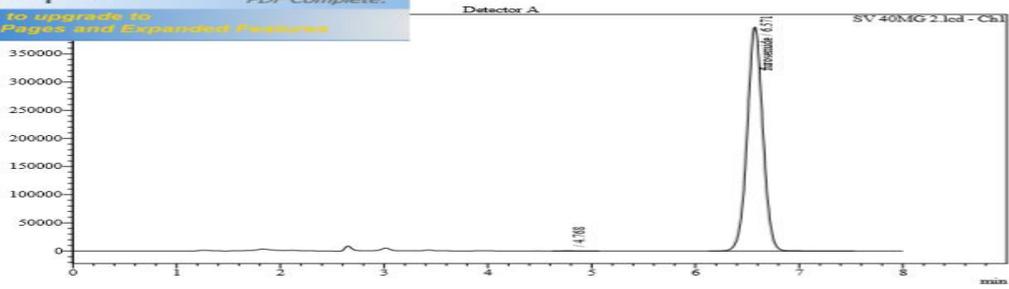


**PDF Complete**  
Your complimentary use period has ended. Thank you for using PDF Complete.  
[Click Here to upgrade to Unlimited Pages and Expanded Features](#)

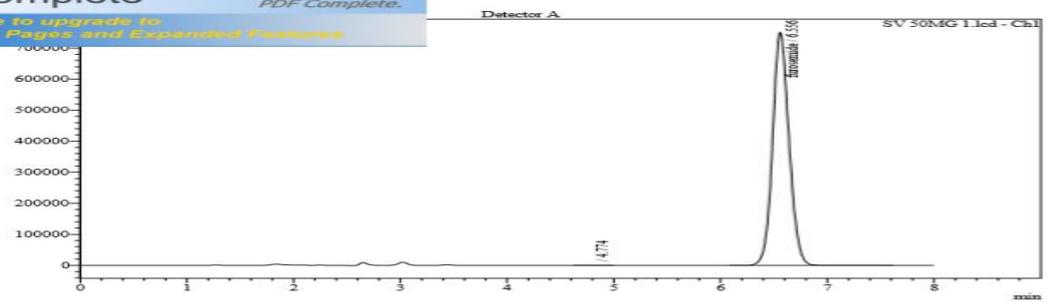


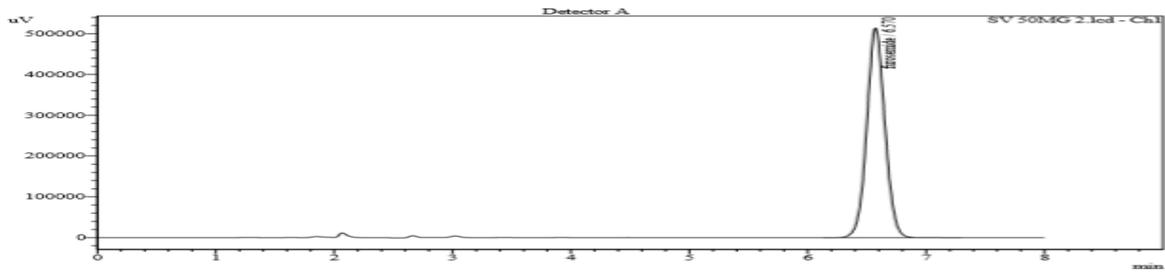


**PDF Complete**  
 Your complimentary use period has ended. Thank you for using PDF Complete.  
 Click Here to upgrade to Unlimited Pages and Expanded Features

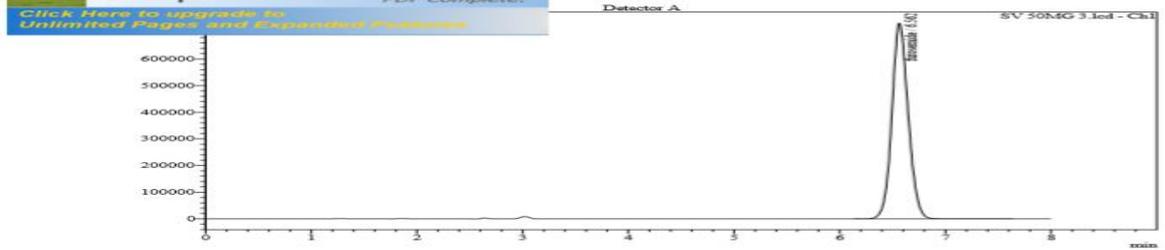


**PDF Complete**  
 Your complimentary use period has ended. Thank you for using PDF Complete.  
 Click Here to upgrade to Unlimited Pages and Expanded Features

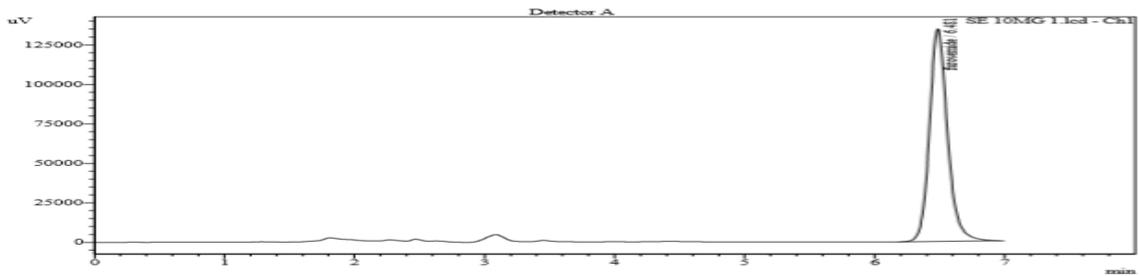
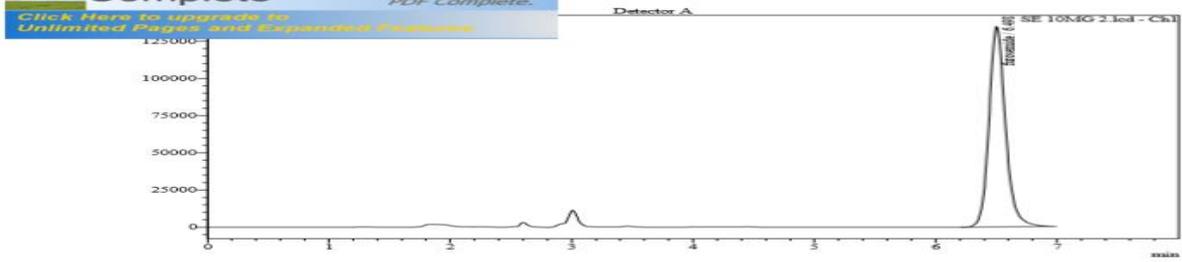




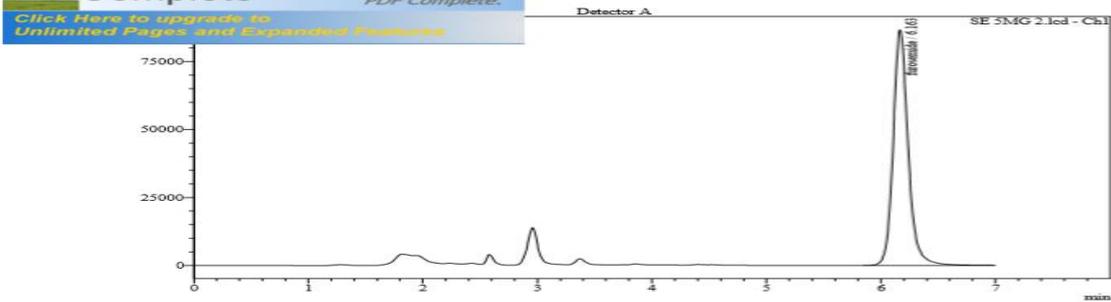
**PDF Complete**  
 Your complimentary use period has ended.  
 Thank you for using PDF Complete.  
[Click Here to upgrade to Unlimited Pages and Expanded Features](#)

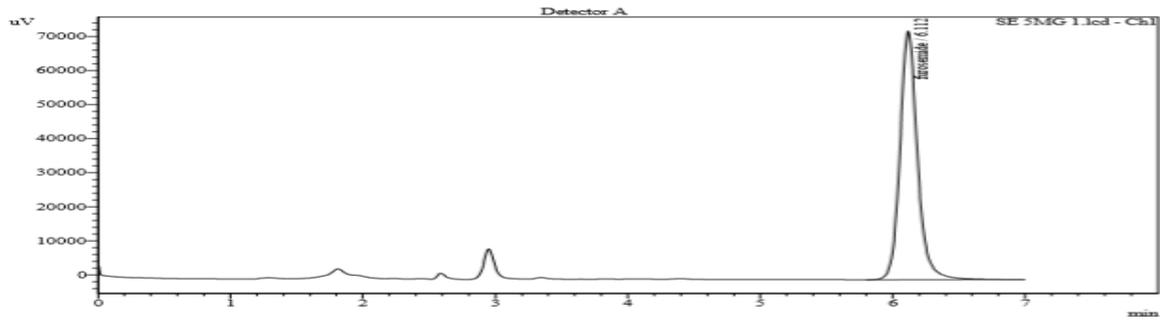


**PDF Complete**  
 Your complimentary use period has ended.  
 Thank you for using PDF Complete.  
[Click Here to upgrade to Unlimited Pages and Expanded Features](#)

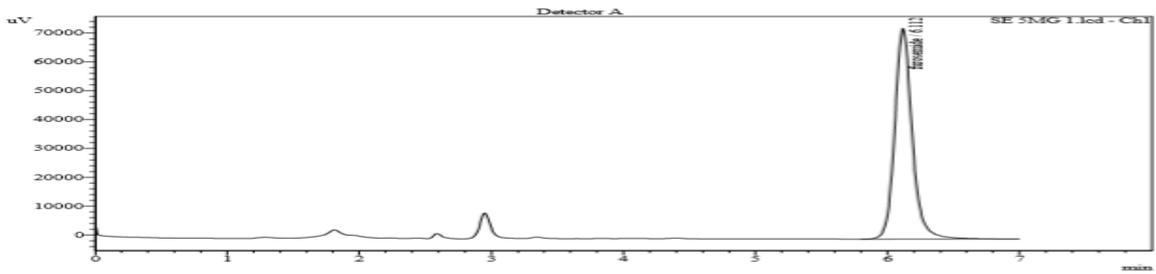
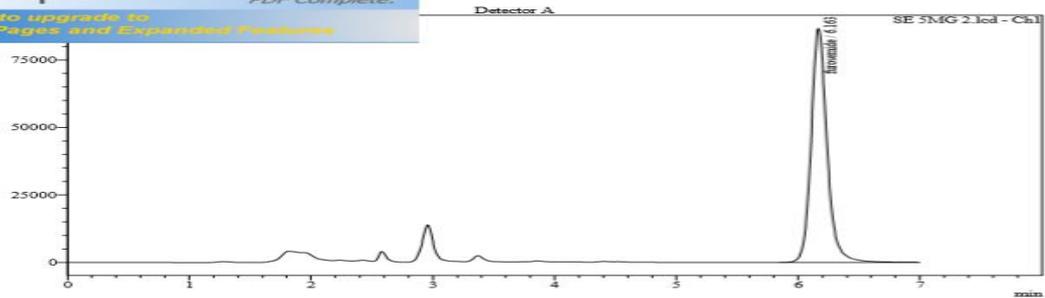


**PDF Complete**  
 Your complimentary use period has ended.  
 Thank you for using PDF Complete.  
[Click Here to upgrade to Unlimited Pages and Expanded Features](#)

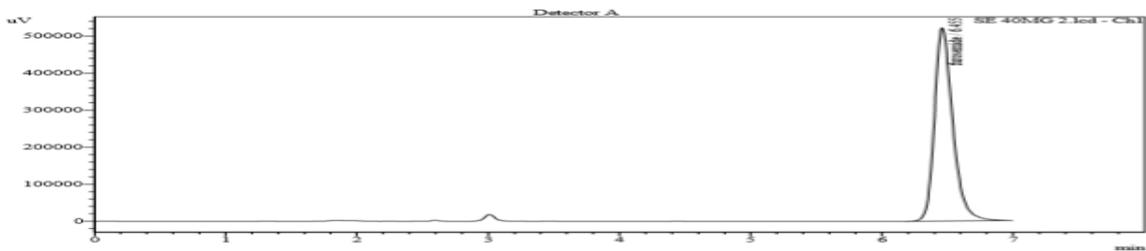
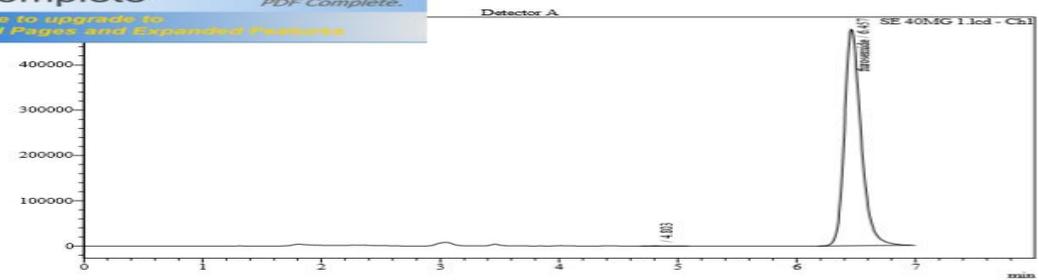




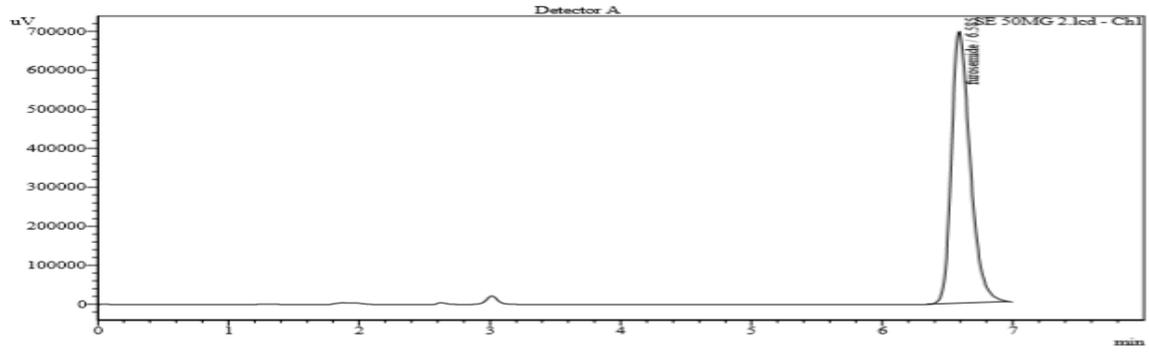
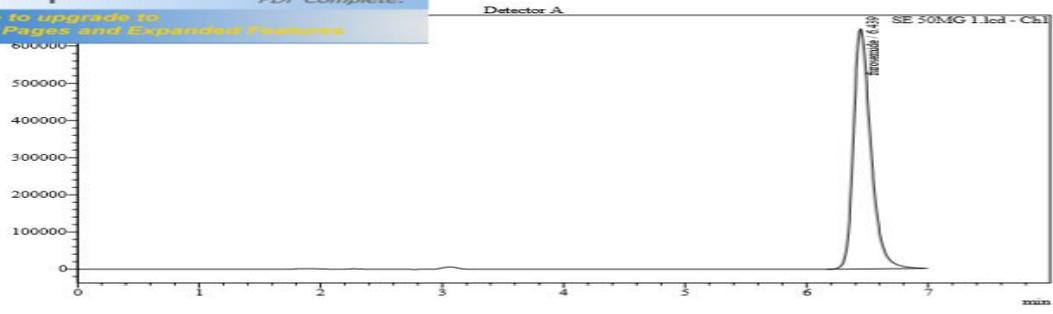
**PDF Complete**  
 Your complimentary use period has ended. Thank you for using PDF Complete.  
[Click Here to upgrade to Unlimited Pages and Expanded Features](#)



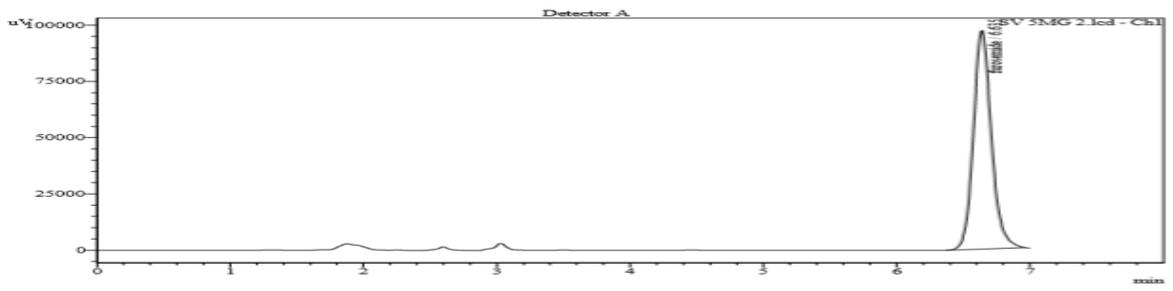
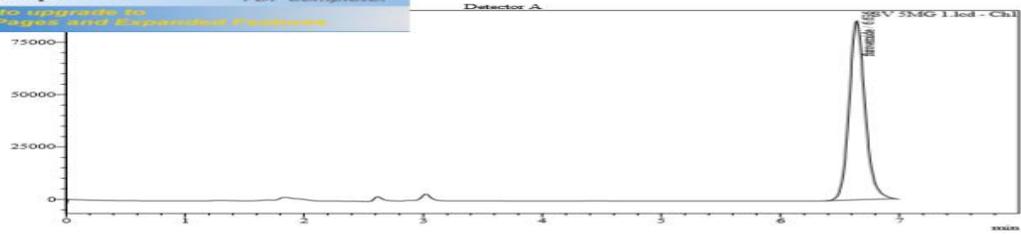
**PDF Complete**  
 Your complimentary use period has ended. Thank you for using PDF Complete.  
[Click Here to upgrade to Unlimited Pages and Expanded Features](#)



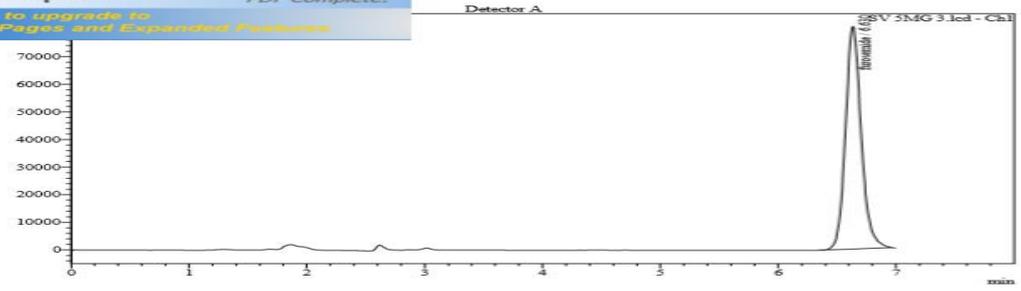
**PDF Complete**  
Your complimentary use period has ended. Thank you for using PDF Complete.  
[Click Here to upgrade to Unlimited Pages and Expanded Features](#)

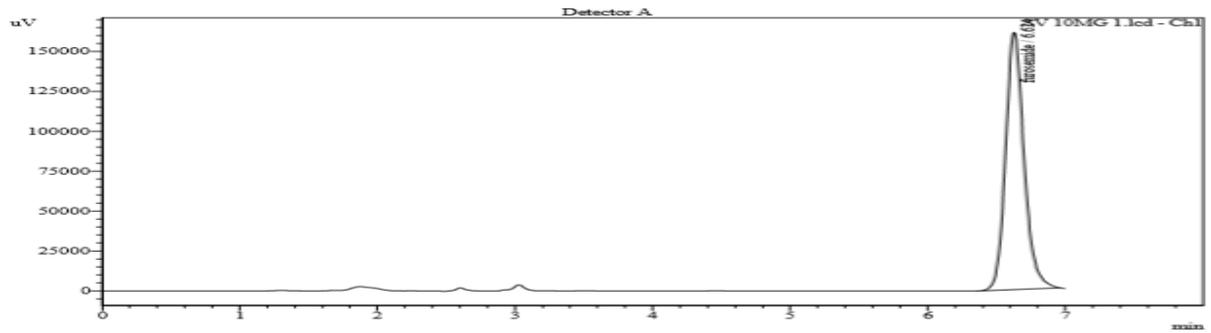


**PDF Complete**  
Your complimentary use period has ended. Thank you for using PDF Complete.  
[Click Here to upgrade to Unlimited Pages and Expanded Features](#)

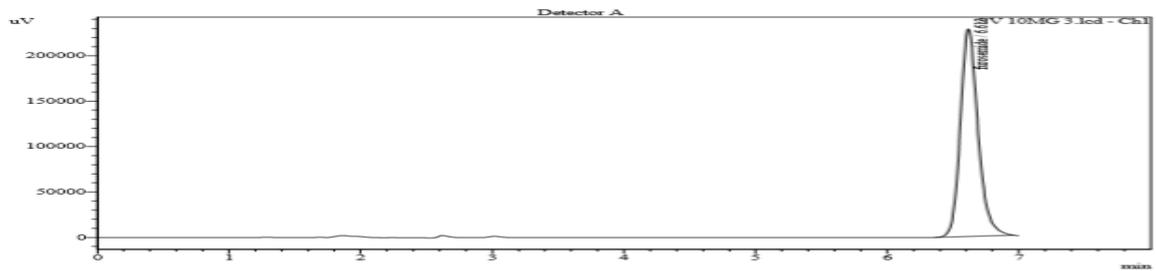
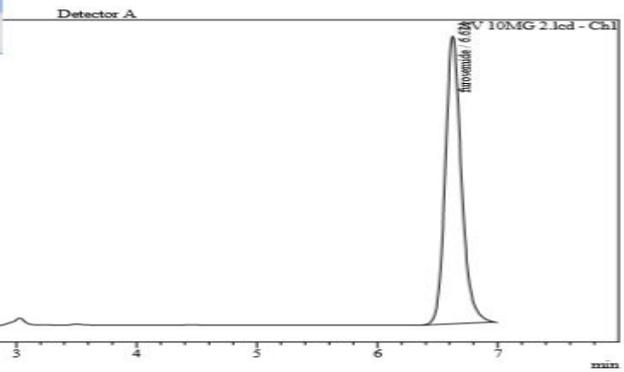


**PDF Complete**  
Your complimentary use period has ended. Thank you for using PDF Complete.  
[Click Here to upgrade to Unlimited Pages and Expanded Features](#)

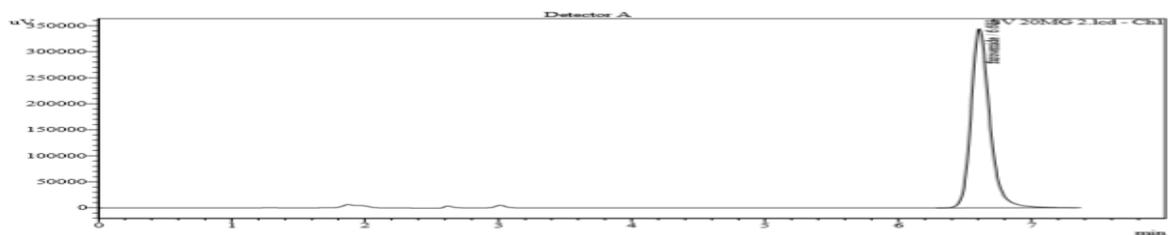
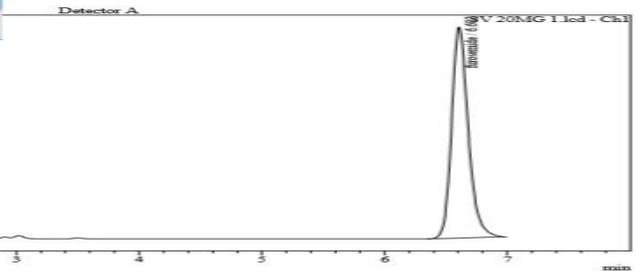




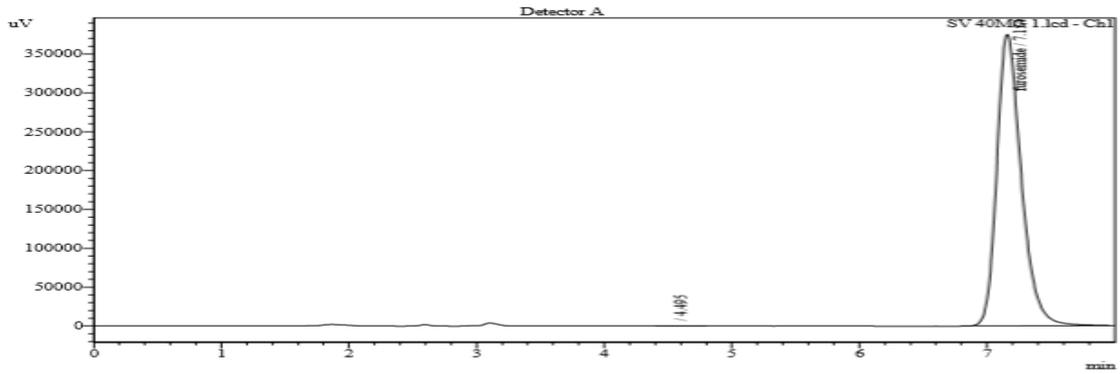
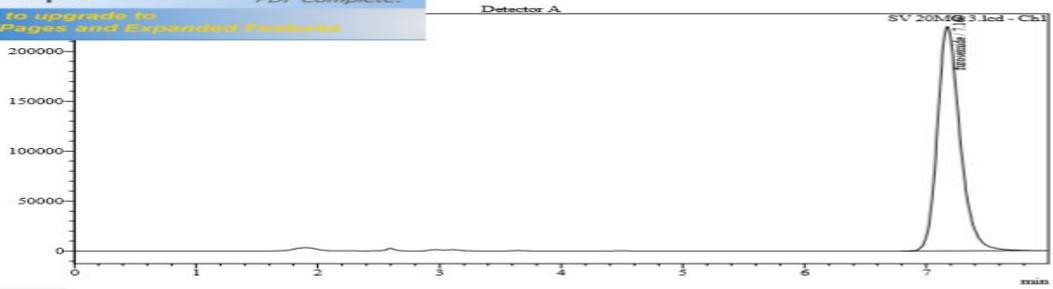
**PDF Complete**  
 Your complimentary use period has ended.  
 Thank you for using PDF Complete.  
[Click Here to upgrade to Unlimited Pages and Expanded Features](#)



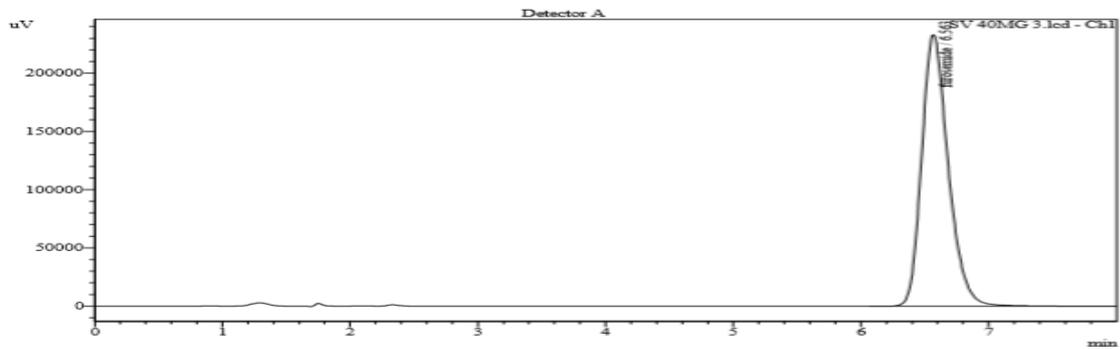
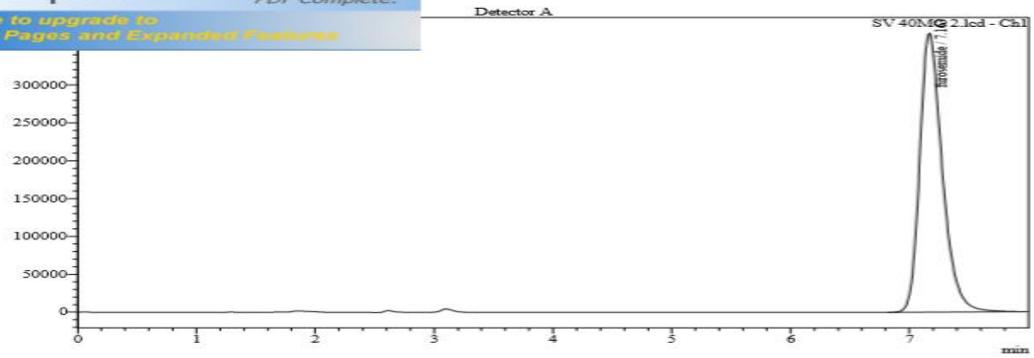
**PDF Complete**  
 Your complimentary use period has ended.  
 Thank you for using PDF Complete.  
[Click Here to upgrade to Unlimited Pages and Expanded Features](#)



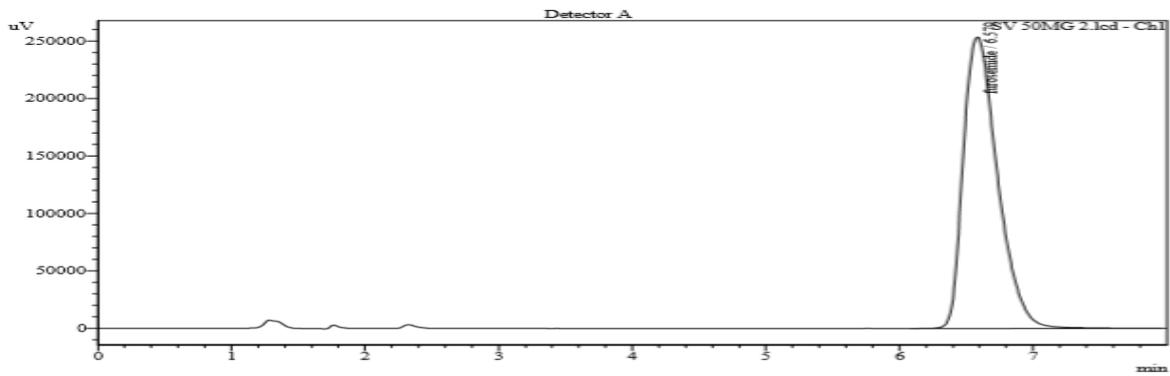
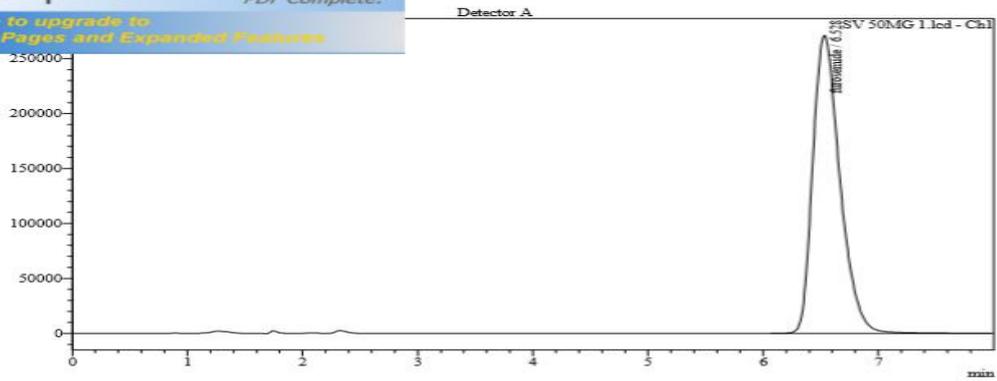
**PDF Complete**  
Your complimentary use period has ended. Thank you for using PDF Complete.  
[Click Here to upgrade to Unlimited Pages and Expanded Features](#)



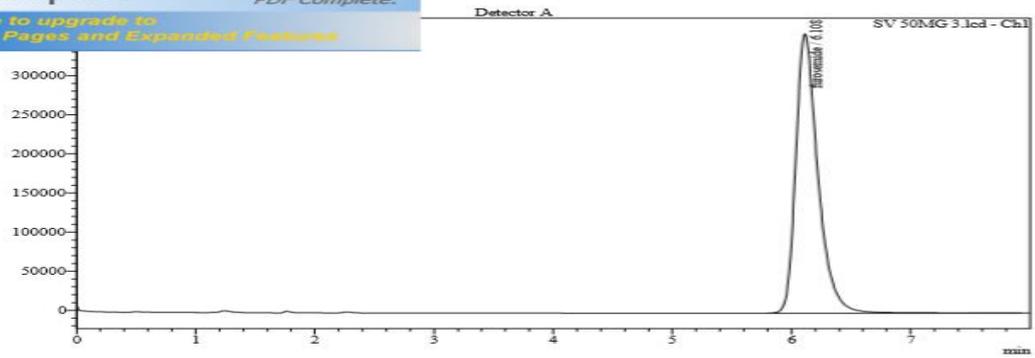
**PDF Complete**  
Your complimentary use period has ended. Thank you for using PDF Complete.  
[Click Here to upgrade to Unlimited Pages and Expanded Features](#)



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



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



## Résumé

La finalité de notre travail a été de valider la méthode de dosage du Furosémide, et ce par HPLC. Nous avons initié ce travail par une revue bibliographique concernant les caractéristiques du Furosémide, du comprimé et la validation d'une méthode d'analyse.

Une partie pratique étudie la validation en se basant sur l'outil statistique qui permet de déterminer un intervalle de tolérance qui a été transposée en un outil de décision final appelé profil d'exactitude.

Ce profil permet de garantir qu'une proportion définie des futurs résultats qui seront fournis par la méthode lors de son utilisation en routine sera bien incluse dans des limites d'acceptation fixées à priori en fonction des besoins des utilisateurs. De cette manière, l'objectif de la validation est parfaitement cohérent avec celui de toute méthode quantitative : obtenir des résultats exacts.

Les résultats expérimentaux montrent que notre méthode analytique satisfait les exigences et performances spécifiques décrites par SFSTP, ce qui atteste de sa validité et son aptitude à être appliquée en routine pour le dosage et le contrôle qualité du Furosémide dans l'intervalle : [7,73 mg /100ml à 50mg/100ml ] avec une probabilité de confiance de 90 % dans les limites d'acceptation définies de  $\pm 10\%$ .

**Mot clés : Furosémide, Validation analytique, HPLC, SFSTP, Intervalle de dosage.**

## Abstract

The purpose of our work was to validate the method of assaying Furosemide by HPLC.

We initiated this work by a literature review concerning the characteristics of Furosemide, the tablet and the validation of an analytical method.

A practical part studies the validation based on the statistical tool that allows to determine a tolerance interval that has been transposed into a final decision tool called accuracy profile.

This profile ensures that a defined proportion of the future results that will be provided by the method during routine use will be included within acceptance limits set according to the needs of the users. In this way, the objective of validation is perfectly consistent with that of any quantitative method: to obtain accurate results.

Experimental results show that our analytical method meets the specific requirements and performances described by SFSTP, which attests to its validity and suitability for routine application for the determination and quality control of Furosemide in the range: [7.73 mg /100ml to 50mg/100ml ] with a confidence probability of 90% within the defined acceptance limits of  $\pm 10\%$ .

**Key words : Furosemide, analytical validation, HPLC, SFSTP, Dosing range.**