REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE

MINISTERE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR ET DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE

UNIVERSITE YAHIA FARES DE MEDEA



Faculté de **T**echnologie

Mémoire de fin d'études de Master

Filière : Génie des Procédés
Spécialité : Génie des Procédés Pharmaceutiques

VALIDATION D'UNE METHODE DE DOSAGE PAR HPLC DE DICLOFENAC SODIQUE (PRINCIPE ACTIF) ET L'ALCOOL BENZYLIQUE (CONSERVATEUR) DANS LE PRODUIT FINI CLOFENAL® A 75MG/3ML D'UNE SOLUTION INJECTABLE

Présenté par :

M^lle^ **DJEKKOUNE Nour el houda**
M^lle^ **BENAIMECHE Bouthaina**

Proposé et Dirigé par

Pr. FERHAT Samira

Dr. KOUIDER AMAR Mohamed

Juin 2024

Dédicace

" وَعَلَّمَكَ مَا لَمْ تَكُنْ تَعْلَمُ وَكَانَ فَضْلُ اللَّهِ عَلَيْكَ عَظِيمًا "

Tout d'abord,

Je tiens à remercier Allah le tout puissant de m'avoir donné la santé, la volonté et le courage.

Avec humilité et profond sentiment, je dédie mon mémoire de fin d'études

Au premier enseignant qui a illuminé nos perspectives « notre prophète Muhamed ».

À ma bien-aimée "ma grand-mère", à qui j'ai promis avant son décès de réussir, et aujourd'hui j'ai tenu ma promesse envers elle, que Dieu ait son âme, chère à mon cœur.

"وَوَصَّيْنَا الْإِنسَانَ بِوَالِدَيْهِ"

À mon père, qui m'a soutenu sans limite et donné sans attendre en retour, celui qui détient la plus grande part de mon cœur. Cet homme extraordinaire qui a tiré le meilleur de moi et m'a toujours encouragé à atteindre, celui qui m'a enseigné la vie de la plus belle manière possible.

À ma mère, à la magnifique histoire de celle qui m'a toujours consolée dans mes moments de faiblesse. Elle m'a encouragé et m'a poussé à essayer, à combattre et à réussir

Après mon succès, dites que c'est grâce à la faveur de mes parents après la faveur d'Allah.

"سنشد عضدك بأخيك "

Aux cœurs pleins de sincérité et d'amour, À mes bras qui me soutiennent toujours "Mustapha et Abderrahmane "

À ma sœur, celle qui me ressemble le plus, celle qui a fait de moi une fille ambitieuse et aimant les défis, toujours m'encourageant à donner le meilleur de moi-même, même lorsque je suis faible, elle me rappelle rapidement mes points forts.

À ma meilleure amie, à la gentille compagnonne de vie, celle qui est toujours fidèle et pleine de rires, la plus belle "Houda".

À tous ceux qui étaient là dans les moments éprouvants, tels des boucliers protecteurs pendant les périodes de besoin, qui m'ont épaulé pour m'aider à atteindre ce que je suis aujourd'hui, que vous soyez présents ou absents, je vous souhaite une vie saine et paisible, emplie de bonheur.

Aux lieux et aux instants qui ont été témoins de mes luttes.

(وَآخِرُ دَعْوَاهُمْ أَنِ الْحَمْدُ لِلَّهِ رَبِّ الْعَالَمِينَ)

Bouthaina

Dédicace

(وَآخِرُ دَعْوَاهُمْ أَنِ الْحَمْدُ لِلَّهِ رَبِّ الْعَالَمِينَ)

À Allah avant tout,

Je tiens à remercier Allah le tout puissant de m'avoir donné la santé, la volonté et le courage.

Je dédie et avec amour et gratitude mon mémoire de fin d'études,

Au premier enseignant « notre prophète Muhamed », nous guidant sur le chemin de savoir.

À celui qui a embelli mon nom des plus beaux titres, au soutien sur lequel je me suis appuyé dans ma fatigue et ma tristesse, à l'épaule sur laquelle j'ai reposé mes fardeaux, à celui qui m'a soutenu sans limite et donné sans attendre en retour, à celui qui m'a appris que la vie est un combat et que son arme est le savoir et la connaissance. « Mon père », le meilleur soutien que j'ai eu dans les éprouves,

À mon cher et bien-aimé, que j'aime autant que ce monde, à celui que Dieu a fait de son cœur tendre une source de paix, qui m'a embrassé avant ses mains et a allégé mes épreuves par ses prières, à la bougie qui a brillé dans les nuits sombres, ma fierté et mon succès, à mon ange pur et ma force après Dieu. « Ma mère », qui possèdes un paradis sous tes pieds.

(سَنَشُدُّ عَضُدَكَ بِأَخِيكَ)

À mes bras droits, mes frères Ismaël, Akram, Amine et Sohaïb, que Dieu les conserve comme des piliers solides pour moi.

Aux cœurs pleins de sincérité de l'amour, vers les sentiments constantes, à ceux qui m'ont soutenu dans mes faiblesses, mes sœurs « Amina, Asmaa et Soumia ».

Aux anges que Dieu m'a donnés pour connaître le goût de la belle vie, «Marame, Dania, Miraal ».

À l'emblème de la fidélité, à mes sources de jois, à ceux qui m'ont comblé d'amour, mes amies les plus belles « Bouthaïna et Hadjar ».

À tous ceux qui m'ont donné un coup de main dans ce voyage, que ce soit de près ou de loin.

Et enfin,

J'ai obtenu mon succée et j'ai embrassé aujourd'hui une grande gloire,

Le rêve n'était pas proche et le chemin n'était pas facile, mais... je suis arrivé.

(وَكَانَ فَضْلُ اللَّهِ عَلَيْكَ عَظِيمًا)

Nour el houda

Remerciement

Lorsque le travail est remarquable, que l'engagement est exceptionnel
et que l'innovation est une norme,
l'expression de la gratitude devient un devoir et les éloges une nécessité.

"لَئِن شَكَرْتُمْ لَأَزِيدَنَّكُمْ"

Notre plus profonde satisfaction va à ***Allah*** *qui nous a aidés à achever ce travail.*

Après Dieu, nous sommes reconnaissantes envers ***nos parents*** *et* ***notre famille*** *pour leur soutien constant, et qui ont contribué à atteindre ce succès et cette excellence.*

« Celui qui n'exprime pas sa gratitude envers les gens n'exprime pas sa gratitude envers Dieu »

Nous exprimons notre profonde remerceiment à tous ceux qui nous ont aidés et soutenus, qu'ils soient proches ou éloignés. Nous remercions ***la professeure de recherche Farhat Samira*** *pour nous dériger dans notre étude. Un hommage éternel à le distingué* ***Docteur Kouidar Amar Mouhamed*** *« Analyste sénior à SAIDAL » pour sa surveillance regulière. Nous remercions vivement* ***les membres du jury****, qui ont eu l'amabilité de porter une appreciation sur ce travail et participer au jury de soutenance. Sans oublier les conseils judicieux du* ***monsieur Zouambia Fouad*** *et les orientations de* ***monsieur kerrache omar****,* ***monsieur Fehis Mohamed*** *et* ***monsieur Ben Issa Mustapha*** *.*

Nous adressons nos sincères appréciations à tous ceux qui ont contribué à nous aider à collecter les données nécessaires pour notre mémoire de fin d'études. Nous saluons ***tous les enseignants*** *des différentes étapes par lesquelles nous sommes passés.*

Tous ceux qui nous ont contribué à l'expansion de nos connaissances et à l'amélioration de notre niveau.

Merci également à tous ***mes amies****,* ***mes collègues****,*
et tout ce qui m'ont aidé de près ou de loin
à realiser cette mémoire.

Que Dieu préserve votre santé
et que le bonheur remplisse vos cœurs.
Votre récompense est auprès de Dieu,
bien au-delà de la simple gratitude.



LISTE DES FIGURES

Figure I. 1. Les voies et les formes pharmaceutiques d'administration des médicaments. 6
Figure I. 2. (a) CLOFENAL® solution injectable 75mg/3ml ; (b) Formule chimique du Diclofénac de sodium; (c) Les danger de la molécules pure du Diclofénac de sodium 12

Figure II. 1. Cycle de vie d'une méthode d'analyse. 26
Figure II. 2. Schéma représentative des 10 étapes de la validation d'une méthode analytique. 32
Figure II. 3. L'organigramme permettant de sélectionner un protocole de validation. 39

Figure III. 1. Les méthodes de peser de Diclofénac sodique standard de référence, solution standard, et solution échantillon de CLOFENAL®. 57
Figure III. 2. Les étapes de préparation de la phase mobile, commençant par la préparation des solutions A et B, leur mélange et dénazification, et l'utilisation en tant que phase mobile pour l'analyse par HPLC. 60

Figure IV. 1. Les spectres UV-Visible de (a) la solution standard diclofenac sodique, (b) la solution standard forme reconstituée, et (c) de la solution placebo. 66
Figure IV. 2. Les chromatogrammes HPLC de (a) la solution standard diclofenac sodique, (b) la solution standard alcool benzylique, (c) de la solution standard de validation, (d) de la phase mobile, (e) de la solution du diluant, (f) de la solution placebo diclofenac sodique, et (g) de la solution placebo alcool benzylique. 69
Figure IV. 3. représentation graphique des fonctions de réponses du diclofénac sodique (a) : $Y = a + bx$, (b) : $Y = bx$, et (c) : $Y = 100\%$, lors des essais d'étalonnage et de Validation, les aires en fonction de la concentration. Les représentations graphiques des fonctions de réponses pour l'alcool benzylique sont représentées, respectivement (d-f), dans le même ordre. 76
Figure IV. 4. (a) profil d'exactitude de biais de diclofénac sodique pour $\lambda = \pm 5\%$ et $\beta = 90\%$, (b) profil d'exactitude des concentrations du diclofénac sodique pour $\lambda = \pm 5\%$ et $\beta = 90\%$, (c) profil d'exactitude de biais de l'alcool benzylique pour $\lambda = \pm 5\%$ et $\beta = 90\%$, (d) profil d'exactitude des concentrations de l'alcool benzylique pour $\lambda = \pm 5\%$ et $\beta = 90\%$. 88
Figure IV. 5. Représentation graphique de la linéarité du (a) diclofénac sodique et (b) de l'alcool benzylique lors des essais d'étalonnage et validation, les concentrations introduites en fonction de concentrations calculées. 90
Figure IV. 6. Limites de quantification de (a) diclofénac sodique et (b) l'alcool benzylique. 93

LISTE DES TABLEAUX

Tableau I. 1. Les différentes familles des AINS 10
Tableau I. 2. Formes pharmaceutiques d'administration de diclofénac sodique..... 11
Tableau I. 3. La composition et caractéristiques de la formulation de CLOFENAL® 13
Tableau I. 4. Propriétés physicochimiques du diclofénac sodique 14

Tableau II. 1. Vocabulaires et définitions..... 20
Tableau II. 2. Critères de la validation en fonction du type d'analyse 28
Tableau II. 3. Caractéristiques de performance à déterminer pour les méthodes qualitatives et les méthodes quantitatives..... 33
Tableau II. 4. Organisation des mesures du plan de validation 35
Tableau II. 5. Choix du nombre des standards d'étalonnage et de validation en fonction du protocole choisi 40
Tableau II. 6. Exemple de fonction de réponse 41
Tableau II. 7. Les règles d'alignement pour différentes fonctions de réponse..... 42
Tableau II. 8. Calcul des prédictions inverses pour différentes fonctions de réponse..... 43
Tableau II. 9. Calcul des prédictions inverses pour la droite ayant subi une transformation logarithmique ou racine carrée..... 44

Tableau III. 1. Matériels et produits utilisés pour la validation du CLOFENAL®..... 52
Tableau III. 2. Les réactifs utilisés dans le présent travail. 53
Tableau III. 3. Les matières premières utilisées dans le présent travail. 54
Tableau III. 4. Les étalons de références utilisées dans le présent travail. 54
Tableau III. 5. Les appareillages utilisés dans le présent travail. 55
Tableau III. 6. CLOFENAL®, solution injectable à 75 mg/3ml. 56
Tableau III. 7. Formule unitaire du CLOFENAL® solution injectable à 75 mg/3ml. 58

Tableau IV. 1. Les données de résultats des solutions. 67
Tableau IV. 2. Récapitulation des résultats chromatographiques. 70
Tableau IV. 3. Données brutes des standards d'étalonnage de diclofénac sodique. 72
Tableau IV. 4. Données brutes des standards d'étalonnage d'alcool benzylique. 72
Tableau IV. 5. Données brutes des standards de validation de diclofénac sodique..... 73
Tableau IV. 6. Données brutes des standards de validation d'alcool benzylique. 74
Tableau IV. 7. Données des fonctions de réponses du diclofénac sodique. 75
Tableau IV. 8. Paramètres d'étalonnage obtenus pour le diclofénac sodique pour $Y = a + bx$ 77
Tableau IV. 9. Paramètres d'étalonnage obtenus pour le diclofénac sodique pour $Y = bx$... 77
Tableau IV. 10. Paramètres d'étalonnage obtenus pour le diclofénac sodique pour $Y = 100\%$ 77
Tableau IV. 11. Les fonctions de réponses pour l'alcool benzylique. 78

Tableau IV. 12. Paramètres d'étalonnage obtenus pour l'alcool benzylique pour $Y = a + bx$. 78
Tableau IV. 13. Paramètres d'étalonnage obtenus pour l'alcool benzylique $Y = bx$. 78
Tableau IV. 14. Paramètres d'étalonnage obtenus pour l'alcool benzylique pour $Y = 100\%$. 79
Tableau IV. 15. Les résultats de concentrations calculées pour diclofénac sodique. 79
Tableau IV. 16. Les résultats de concentrations calculées pour alcool benzylique. 80
Tableau IV. 17. Justesse calculée pour chaque niveau de concentration pour le diclofénac sodique. 81
Tableau IV. 18. Justesse calculée pour chaque niveau de concentration pour l'alcool benzylique. 82
Tableau IV. 19. Fidélité calculée pour chaque niveau de concentration pour le diclofénac sodique. 82
Tableau IV. 20. Fidélité calculée pour chaque niveau de concentration pour l'alcool benzylique. 83
Tableau IV. 21. Profil d'exactitude obtenu pour le diclofénac sodique. 84
Tableau IV. 22. Profil d'exactitude obtenu pour l'alcool benzylique. 84
Tableau IV. 23. Limites de tolérance de Biais du diclofénac sodique. 85
Tableau IV. 24. Limites de tolérance de Biais de l'alcool benzylique. 85
Tableau IV. 25. Limites de tolérance de concentration du diclofénac sodique. 86
Tableau IV. 26. Limites de tolérance de concentration d'alcool benzylique. 86
Tableau IV. 27. Concentrations prédites en fonction des concentrations introduites pour les trois séries. 89
Tableau IV. 28. Concentrations prédites en fonction des concentrations introduites pour les trois séries. 91
Tableau IV. 29. Calcul des limites de quantification de diclofénac sodique. 92
Tableau IV. 30. Calcul des limites de quantification d'alcool benzylique. 94

LISTE D'ABREVIATIONS

µg : Microgramme

AINS : Les anti-inflammatoires non stéroïdiens

AIS : Les anti-inflammatoires stéroïdiens

BP : British Pharmacopoeia

CEI : Commission Electronique Internationale

CMH II : Complexe Majeur d'Histocompatibilité de classe II

Cox : Cyclo-oxygénase

CV : Coefficient de variation

DCI : Dénomination commune internationale

Ddl : Degré de Liberté

FDA: Food and Drug Administration

g: Gramme

HPLC: High Performance Liquid Chromatography

IC: L'intervalle de confiance

ICH: International Conference of Harmonization

IM: Intramusculaire

ISO: International Organization for Standardization

IT: L'intervalle de tolérance

IUPAC: International Union of Pure and Applied Chemestry

IV: Intraveineuse

Kg : Kilogramme

L : Litre

L'AUC: Area Under the Curve

LC: Liquid Chromatography

LD : Limite de détection

LQ : Limite de quantification

M : Masse Molaire

mg : Milligramme

ml : Millilitre

MRC : Matériau de référence certifié

NLT : Not Less Than

OMS : Organisation mondiale de la santé

PA : Principe Actif

PE : Plan d'Étalonnage

PV : Plan de Validation

QSP : quantité suffisante pour préparer un médicament

R2 : Coefficient de détermination

RS : Reference Standard

RSD : Relative Standard Deviation

SC : Sous cutanée

SE : Standards d'étalonnage

SFSTP : Société Française des Sciences et Techniques Pharmaceutiques

STP : Sciences et Techniques Pharmaceutiques

STQ : Standard Titrant Quantity

SV : Standards de validation

USP : United States Pharmacopeia

UV-visible : Ultraviolet-Visible

V2 : Volume 2

TABLE DES MATIERES

Dédicace i
Dédicace ii
Remerciement iii
LISTE DES FIGURES iv
LISTE DES TABLEAUX v
LISTE D'ABREVIATIONS vii
TABLE DES MATIERES ix
Résumé vii
Abstract vii
ملخص vii
INTRODUCTION GENERALE 1

CHAPITRE I: **GENERALITES SUR LES MEDICAMENTS**
I.1 INTRODUCTION 4
I.2 MEDICAMENT 4
I.2.1 Comparaison entre un princeps et un générique 5
I.2.2 Formes des médicaments 6
I.3 PREPARATIONS INJECTABLES 7
I.3.1 Propriétés des préparations injectables 7
I.3.2 Avantages et Inconvénients de la voie injectable 7
I.4 INFLAMMATION 8
I.5 ANTIS – INFLAMMATOIRES 8
I.5.1 Anti-inflammatoires stéroïdiens : 8
I.5.2 Anti-inflammatoires non stéroïdiens 9
- Effet analgésique 9
- Effet antipyrétique 9
- Effet anti-inflammatoire 10

I.6 DICLOFENAC SODIQUE 10
I.6.1 Différents formes de diclofénac sodium 11
I.7 CLOFENAL (DICLOFENAC) 75MG/3ML ; SOLUTION INJECTABLE 12
I.7.1 Composition de la formulation de CLOFENAL® 12
I.7.2 Caractéristiques physicochimiques 14
I.7.3 Propriétés pharmacologique du diclofénac sodique 14
a) Propriétés pharmacocinétiques 15
b) Propriétés pharmacodynamiques 16
I.7.4 Indications thérapeutiques 17
I.7.5 Contre-indications 17
I.7.6 Effets indésirables 17
I.8 CONCLUSION 18

CHAPITRE II: **VALIDATION DES METHODES D'ANALYSES**
II.1 INTRODUCTION 19

II.2 DEFINITION ET OBJECTIFS DE LA VALIDATION 19
II.3 PROCEDURES ANALYTIQUES A VALIDER 22
II.4 ASPECT REGLEMENTAIRE ET NORMATIF 23
II.4.1 Documents ISO 17025 23
II.4.2 Documents ICH 23
II.4.3 Documents de la FDA (guidance for industry) 24
II.4.4 Documents des commissions SFSTP 24
II.5 SELECTIONNER LES ECHANTILLONS DE VALIDATION 24
II.5.1 Choisir la ou les matrices 24
II.5.2 Etablir les valeurs de référence des échantillons de validation 24
II.6 CYCLE DE VIE D'UNE METHODE D'ANALYSE 25
II.6.1 Sélection de la méthode 26
II.6.2 Mise au point et pré-validation de la méthode 26
II.6.3 Validation de la méthode 27
II.6.4 Estimation de l'incertitude et vérification de l'aptitude 27
II.6.5 Utilisation en routine 27
II.6.6 Revalidation 28
II.7 CRITERES DE VALIDATION 28
II.7.1 Spécificité-sélectivité 29
II.7.2 Linéarité 29
II.7.3 Fidélité (répétabilité et fidélité intermédiaire) 29
- Répétabilité 29
- Fidélité intermédiaire 29
- Reproductibilité 29
II.7.4 Justesse (biais) 30
II.7.5 Exactitude 30
II.7.6 Sensibilité 30
II.7.7 Robustesse 30
II.7.8 Limite de détection 30
II.7.9 Limite de quantification 30
II.8 APPROCHES DE VALIDATION 30
II.8.1 Approche descriptive 30
II.8.2 Approche globale 31
II.8.3 Approche de capabilité 31
II.9 ETAPES DE VALIDATION 31
II.10 CRITERES DE CHOIX DE LA VALIDATION ANALYTIQUE 32
II.11 CHOIX DU PROTOCOLE DE VALIDATION 33
II.12 PLANIFIER LES ESSAIS DE VALIDATION 34
II.12.1 Organiser les essais 34
II.12.2 Choisir le nombre de séries, de répétitions et de niveaux de validation 35
II.12.3 Réaliser les essais 35
a) Exigences d'être en condition de fidélité intermédiaire 36
b) Exigences de couvrir le domaine d'application 36
c) Exigences de synchroniser les plans 36
II.13 ÉTUDES STATISTIQUE DE LA VALIDATION ANALYTIQUE 37
II.13.1 Spécificité 37

II.13.2 Fonction de réponse 40
II.13.3 Alignement des observations 42
II.13.4 Prédiction inverse 43
II.13.5 Justesse 44
II.13.6 Fidélité 44
II.13.7 L'exactitude 46
 L'erreur totale et profil de l'erreur totale 46
II.13.8 Calcul de l'intervalle de tolérance 47
II.13.9 Profile d'exactitude et décision 48
III.14 LINEARITE 49
II.15 LIMITES DE QUANTIFICATION SUPERIEURES ET INFERIEURES 49
II.16 LIMITES DE DETECTION 49
II.17 CONCLUSION 50

CHAPITRE III: **MATERIELS ET METHODES**
III.1 INTRODUCTION 51
III.2 MATERIELS 51
III.3 METHODES 55
III.3.1 Méthode par spectrophotométrie d'absorption UV/vis 55
a) Identification de la Diclofénac Sodique par UV/vis 56
b) Dosage de la Diclofénac Sodique par UV/vis 56
III.3.2 Méthode par chromatographie liquide haute performances (HPLC) 57
a) Préparations et calcul des teneurs 58
b) Validation de procédure d'analyse de profile d'exactitude de déclofinac sodique et l'alcool benzylique dans le produit fini CLOFENAL® 61

CHAPITRE IV: **RESULTATS ET DISCUSSIONS**
IV.1 RESULTATS DE LA METHODE D'ANALYSE UV-VISIBLE 65
IV.1.1 Etude de la spécificité 65
IV.1.2 Spécificité de la méthode d'identification du diclofénac sodique 65
a. Spécificité par rapport au placebo 65
b. Solution de la forme reconstituée (solution échantillon) 65
IV.1.3 Résultats et calcules statistiques 66
IV.2 RESULTATS DE LA METHODE D'ANALYSE PAR HPLC 68
IV.2.1 Spécificité 68
IV.2.2 Résultats de l'étude statistique 70
IV.2.3 Plans d'expérience 71
IV.2.4 Fonctions de réponse 74
IV.2.5 Prédiction inverse 79
IV.2.6 Estimation de la justesse et de la fidélité 81
a) Estimation de la justesse 81
b) Estimation de la fidélité 82
c. Estimation de l'exactitude 83
IV.2.7 Intervalle de tolérance 84
IV.2.8 Intervalle de tolérance (Concentration) 86

IV.2.9 Profil d'exactitude 87
IV.2.10 Estimation de la linéarité et des limites de quantification 89
a. Estimation de la linéarité de la méthode de dosage du diclofénac sodique 89
b. Estimation de la linéarité de la méthode de dosage de l'alcool benzylique 91
IV.3 Critères complémentaires 92
IV.3.1 Limites de quantification du diclofénac sodique 92
IV.3.2 Limites de quantification de l'alcool benzylique 93
IV.4 CONCLUSION 95
CONCLUSION GENERALE 62
Conclusion générale 96
REFERENCES BIBILOGRAPHIQUES 97

Résumé

Diclofénac sodique est un anti-inflammatoire non stéroïdien utilisé pour traiter diverses affections caractérisées par l'inflammation. Le but du présent travail est de mettre au point et de valider une méthode de dosage du diclofénac sodique "principe actif " et d'alcool benzylique "conservateur" dans une solution injectable CLOFENAL® 75mg/3ml par deux méthodes analytiques distinctes: UV-visible et HPLC. Ces deux méthodes ont été appliquées avec succés à SAIDAL Médéa, En utilisant le profil d'exactitude comme outil de décision de validation, qui permet d'évaluer la fiabilité et l'exactitude des résultats obtenus. En fonction de profil d'exactitude, nous avons conclu que la méthode par UV est non spécifique, puis nous avons réalisé la méthode monographique par HPLC. Dans cette dernière, la sélectivité a été évaluée au préalable. Elle est suivie de l'évaluation de la fidélité et de la justesse de cette méthode à partir des standards d'étalonnage et standards de validation qui ont été effectués sur cinq niveaux de concentration : 80%, 90%, 100%, 110%, 120%. Nos résultats experimentaux montre que cette méthode est sélective/spécifique, linéaire, fidèle, et exacte. La technique s'est montrée valide pour les utilisations définies et en conformité parfaite avec les critères de validation définis par l'ICH, ISO et SFSTTP.

Mots clés : CLOFENAL®, validation, UV-visible, HPLC, profil d'exactitude.

Abstract

Diclofenac sodium is an anti-inflammatory nonsteroidal (AINS) used to treat various conditions characterized by inflammation. The purpose of this work is to develop and validate a method for dosing diclofenac sodium "active principle" and benzyl alcohol "preservative" in a injectable solution CLOFENAL® 75mg/3ml using two distinct analytical methods: UV-visible and HPLC. These two methods were applied with success at SAIDAL Medea, using the accuracy profile as a decision-making tool for validation, which allows evaluating the reliability and accuracy of the obtained results. Based on the accuracy profile, we concluded that the UV method is non-specific, and then we performed the monographic method by HPLC. In this latter, selectivity was evaluated beforehand. It is followed by the evaluation of the method's fidelity and accuracy from calibration and validation standards that were performed at five concentration levels: 80%, 90%, 100%, 110%, 120%. Our experimental eresults show that this method is selective/specifc, linear, faithful, and accurate. The technique has proven valid for defined uses and in perfect compliance with the validation criteria defined by ICH, ISO, and SFSTTP.

Keywords: CLOFENAL®, validation, UV-visible, HPLC, accuracy profile.

ملخص

الديكلوفيناك الصوديوم هو مضاد التهاب غير ستيرويدي يستخدم لعلاج مختلف الحالات التي تتميز بالالتهاب. الهدف من هذا العمل هو تطوير وتحقيق طريقة لقياس الديكلوفيناك الصوديوم "المبدأ الفعال" والكحول البنزيلي "مادة حافظة" في محلول حقني لكلوفينال® 75 ملجم/3 مل بواسطة طريقتين تحليليتين متميزتين: الأشعة فوق البنفسجية وكروماتوغرافية السائل عالية الأداء. تم تطبيق هاتين الطريقتين بنجاح في سايدال المدية، باستخدام ملف الدقة كأداة لاتخاذ القرار في التحقق، الذي يسمح بتقييم موثوقية ودقة النتائج المحصل عليها. استنادًا إلى ملف الدقة، خلصنا إلى أن الطريقة بالأشعة فوق البنفسجية غير محددة، ثم قمنا بتنفيذ الطريقة الداخلية بواسطة كروماتوغرافية السائل عالية الأداء. في هذه الأخيرة، تم تقييم الاختيارية مسبقًا. تلتها تقييم الوفاء والدقة لهذه الطريقة ابتداءً من معايير المعايرة ومعايير التحقق التي تم إجراؤها على خمسة مستويات تركيز: 80٪، 90٪، 100٪، 110٪، 120٪. نتائجنا التجريبية تظهر أن هذه الطريقة اختيارية/محددة، خطية، مخلصة، ودقيقة. أظهرت التقنية أنها صالحة للاستخدامات المحددة وفقًا لمعايير التحقق المحددة من قبل ICH، ISO و SFSTP.

الكلمات المفتاحية: كلوفينال®، التحقق، الأشعة فوق البنفسجية، كروماتوغرافية السائل عالية الأداء، ملف الدقة.

INTRODUCTION GENERALE

INTRODUCTION GENERALE

L'industrie pharmaceutique joue un rôle important dans les systèmes de santé mondiaux, car elle est responsable de la production et de la distribution de médicaments essentiels à la qualité thérapeutique. Les entreprises du secteur, qu'elles soient publiques ou privées, s'emploient à développer des produits pharmaceutiques de haute qualité, tout en respectant les normes rigoureuses imposées par les professionnels de la santé. Cette quête incessante de qualité requiert des chercheurs une validation des méthodes analytiques avant leur intégration dans les protocoles de routine des laboratoires.

L'industrie pharmaceutique est en constante expansion, avec une diversité de structures et de tailles, jouant un rôle croissant dans le système de santé. L'accent est mis sur la modernisation des installations et des équipements pour garantir des normes de qualité élevées. Le contrôle qualité, développé dans les années 1950-1960, est essentiel pour assurer la conformité éthique, réglementaire et commerciale de la production pharmaceutique, en veillant à ce que les médicaments répondent à des critères rigoureux de sécurité et d'efficacité. La qualité des médicaments est une préoccupation majeure pour les professionnels de la santé et les patients, impliquant la maîtrise de multiples paramètres et caractéristiques pour garantir l'intégrité du produit et la sécurité des utilisateurs [1,2].

Dans les pays en développement, tels que l'Algérie, l'industrie pharmaceutique se profile comme un secteur économique complexe en pleine expansion. Cette dynamique a engendré l'éclosion de plusieurs entreprises pharmaceutiques, parmi lesquelles le groupe SAIDAL occupe une position prépondérante. Réputé pour son expertise, il se distingue parmi les premiers acteurs sur le marché algérien, proposant une large gamme de médicaments sous différentes formulations, allant des formes solides, semi-solides et liquides [3].

Parmi les médicaments développés par les sociétés pharmaceutiques, on trouve les anti-inflammatoires. Le premier médicament de cette classe à être mis sur le marché après l'acide acétylsalicylique est la phénylbutazone, introduite en 1952. Ce n'est qu'une décennie plus tard que l'acide méfénamique, l'ibuprofène et l'indométacine ont été introduits dans cette catégorie. À ce stade, les industriels pharmaceutiques ont entrepris un projet visant à développer de nouveaux anti-inflammatoires ayant une activité supérieure et une meilleure tolérance. En 1973, le laboratoire CIBA-GEIGY a innové en commercialisant le diclofénac sous le nom de Voltarène [4].

Vu son importante utilisation, plusieurs études ont été menées dans divers laboratoires pour vérifier l'efficacité et la fiabilité de ce médicament avant son utilisation en routine. Cette procédure repose sur un ensemble de mesures expérimentales et de tests statistiques visant à valider le médicament, garantissant ainsi aux laboratoires et aux autorités compétentes la précision et la fiabilité des résultats fournis.

La problématique posée est de savoir quelle technique analytique spécifique faut-il choisir pour développer une méthode de dosage fiable et robuste pour le produit fini CLOFENAL® d'une solution injectable de 75 mg/3ml dans le cadre d'application industrielle de SAIDAL, Médéa?

Dans notre étude, nous nous sommes particulièrement intéressés à la mise au point et à la validation de la méthode de dosage par HPLC et UV du CLOFENAL® d'une solution injectable de 75 mg/3 ml.

Le contenu de notre mémoire est réparti en deux grandes parties, lesquelles sont scindées en chapitres :

La première partie comprend une synthèse bibliographique :

- Chapitre I : Généralités sur les médicaments.
- Chapitre II : Validation des méthodes d'analyses.

La deuxième partie est consacrée au matériel et méthodes pratique, qui comprend la mise au point et la validation d'une méthode de dosage du diclofénac de sodium d'une solution injectable à 75 mg/3 ml 'CLOFENAL®' par UV et HPLC.

- Chapitre III : Matériel et méthodes.
- Chapitre IV : Résultats et discussions.

L'étude devrait permettre de comparer les deux techniques analytiques (HPLC et UV-visible) en termes de sensibilité, de précision et de robustesse, fournissant ainsi des recommandations éclairées pour leur utilisation en routine dans le contexte industriel. Les conclusions attendues devraient également contribuer à l'amélioration des procédures de contrôle qualité dans les laboratoires pharmaceutiques, en offrant des méthodes de dosage validées qui garantissent la sécurité et l'efficacité des médicaments. Enfin, cette recherche devrait enrichir la littérature scientifique et technique en matière de validation des méthodes

analytiques, apportant des données précieuses pour les chercheurs et les professionnels de l'industrie pharmaceutique.

CHAPITRE I

GENERALITES SUR LES MEDICAMENTS

I.1 INTRODUCTION

Dans le cadre de la recherche scientifique en constante évolution, l'exploration des récentes avancées dans le domaine pharmaceutique demeure essentielle pour continuer à innover dans le domaine de la santé. En approfondissant notre compréhension des principes fondamentaux de la pharmacologie, incluant les réactions chimiques, les effets physiologiques et la pharmacocinétique, cela ouvre la voie au développement et à l'optimisation de thérapies pour les maladies chroniques et aiguës. En suivant de près les recherches et les innovations émergentes, de nouvelles perspectives s'ouvrent pour des traitements plus efficaces et sûrs. Ceci contribue ainsi à améliorer la qualité des soins de santé et à promouvoir la santé publique à long terme.

Le diclofénac sodique est un médicament largement répandu et hautement réputé dans le domaine médical, reconnu pour son efficacité remarquable dans la lutte contre l'inflammation et le soulagement de la douleur. Utilisé principalement pour traiter des affections chroniques telles que l'arthrite et la polyarthrite rhumatoïde, ainsi que dans la gestion des douleurs aiguës comme les douleurs musculaires et dorsales, le diclofénac sodique est largement choisi pour son efficacité rapide dans l'atténuation des symptômes inflammatoires et douloureux dans divers contextes médicaux.

I.2 MEDICAMENT

Un médicament est toute substance ou préparation présentée comme ayant des propriétés curatives ou préventives contre les maladies de l'homme ou de l'animal. Cela comprend également toute substance ou préparation susceptible d'être utilisée chez l'homme ou l'animal ou pouvant être utilisée pour eux en vue d'établir un diagnostic médical, restaurer, corriger ou modifier leurs fonctions physiologiques en exerçant des effets pharmacologiques, immunologiques ou métaboliques [5].

Un médicament générique est une copie du médicament original (ou princeps), ayant la même composition qualitative et quantitative en principe actif, le même dosage, la même forme pharmaceutique et la même « biodisponibilité ». Les génériques sont soumis aux mêmes normes rigoureuses de qualité, d'efficacité, de sécurité et de contrôle que tout autre médicament, et ils peuvent être fabriqués et commercialisés sous un nom différent par les laboratoires pharmaceutiques autorisés [6,7].

I.2.1 Comparaison entre un princeps et un générique

Les médicaments génériques sont moins chers que les princeps, de 30 % à 40 % en moyenne. Ce prix se justifie par l'absence de frais de recherche, de développement et d'essais cliniques. Ils sont bien meilleur marché après 10 à 15 ans d'exploitation du princeps par un laboratoire [8].

Chaque médicament possède au moins trois noms : le nom chimique, la dénomination commune internationale (DCI) et le nom de spécialité ou de marque. Les noms chimiques sont développés selon des règles de nomenclature très strictes établies par l'IUPAC, représentant la formule développée [9]. La DCI est désignée par l'OMS pour unifier les appellations des médicaments à l'échelle mondiale, distincte du nom de marque et du nom chimique. Ce nom est la substance active du médicament, utilisée par les professionnels de santé et les patients partout dans le monde [10]. Le nom de marque, également appelé nom commercial ou pharmaceutique, est sélectionné par le fabricant et peut varier d'un pays à l'autre pour un même médicament. Les signes « * » ou « ® » indiquent un nom enregistré [9].

Les médicaments sont constitués de molécules biologiquement actives appelées « principes actifs » et inactives appelées « excipients », ces derniers, leur permettent d'obtenir leur forme définitive, de se distribuer dans tout l'organisme et de se conserver. Les principes actifs sont les molécules responsables des effets thérapeutiques des médicaments, supportant l'activité pharmacologique ou un autre effet direct lié au diagnostic, au traitement ou à la prévention d'une maladie. Ils peuvent être d'origine naturelle ou synthétique et sont essentiels pour l'efficacité du traitement [11].

Un excipient est une substance inactive pharmacologique essentielle pour la fabrication d'un médicament, facilitant la préparation, l'administration et la conservation du médicament sans effet curatif ou préventif [12]. Les excipients jouent un rôle essentiel dans la formulation et la délivrance des principes actifs. Leur choix et leur interaction avec le principe actif sont cruciaux pour optimiser l'efficacité et la tolérance du médicament, incluant des aromatisants, édulcorants et colorants pour améliorer l'acceptabilité du médicament par le malade [13]. Cependant, certains excipients peuvent causer des réactions individuelles : il s'agit des excipients à effet notoire, tels que le lactose ou l'huile d'arachide. Leur présence détermine certaines précautions spécifiques d'utilisation pour chaque médicament générique, en fonction des effets indésirables qu'ils peuvent entraîner [14].

Le récipient, spécialement conçu pour le conditionnement, assure une protection efficace contre les influences de l'environnement extérieur, tout en garantissant l'intégrité du produit. Il est présenté dans un emballage avec une notice explicative détaillée, offrant une expérience utilisateur complète et rassurante [15].

Il existe trois types de conditionnement. Le conditionnement primaire est en contact direct avec le produit et est essentiel pour garantir la sécurité d'utilisation. Il comprend un étiquetage détaillé et des notices fournissant des instructions, des précautions et le numéro de lot. Il doit être solide, léger, compact, et imperméable aux éléments extérieurs tels que l'air, l'humidité et la lumière pour assurer une conservation optimale. Le conditionnement secondaire inclut les étiquettes, les notices et les étuis qui accompagnent le produit mais ne sont pas en contact direct avec le médicament, contribuant à son identification. Le conditionnement tertiaire a pour but de rassembler les étuis issus du conditionnement secondaire dans des emballages adaptés à la logistique [16].

I.2.2 Formes des médicaments

Les formes pharmaceutiques représentent les différentes présentations des médicaments (Figure I.1), conçues pour faciliter leur administration. Ces formes sont adaptées en fonction de la voie d'administration choisie, et il est possible d'utiliser plusieurs formes pour une même voie. Les formes galéniques intègrent les principes actifs et les excipients dans une configuration spécifique, assurant une administration optimale [17,18].

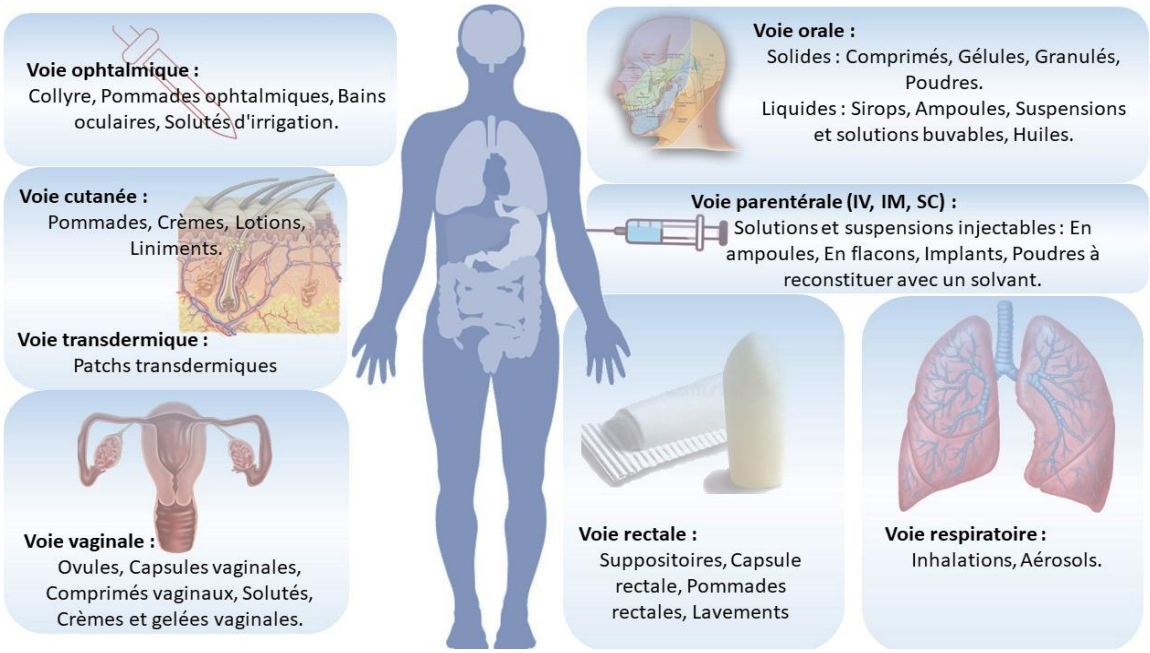


Figure I. 1. Les voies et les formes pharmaceutiques d'administration des médicaments.

I.3 PREPARATIONS INJECTABLES

La voie parentérale est une méthode d'administration de médicaments par injection, utilisant des préparations stériles destinées à être injectées ou implantées dans le corps humain ou animal [19]. Les médicaments administrés par voie parentérale se présentent sous différentes formes pharmaceutiques, notamment : les préparations injectables, les préparations injectables pour perfusion, les préparations à diluer pour injection ou pour perfusion, les poudres pour injection ou pour perfusion, les gels injectables et les implants [20].

Les préparations injectables sont des solutions, des émulsions ou des suspensions stériles. Elles sont préparées en dissolvant, émulsionnant ou dispersant les substances actives, et éventuellement des excipients, dans de l'eau, dans un liquide non aqueux approprié ou dans un mélange de ces deux liquides. Elles doivent être apyrogènes [21].

I.3.1 Propriétés des préparations injectables

Les préparations injectables doivent satisfaire à plusieurs exigences, notamment la stérilité (absence de germes), l'apyrogénicité (absence de pyrogènes), la neutralité (pH proche du sang), l'isotonicité (pression osmotique similaire au plasma) et la limpidité (absence de particules en suspension pour les solutions). Ces critères garantissent la sécurité et l'efficacité des médicaments administrés par voie injectable, assurant ainsi des traitements appropriés et sans risques pour les patients [22].

I.3.2 Avantages et Inconvénients de la voie injectable

La voie parentérale, qui comprend les injections sous-cutanées, intradermiques, intraveineuses, intramusculaires, intraartérielles, intrarachidiennes et intracardiaques, offre de nombreux avantages et inconvénients [23].

Les avantages de la voie parentérale incluent une réponse rapide dans l'organisme, ce qui est crucial en cas d'urgence médicale. Elle permet également de soigner des patients inconscients ou dans le coma, car elle ne nécessite pas la coopération du patient. De plus, cette voie d'administration n'a aucun effet préjudiciable des composés actifs sur le système digestif, assure une biodisponibilité optimale, permet une absorption totale et est résistante à la dégradation enzymatique.

Cependant, la voie parentérale présente aussi des inconvénients. Elle est peu adaptée pour un traitement en ambulatoire, car les patients ne peuvent généralement pas s'auto-

administrer les injections. Il est nécessaire de diversifier les sites d'injection pour éviter des complications locales, et l'utilisation de cette méthode implique l'obligation de stérilisation du matériel, ce qui ajoute une complexité et un coût supplémentaires au traitement [24].

I.4 INFLAMMATION

L'inflammation est la première manifestation ressentie par le patient ; cette réponse fait intervenir des phénomènes immunitaires. L'inflammation est un processus habituellement bénéfique, puisque son but est d'éliminer l'agent pathogène et de réparer les lésions. Toutefois, elle peut être néfaste en raison de l'agressivité du pathogène, de sa persistance, du siège de l'inflammation, ou des anomalies dans les processus régulateurs à l'origine de modifications quantitatives et qualitatives des populations cellulaires intervenant dans l'inflammation [25].

La réaction inflammatoire est classée en deux catégories : l'inflammation aiguë et l'inflammation chronique. L'inflammation aiguë est médiée par l'activation du système immunitaire, permettant aux leucocytes (globules blancs) et aux substances produites (anticorps, cytokines, complément, etc.) d'accéder rapidement au foyer infectieux. L'inflammation chronique se développe lorsqu'une agression persiste ou dans les tissus soumis à des réactions auto-immunes, où l'antigène ne peut être éliminé [26].

I.5 ANTIS – INFLAMMATOIRES

Les anti-inflammatoires sont des médicaments utilisés pour traiter l'inflammation en réduisant la douleur et la fièvre, ainsi qu'en aidant à contrôler les processus inflammatoires. Ils sont couramment prescrits pour diverses affections telles que l'arthrose, l'arthrite et les douleurs musculaires. Cependant, leur utilisation nécessite une surveillance étroite en raison des effets secondaires potentiels, notamment sur le système cardiovasculaire [27]. Il existe deux types d'anti-inflammatoires :

I.5.1 Anti-inflammatoires stéroïdiens :

Les anti-inflammatoires stéroïdiens (AIS) ou glucocorticoïdes forment une vaste famille de médicaments dérivés du cortisol, constituant le traitement le plus efficace pour les maladies inflammatoires chroniques telles que l'asthme, l'arthrose rhumatoïde, les maladies inflammatoires de l'intestin et les maladies auto-immunes. Ces médicaments empêchent l'activation de la phospholipase A2, qui libère l'acide arachidonique, et inhibent la production des facteurs chimiotactiques et la libération d'histamine [28].

Les anti-inflammatoires stéroïdiens agissent en inhibant la réaction inflammatoire en bloquant l'activité de la phospholipase membranaire, ce qui empêche la libération de l'acide arachidonique, nécessaire à la production des prostaglandines. De plus, ils favorisent la production de lipocortine, une protéine qui se lie à la phospholipase, la rendant ainsi inactive [29].

I.5.2 Anti-inflammatoires non stéroïdiens

Les anti-inflammatoires non stéroïdiens (AINS) sont des médicaments qui agissent de manière symptomatique pour contrer le processus inflammatoire, quelle que soit sa cause (mécanique, chimique, infectieuse, immunologique). Ils ciblent les manifestations locales de l'inflammation telles que rougeurs, chaleur, douleur et œdème. En plus de leur effet anti-inflammatoire, tous les AINS possèdent des propriétés antalgiques et antipyrétiques. Contrairement aux corticostéroïdes anti-inflammatoires qui sont des glucocorticoïdes, les AINS se distinguent par l'absence de structure chimique stéroïdienne. Parmi les AINS les plus connus figurent l'aspirine et l'ibuprofène [30].

Les AINS sont largement utilisés dans le traitement de la polyarthrite rhumatoïde, de l'arthrose et de la douleur (douleur dentaire, douleur post-opératoire, etc.). Leur mécanisme d'action repose sur l'inhibition de la cyclooxygénase (COX), une enzyme clé de la biosynthèse des prostaglandines. Cette enzyme existe sous deux isoformes : la COX-1 et la COX-2. La COX-1 est constitutivement exprimée dans les cellules normales (plaquettes, tractus gastro-intestinal, reins, etc.), tandis que la COX-2 est spécifiquement exprimée dans les cellules inflammatoires et impliquée dans les réponses inflammatoires aiguës et chroniques. Les AINS traditionnels inhibent à la fois la COX-1 et la COX-2, l'inhibition de la COX-1 provoquant des effets indésirables sur le tractus gastro-intestinal [31,32]. Les AINS ont plusieurs effets notables [29,33] :

- **Effet analgésique :** L'effet analgésique des AINS agit à la fois au niveau périphérique et central, avec une prédominance de l'effet périphérique. Cet effet est généralement associé à l'effet anti-inflammatoire des AINS et résulte de l'inhibition de la synthèse des prostaglandines dans les tissus inflammés.
- **Effet antipyrétique :** Les AINS possèdent un effet antipyrétique qui peut abaisser la température corporelle jusqu'à des valeurs proches de la normale en cas de fièvre.

- **Effet anti-inflammatoire :** Les prostaglandines jouent un rôle clé dans l'inflammation en favorisant la vasodilatation et en augmentant la perméabilité vasculaire. Bien que l'effet anti-inflammatoire des AINS soit relativement modeste chez la plupart des patients atteints d'arthrite rhumatoïde, ils peuvent soulager la douleur, la raideur et le gonflement sans modifier la cause sous-jacente de la maladie.

  Les différentes formes d'AINS sont représentées dans le Tableau I. 1 :

Tableau I. 1. Les différentes familles des AINS [34].

FAMILLE	DCI
Anti-inflammatoires Salicylés	Acide Acétylsalicylique
Anti-inflammatoires Indoliques	Indométacine, Sulindac
Anti-inflammatoires Propioniques (Dérivés De L'acide Arylecarboxyliques)	Kétoprofène, Dexkétoprofène, Ibuprofène, Naproxène, Diclofénac de sodium, Diclofénac de potassium, Flurbiprofène, Alminoprofène
Anti-Inflammatoires Oxicams	Piroxicam, Ténoxicam, Méloxicam
Anti-inflammatoires Anthraniliques (=Fenamates)	Acide Niflumique
Anti-inflammatoires Inhibiteurs sélectifs de la COX-2 Coxibs	Célécoxib, Parécoxib, Étoricoxib
Anti-inflammatoires Pyrazolés	Phénylbutazone

I.6 DICLOFENAC SODIQUE

Le diclofénac est un anti-inflammatoire non stéroïdien (AINS) dérivé de l'acide phénylacétique, utilisé pour traiter les rhumatismes douloureux et inflammatoires, ainsi que d'autres affections. Il est disponible sous différentes formes et doses, telles qu'orales, injectables, rectales, cutanées et en collyre, à des doses de 25 mg, 50 mg, 75 mg et 100 mg [35]. Ce médicament ne nécessite généralement pas d'ajustement de posologie chez les personnes âgées ou celles souffrant d'insuffisance rénale ou hépatique. Son administration par voie intramusculaire le rend comparable, voire supérieur, à d'autres traitements dans certaines conditions, comme les

coliques rénales et biliaires. Le diclofénac est bien toléré et présente un profil de sécurité établi par une vaste expérience clinique. Cependant, il est contre-indiqué chez les personnes allergiques à l'aspirine ou à d'autres inhibiteurs de la prostaglandine synthase [36].

I.6.1 Différents formes de diclofénac sodium

La diversité des formes pharmaceutiques du diclofénac sodium offre une gamme étendue d'options thérapeutiques pour le traitement de diverses conditions inflammatoires et douloureuses. Cette section examine les différentes formes d'administration du diclofénac sodium, allant des comprimés oraux aux injections, en passant par les gels topiques et les solutions ophtalmiques. Chaque forme possède des caractéristiques spécifiques en termes de dosage, de posologie et de mode d'action, permettant ainsi une adaptation précise aux besoins individuels des patients. De plus, nous explorerons les propriétés du CLOFENAL, une solution injectable de diclofénac sodique largement utilisée comme anti-inflammatoire et analgésique.

Tableau I. 2. Formes pharmaceutiques d'administration de diclofénac sodique.

Forme	Dosage	Posologie
Comprimés oraux à libération immédiate	25 mg, 50 mg,	1 comprimé de 50 mg, 3 fois par jour.
Comprimés oraux à libération prolongée	75 mg, 100 mg	1 comprimé de 75 mg, 2 fois par jour. 1 comprimé à 100 mg en prise unique par jour.
Suppositoires	100 mg	1 suppositoire à 100 mg, une fois par jour.
Injections	75 mg/3 ml	1 ampoule de 75 mg par jour en injection intramusculaire profonde.
Gel topique	1%, 2 %	Appliquer le gel 3 à 4 fois par jour.
Solution ophtalmique	0,1 %	1 à 2 gouttes dans l'œil, 4 fois par jour.

I.7 CLOFENAL (DICLOFENAC) 75MG/3ML ; SOLUTION INJECTABLE

CLOFENAL injectable (Figure I. 2(a)), également connu sous le nom de CLOFENAL® 75 mg/3 ml, est une solution injectable de diclofénac sodique utilisée comme anti-inflammatoire non stéroïdien (AINS) et analgésique [37].

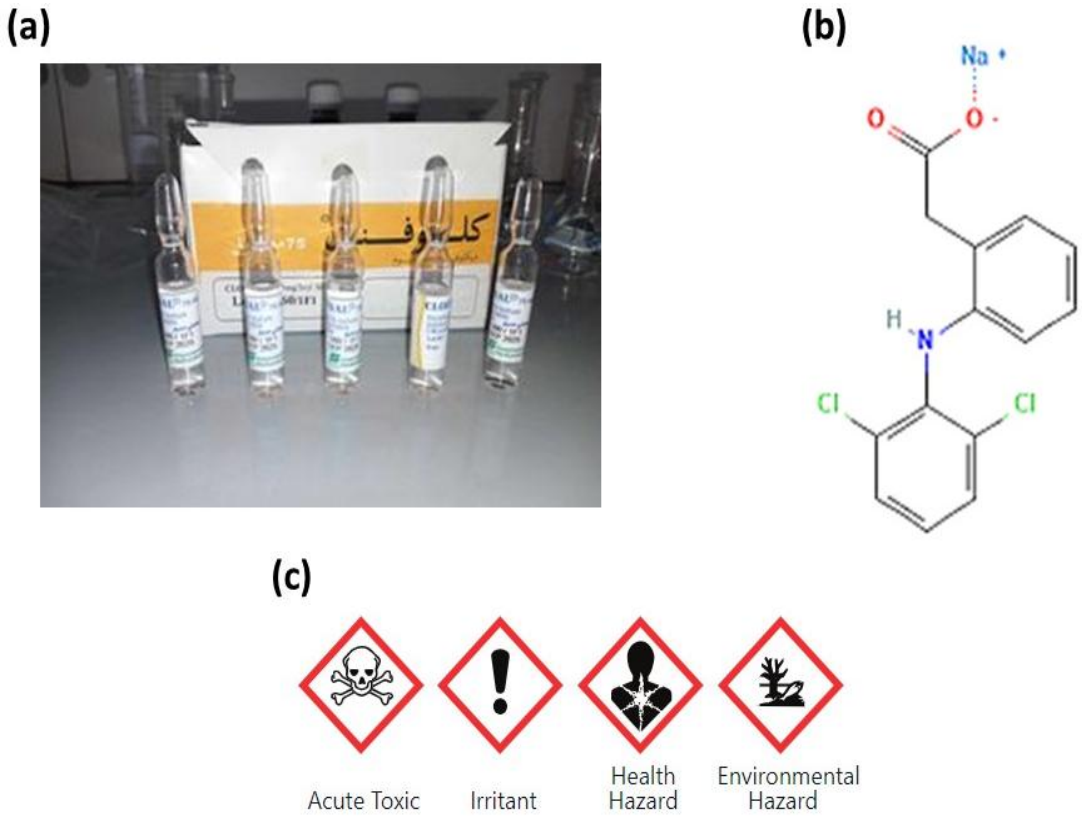
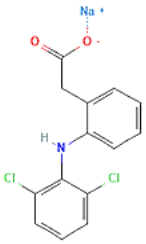
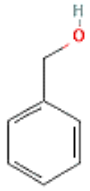
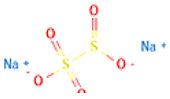
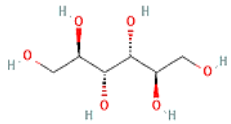
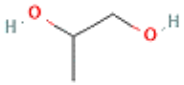
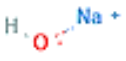


Figure I. 2. (a) CLOFENAL® solution injectable 75mg/3ml ; (b) Formule chimique du Diclofénac de sodium [38] ; (c) Les danger de la molécules pure du Diclofénac de sodium[38].

I.7.1 Composition de la formulation de CLOFENAL®

Le Tableau I. 3 fournit une vue d'ensemble détaillée de la formulation de CLOFENAL® dont le principe actif est le diclofénac sodique, détaillant également les excipients utilisés dans sa formulation, obtenue lors de notre stage pratique à SAIDAL, Medea.

Tableau I. 3. La composition et caractéristiques de la formulation de CLOFENAL® [39,40].

Composition	Nom chimique	Structure chimique	Caractère
Principe actif	**Diclofénac sodique** 75mg : « Diclofenacum-natricum » **$C_{14}H_{10}C_{12}NNaO_2$** **Mr=318.1**		-Poudre cristalline. -Blanche à faiblement jaunâtre. -Faiblement hygroscopique. -Assez soluble dans l'eau. -Facilement soluble dans le méthanol. -Soluble dans l'alcool. -Peu soluble dans l'acétone. -Pratiquement insoluble dans l'éther. -Fond en se décomposant vers 280°C.
Excipient	**L'alcool benzylique :** « Alcool benzylicus » **CHO** **Mr=108.1**		-Liquide huileux. -Limpide. -Incolore. -Réfringent. -Soluble dans l'eau. -Miscible à l'alcool, à l'éther, aux huiles grasses et aux huiles essentielles.
	Metabisulfite de sodium : **$Na_2S_2O_5$** **Mr=190.1**		-Poudre cristalline blanche ou sensiblement blanche ou cristaux incolores. Facilement solubles dans l'eau, peu solubles dans l'alcool.
	Mannitol : monnitolum **$C_6H_{14}O_6$** **Mr=182.2**		-Poudre cristalline blanche. -Bonne solubilité dans l'eau. -Faible solubilité dans l'alcool. -Quasi-insolubilité dans l'éther.
	Propylène glycol : **$C_3H_8O_2$** **Mr=76.1**		-Un liquide visqueux. -Incolore et inodore. -Miscible dans l'eau, l'alcool et le chloroforme. -Soluble dans l'éther et -Insoluble dans l'eau ou en solution aqueuse d'acétylcholine.
	Hydroxyde de sodium : « Natri hydroxymum » **NaOH** **Mr=40.0**		-Blanche. -Cristalline. -Sous forme de pastilles, cylindres ou plaques. -Déliquescente (elle absorbe facilement le dioxyde de carbone). -Très soluble dans l'eau et facilement soluble dans l'alcool.
	Eau pour préparation injectable « EPPI » **H_20** **Mr=18.02**		-Utilisée pour la préparation de médicaments injectables avec un véhicule aqueux (EPPI en vrac). -Dissolution ou dilution de substances ou préparations injectables. -Utilisation au moment de l'administration.

I.7.2 Caractéristiques physicochimiques

Le tableau ci-dessous (Tableau I. 4) présente une synthèse des propriétés physicochimiques du diclofénac de sodium. Les informations fournies comprennent la dénomination commune internationale (DCI), la formule chimique brute, le point de fusion, la solubilité à différentes températures, ainsi que l'aspect physique du composé.

Tableau I. 4. Propriétés physicochimiques du diclofénac sodique[41].

DCI	Diclofénac de sodium
IUPAC	2-[(2,6-dichlorophenyl) amino] phényl] acétate de sodium.
Formule chimique brute	$C_{14}H_{11}C_{12}NO_2$
Pka	4,0±0,2 à 25°C dans l'eau
Masse molaire	318,1 g/mole
Point de fusion	280°c, avec décomposition
Solubilité pour une température de 15°C à 25°C	-Facilement soluble dans le méthanol (1 à 10 ml/1g du Diclofénac) -Soluble dans l'éthanol à 96% (10 à 30 ml/1g du Diclofénac) -Assez soluble dans l'eau (30 à 100 ml/1g du Diclofénac) -Peu soluble dans l'acétone (100 à 1000 ml/1g du Diclofénac)
Aspect	Poudre cristalline, blanche ou faiblement jaunâtre, faiblement hygroscopique.

I.7.3 Propriétés pharmacologique du diclofénac sodique

Cette section offre un aperçu détaillé des propriétés pharmacologiques du diclofénac sodique. Elle se divise en deux sous-sections principales : les propriétés pharmacocinétiques et les propriétés pharmacodynamiques. Les propriétés pharmacocinétiques examinent les aspects liés à l'absorption, à la distribution, à la biotransformation et à l'excrétion du diclofénac, tandis que les propriétés pharmacodynamiques se penchent sur son mécanisme d'action et ses effets pharmacologiques. Cette analyse approfondie permet de mieux comprendre le mode d'action,

la cinétique et les implications thérapeutiques de ce médicament, contribuant ainsi à son utilisation efficace et sécuritaire dans la pratique médicale.

a) Propriétés pharmacocinétiques

- **Absorption**

L'absorption du diclofénac est rapide, avec une concentration plasmatique maximale moyenne de 2,5 microgrammes/ml atteinte environ 20 minutes après une injection intramusculaire de 75 mg. La quantité absorbée est proportionnelle à la dose administrée. Les concentrations plasmatiques maximales sont plus élevées avec une administration intraveineuse de courte durée, atteignant un plateau après 3 à 4 heures, tandis qu'elles diminuent rapidement après une administration intramusculaire, orale ou rectale. L'AUC (aire sous la courbe) après administration intraveineuse ou intramusculaire est environ le double de celle après administration orale ou rectale, en raison de l'effet de premier passage hépatique. Les doses répétées n'entraînent pas d'accumulation si les délais entre les prises sont respectés [42].

- **Distribution**

Le diclofénac est fortement lié aux protéines plasmatiques (> 99 %), principalement à l'albumine (99,4 %), avec un volume de distribution apparent compris entre 0,12 et 0,17 L/kg. Il se diffuse dans le liquide synovial, atteignant des concentrations maximales 2 à 4 heures après le pic plasmatique, avec une demi-vie apparente d'élimination de 3 à 6 heures. Les concentrations dans le liquide synovial restent élevées pendant jusqu'à 12 heures après le pic plasmatique. Une faible concentration de diclofénac (100 mg/ml) a été détectée dans le lait maternel, avec une dose ingérée estimée à 0,03 mg/kg/jour pour un nourrisson allaité [43].

- **Biotransformation**

Le diclofénac subit une biotransformation rapide et quasi complète, principalement dans le foie. Cette transformation implique la glucuroconjugaison de la molécule inchangée ainsi que des processus d'hydroxylation et de méthoxylation simples et multiples, conduisant à la formation de divers métabolites phénoliques (3’-hydroxy, 4’-hydroxy, 5-hydroxy, 4’,5-dihydroxy et 3’-hydroxy-4’-méthoxy diclofénac), qui sont principalement éliminés sous forme glycuroconjuguée. Deux de ces métabolites phénoliques ont une activité pharmacologique, mais à un degré significativement inférieur à celui du diclofénac [44].

➢ **Excrétion**

La demi-vie d'élimination plasmatique du diclofénac non modifié est d'environ 1 à 2 heures, avec une clairance plasmatique totale d'environ 263 ± 56 ml/minute en moyenne. Quatre des métabolites, dont deux sont biologiquement actifs, ont une courte demi-vie plasmatique de 1 à 3 heures, tandis qu'un autre métabolite, le 3'-hydroxy-4'-méthoxy diclofénac, a une demi-vie plus longue mais est pratiquement inactif. L'élimination du diclofénac se fait à la fois par voie urinaire et fécale. Environ 60 % de la dose administrée est excrétée dans les urines sous forme de conjugué glucuronide de la molécule native et de métabolites, la plupart étant convertis en conjugués glucuronides. Moins de 1 % du principe actif est excrété inchangé dans les urines, le reste étant éliminé sous forme de métabolites par voie biliaire dans les fèces [45].

b) Propriétés pharmacodynamiques

➢ **Mécanisme d'action**

Le diclofénac sodique, un composé non stéroïdien, possède des propriétés antirhumatismales, anti-inflammatoires, analgésiques et antipyrétiques. Son mécanisme d'action repose principalement sur l'inhibition de la biosynthèse des prostaglandines, qui sont impliquées dans l'inflammation, la douleur et la fièvre. À des concentrations équivalentes à celles chez l'homme, le diclofénac sodique n'inhibe pas la biosynthèse des protéoglycanes dans le cartilage in vitro [46].

➢ **Effets pharmacodynamiques**

Le diclofénac présente des propriétés anti-inflammatoires et analgésiques efficaces dans les maladies rhumatismales, réduisant les douleurs, la raideur matinale et améliorant la capacité fonctionnelle. Il soulage rapidement les douleurs post-traumatiques et post-opératoires, réduit l'œdème inflammatoire et traumatique, et démontre un effet analgésique dans les douleurs modérées à sévères non rhumatismales en 15 à 30 minutes. Il est également bénéfique dans le traitement des crises de migraine et permet de réduire la dose d'opioïdes nécessaire dans la gestion de la douleur postopératoire lorsqu'il est utilisé en association avec ces derniers. Les ampoules de diclofénac sont particulièrement adaptées pour le traitement initial des maladies rhumatismales inflammatoires et dégénératives ainsi que des douleurs non rhumatismales d'origine inflammatoire [47].

I.7.4 Indications thérapeutiques

Les indications du diclofénac sodium sont restreintes à un usage limité chez les adultes et les enfants à partir de 15 ans. Ce médicament est destiné au traitement symptomatique de courte durée des conditions suivantes [43] :

- Poussées de rhumatismes inflammatoires même si elles sont chroniques ;
- Lombalgies aiguës ;
- Radiculalgies ;
- Douleurs modérées avec composante inflammatoire telles que la sciatique aiguë, les coliques néphrétiques, les douleurs postopératoires, les douleurs aiguës d'arthrose, les arthrites, les tendinites, les bursites et les cruralgies.

I.7.5 Contre-indications

Le produit fini contenant le diclofénac de sodium de la forme injectable a 75mg/3ml présente des contre-indications importantes. Il ne doit pas être administré en cas d'allergie aux AINS (aspirine, ibuprofène, etc.), d'ulcère gastroduodénal, d'anomalies de l'hémostase, d'hémorragie, de chirurgie hémorragique, d'insuffisance rénale, hépatique ou cardiaque sévères, de malnutrition sévère, de déshydratation ou d'hypovolémie non corrigées, d'asthme ou d'infection grave. Des effets indésirables peuvent inclure des réactions au point d'injection, une insuffisance rénale, des troubles digestifs et des réactions d'hypersensibilité comme des éruptions cutanées et des bronchospasmes. Il est déconseillé de l'associer à d'autres AINS (aspirine, ibuprofène), diurétiques et anticoagulants. De plus, son utilisation est contre-indiquée pendant la grossesse et l'allaitement [48,49].

I.7.6 Effets indésirables

Le traitement par diclofénac est associé à un risque accru d'événements thrombotiques artériels, tels que l'infarctus du myocarde et l'accident vasculaire cérébral, surtout à des doses élevées (150 mg/jour) et lors d'une utilisation prolongée. Les effets indésirables les plus courants sont d'origine gastro-intestinale, incluant des ulcères, perforations ou hémorragies pouvant être fatales, surtout chez les personnes âgées. Des symptômes tels que nausées, vomissements, diarrhées, constipation, dyspepsie, et douleurs abdominales ont été observés, ainsi que des exacerbations de maladies comme la recto-colite ou la maladie de Crohn. Moins fréquemment, des gastrites ont été rapportées [50].

I.8 CONCLUSION

En conclusion, le diclofénac sodique est un médicament largement utilisé pour ses propriétés anti-inflammatoires, analgésiques et antipyrétiques dans le traitement de diverses affections, notamment les rhumatismes inflammatoires, les douleurs post-traumatiques et post-opératoires, ainsi que les maladies rhumatismales dégénératives. Sa pharmacocinétique rapide, son efficacité dans la réduction de la douleur et de l'inflammation, et sa capacité à soulager rapidement les symptômes en font un choix thérapeutique populaire. Cependant, il est essentiel de prendre en compte ses contre-indications et ses effets indésirables potentiels, notamment ceux liés au système gastro-intestinal et cardiovasculaire, ainsi que son association avec un risque accru d'événements thrombotiques artériels. Une utilisation prudente, en tenant compte des facteurs de risque individuels, est nécessaire pour maximiser les avantages thérapeutiques du diclofénac tout en minimisant les risques pour la santé du patient.

Les parties prenantes, qu'il s'agisse des autorités sanitaires ou de la communauté scientifique, doivent continuer à investir dans la recherche et le développement de médicaments. Cela garantira la disponibilité de traitements efficaces et sûrs pour les patients, renforçant ainsi les soins de santé dans leur ensemble. Par conséquent, les autorités sanitaires et la communauté scientifique doivent collaborer pour garantir l'accessibilité des médicaments essentiels à des prix abordables et de haute qualité pour tous, contribuant ainsi à améliorer l'accès aux traitements et à promouvoir la santé publique.

CHAPITRE II

VALIDATION DES METHODES D'ANALYSES

II.1 INTRODUCTION

La validation des méthodes analytiques constitue un pilier essentiel dans les industries pharmaceutiques, chimiques, biopharmaceutiques et agroalimentaires. Elle s'impose comme une étape cruciale et déterminante dans le processus de mise en œuvre des procédures analytiques, garantissant ainsi la fiabilité des résultats obtenus. Après l'étape d'optimisation, la validation confirme que la méthode optimisée répond parfaitement aux exigences spécifiques tout en produisant des résultats d'une fiabilité à toute épreuve, et en maintenant une efficacité opérationnelle hors pair.

Conformément aux directives rigoureuses et exigeantes de la FDA, la validation d'une méthode requiert une démonstration documentée et hautement confiante de sa parfaite conformité aux spécifications prédéfinies. Ce concept de validation a stimulé et propulsé le développement de nouvelles méthodes analytiques, désormais standardisées et largement débattues dans la littérature. Les critères de validation sont intégrés dans les directives de l'ICH Q2(R1) pour une mise en œuvre harmonisée à l'échelle internationale [51,52].

II.2 DEFINITION ET OBJECTIFS DE LA VALIDATION

La validation est le processus de confirmation par examen et de preuve objective que des exigences particulières pour une utilisation prévue déterminée sont remplies. Selon l'ICH Q2A : « L'objectif d'une procédure analytique est de démontrer qu'elle est appropriée à l'usage auquel elle est destinée » [53]. Selon la norme ISO 17025 : la validation est : « La confirmation par examen et apport de preuves objectives du fait que les exigences particulières en vue d'une utilisation prévue déterminée sont remplies » [54]. 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 » [55]. Selon la pharmacopée américaine : « Processus par lequel il est établi, par des études au laboratoire, que les caractéristiques de performance d'une méthode satisfont aux exigences pour ses applications analytiques prévues » [56]. Selon les BPF : « l'établissement d'une preuve documentée, en conformité avec les principes des BPF, 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 » [57].

La validation est une exigence réglementaire clairement évoquée dans la ligne directrice 15 des BPF. Le but d'une validation analytique est de démontrer l'aptitude et la fiabilité de la méthode vis-à-vis des référentiels opposables et de donner aux laboratoires ainsi qu'aux

autorités compétentes les garanties que chaque mesure qui sera réalisée ultérieurement en routine, une fois la procédure validée, sera suffisamment proche de la vraie valeur inconnue de l'échantillon ou du moins comprise dans une limite acceptable, en fonction de la finalité de la procédure. L'objectif est de minimiser le risque tant au niveau du producteur que du futur consommateur [58].

Le processus de validation inclut des termes scientifiques dont les définitions sont internationalement convenues. Parmi les définitions les plus courantes sont classées dans le Tableau suivant (Tableau II. 1) :

Tableau II. 1. Vocabulaires et définitions [59,60].

Terme	Définition
ICH	Un processus d'harmonisation des exigences réglementaires concernant les médicaments destinés à l'usage humain, 'International Council for Harmonisation of Technical Requirements for Pharmaceuticals for Human Use'.
SFSTP	Le guide SFSTP a été produit pour aider les analystes à valider leurs méthodes analytiques. Il est le résultat d'un consensus entre des professionnels possédant une expertise dans les domaines analytique et/ou statistique.
BPF	Les BPF sont un ensemble de principes et de directives visant à assurer une haute qualité de certains produits industriels. Ces lignes directrices permettent à une entreprise et à ses consommateurs de garantir la qualité des produits pharmaceutiques.
FDA	Elle établit et applique des normes réglementaires pour garantir la sécurité, l'efficacité et la qualité des produits pharmaceutiques, des dispositifs médicaux et des aliments commercialisés aux États-Unis.
ISO	C'est une norme réglementaire qui définit les exigences pour la compétence des laboratoires d'étalonnage et d'essais. Cette norme établit des lignes directrices pour les systèmes de management de la qualité des laboratoires.
Mesurage ou mesure	Processus visant à expérimenter et à obtenir une ou plusieurs valeurs qui peuvent être raisonnablement associées à une grandeur donnée.
Analyte	L'entité soumise à l'analyse peut être soit physique, soit chimique.
Mesurande	Grandeur que l'on veut mesurer.
Valeur de référence	Valeur qui sert de référence pour une comparaison.

Vérification	La vérification consiste à présenter des éléments concrets démontrant qu'une entité donnée répond aux exigences spécifiées, tout en tenant compte de toute incertitude de mesure.
Domaine d'application de la méthode	Le domaine d'application de la méthode englobe tous les types de matrices auxquels la méthode s'applique, en prenant en considération la plage de concentration pour laquelle la validation est nécessaire.
Domaine de validation	Le domaine de validation englobe tous les types de matrices auxquels la méthode s'applique, ainsi que la plage de concentrations sur laquelle la validation a été réalisée.
Domaine de validité	Le domaine de validité se réfère à tous les types de matrices auxquels la méthode peut être appliquée, ainsi qu'à la plage de concentrations sur laquelle la validation a été effectuée. C'est sur cette plage que les résultats futurs de la méthode seront considérés comme valides.
Méthode de référence	Une méthode de référence est une technique d'analyse reconnue par des experts ou adoptée comme référence par consentement mutuel, fournissant ou censée fournir une valeur de référence acceptée.
Matrice	Ensemble des constituants de l'´échantillon autre que l'analyte.
Série	Une série consiste en un ensemble de mesures effectuées sur un même échantillon dans des conditions identifiées. Par exemple, une série regroupe des mesures réalisées le même jour et/ou par le même opérateur et/ou avec le même appareil.
Profile d'exactitude	Le profil d'exactitude est une représentation graphique qui combine un ou plusieurs intervalles de tolérance d'espérance, calculés à divers niveaux de concentration, avec un ou plusieurs intervalles d'acceptabilité.
L'intervalle de tolérance d'espérance	L'intervalle de tolérance d'espérance est défini comme un intervalle qui, en moyenne, englobe une proportion de ß% des mesurages futurs réalisés selon un protocole spécifique et pour une concentration donnée. Ce seuil est calculé à partir de mesures répétées et est généralement fixé entre 80% et 95%, servant principalement à déterminer la limite de quantification de la méthode utilisée.
L'intervalle d'acceptabilité	L'intervalle d'acceptabilité se définit comme une spécification de la performance requise pour une méthode, exprimée sous forme d'une marge d'erreur acceptable par rapport à la valeur de référence. Ces limites sont déterminées par le client ou par des réglementations, parfois en fonction du niveau de concentration, et sont notées ± λ en valeurs absolues dans l'unité de mesure du paramètre,

Un échantillon de validation	Egalement connu sous le nom d'échantillon témoin, est un matériau dont la valeur de référence peut être établie. Cela peut être grâce à son statut de matériau de référence, qu'il soit certifié ou non, ou bien parce qu'il a subi un dosage ajouté ou un marquage spécifique de la molécule à mesurer.
Signal	Il s'agit d'une mesure dérivée d'un phénomène complexe et variable, sur laquelle agissent les méthodes de traitement du signal.
Biais	Estimation d'une erreur systématique.
Ecart type	Paramètre statistique indiquant la dispersion des valeurs au niveau de la moyenne d'une série de mesures.
Echantillon d'étalonnage	Echantillons, avec ou sans matrice, de concentration connue qui permettent d'établir les points de gamme.
Echantillon de validation	Echantillons, reconstitués dans la matrice, dont la valeur vraie a pu être établie et qui sont utilisés pour la validation de la procédure d'analyse.
Dosage	Détermination de la quantité de matière, la fraction, ou la concentration d'une substance précise (l'analyte) présente dans une autre ou dans un mélange (la matrice).
Gamme	Intervalle de dosage ou série de concentration.
Etalon	Molécule de référence.
Courbe d'étalonnage ou fonction de réponse	Relation existante entre la réponse (signal) et la teneur (quantité) en substance à examiner de l'échantillon à l'intérieur de l'intervalle de dosage.
Fonctions de réponse	Equation de l'intensité du signal analyse en fonction de la concentration.
Placebo	Le placebo constitue une forme pharmaceutique reconstituée contenant tous les composants présents dans la forme pharmaceutique à l'exception des substances à analyser.

II.3 PROCEDURES ANALYTIQUES A VALIDER

L'analyse des procédures fait référence à la manière de réaliser l'analyse. Elle devrait décrire en détail les étapes nécessaires pour effectuer chaque test analytique. Cela peut inclure, mais sans s'y limiter : l'échantillon, le standard de référence et la préparation des réactifs, l'utilisation de l'appareil, la génération de la courbe d'étalonnage, l'utilisation des formules pour le calcul, etc. Le laboratoire doit valider [61] :

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 ;
- 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.

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.

II.4 ASPECT REGLEMENTAIRE ET NORMATIF

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

II.4.1 Documents ISO 17025

Les documents ISO 17025 incluent les « Exigences générales concernant la compétence des laboratoires d'étalonnages et d'essais » ainsi que l'ISO 5725, qui traite de l'exactitude (justesse et fidélité) des résultats et des méthodes de mesure.

II.4.2 Documents ICH

- Les documents ICH comprennent plusieurs textes clés :

✓ L'ICH Q2A, publié en 1995, fournit des définitions et une terminologie sur la validation des procédures analytiques.

✓ L'ICH Q2B, publié en 1997, décrit la méthodologie de validation des procédures analytiques.

✓ L'ICH Q2 (R1), publié en 2005, intègre à la fois le texte et la méthodologie de la validation des procédures analytiques.

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

En 2001, la FDA a publié des directives intitulées « Validation of Bioanalytical Method », offrant des orientations pour l'industrie concernant la validation des méthodes bioanalytiques.

II.4.4 Documents des commissions SFSTP

Les commissions SFSTP ont produit plusieurs documents importants :

- Le « Guide de validation, rapport d'une commission SFSTP » publié en 1992, qui inclut une méthodologie et des exemples d'application.
- En 1997, la SFSTP a publié un document sur le dosage dans les milieux biologiques par des méthodes chromatographiques.
- La série de publications « validation des procédures analytiques : harmonisation des démarches », comprenant :
  - ✓ Partie I : généralités, parues dans STP Pharma Pratique en 2003.
  - ✓ Partie II : statistiques, parues dans STP Pharma Pratique en 2006.
  - ✓ Partie III : exemples d'application, parus dans STP Pharma Pratique en 2006 et dans le Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis en 2008 [62].

II.5 SELECTIONNER LES ECHANTILLONS DE VALIDATION

II.5.1 Choisir la ou les matrices

Pour déterminer avec précision les paramètres de performance, il est essentiel de choisir soigneusement les échantillons de validation. Ceux-ci doivent être représentatifs du domaine d'application et peuvent comprendre différentes matrices pour les méthodes multi-matrices. Il est crucial de garantir que ces échantillons possèdent une valeur de référence connue, reflétant la teneur attendue. Il est recommandé d'opter pour des matériaux stables, homogènes et en quantité suffisante pour mener à bien les essais selon le plan d'expérience de validation [59].

II.5.2 Etablir les valeurs de référence des échantillons de validation

Pour évaluer l'exactitude d'une méthode, il est nécessaire de disposer d'échantillons de validation avec une concentration connue et une incertitude définie. Cette concentration, notée X, est la valeur de référence attribuée à l'échantillon de validation et doit être déterminée

indépendamment de la méthode à valider. Il existe diverses approches pour établir cette valeur de référence. L'utilisation de matériaux de référence certifiés implique une traçabilité qui varie selon leur nature et nécessite la création d'ajouts dosés à partir d'une molécule étalon de pureté connue, ainsi que la préparation d'échantillons avec la matrice choisie. Une méthode de référence, qu'elle soit interne ou provenant d'un laboratoire tiers, peut être utilisée. Lorsque la valeur de référence est estimée à partir de répétitions de la méthode de référence, il est recommandé de choisir la valeur la plus représentative, telle que la moyenne ou la médiane. Cette approche est préférablement utilisée lors de la validation d'une méthode alternative par rapport à une méthode de référence [59].

Pour assurer une préparation d'échantillons de validation sans dépendance entre les différentes préparations, il est conseillé d'éviter les dilutions successives à partir d'une même solution mère, car cela crée une corrélation entre les mesures, augmentant ainsi les conséquences d'une erreur de justesse. L'utilisation de la dilution isotopique est recommandée dans ce contexte, y compris pour la préparation des solutions étalons. Le choix judicieux des valeurs de référence est nécessaire pour garantir la justesse de la méthode analytique utilisée. En l'absence de valeur de référence assignée à un échantillon de validation, la moyenne ou la médiane des concentrations obtenues directement sur cet échantillon peut être utilisée, mais cette approche restreinte doit être justifiée clairement dans le dossier de validation [63].

II.6 CYCLE DE VIE D'UNE METHODE D'ANALYSE

Le cycle de vie d'une méthode d'analyse, tel que décrit dans la norme ISO 17025, vise à aligner la variabilité de la méthode avec les exigences du produit à tester. Il comprend plusieurs étapes, représentées par un cycle, visant à améliorer la fiabilité de la méthode en comprenant, réduisant et contrôlant les sources de variabilité [64,65].

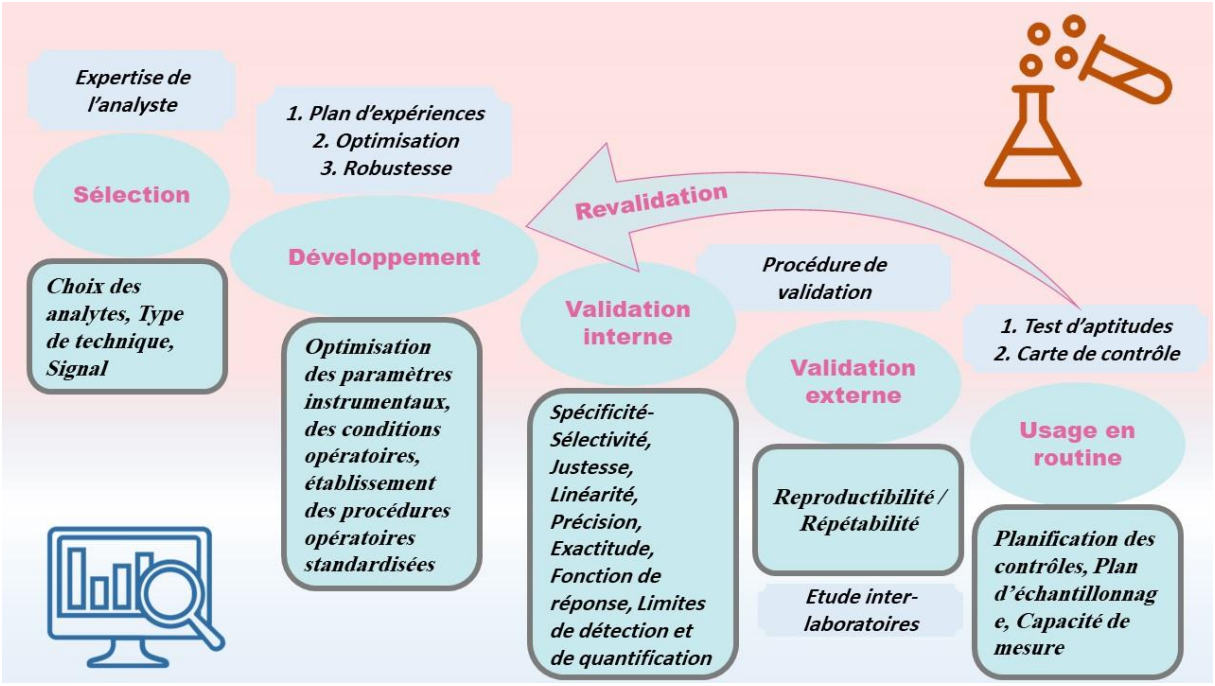


Figure II. 1. Cycle de vie d'une méthode d'analyse.

La mise en place d'une procédure de dosage peut être subdivisée en six étapes consécutives :

II.6.1 Sélection de la méthode

La sélection de la méthode consiste à définir les objectifs et les conditions initiales. L'analyste choisit la méthode physico-chimique la plus pertinente pour le dosage de l'analyte, en privilégiant les méthodes normatives internationales. L'ISO 17025 recommande l'utilisation de méthodes officielles, mais autorise également le développement de méthodes internes, sous réserve d'un personnel qualifié et de ressources adéquates, avec une documentation précise des démarches et des résultats [66].

II.6.2 Mise au point et pré-validation de la méthode

La phase de mise au point et pré-validation de la méthode implique l'optimisation des paramètres du protocole pour s'adapter aux échantillons et aux conditions d'utilisation. L'utilisation de plans d'expériences est recommandée pour optimiser le nombre d'essais nécessaires. Les performances de la procédure analytique, y compris la pertinence du modèle de régression, la variabilité des résultats, la limite de quantification et l'intervalle de dosage, doivent être évaluées. Ces informations serviront de base pour la phase de validation [58].

II.6.3 Validation de la méthode

La validation de la méthode intervient après le développement de la nouvelle procédure d'analyse. Les performances de la méthode évoluent tout au long du cycle de vie, surtout pendant les deux premières étapes. Il est crucial d'améliorer la fiabilité du résultat analytique durant ces phases initiales pour atteindre une confiance accrue, confirmée lors de la validation. On distingue deux types de validation [58]:

- La validation inter-laboratoire : La validation inter-laboratoire concerne les méthodes analytiques utilisées par plusieurs laboratoires ou pour les échanges commerciaux, fréquente dans l'industrie agro-alimentaire. Elle est rare dans l'industrie pharmaceutique où les méthodes sont utilisées en interne. Elle est essentielle pour mesurer la conformité des denrées lors d'échanges commerciaux et permet de calculer les limites de reproductibilité.
- La validation intra-laboratoire : La validation intra-laboratoire concerne les méthodes analytiques développées en interne par un laboratoire. Cette thèse se concentre uniquement sur ce type de validation.

II.6.4 Estimation de l'incertitude et vérification de l'aptitude

L'estimation de l'incertitude de mesure, exigée par la norme ISO 17025, évalue la capacité de mesure de la méthode et sa conformité aux exigences. Elle rejoint le concept de "fitness-for-purpose". L'estimation de l'incertitude et la validation analytique sont interdépendantes, et un protocole de la SFSTP les combine. L'utilisation du profil d'exactitude permet d'obtenir l'incertitude à partir des résultats de validation, et le calcul de l'intervalle de tolérance démontre clairement la pertinence de la méthode [67,68].

II.6.5 Utilisation en routine

Le but principal d'une méthode analytique n'est pas seulement sa validation, mais surtout son utilisation en routine pour analyser des échantillons de valeur vraie inconnue. Le passage en routine s'intègre dans un système de contrôle de la qualité visant à valider les résultats sur des échantillons inconnus et à surveiller les performances de la méthode au fil du temps [58].

II.6.6 Revalidation

Pendant l'utilisation en routine, des améliorations peuvent être apportées à la méthode analytique, nécessitant une revalidation. Les modifications mineures peuvent être évaluées par un test simple, tandis que les modifications majeures exigent une revalidation complète de la méthode [66].

II.7 CRITERES DE VALIDATION

Les principaux critères de validation couramment utilisés dans les laboratoires d'analyse, dont la nécessité d'étude fait l'objet d'un large consensus, sont la spécificité-sélectivité, la linéarité, la fidélité (répétabilité et fidélité intermédiaire), la justesse, l'exactitude, la sensibilité, la robustesse, la limite de détection et la limite de quantification [69] (Tableau II. 2).

Tableau II. 2. Critères de la validation en fonction du type d'analyse [69].

Type de tests caractéristiques	**Dosage**	**Impuretés**		**Identification**	**Dosage bio-analyse**
		Qualitatif	**Essais limites**		
Exactitude	✓	✓			✓
Fidélité Répétabilité	✓	✓			✓
Fidélité Fidélité intermédiaire	✓	✓			✓
Spécificité-sélectivité	✓	✓	✓	✓	✓
Limite de détection		✓	✓		✓
Limite de quantification		✓			✓
Linéarité	✓	✓			Fonction de réponse
Intervalle de mesure	✓	✓			✓
Robustesse	✓	✓	✓		✓

II.7.1 Spécificité-sélectivité

À chaque étape du développement, la technique analytique doit démontrer sa spécificité. La technique doit avoir le pouvoir d'évaluer de manière irréfutable l'analyte d'intérêt en présence de tous les composants attendus, qui peuvent inclure les dégradants, les excipients/la matrice de l'échantillon et les pics blancs de l'échantillon. La spécificité a été réalisée pour déterminer le temps de rétention de chaque médicament dans un mélange et dans l'échantillon [70,71].

II.7.2 Linéarité

Linéarité se rapporte à la relation entre les concentrations calculées à l'aide de la fonction d'étalonnage et les concentrations théoriques. La linéarité d'une procédure analytique exprime sa capacité, dans une plage donnée, à obtenir des résultats de test directement proportionnels à la concentration (quantité) de l'analyte dans l'échantillon. L'étude de la linéarité est en fait une évaluation du biais de justesse [72].

II.7.3 Fidélité (répétabilité et fidélité intermédiaire)

La fidélité d'une procédure analytique exprime la proximité des accords (degré de dispersion) entre un groupe de mesures obtenues à partir de différents échantillonnages d'un même échantillon dans des conditions prescrites. Elle est généralement exprimée en termes de variance, d'écart-type ou de coefficient de variation d'une série de mesures [73].

- ***Répétabilité :*** Cela exprime la précision en dessous de conditions de fonctionnement similaires sur une brève période de temps, également désignée sous le nom de précision intra-analyse. Un minimum de six préparations d'essai répétées d'un échantillon similaire ou cohérent est prêt lors de la vérification à 100% [74].
- ***Fidélité intermédiaire :*** Elle exprime l'exactitude dans les laboratoires de recherche, sur des jours différents, avec des analystes différents, sur des instru-ments/équipements différents. Deux analystes différents préparent chacun six solu-tions d'échantillons, selon la méthode spécifiée [75].
- ***Reproductibilité :*** Il fait référence à la précision entre différents laboratoires analytiques. Chaque installation de recherche établit un ensemble de six solutions d'échantillons, selon la technique analytique [71].

II.7.4 Justesse (biais)

La justesse exprime la différence entre un ensemble de valeurs mesurées et une valeur de référence. La vraie valeur de la justesse est déterminée par rapport à un matériau de référence certifié (MRC). Dans le cas d'absence de MRC, une valeur qui est acceptée comme une valeur conventionnellement vraie peut être utilisée [76].

II.7.5 Exactitude

L'exactitude exprime la proximité de l'accord entre la valeur acceptée soit comme une valeur vraie conventionnelle soit comme une valeur de référence acceptée et la valeur trouvée [77].

II.7.6 Sensibilité

La sensibilité d'une procédure d'analyse est le rapport de la variation de la réponse de la méthode d'analyse à la variation de la quantité d'analyte [78].

II.7.7 Robustesse

Qualité d'une méthode capable de donner des résultats d'une exactitude et d'une précision acceptables dans des conditions diverses [79].

II.7.8 Limite de détection

C'est la plus faible quantité ou concentration d'une substance à analyser qui puisse être détectée avec une certitude suffisante [77].

II.7.9 Limite de quantification

C'est la quantité ou la concentration minimale d'une substance à analyser qui puisse être dosée avec une certitude suffisante [78].

II.8 APPROCHES DE VALIDATION

II.8.1 Approche descriptive

L'approche descriptive de la validation, la plus répandue, évalue une méthode de dosage selon sa fidélité et sa justesse. Bien qu'elle soit simple, elle ne permet pas de gérer le risque si elle est utilisée seule [60].

II.8.2 Approche globale

L'approche globale de la validation, basée sur l'erreur totale, utilise des critères objectifs pour minimiser la différence entre le résultat rendu et la vraie valeur, selon une limite d'acceptation définie par l'analyste. Elle permet aux laboratoires de valider leurs méthodes et d'estimer leur incertitude de mesure associée [60].

II.8.3 Approche de capabilité

L'approche de capabilité est un indicateur de qualité utilisé dans l'industrie pour évaluer la performance régulière des méthodes analytiques, visant à éviter le rejet injustifié de produits acceptables en raison d'erreurs de dosage [80].

II.9 ETAPES DE VALIDATION

Les 10 étapes pour valider une méthode avec le profil d'exactitude incluent d'abord la disposition du mode opératoire et la définition du mesurande, puis le choix du domaine de validation (gamme de concentration) et la précision de l'objectif attendu de validation (limite d'acceptabilité). Ensuite, il est nécessaire de sélectionner les échantillons de validation et d'établir leur valeur de référence. Après cela, il faut planifier les essais de validation en déterminant le nombre de séries, de répétitions et les niveaux de validation, ainsi que planifier l'étalonnage avec des critères similaires. Une fois la planification terminée, il est nécessaire de réaliser les essais et de calculer les concentrations prédites inverses. À la suite de ces calculs, il est requis de calculer les critères de validation et de construire le profil d'exactitude, ce qui permet de visualiser la performance de la méthode. Enfin, il est indispensable d'interpréter les résultats obtenus afin de décider si la méthode est valide ou non.

1	Disposer du mode opératoire et définir le mesurande.
2	Choisir le domaine de validation (gamme de concentration) et préciser l'objectif attendu de validation (limite d'acceptabilité)
3	Sélectionner les échantillons de validation et leur établir une valeur de référence)
4	Planifier les essais de validation (choisir le nombre de e séries, répétitions et niveaux de validation)
5	Planifier l'étalonnage (choisir le nombre de séries, répétitions et niveaux de l'étalonnage)
6	Réaliser les essais
7	Calculer les concentrations prédites inverses
8	Calculer les critères de validation
9	Construire le profil d'exactitude
10	Interpréter les résultats et décider si la méthode est valide ou non

Figure II. 2. Schéma représentative des 10 étapes de la validation d'une méthode analytique.

II.10 CRITERES DE CHOIX DE LA VALIDATION ANALYTIQUE

Divers critères de validation existent, et leur sélection dépend de la méthode d'analyse utilisée, qu'elle soit qualitative ou quantitative. Bien que ces critères ne soient pas nécessairement complètement détaillés pour chaque méthode, il est impératif de justifier et de mentionner toute omission dans le rapport de caractérisation et de validation de la méthode d'analyse. Ces critères sont évalués et classés en fonction du problème spécifique, avec comme objectif principal d'obtenir des informations pertinentes à moindre coût. Ainsi, le choix d'une méthode d'analyse constitue en lui-même un problème analytique à résoudre en suivant une démarche méthodique, impliquant une formulation précise du problème initial et sa traduction en termes d'analyses à réaliser [81].

Tableau II. 3. Caractéristiques de performance à déterminer pour les méthodes qualitatives et les méthodes quantitatives [61].

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

Sans objet : caractéristique non pertinente.
(X) : les caractéristiques inscrites entre parenthèses sont recommandées.

Les caractéristiques énumérées dans le tableau II.3 constituent le niveau minimum nécessaire pour caractériser pleinement la méthode. Cependant, selon les normes applicables au domaine en question, d'autres caractéristiques pourraient être requises, telles que la robustesse ou l'exactitude relative [61].

II.11 CHOIX DU PROTOCOLE DE VALIDATION

Le guide SFSTP propose plusieurs protocoles pour la validation des méthodes d'analyse, en mettant l'accent sur l'étude de la sélectivité et de la spécificité. Le choix du protocole dépend de la connaissance préalable de la méthode, obtenue en étudiant son domaine d'application en termes de types de matrices et de niveaux de concentrations. En l'absence de cette connaissance,

une vérification préalable sera nécessaire. Toutes les données de la phase de validation doivent être documentées de manière détaillée dans un rapport, et la procédure analytique doit être décrite de manière exhaustive sous forme d'un protocole standardisé avant son utilisation régulière. Les principaux objectifs de la phase de validation incluent la démonstration de la spécificité, la détermination de la fonction de réponse, l'estimation de la précision et de la fidélité, la définition des limites de quantification, la détermination de l'intervalle de dosage, et la vérification de la linéarité de la procédure analytique.

II.12 PLANIFIER LES ESSAIS DE VALIDATION

II.12.1 Organiser les essais

Le plan d'expérience de validation conçu pour estimer les performances d'une méthode dans des conditions réelles d'utilisation en routine. Chaque essai implique la mesure d'un échantillon de validation, idéalement avec une valeur de référence connue et une incertitude maîtrisée. Pour mettre en œuvre ce plan, il est nécessaire de prévoir :

- I séries de mesures ($1 \leq i \leq I$) ;
- Pour chaque série, effectuer J répétitions ($1 \leq j \leq J$) :
- K niveaux de concentration ($1 \leq k \leq K$) couvrant le domaine d'application de la méthode.

Les échantillons de validation sont caractérisés par des valeurs de référence X_k exprimées en quantités absolues (mg, g, log ...) ou relatives (mg/mg, µmg/mg, mg/l, ...). Dans le cas des méthodes indirectes, la réponse Y est enregistrée dans une unité correspondant à celle de l'instrumentation utilisée (surface du pic, hauteur du pic, absorbance, ...). Pour les méthodes directes, la réponse est exprimée dans la même unité que les valeurs de référence, assurant ainsi une comparaison directe et précise des résultats obtenus [59].

Tableau II. 4. Organisation des mesures du plan de validation [59].

Niveaux	**Série (Jour)**	**Concentration échantillons de validation (valeurs de référence) X**	**Réponses instrumentales Y**			
			1	2	…	J
1	1	X_{11}	X_{111}	Y_{121}	…	Y_{1J1}
	…	…				
	I					
2	1					
	…					
	I					
…	…					
K	1					
	…	…				
	I	X_{1K}			…	Y_{1JK}

II.12.2 Choisir le nombre de séries, de répétitions et de niveaux de validation

Le choix du nombre de séries, de répétitions et de niveaux de validation est crucial dans le processus de validation des méthodes analytiques. Selon les directives de l'ISO 5725-1 et de l'IUPAC, pour une étude inter-laboratoires, il est recommandé d'avoir un nombre de séries (I) supérieur ou égal à 8 pour une reconnaissance scientifique. Cependant, pour une validation interne, des exigences minimales peuvent être fixées : au moins 3 séries (I), 2 répétitions constantes par série et par niveau (J), et au moins 3 niveaux de concentration (K) pour vérifier la linéarité entre les valeurs de référence et les valeurs mesurées. Il est conseillé d'opter pour $K \geq 4$ lorsque la validation est proche de la limite de quantification. En choisissant $I = 3$, $J = 2$ et $K = 3$, le plan de validation comprendrait 18 essais. Il est essentiel de maintenir un équilibre entre le nombre de séries, de répétitions et de niveaux pour obtenir des estimations précises des critères de validation et une confiance accrue dans les résultats [59].

II.12.3 Réaliser les essais

Pour réaliser les essais de validation, il est crucial de suivre rigoureusement la méthode telle qu'elle sera appliquée en pratique, en respectant scrupuleusement les conditions d'étalonnage, même si des ajustements peuvent être nécessaires en fonction des résultats du profil d'exactitude. Par exemple, si des effets de matrice sont observés pendant le développement de la méthode, plusieurs plans de validation peuvent être requis pour déterminer un facteur de correction à appliquer de manière routinière. Dans ce cas, deux plans de validation indépendants

doivent être réalisés, et les résultats du premier plan sont utilisés pour calculer le facteur de correction utilisé dans le second plan.

Le profil d'exactitude joue un rôle crucial dans l'évaluation de la confiance que l'utilisateur peut avoir dans la capacité de la méthode à produire des résultats acceptables en pratique. Ainsi, la mise en œuvre des plans de validation doit respecter des conditions rigoureuses pour garantir une validation efficace et fiable. Ces conditions comprennent :

a) Exigences d'être en condition de fidélité intermédiaire

Il est essentiel que les mesures soient effectuées dans des conditions de fidélité intermédiaire ou de reproductibilité afin de prendre en compte un maximum de sources d'incertitude. Étant donné que ces sources d'incertitude varient en fonction de la méthode et des matrices analysées, il n'existe pas de stratégie universelle. Il est recommandé de créer un diagramme causes/effets pour sélectionner les conditions les plus exhaustives. Dans la plupart des situations, il peut être judicieux d'effectuer les mesures sur plusieurs jours afin de prendre en compte les incertitudes liées à l'appareillage (réglages et préparation des réactifs), à l'étalonnage, au personnel et à la conservation des échantillons. Cependant, pour des échantillons très instables, il peut être préférable de réaliser les mesures sur une seule journée en impliquant plusieurs opérateurs ou instruments.

b) Exigences de couvrir le domaine d'application

Pour assurer la validation complète d'une méthode, il est nécessaire de couvrir l'ensemble des applications possibles. Ainsi, plusieurs approches peuvent être utilisées pour répondre à cette exigence tout en ayant suffisamment d'échantillons pour effectuer les mesures nécessaires. Ces approches incluent l'utilisation d'un seul échantillon avec des concentrations variables, l'utilisation de multiples échantillons présentant diverses concentrations, la création de matrices synthétiques et l'utilisation de matériaux de référence certifiés.

c) Exigences de synchroniser les plans

Lorsque deux plans sont requis, pour l'étalonnage et la validation, il est impératif de réaliser les essais dans des conditions de fidélité intermédiaire identiques. Par exemple,

si la variation est attribuée au jour, il est nécessaire d'effectuer les mesures d'étalonnage et de validation le même jour. Les données d'étalonnage de ce jour seront utilisées pour prédire les concentrations à partir des données de validation collectées également ce jour-là [59].

II.13 ÉTUDES STATISTIQUE DE LA VALIDATION ANALYTIQUE

La validation des techniques analytiques implique l'évaluation de plusieurs critères tels que la spécificité, la linéarité, l'exactitude, la fidélité, les limites de quantification et de détection. Cette approche suit les lignes directrices établies par la SFSTP et l'ICH Q2(R1), en se basant notamment sur le profil d'exactitude. Ce dernier offre une représentation graphique intégrant de manière statistiquement rigoureuse tous les éléments clés de la validation, simplifiant ainsi le processus tout en maîtrisant les risques associés à l'utilisation de la méthode analytique [82].

II.13.1 Spécificité

La spécificité est vérifiée en s'assurant que, pour les matières premières, le signal n'est pas altéré par l'ajout intentionnel de produits chimiquement similaires, et pour les produits finis, les substances autres que celle à doser ne produisent aucun signal comparable. Une approche empirique consiste à comparer les chromatogrammes de quatre solutions : le diluant (solution standard sans matrice), la solution placebo (matrice seule), la solution standard à 100% préparée dans le diluant, et la solution placebo rechargée à 100% (forme reconstituée). Idéalement, le signal produit par la solution placebo doit être nul, et les signaux des solutions standards à 100% et de l'échantillon à 100% doivent être similaires et comparables. Les chromatogrammes des solutions du diluant et du placebo ne doivent pas présenter de pic au même temps de rétention que l'analyte, tandis que les chromatogrammes de la solution standard à 100% et de l'échantillon doivent être comparables.

Etude statistique

La spécificité peut être démontrée de deux manières : d'abord, en comparant les chromatogrammes de quatre solutions préparées, où les chromatogrammes de la solution standard à 100% et de l'échantillon à 100% doivent présenter des pics de rétention similaires avec des surfaces comparables, tandis que les chromatogrammes du diluant et du placebo ne doivent pas montrer de pic de rétention au même temps que le diclofénac de sodium ; ensuite, en comparant la droite obtenue à partir de la matrice (forme reconstituée) avec celle obtenue à partir de la gamme standard, ce qui indique l'absence d'effet matrice, c'est-à-dire aucune

interaction entre le milieu et la substance à quantifier. La comparaison des droites repose sur le test t de Student (Equation II. 1) selon une stratégie statistique permettant de rechercher un effet matrice et/ou une erreur systématique, en vérifiant la spécificité de la méthode pour le dosage du principe actif seul et pour la forme reconstituée [61].

Le test t de Student permet de comparer les pentes des droites de régression obtenues à partir des standards et de la forme reconstituée pour vérifier l'absence d'effet matrice. Si les pentes sont similaires, leur différence devrait être égale à zéro. La formule utilisée pour le calcul est la suivante :

$$t_{calculé} = \frac{|a_1 - a_2|}{\sqrt{\sigma_{a_1}^2 + \sigma_{a_2}^2}} \qquad \text{(II.1)}$$

Où a_1 et a_2 représentent respectivement les pentes des droites de régression D1 (obtenue à partir de la gamme standard) et D2 (obtenue à partir de la gamme placebo chargé), et $\sigma_{a_1}^2$ et $\sigma_{a_2}^2$ sont les variances de ces pentes. Le $t_{calculé}$est comparé à la valeur critique $t^0(\alpha\,;\, n_1 + n_2 - 4)$ lue sur la table de Student, où α est le risque d'erreur accepté (généralement 5%) et $n_1$et n_2 sont les nombres d'échantillons réalisés pour la forme standard et la forme placebo chargé, respectivement. Le degré de liberté est $n_1 + n_2 - 4$.

Si $t_{calculé}$ est inférieur à t^0, cela indique que les pentes sont comparables, signifiant l'absence d'effet matrice et confirmant que la méthode est spécifique. En d'autres termes, cette comparaison statistique permet de vérifier si la méthode analytique peut mesurer la substance d'intérêt sans interférence significative de la matrice, assurant ainsi la fiabilité et la précision des résultats obtenus pour la substance à quantifier, que ce soit dans la forme standard ou reconstituée.

Après avoir vérifié la spécificité de la méthode analytique, deux ensembles de standards sont préparés :

- **Les standards d'étalonnage (SE) :** ce sont des solutions à des concentrations connues, préparées à partir de la substance à mesurer dans un milieu contenant ou non la matrice, selon qu'il y ait ou non un effet de la matrice. Ces solutions sont utilisées pour tester les différentes fonctions de réponse : la réponse de l'appareil en fonction de la concentration (quantité) de la substance. Cela implique la préparation de 30 solutions, réparties en 5 niveaux de concentrations, avec chaque niveau répété deux fois, sur trois séries (5×2×3).

- **Les standards de validation (SV) :** ce sont des solutions à des concentrations connues, préparées obligatoirement avec la matrice. Ces solutions visent à évaluer les différents aspects de la méthode, y compris les prédictions inverses, à chaque niveau de concentration. Cette procédure dépend du protocole de validation sélectionné. Cela nécessite la préparation de 45 solutions, réparties en 5 niveaux de concentrations, avec chaque niveau répété trois fois, sur trois séries (5×3×3).

Le logigramme de la Figure II. 3 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 [83].

Le Tableau II. 5 qui suit résume les différents protocoles de validation. Il présente également les types de standards (SE, SV), niveaux de concentration à utiliser en fonction de protocole choisi ainsi le nombre total d'essais à réaliser pour valider la méthode. Le protocole adopté dans notre étude est le V2 : en utilisant cinq niveaux de concentration au lieu de trois pour les SE et les SV.

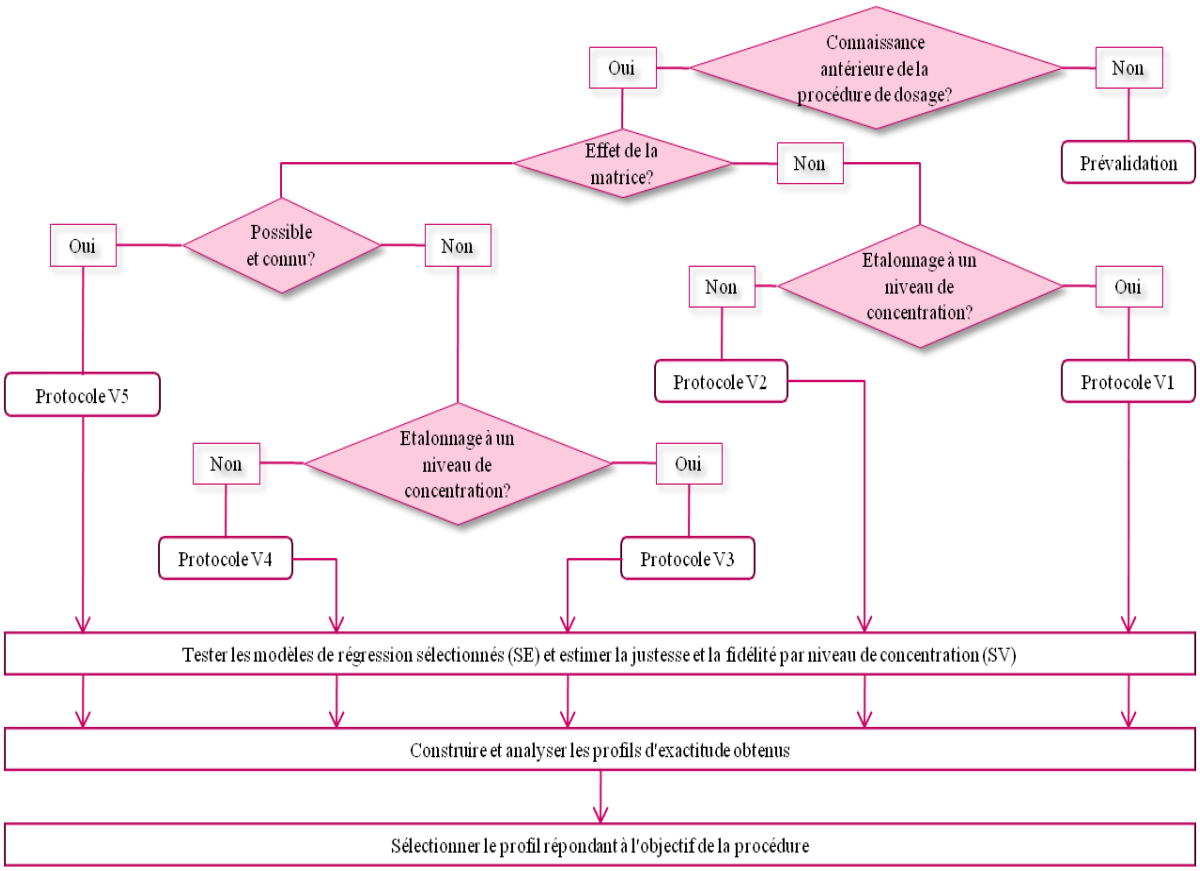


Figure II. 3. L'organigramme permettant de sélectionner un protocole de validation.

Tableau II. 5. Choix du nombre des standards d'étalonnage et de validation en fonction du protocole choisi [83].

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

II.13.2 Fonction de réponse

La relation entre la réponse instrumentale Y et la concentration de l'analyte X est établie en utilisant les résultats des expériences menées sur les standards d'étalonnage (SE) [84]. Dans l'équation II. 2, la fonction f qui lie les réponses expérimentales aux concentrations doit être strictement monotone, c'est-à-dire qu'elle doit être soit strictement croissante, soit strictement décroissante sur l'intervalle de dosage spécifié.

$$Y = f(X) + \varepsilon \qquad \text{(II.2)}$$

Ou ε représente l'erreur associée à la fonction de réponse f, également appelée erreur résiduelle. Ainsi, il est nécessaire d'ajuster la fonction de réponse en évaluant les paramètres du modèle de manière à minimiser cette erreur résiduelle.

Différentes fonctions de réponse sont utilisées pour valider une méthode de dosage, chacune adaptée à un type spécifique de méthode. Pour les méthodes physicochimiques, une fonction linéaire est souvent privilégiée, ce qui se traduit par une droite passant par l'origine ou non. Pour les méthodes bioanalytiques, une fonction quadratique est préférable. En ce qui

concerne les immuno-dosages, l'utilisation de fonctions logistiques à 4 ou 5 paramètres est recommandée [84].

Tableau II. 6. Exemple de fonction de réponse[84].

Type	Équation	Paramètre	Linéaire
Droite passant par l'origine	$Y = \beta X$	Pente β	Oui
Fonction linéaire	$Y = \alpha + \beta X$	Ordonnée à l'origine α Pente β	Oui
Fonction quadratique	$Y = \alpha + \beta X + \gamma X^2$	α, β, γ	Oui
Fonction logistique à 4 paramètres	$Y = \alpha + \frac{\delta - \alpha}{1 + \left(\frac{X}{\gamma}\right)^{\beta}}$	$\alpha, \beta, \gamma, \delta$	Non
Fonction logistique à 5 paramètres	$Y = \alpha + \frac{\delta - \alpha}{1 + \left[\left(\frac{X}{\gamma}\right)^{\beta}\right]^{\Psi}}$	$\alpha, \beta, \gamma, \delta, \Psi$	Oui

Il est probable que la plupart des méthodes physicochimiques utilisent une droite pour leur fonction de réponse, qu'elle passe par zéro ou non. Pour les méthodes bios analytiques, une fonction quadratique pourrait être considérée dans certaines situations. Pour les immuno-dosages, les fonctions logistiques à 4 ou 5 paramètres sont préférées [85]. Trois modèles mathématiques sont choisis, à savoir :

- Droite linéaire
- Droite linéaire passant par l'origine
- Droite linéaire passant par zéro et un point de la gamme qui est le 100% :

Pour chaque modèle mathématique, il est essentiel de calculer la pente, l'ordonnée à l'origine, le coefficient de détermination et l'erreur résiduelle. Il est impératif que le coefficient de détermination R^2 soit supérieur à 0.99. Cependant, il convient de noter que ce coefficient ne fournit pas une indication fiable de la qualité des résultats obtenus par la méthode d'analyse.

II.13.3 Alignement des observations

Le protocole d'alignement implique de réajuster les réponses observées pour les aligner sur la concentration moyenne. Étant donné l'indépendance des pesées, cette étape est fondamentale car les quantités introduites ne sont pas uniformes pour toutes les séries, même pour un niveau de concentration spécifique. Ce processus est indispensable pour calculer la variance, ce qui permet d'évaluer la répétabilité et la fidélité intermédiaire [84].

L'alignement concerne les réponses obtenues avec les échantillons de validation en utilisant les équations ou les fonctions de réponse issues des standards d'étalonnage. Ces standards peuvent être réalisés avec ou sans la matrice (en l'absence d'un effet matrice prouvé). Ils sont utilisés pour évaluer différentes fonctions de réponse $y = f(x)$ en vue d'effectuer des prédictions inverses.

L'objectif de l'interpolation est d'ajuster la réponse observée en ajoutant 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. Pour n_{ij} répétitions du niveau de concentration *j* de la série i, l'alignement se traduit par la relation suivante (Equation II. 3) :

$$Y_{ijk,c} = Y_{ijk} + f(\bar{X}_{ij}) - f(X_{ijk}) \quad \text{(II.3)}$$

Avec : $Y_{ijk,c}$ est la réponse alignée ; Y_{ijk} est la réponse obtenue ; β_i est la pente de la fonction de réponse testée avec les «SE» ; $\bar{X}_{ij}$ est la moyenne des concentrations introduites du niveau *j* de la série i ; et X_{ijk} est la concentration introduite du niveau *j* de la série i pour la répétition k.

Le Tableau II. 7 ci-dessous établit les règles d'alignement des réponses pour les fonctions usuelles.

Tableau II. 7. Les règles d'alignement pour différentes fonctions de réponse[86].

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

II.13.4 Prédiction inverse

Les prédictions inverses servent à déterminer les concentrations calculées à partir des résultats de la validation. Elles peuvent être définies en tant que forme inverse des fonctions de réponse de la courbe d'étalonnage [87]. La formule utilisée est définie de la manière suivante (Equation II. 4) :

$$x_{calc} = f^{-1}(y) \tag{II.4}$$

Le Tableau II.8 présenté ci-dessous énonce les prédictions inverses pour diverses fonctions de réponse.

Note :

- Si les observations ont été alignées, il convient de remplacer les valeurs de Y_{ijk} par celles de $Y_{ijk,c}$ dans le Tableau II. 8.
- Si une transformation a été utilisée il est demandé de réaliser les transformations inverses 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 tel que illustre le Tableau II. 9 [86].

Tableau II. 8. Calcul des prédictions inverses pour différentes fonctions de réponse [87].

Type de la fonction de réponse	Equation
Droite passant par 0	$x_{ijk,calc} = \frac{y_{ijk}}{\hat{\beta}_i}$
Droite (ne passant par 0)	$x_{ijk,calc} = \frac{y_{ijk} - \hat{\alpha}_i}{\hat{\beta}_i}$
Fonction quadratique	$x_{ijk,calc} = \frac{-\hat{\beta}_i + \sqrt{\hat{\beta}_i^{\,2} - 4\hat{\gamma}_i(\hat{\alpha}_i - y_{ijk})}}{\hat{\beta}_i}$
Fonction logistique à 4 paramètres	$x_{ijk,calc} = \hat{\gamma}_i \left(\frac{\hat{\delta}_i - \hat{\alpha}_i}{y_{ijk} - \hat{\alpha}_i} - 1 \right)^{\frac{1}{\hat{\beta}_i}}$
Fonction logistique à 5 paramètres	$x_{ijk,calc} = \hat{\gamma}_i \left(\left(\frac{\hat{\delta}_i - \hat{\alpha}_i}{y_{ijk} - \hat{\alpha}_i} - 1 \right)^{\frac{1}{\hat{\psi}_i}} \right)^{\frac{1}{\hat{\beta}_i}}$

Tableau II. 9. Calcul des prédictions inverses pour la droite ayant subi une transformation logarithmique ou racine carrée[87].

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

II.13.5 Justesse

Le protocole pour évaluer la justesse repose sur les concentrations calculées à partir des standards de validation lors de la phase de validation. Ces derniers doivent systématiquement être préparés avec la matrice concernée [84].

L'étude statistique permet de déterminer la justesse, également connue sous le nom de biais de méthode au niveau de la concentration, en calculant la différence entre la moyenne arithmétique des concentrations introduites et la moyenne des concentrations calculées (Equations II. 5-6). Elle peut être exprimée en valeurs absolues, relatives ou en termes de recouvrement (Equations II. 7) par rapport aux quantités introduites concentrations calculées [84].

$$biais_j = \hat{\mu}_j - \bar{x}_j \quad \text{(II.5)}$$

$$biais(\%)_j = 100 \times \frac{\hat{\mu}_j - \bar{x}_j}{\bar{x}_j} \quad \text{(II.6)}$$

$$Recouvrement(\%)_j = 100 \times \frac{\hat{\mu}_j}{\bar{x}_j} \quad \text{(II.7)}$$

Avec : $\hat{\mu}_j$ soit la Moyenne des concentrations prédites et $\bar{x}_j$ est la moyenne des concentrations introduites.

II.13.6 Fidélité

Le protocole pour évaluer la fidélité repose également sur les concentrations calculées à partir des standards de validation, lesquels doivent toujours être préparés avec la matrice concernée [87]. L'erreur expérimentale est considérée comme étant indépendante de la série d'observations. Elle est une variable aléatoire qui suit une distribution normale, avec une

moyenne de 0 et une variance de $\sigma^2_{w,j}$ (Equation II. 8). La variance de répétabilité est estimée par l'évaluation de la variance intra-série (Equation II. 9).

$$Répétabilité : \hat{\sigma}^2_{Re,j} = \hat{\sigma}^2_{w,j} \quad \text{(II.8)}$$

$$CV_{répétabilité} = 100 \times \frac{\hat{\sigma}_{w,j}}{\bar{x}_{j,calc}} \quad \text{(II.9)}$$

La variance de fidélité intermédiaire (Equation II. 10) est obtenue en additionnant les estimations des variances intra et inter-série.

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

$$CV_{répétabilité} = 100 \times \frac{\hat{\sigma}_{w,j}}{\bar{x}_{j,calc}} \quad \text{(II.10)}$$

Il est à souligner qu'à chacun des J niveaux de concentration pris en considération, une estimation statistique est effectuée selon le modèle suivant (Equation II. 11) :

$$X_{ijk} = \mu_j + \alpha_{ij} + \varepsilon_{ijk} \quad \text{(II.11)}$$

Avec : X_{ijk}est la $k^{ième}$ concentration calculée du niveau j de la $i^{ème}$ concentration. μ_j est la moyenne des concentrations calculées du niveau de concentration j. α_{ij} est l'écart entre la moyenne de la $i^{ème}$ série et la moyenne μ_j. Au niveau j_{aij} comme une variable aléatoire ayant une distribution normale de moyenne 0 et $\hat{\sigma}^2_{B,j}$ et ε_{ijk} est l'erreur expérimentale.

La méthode du maximum de vraisemblance restreinte est utilisée pour évaluer, à chaque niveau de concentration j, les paramètres n_j, $\sigma^2_{w,j}$, et $\sigma^2_{B,j}$ des modèles suivant (Equation II. 12-14):

$$\hat{\mu} = \frac{1}{\sum_{i=1}^{p} n_{ij}} \sum_{i=1}^{p} \sum_{k=1}^{n_{ij}} x_{ijk,calc} \quad \text{(II.12)}$$

$$MSM_j = \frac{1}{p-1} \sum_{i=1}^{p} n_{ij} \left(\bar{x}_{ij,calc} - \bar{x}_{j,calc}\right)^2 \quad \text{(II.13)}$$

$$MSE_j = \frac{1}{\sum_{i=1}^{p} n_{ij} - p} \sum_{i=1}^{p} \sum_{k=1}^{n_{ij}} \left(x_{ijk,calc} - \bar{x}_{ij,calc}\right)^2 \quad \text{(II.14)}$$

Si $MSE_j < MSM_j$;

$$\hat{\sigma}^2{}_{W,j} = MSE_j \quad \text{(II.15)}$$

$$\hat{\sigma}^2{}_{B,j} = \frac{MSM_j - MSE_j}{n} \quad \text{(II.16)}$$

Si $MSE_j > MSM_j$;

$$\hat{\sigma}^2{}_{B,j} = 0 \quad \text{(II.17)}$$

$$\hat{\sigma}^2{}_{W,j} = \frac{1}{pn-1}\sum_{i=1}^{P}\sum_{j=1}^{k}(x_{ijk,calc} - \bar{x}_{j,calc})^2 \quad \text{(II.18)}$$

Avec : MSM_j et MSE_j soient les maximums des vraisemblances des moindres carrés pour chaque niveau de concentration j. $x_{ij,calc}$ est la moyenne des concentrations calculées du niveau j de la série i. $x_{ijk,calc}$ est la concentration calculée du niveau j de la série i de la répétition k. $\bar{x}_{j,calc}$ est la moyenne des concentrations calculées du niveau j. n est le nombre de répétitions et p est le nombre de série.

II.13.7 L'exactitude

Le calcul de l'exactitude évalue la concordance entre le résultat d'un essai et la valeur de référence acceptée, également connue sous le nom de valeur conventionnellement vraie, pour chaque mesure. À savoir pour chaque mesure l'exactitude est calculée en pourcentage en utilisant l'Equation II. 19.

$$Exactitude\ (\%) = x - \mu \quad \text{(II.19)}$$

Avec x est la concentration prédite et μ est la concentration introduite.

Pour chaque modèle et observation, l'exactitude de la mesure en valeur relative est exprimée par l'Equation II. 20 :

$$Exactitude\ (\%) = \frac{(x-\mu)}{\mu} \times 100 \quad \text{(II.20)}$$

L'analyse de l'erreur maximale relative observée pour chaque modèle sur l'ensemble des séries illustre déjà l'impact du choix de la fonction de réponse sur l'exactitude des résultats [81].

- **L'erreur totale et profil de l'erreur totale**

Chaque mesure obtenue est la somme de la vraie valeur, du biais de la méthode et de sa fidélité, représentée par les Equations II. 21 et II. 22 :

$$X = \mu + |Biais|_{procédure} + Fidélité\ intermédiaire_{procédure} \quad \text{(II.21)}$$

$$X - \mu = |Biais|_{procédure} + Fidélité\ intermédiaire_{procédure} \quad \text{(II.22)}$$

Ce qui peut être exprimé ainsi par l'Equation 23 :

$$X - \mu = Erreur\ Totale_{procédure} \quad \text{(II.23)}$$

Cette différence représente l'erreur totale de la procédure, évaluant ainsi son aptitude à produire des résultats exacts. L'estimation de cette erreur totale est cruciale pour évaluer la validité de la méthode.

L'erreur totale, comme définie précédemment, est la somme du biais (justesse) et de la fidélité. Elle est étroitement liée aux erreurs maximales observées pour chaque modèle et niveau de concentration. Bien que les erreurs maximales puissent être sensiblement plus grandes que l'erreur totale sur un grand nombre d'observations, elles représentent des événements rares, tandis que l'erreur totale reflète les erreurs les plus grandes attendues dans la plupart des cas.

En examinant la deuxième plus grande erreur, on constate que les points se répartissent bien autour de la bissectrice $y = x$, ce qui démontre que l'estimation de l'erreur totale rend compte des plus grandes erreurs que la méthode peut produire. Ainsi, l'erreur totale d'une procédure analytique est un indicateur fiable de l'exactitude de ses résultats. C'est pourquoi nous proposons ce critère comme première évaluation simple de la procédure analytique [82].

II.13.8 Calcul de l'intervalle de tolérance

L'aspect le plus important de la validation n'est pas la validité des résultats calculés avec l'erreur totale, mais plutôt la garantie ou la représentation des résultats futurs que la même procédure analytique pourrait produire. C'est là où le rôle de l'intervalle de tolérance intervient.

L'estimation des paramètres de justesse et fidélité μ_j, $\sigma^2_{B,j}$, et $\sigma^2_{w,j}$ à chaque niveau de concentration j vise à estimer la proportion attendue d'observations dans les limites d'acceptation prédéfinies $[-\lambda, \lambda]$. Ceci peut être estimer par l'Equation II. 24:

$$E_{\hat{\mu}M,\hat{\sigma}M} = \{[|X - \mu_T| < \lambda]|\hat{\mu}_M + \hat{\sigma}_M|\} \geq \beta \quad \text{(II.24)}$$

L'intervalle de tolérance sera calculé pour chaque niveau de concentration envisagé avec les standards de validation et pour chaque modèle mathématique. Pratiquement, l'intervalle de tolérance se calcule comme suit en valeur absolue (Equations 25-29) :

$$E_{\hat{\mu}M,\hat{\sigma}M} = \{P_x[\hat{\mu}_M + Q_t\hat{\sigma}_M < X < \hat{\mu}_M + Q_t\hat{\sigma}_M|\hat{\mu}_M + \hat{\sigma}_M|]\} = \beta \quad \text{(II.25)}$$

$$\hat{\sigma}^2{}_{FI,j} = \hat{\sigma}^2{}_{W,j} + \hat{\sigma}^2{}_{B,j} \quad \text{(II.26)}$$

$$R_j = \frac{\hat{\sigma}^2{}_{B,j}}{\hat{\sigma}^2{}_{W,j}} \quad \text{(II.27)}$$

$$B_j = \sqrt{\frac{R+1}{nR_j+1}} \quad \text{(II.28)}$$

$$v = \frac{(R+1)^2}{\frac{\left(R+\frac{1}{n}\right)^2}{p-1}+\frac{1-\frac{1}{n}}{pn}} \quad \text{(II.29)}$$

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

Le même intervalle en échelle relative devient (Equation II. 30) :

$$\left[biais(\%)_j - Q_t\left(v;\frac{1+\beta}{2}\right)\sqrt{1+\frac{1}{pnB_j{}^2}}CV_{FI,j}; biais(\%)_j + Q_t\left(v;\frac{1+\beta}{2}\right)\sqrt{1+\frac{1}{pnB_j{}^2}}CV_{FI,j}\right] \quad \text{(II.30)}$$

L'intervalle de tolérance combine deux concepts : la justesse et le coefficient de variation de fidélité intermédiaire, qui sont étroitement liés. Cet intervalle exprime l'exactitude des résultats tout en tenant compte du risque ou de la probabilité associée aux résultats futurs en fonction des résultats passés.

Une méthode est considérée comme précise à un niveau de risque β pour un niveau de concentration donné si son intervalle de tolérance est contenu dans les limites [-λ, +λ], définies en fonction des objectifs spécifiques de la méthode [86].

II.13.9 Profile d'exactitude et décision

Le profil d'exactitude de la méthode est obtenu en reliant d'une part les bornes L_j entre elles ($L_1 \rightarrow L_2 \rightarrow \ldots L_m$) et d'autre part les bornes U_j entre elles (Equations II. 31 et II. 32).

$$L_j = biais(\%)_j - Q_t\left(v;\frac{1+\beta}{2}\right)\sqrt{1+\frac{1}{pnB_j{}^2}}CV_{FI,j} \quad \text{(II.31)}$$

$$U_j = biais(\%)_j + Q_t\left(v; \frac{1+\beta}{2}\right)\sqrt{1 + \frac{1}{pnB_j{}^2}}CV_{FI,j} \quad \text{(II.32)}$$

Si le profil d'exactitude est complètement inclus dans les limites d'acceptation $[-\lambda, +\lambda]$, alors on peut conclure que, dans des conditions de routine, le pourcentage de résultats pour lesquels la différence entre la valeur déterminée X et la valeur vraie V est inférieure, en valeur absolue sera au moins égal à β (Equation II. 33) [61].

$$Prob(|X - V| < \lambda \geq \beta) \quad \text{(II.33)}$$

III.14 LINEARITE

La méthode de dosage est validée pour son caractère linéaire sur l'intervalle de validation en utilisant les résultats des premières répétitions à chaque niveau de concentration, pour les trois séries de validation. La linéarité est évaluée initialement par une comparaison visuelle des graphiques représentant les réponses instrumentales (y) en fonction des concentrations introduites (x), à la fois pour la forme pharmaceutique reconstituée et pour les étalons d'étalonnage. Ensuite, la linéarité de la relation entre les concentrations mesurées (x_{calc}) et les concentrations introduites (x) est analysée en représentant graphiquement la fonction $[x_{calc} = f(x)]$ pour les trois séries de validation simultanément. Une analyse statistique est réalisée sur la droite obtenue, en comparant la pente à la valeur de référence 1 et l'ordonnée à l'origine à la valeur de référence 0, tout en vérifiant l'adéquation de l'ajustement [58].

II.15 LIMITES DE QUANTIFICATION SUPERIEURES ET INFERIEURES

Le profil d'exactitude, basé sur les plages de mesures attendues, permet de déterminer les niveaux de concentration pour lesquels une méthode est capable de produire des résultats acceptables. En effet, l'intersection entre le profil d'exactitude et les limites d'acceptation définit les limites de quantification basse (LQ_{inf}) et haute (LQ_{sup}) de la méthode. Ces limites délimitent l'intervalle de dosage, représentant les valeurs extrêmes pouvant être mesurées avec une précision définie [88].

II.16 LIMITES DE DETECTION

La limite de détection peut être évaluée de deux manières : par examen visuel ou par rapport signal sur bruit. L'examen visuel peut être utilisé avec des méthodes instrumentales ou non

instrumentales. Pour déterminer le rapport signal sur bruit, il est nécessaire de comparer les signaux provenant d'échantillons de faibles concentrations avec ceux des échantillons blancs, en observant la ligne de base de la méthode. Un rapport signal sur bruit de 3/1 à 2/1 est généralement considéré comme satisfaisant pour estimer cette limite [88].

II.17 CONCLUSION

La validation de la conformité est désormais une étape cruciale dans le cycle de vie des méthodes analytiques. Les résultats doivent être examinés dès leur production avant d'être soumis à une validation finale par le responsable du laboratoire, afin de garantir le respect de toutes les étapes de la procédure selon des exigences spécifiques. Après la phase d'amélioration, il est impératif de démontrer, par le biais de vérifications, que la méthode améliorée est conforme à l'usage prévu et fournit des résultats fiables. Cela permettra d'assurer aux laboratoires et aux autorités compétentes que chaque mesure effectuée ultérieurement avec cette méthode se rapprochera suffisamment de la vraie valeur. Il est essentiel que ces techniques soient rapides, faciles à utiliser et maintiennent un haut niveau de qualité. Le concept de vérification a donc considérablement accru l'importance du développement de nouvelles méthodes analytiques, la plupart étant désormais standardisées. Dans les industries chimiques, pharmaceutiques et autres secteurs industriels où la chimie analytique est omniprésente, les méthodes analytiques sont obligatoires pour tous les produits manufacturés.

CHAPITRE III

MATERIELS ET METHODES

III.1 INTRODUCTION

Toute analyse chimique nécessite des procédures de mise au point de méthodes de dosage, d'étalonnage et de validation des résultats. La démarche qualité a pour objectif d'assurer la fiabilité et la traçabilité des résultats. La démarche est appliquée dans ce travail au dosage du Diclofénac Sodique (principe actif) et de l'alcool benzylique (excipient à effet notoire) dans le produit fini CLOFENAL® solution injectable à 75 mg/3 ml en "diclofénac sodique" par deux techniques de pointe : la spectrophotométrie d'absorption UV/VIS et la chromatographie liquide haute performance (HPLC). Le but de ce travail est d'adopter une méthode d'analyse pour le dosage du Diclofénac Sodique (principe actif) et de l'alcool benzylique (excipient à effet notoire) dans le produit fini CLOFENAL. Parce qu'il n'y a pas de références dans ce contexte, telles que la Pharmacopée Britannique (BP) ou la Pharmacopée Américaine (USP), des protocoles établis ont été suivis. L'approche comprend une analyse d'identification et de dosage du principe actif par spectrophotométrie d'absorption UV/VIS et chromatographie liquide à barrette de diodes conformément aux directives de l'USP (Pharmacopée Américaine) pour la solution topique de Diclofénac Sodium, avec des ajustements que nous avons apportés à la méthode de préparation des solutions pour quantifier et identifier l'alcool benzylique.

L'objectif principal de cette étude est d'évaluer statistiquement la validité des méthodes dans le domaine de dosage de 80 % à 120 % et de détailler les procédures d'étalonnage multiparamétrique, de correction des biais et de calcul de l'incertitude en utilisant des étalons, des réactifs et des équipements certifiés. Ces démarches visent à permettre une application en routine, en se basant sur le profil d'exactitude comme critère de décision, conformément au guide de validation élaboré par une commission de la Société Française des Sciences et Techniques Pharmaceutiques (SFSTP) et publié dans STP Pharma Pratique en janvier 2006.

III.2 MATERIELS

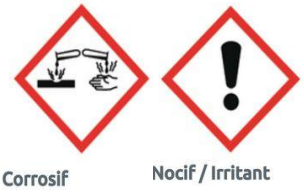
Pour la réalisation de cette étude, divers matériels de laboratoire et produits chimiques sont nécessaires. La liste ci-dessous (Tableau III. 1) présente les équipements et substances utilisés dans les différentes étapes du processus expérimental.

Tableau III. 1. Matériels et produits utilisés pour la validation du CLOFENAL®.

Matériels	**Produits**
Fioles jaugées : 10ml, 25ml, 50ml, 250ml, 1000ml ; Béchers ; Erlenmeyer ; Eprouvette : 1000ml ; Pipettes graduées : 10ml, 20ml ; Pipettes jaugées : 2ml, 5ml ; Micropipette : 1ml ; Entonnoirs ; Poires ; Pissettes ; Spatules ; Verre de montre ; Compte-gouttes ; Papier aluminium ; Flacons pour phase mobile ; Mortier ; Barreau magnétique ; Filtres millipores ; Agitateur magnétique ; Balance analytique ; Distillateur ; pH-mètre ; HPLC ; Vials ; Colonne ; Pompe à vide ; UV-vis ; Ampoule à décanter ; Etuve ; Bain Ultrasons ;	Déclofinac sodique ; Alcool benzylique ; CLOFENAL (solution injectable 75mg/3ml) ; Mannitol ; Metabisulfite de Sodium ; Propylen Glycol ; Hydroxyde de Sodium ; Eau distillé ; Eau purifié ; Hydroxyde de soduim 1N ; Méthanol "grade HPLC" ; Acide orthophosphorique (pour analyse) ; Phosphate de sodium monobasique dihydraté ; Méthanol (pour analyse) ;

Les solvants et les réactifs utilisés sont tous de pureté chromatographique et analytique. Le tableau III.2 regroupe les différents réactifs utilisés pour réaliser cette validation.

Tableau III. 2. Les réactifs utilisés dans le présent travail.

Réactifs	Propriétés physicochimique	Précaution d'emploi
Méthanol (grade HPLC)	Formule brute : CH_4O M : 32,04 g/mol, ρ : 0,8g/cm^{-3} Pureté : 99,80% Producteurs : Fisher Scientifique N° LOT : 2183806 Date de péremption : 02-06-2024	
Acide orthophosphorique (pour analyse)	Formule brute : H_3PO_4 M : 98 g/mol, ρ :1,71…1.87 g/cm³ Pureté : 85,00% Producteurs : PanReac N° LOT : 0001669230 Date de péremption : 01-2025	
Phosphate de Sodium monobasique dihydraté	Formule brute : NaH_2PO_4 M : 119.98 g/mol, ρ :1.915 g/cm^3 Pureté : ≥99,00% Producteurs : TITAN BIOTECH LTD N° LOT : C6F8LP01 Date de péremption : 12-2025	Aucun
Méthanol (pour analyse)	Formule brute : CH_4O M : 32,04 g/mol, ρ : 0,8g/cm^{-3} Pureté : ≥99,70% Producteurs : Honeywell N° LOT : K0910 Date de péremption : 31-03-2025	
Eau Distillé	Formule brute : H_2O M : 18 g/mol, ρ : 1 g/cm^{-3} Producteurs : Site de production Médéa	Aucun
NaOH 1N	Formule brute : NaOH M : 40 g/mol, ρ : 2,13g/cm^3 Pureté : ≥98% Producteurs : PanReac Applichem N° LOT : 40869895	

Les matières premières et les étalons internes (standards de référence) sont regroupés dans les tableaux III.3 et III.4, respectivement.

Tableau III. 3. Les matières premières utilisées dans le présent travail.

Matières		**N° LOT**	**Fabriquant**	**Pureté**	**Date de péremption**
Principe actif	Diclofénac Sodium	301201226-53w	HENAN DONGTAI PHARM	100.2% Stq	25/12/2025
Excipient	Alcool benzylique	K55129787	MERCK	99.90% Stq	31/08/2024
	Propylène glycol	23481647G0	POLYPHARMA	/	11/2024
	Meta-bisulfite de sodium	220505	STRM	99.50% Stq	02/2024
	Mannitol	2304022	Shijiazhuang Huaxu Pharmaceutical CO,LTD Laboratory	/	/
	Eau Pour Préparation Injectable	/	Site de production Médéa	/	/

Tableau III. 4. Les étalons de références utilisées dans le présent travail.

Etalon	**Pureté**	**Reference**	**N° LOT**
Diclofénac Sodique	100%	EDQM et USP Lot N°4.1	4.1
Alcool Benzylique	100%	USP	R097X0

Les appareils utilisés pour la réalisation des validations sont regroupés dans le Tableau III. 5.

Tableau III. 5. Les appareillages utilisés dans le présent travail.

Appareils	Marque	Référence	Date de qualification
Appareille UV/Vis	PerkinElmer	Interne (SAIDAL)	12/08/2023
Appareille HPLC DAD	Shimadzu SPD – M2QA230V (logiciel lab-solution)	MU.SP-MED.LCQ.PC.053	24/11/2023
Balance analytique	Radwag	IMP.10 (PR.G.DSMQ.01)	12/07/2023
Agitateur magnétique	Velp Scientifica	MO.SP-MED.LQ.PC.031	/
Bain Ultrason	Selectr	MU.SP-MED.LOQ.PC.031	10/09/2023
PH mètre	Metrohm	Y9344	/
Colonne : C8 : (25 Cm x4,6 mm) 5 µm.	/	/	/
Pompe à vide et dispositif de filtration sous vide	/	/	/

III.3 METHODES

III.3.1 Méthode par spectrophotométrie d'absorption UV/vis

Ce travail présent l'étude de spécificité de la méthode d'identification et du dosage du principe actif Diclofénac Sodique dans le produit fini CLOFENAL® par spectrophotométrie d'absorption UV/VIS selon le protocole décrit ci-dessous. La composition du produit inclut la forme pharmaceutique et son aspect, qui est une solution incolore, limpide et sans particules en suspension. Le principe actif, Diclofénac Sodique, est dosé à 75 mg/3 ml. Les excipients comprennent du mannitol, du métabisulfite de sodium, de l'alcool benzylique, du propylène glycol, de l'hydroxyde de sodium et de l'eau pour préparation injectable. La formule centésimale du CLOFENAL® solution injectable à 75 mg/3 ml est détaillée dans le Tableau III.6, qui spécifie les quantités de chaque matière première par ampoule

Tableau III. 6. CLOFENAL®, solution injectable à 75 mg/3ml.

Matières premières	Formule centésimale %/ampoule
Diclofénac Sodique	2.5
Mannitol	0.6
Métabisulfite de Sodium	0.066
Alcool Benzylique	4.0
Propylene Glycol	20.0
Hydroxide de Sodium	Qsp pH (8.0-9.0)
Eau pour préparation injectable Qsp	3.00 ml

Les matières et réactifs utilisés dans cette étude incluent le produit fini CLOFENAL® solution injectable Lot N° 560/1F1, le standard de référence Diclofénac Sodique USP Lot N°4.1, et un placebo (préparation d'un mélange sans Diclofénac Sodique).

a) Identification de la Diclofénac Sodique par UV/vis

Les solutions préparées lors du dosage sont utilisées pour une analyse spectrale dans la plage de longueurs d'onde de 240 à 300 nm. Cette démarche permet d'identifier les maximums d'absorption des composés d'intérêt par spectrophotométrie UV-visible, assurant ainsi une évaluation précise des concentrations de diclofénac sodique et d'alcool benzylique dans le produit final CLOFENAL®. Le maximum d'absorption est à 275 nm pour le diclofénac sodique.

b) Dosage de la Diclofénac Sodique par UV/vis

Les méthodes de préparation des diffèrent solutions sont représentées dans la Figure III. 1 et détaillées comme suit :

- **Solution standard**
  - Peser 120 mg de Diclofénac sodique standard de référence, puis le dissoudre dans 100 ml d'eau distillée pour obtenir une solution mère concentrée.
  - Prélever 1 ml de cette solution mère et le compléter à 200 ml avec une solution d'hydroxyde de sodium à 0,01 N pour obtenir une solution de travail à une concentration appropriée pour l'analyse spectrophotométrique.

- **Solution échantillon**
  - Prélever avec précision 5 ml d'échantillon (équivalent à 120 mg de Diclofénac sodique) du mélange des ampoules de CLOFENAL®.
  - Prélever 1 ml de cette solution et le compléter à 200 ml en utilisant une solution d'hydroxyde de sodium à 0,01 N pour obtenir une solution de travail à la concentration appropriée pour l'analyse spectrophotométrique.

Les absorbances sont lues à 275 nm. Le pourcentage de la teneur en Diclofénac sodique dans la portion de la solution injectable prise est calculé selon la formule suivante (Equation III. 1) :

$$T\ (mg/3ml)\ = \frac{A_e \times C_{st} \times P_{st} \times V_m}{A_{st} \times C_e \times 5} \qquad \text{(III. 1)}$$

Où A_e et A_{st} sont les absorbances de la solution échantillon et standard, respectivement. C_{st} et C_e représentent les concentrations de la solution standard et échantillon, en mg/ml, respectivement. P_{st} est la puissance (pureté) du standard en mg/mg et V_m est le volume moyen.

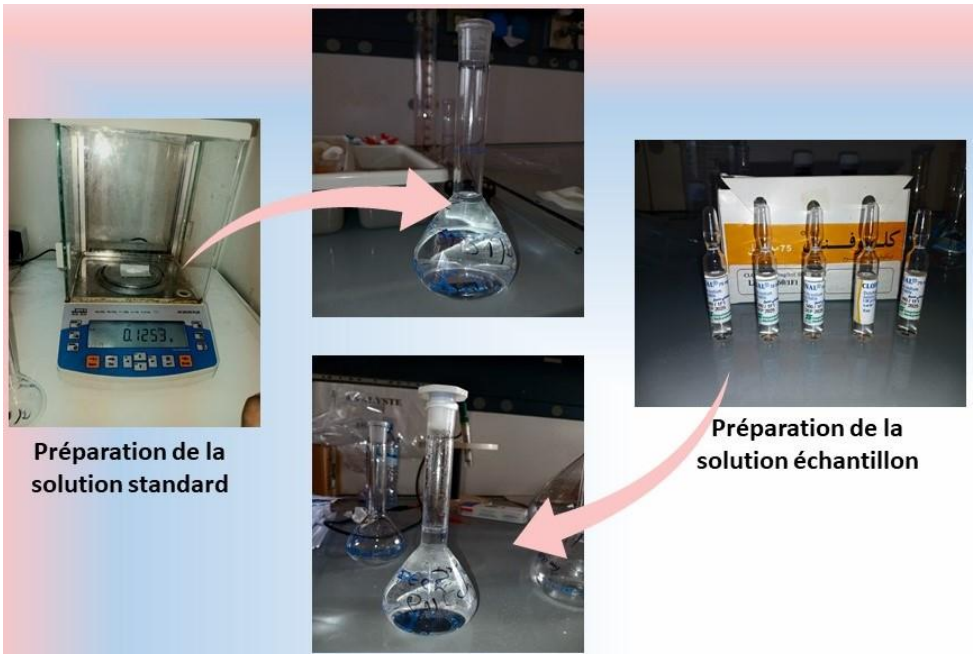


Figure III. 1. Les méthodes de peser de Diclofénac sodique standard de référence, solution standard, et solution échantillon de CLOFENAL®.

III.3.2 Méthode par chromatographie liquide haute performances (HPLC)

Pour cette étude, plusieurs standards de validation et préparations ont été utilisés. La forme reconstituée de la solution injectable contient le principe actif diclofénac sodique et le

conservateur alcool benzylique qui sont listés dans le Tableau III. 7. Un placebo de CLOFENAL® est également préparé, ne contenant pas le principe actif, ainsi qu'un autre placebo est préparé, ne contenant pas l'alcool benzylique.

Tableau III. 7. Formule centésimale du CLOFENAL® solution injectable à 75 mg/3ml.

Composants	**Formule centésimale %/ampoule**
Diclofénac sodique	2.5
Mannitol	0.06
Métabisulfite de sodium	0.066
Alcool benzylique	4.0
Propylène glycol	20.0
Hydroxyde de sodium	Qsp pH (8.0 à 9,0)
Eau pour préparation injectable qsp	Qsp volume 3,00 ml

Pour l'identification, deux méthodes sont employées. Premièrement, le temps de rétention du pic principal de la solution échantillon doit être identique à celui de la solution standard. Deuxièmement, le spectre UV du pic principal de la solution échantillon doit être similaire à celui de la solution standard.

a) Préparations et calcul des teneurs

Le dosage implique plusieurs solutions et préparations comme représenté dans la Figure III. 2. La solution A est constituée d'acide phosphorique et d'eau (0,62 : 1 000), tandis que la solution B est composée de 1,86 g de phosphate de sodium monobasique dihydraté dissous dans 1 000 ml d'eau. La solution C est un mélange équivolumique des solutions A et B (50 : 50). La phase mobile est un mélange de méthanol et de solution C dans un rapport de 70 : 30,

Le diluant est un mélange de méthanol et d'eau dans un rapport de 70 : 30.

La solution mère standard de diclofénac est préparée en dissolvant 75 mg de diclofénac sodique USP RS dans 10 ml de méthanol dans une fiole jaugée 50 ml, puis complétée avec le diluant, et la solution mère standard d'alcool benzylique est préparée en dissolvant 120 mg d'alcool benzylique RS dans 10 ml de méthanol dans une fiole jaugée 50 ml, puis complétée avec le diluant, soniquée pendant 10 minutes La solution standard contient 0,06 mg/ml de

diclofénac sodique et 0,096 mg/ml d'alcool benzylique, préparée à partir des solutions mères respectives.

La solution échantillon, quant à elle, est préparée en transférant 3 ml de la solution injectable dans une fiole jaugée de 50 ml, soniquée pendant 10 minutes avec du méthanol, puis complétée avec le diluant.

Le système chromatographique utilisé, représenté en Figure III. 2, comprend un détecteur UV à 254 nm (pour l'identification B, un détecteur à barrette de diodes dans la plage de 200 à 400 nm), une colonne L7 (4,6 mm × 25 cm, granulométrie 5 µm), une température de colonne de 30°C, un débit de 1 ml/min, un volume d'injection de 10 µl et un temps d'exécution d'au moins deux fois le temps de rétention du diclofénac.

Pour assurer la conformité du système, les facteurs de symétrie de l'alcool benzylique et du diclofénac sodique doivent être inférieurs ou égaux à 2,0, et la RSD% de six injections de ces composés doit également être inférieure ou égale à 2,0.

Les formules de calculs pour la teneur en diclofénac sodique et en alcool benzylique dans la solution injectable sont fournies dans les Equations III. 2-III. 5. La teneur en diclofénac sodique est déterminée en mg/3ml et en pourcentage de la teneur déclarée, avec des limites de spécification respectives de 67,50-82,50 mg/3ml et 90,00-110,00 %. De même, la teneur en alcool benzylique est déterminée avec des limites de spécification de 108,00-132,00 mg/3ml et 90,00-110,00 %. Les formules prennent en compte les surfaces des pics dans les solutions examinées et standards, ainsi que les concentrations et puretés des standards.

- Teneur en diclofénac sodique : (67,50-82,50) mg/3ml soit (90.00-110.00) % de la teneur déclarée :

$$T\left(\frac{mg}{3ml}\right) = \frac{S_{éch} \times C_{std} \times Purté_{std}\left(\frac{mg}{mg}\right)}{S_{std} \times C_{éch}} \times 3 \qquad \text{(III.2)}$$

$$T(\%) = \frac{S_{éch} \times C_{std} \times Purté_{std}(\%)}{S_{std} \times C_N} \times 100 \qquad \text{(III.3)}$$

D'où $T\left(\frac{mg}{3ml}\right)$ soit la teneur en diclofénac sodique en mg/3ml ; $T(\%)$ est la teneur en diclofénac sodique en pourcentage de la teneur déclarée. $S_{éch}$ et S_{std} sont les surfaces des pics de diclofénac sodique dans la solution examinée et la solution standard, respectivement. C_{std} et $C_{éch}$ sont les concentrations du diclofénac sodique dans la solution standard (USP RS) et

examinée en mg/ml, respectivement. C_N est la concentration nominale (déclarée) du diclofénac sodique dans la solution examinée en mg/ml. $Purté_{std}\left(\frac{mg}{mg}\right)$ et $Purté_{std}(\%)$ sont les puretés du diclofénac sodique (USP RS) exprimée en (mg/mg) STQ et en % STQ, respectivement. Finalement le 3 réfère au volume déclaré d'une ampoule CLOFENAL® 75mg injection.

- Teneur en l'alcool benzylique : (108 ,00-132,00) mg/3ml soit (90.00-110.00) % de la teneur déclarée :

$$T\left(\frac{mg}{3ml}\right) = \frac{S_{éch} \times C_{std} \times Purté_{std}\left(\frac{mg}{mg}\right)}{S_{std} \times C_{éch}} \times 3 \qquad \text{(III.4)}$$

$$T(\%) = \frac{S_{éch} \times C_{std} \times Purté_{std}(\%)}{S_{std} \times C_N} \times 100 \qquad \text{(III.5)}$$

D'où $\boldsymbol{T\left(\frac{mg}{3ml}\right)}$ et $\boldsymbol{T}(\%)$ sont les teneurs de l'alcool benzylique en mg/3ml et en % de la teneur déclarée, respectivement. $S_{éch}$ et S_{std} sont les surfaces des pics de l'alcool benzylique dans la solution examiné et la solution standard, respectivement. C_{std} et $C_{éch}$ sont les concentrations de l'alcool benzylique dans la solution standard (USP RS) et dans la solution examiné en ml/ml, respectivement. C_N est la Concentration nominale (déclarée) de l'alcool benzylique dans la solution examinée en mg/ml. $Purté_{std}\left(\frac{mg}{mg}\right)$ et $Purté_{std}(\%)$ sont les puretés de l'alcool benzylique USP RS exprimée en (mg/mg) STQ et en pourcentage STQ, respectivement. Finalement le 3 réfère au volume déclaré d'une ampoule CLOFENAL® 75mg injection.

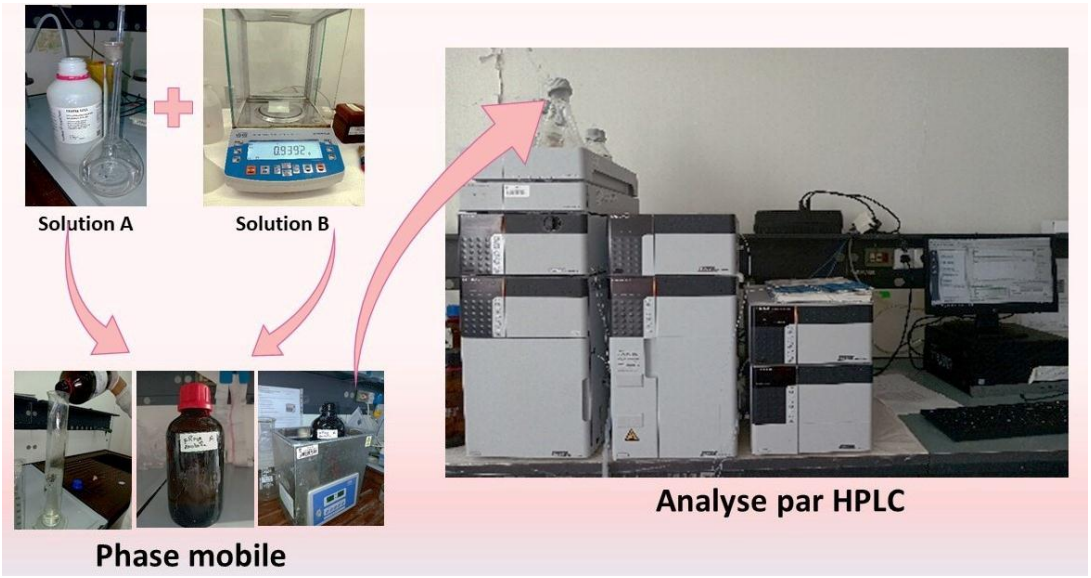


Figure III. 2. Les étapes de la préparation de la phase mobile, commençant par la préparation

des solutions A et B, leur mélange et dénazification, et l'utilisation en tant que phase mobile pour l'analyse par HPLC.

b) Validation de procédure d'analyse de profile d'exactitude de déclofinac sodique et l'alcool benzylique dans le produit fini CLOFENAL®

L'objectif d'une procédure est de pouvoir déterminer avec la plus grande exactitude possible chacune des concentrations inconnues que le laboratoire devra doser ($x_i \leftrightarrow \mu_T$). Il est essentiel de démontrer que l'écart entre ces concentrations et les concentrations de référence se situe dans les limites d'acceptation $[-\lambda, +\lambda]$ fixées à priori pour chaque type d'application (Equation III. 6).

$$-\lambda < x_i - \mu_T < +\lambda \qquad \text{(III.6)}$$

L'objectif de la validation est de fournir au laboratoire et aux autorités réglementaires des garanties que chaque résultat obtenu dans le futur par cette méthodologie sera suffisamment proche de la valeur de l'échantillon à doser. Cela signifie que la probabilité que $|x_i - \mu_T| < \lambda$ doit être supérieure ou égale à une valeur minimale β (Equation III. 7).

$$Prob\,[|x_i - \mu_T| < \lambda] \geq \beta \qquad \text{(III.7)}$$

Dans cette dernière équation, $|x_i - \mu_T|$ représente l'erreur totale, qui est la somme du biais et de l'écart type. Les limites d'acceptation sont fixées à 5 % autour de la valeur cible, et la proportion β est égale à 90 %.

- **Spécificité**

La spécificité, ou sélectivité, est la capacité d'une méthode analytique à mesurer de manière spécifique et sans ambiguïté l'analyte d'intérêt en présence d'autres composés susceptibles d'être présents dans l'échantillon. Cela signifie démontrer que la substance analysée au sein de la matrice est bien l'analyte recherché, sans interférences provenant d'autres substances telles que les principes actifs, les excipients, les impuretés ou les produits de dégradation. Les chromatogrammes obtenus ne doivent présenter aucun pic aux temps de rétention correspondant au diclofénac sodique (principe actif) et à l'alcool benzylique (agent conservateur).

- **Plan d'expérience**

Deux plans d'expériences sont nécessaires : le Plan d'Étalonnage « PE » servant à calculer la fonction de réponse de la méthode, et le Plan de Validation « PV » servant à calculer les caractéristiques de la validation. Les standards de validation de la même série sont effectués le même jour que ceux de l'étalonnage afin d'utiliser les fonctions de réponse correspondantes.

- **Plan d'étalonnage**

Trente essais sont réalisés selon un plan factoriel complet à 5 niveaux de concentration avec 2 répétitions sur 3 séries (5×2×3). Les standards d'étalonnage « SE » sont préparés à différentes concentrations en diclofénac sodique allant de 0,048 mg/ml à 0,072 mg/ml, soit de 80 % à 120 % de l'intervalle de mesure où la concentration 100 % est de 0,06 mg/ml. Les concentrations en alcool benzylique varient de 0,0768 mg/ml à 0,1152 mg/ml, soit de 80 % à 120 % de l'intervalle de mesure où la concentration 100 % est de 0,096 mg/ml.

- **Préparation des solutions mères**

  Solution mère standard de diclofénac : 1,5 mg/ml de diclofénac sodique USP RS préparée en transférant 75 mg de diclofénac sodique USP RS dans une fiole jaugée appropriée (50 ml). Ajouter 20 % du volume de la fiole de méthanol (10 ml), soniquer pour dissoudre et diluer avec le diluant jusqu'au volume.

  Solution mère standard d'alcool benzylique : 2,4 mg/ml d'alcool benzylique RS préparée en transférant 120 mg d'alcool benzylique RS dans une fiole jaugée appropriée (50 ml). Ajouter 20 % du volume de la fiole de méthanol (10 ml), soniquer pour dissoudre et diluer avec le diluant jusqu'au volume.

- **Niveaux de concentration**
- **Niveau 80 % :** 0,048 mg/ml de diclofénac sodique RS et 0,0768 mg/ml d'alcool benzylique préparés à partir des solutions mères standard. Prélever 0,8 ml de chaque solution dans une fiole jaugée de 25 ml, diluer et compléter au volume avec le diluant.
- **Niveau 90 % :** 0,054 mg/ml de diclofénac sodique RS et 0,0864 mg/ml d'alcool benzylique. Préparer en prélevant 0,9 ml de chaque solution dans une fiole jaugée de 25 ml, diluer et compléter au volume avec le diluant.
- **Niveau 100 % :** 0,06 mg/ml de diclofénac sodique RS et 0,096 mg/ml d'alcool benzylique. Préparer en prélevant 1 ml de chaque solution dans une fiole jaugée de 25 ml, diluer et compléter au volume avec le diluant.

- **Niveau 110 % :** 0,066 mg/ml de diclofénac sodique RS et 0,1056 mg/ml d'alcool benzylique. Préparer en prélevant 1,1 ml de chaque solution dans une fiole jaugée de 25 ml, diluer et compléter au volume avec le diluant.
- **Niveau 120 % :** 0,072 mg/ml de diclofénac sodique RS et 0,1152 mg/ml d'alcool benzylique. Préparer en prélevant 1,2 ml de chaque solution dans une fiole jaugée de 25 ml, diluer et compléter au volume avec le diluant.

- **Plan de validation**

Quarante-cinq essais sont réalisés à cinq niveaux de concentrations avec trois répétitions sur trois séries (5×3×3). Les standards de validation (SV) sont préparés à différentes concentrations en diclofénac sodique allant de 0,048 mg/ml à 0,072 mg/ml, soit de 80 % à 120 % de l'intervalle de mesure où la concentration 100 % est 0,06 mg/ml. Pour l'alcool benzylique, les concentrations varient de 0,0768 mg/ml à 0,1152 mg/ml, soit de 80 % à 120 % de l'intervalle de mesure où la concentration 100 % est 0,096 mg/ml.

Il s'agit d'une gamme préparée à partir d'une forme reconstituée dont la concentration correspond à 75 mg/3 ml en diclofénac sodique et 120 mg/3 ml en alcool benzylique.

Solution mère de l'échantillon : Nominalement 0,06 mg/ml de diclofénac sodique préparé comme suit. Transférer une quantité de solution injectable (3 ml) dans une fiole jaugée appropriée (50 ml), ajouter 20 % du volume de méthanol de la fiole (10 ml), soniquer pendant environ 10 minutes, puis diluer avec un diluant approprié jusqu'au volume. Passer une partie de la solution à travers un filtre de 0,45 µm de taille de pores, puis prélever.

- **Niveaux de concentration**
- **Niveau 80 % :** Prélever 0,8 ml du filtrat dans une fiole jaugée de 25 ml, diluer et compléter au trait jauge avec le diluant approprié.
- **Niveau 90 % :** Prélever 0,9 ml du filtrat dans une fiole jaugée de 25 ml, diluer et compléter au trait jauge avec le diluant approprié.
- **Niveau 100 % :** Prélever 1,0 ml du filtrat dans une fiole jaugée de 25 ml, diluer et compléter au trait jauge avec le diluant approprié.
- **Niveau 110 % :** Prélever 1,1 ml du filtrat dans une fiole jaugée de 25 ml, diluer et compléter au trait jauge avec le diluant approprié.

- **Niveau 120 % :** Prélever 1,2 ml du filtrat dans une fiole jaugée de 25 ml, diluer et compléter au trait jauge avec le diluant approprié.

- **Fonction de réponse**

Pour chaque série de données (jour), on calcule la fonction de réponse en utilisant un même modèle théorique, puis on teste la significativité de la pente à l'aide du test de Fischer.

- **Alignement des observations**

Il est indispensable de s'assurer que les concentrations soient identiques pour toutes les séries au sein d'un même niveau de concentration. Si ce n'est pas le cas, il faut alors les aligner sur une même concentration moyenne.

- **Prédiction inverse**

À partir de la fonction de réponse et des réponses des standards de validation, on calcule les concentrations correspondantes pour chacune des séries.

- **Justesse et fidélité**

Étant donné une limite d'acceptation λ fixée, on calcule la justesse et la fidélité de la procédure pour chaque niveau de concentration.

- **Intervalle de tolérance**

À l'issue des analyses précédentes, on estime les limites de confiance unilatérales de l'exactitude pour chaque niveau de concentration.

- **Profil d'exactitude**

Avec la limite d'acceptation λ fixée et les limites de confiance unilatérales de l'exactitude estimées, on peut tracer les profils d'exactitude correspondant au modèle mathématique choisi.

CHAPITRE IV
RESULTATS ET DISCUSSIONS

IV.1 RESULTATS DE LA METHODE D'ANALYSE UV-VISIBLE

IV.1.1 Etude de la spécificité

La spécificité d'une méthode d'analyse spectrophotométrique UV-Visible permet de s'assurer que le spectre UV et les maximums d'absorbances obtenus dans les conditions opératoires retenues soient exclusivement liés à la substance à analyser, sans interférences provenant des excipients, des produits de dégradation, des impuretés, ou des réactifs utilisés pour l'analyse.

IV.1.2 Spécificité de la méthode d'identification du diclofénac sodique

a. Spécificité par rapport au placebo

Après préparation de la solution du standard de référence, de la solution de la forme reconstituée, et de la solution placebo, l'analyse spectrophotométrique dans la région UV-visible (240 nm à 300 nm) a révélé les observations suivantes :

Solution placebo : le spectre UV-visible et les maximums d'absorbances ne sont pas identiques à ceux obtenus avec la solution standard.
Absorbance à 275 nm : 0.0145.

b. Solution de la forme reconstituée (solution échantillon)

Le spectre UV-visible et les maximums d'absorbances sont identiques à ceux obtenus avec la solution standard dans la bande (240 nm à 300 nm).

Les résultats de cette étude, représentés dans les Figures IV. 1(a-c), indiquent que la solution de la forme reconstituée présente des caractéristiques spectrales similaires à celles de la solution standard, contrairement à la solution placebo.

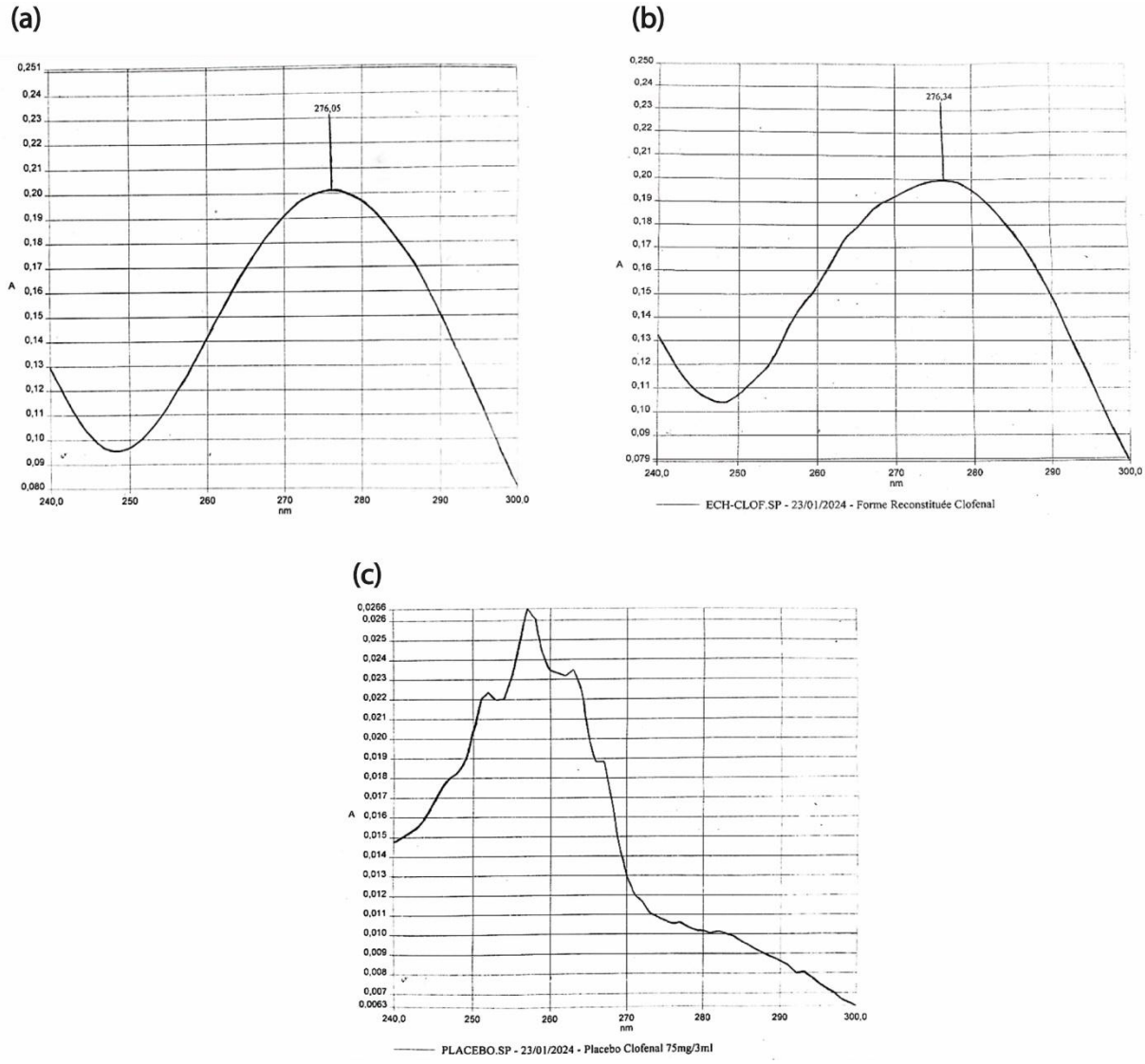


Figure IV. 1. Les spectres UV-Visible de (a) la solution standard diclofenac sodique, (b) la solution standard forme reconstituée, et (c) de la solution placebo.

IV.1.3 Résultats et calcules statistiques

Les résultats de l'analyse spectrophotométrique UV-Visible montrent que la méthode d'identification du diclofénac sodique manque de spécificité, comme le démontrent les données présentées dans le tableau ci-dessous (Tableau IV. 1).

Tableau IV. 1. Les données de résultats des solutions.

Solution	Absorbance a 275nm		Moyenne	Ecart type	RSD%
Placebo	Essai 01	0.0145	0.0144	0.000156	1.077752
	Essai 02	0.0142			
	Essai 03	0.0146			
Forme Reconstituée	Essai 01	0.2096	0.2096	0.000044	0.021208
	Essai 02	0.2095			
	Essai 03	0.2096			
Standard	Essai 01	0.2124	0.2120	0.000167	0.078604
	Essai 02	0.2117			
	Essai 03	0.2119			
	Essai 04	0.212			
	Essai 05	0.2121			
	Essai 06	0.2121			

Le spectre UV-Visible de la solution placebo dans la bande (240 à 300) nm présente des pics maximale à 251nm, 257nm et 263 nm, contrairement ne révèle aucun pic d'absorbance à 275 nm . Cependant, l'absorbance moyenne à 275 nm de la solution placebo est de 0,0144, avec un écart type de 0,000156 et un pourcentage de RSD de 1,077752%. Cette valeur, bien que faible, diffère significativement de zéro, indiquant une présence résiduelle d'absorbance qui pourrait provenir d'interférences mineures des excipients ou des impuretés.

D'autre part, le spectre UV-Visible de la solution échantillon (forme reconstituée) présente un maximum d'absorbance à 275 nm, avec une moyenne de 0,2096, un écart type très faible de 0,000044 et un RSD de 0,021208%. La faible variabilité des essais de la forme reconstituée montre une bonne répétabilité, mais cette information seule ne suffit pas pour confirmer l'absence totale d'interférences.

Pour la solution standard, l'absorbance moyenne à 275 nm est de 0,2120, avec un écart type de 0,000167 et un RSD de 0,078604%. Les valeurs d'absorbance de la solution standard sont proches de celles de la solution échantillon, ce qui suggère que la méthode est capable de détecter correctement le diclofénac sodique.

Cependant, en comparant les résultats de la solution placebo et ceux de la forme reconstituée, il est évident que même de petites interférences peuvent influencer les mesures d'absorbance, compromettant ainsi la spécificité de la méthode. La présence d'une absorbance non nulle pour le placebo indique que la méthode peut être sujette à des interférences, rendant difficile la discrimination précise entre le diclofénac sodique et d'autres composants potentiellement présents.

En conclusion, les résultats prouvent que la méthode d'identification de diclofénac sodique dans le produit fini CLOFENAL® est spécifique, d'une autre coté la méthode de dosage de diclofénac sodique est non spécifique en raison des interférences observées avec le placebo.

IV.2 RESULTATS DE LA METHODE D'ANALYSE PAR HPLC

IV.2.1 Spécificité

Les chromatogrammes obtenus avec les solutions préparées (Figures IV. 2(a-g)) ne présentent aucun pic au temps de rétention correspondant à celui du diclofénac sodique et de l'alcool benzylique. Le pic principal de la solution échantillon correspond à celui de la solution standard, confirmant ainsi la spécificité de la méthode pour ces substances.

Concernant la phase mobile, après son injection, aucun pic n'a été observé au temps de rétention des substances à analyser. Cela indique que la phase mobile n'interfère pas avec la détection du diclofénac sodique et de l'alcool benzylique, renforçant ainsi la fiabilité de la méthode.

De même, l'injection du diluant n'a révélé aucun pic ayant le même temps de rétention que les substances à analyser. Ceci démontre que le diluant utilisé n'affecte pas la spécificité de l'analyse et ne crée pas de faux positifs dans les résultats.

Lors de l'injection de la solution placebo, aucun pic n'a été détecté au temps de rétention correspondant aux substances à analyser. Les chromatogrammes des solutions placebo ne montrent pas de pics au temps de rétention du diclofénac sodique et de l'alcool benzylique, ce qui confirme l'absence d'interférences provenant des excipients ou autres composants présents dans le placebo.

Enfin, un système chromatographique est considéré spécifique si, parmi les nombreux constituants à identifier, la méthode ne fournit qu'un signal pour le seul constituant à mesurer, bien séparé des autres constituants par un temps de rétention connu. Dans cette étude, la méthode HPLC a démontré sa capacité à séparer efficacement le diclofénac sodique et l'alcool benzylique des autres composés, confirmant ainsi sa spécificité et son adéquation pour les analyses prévues.

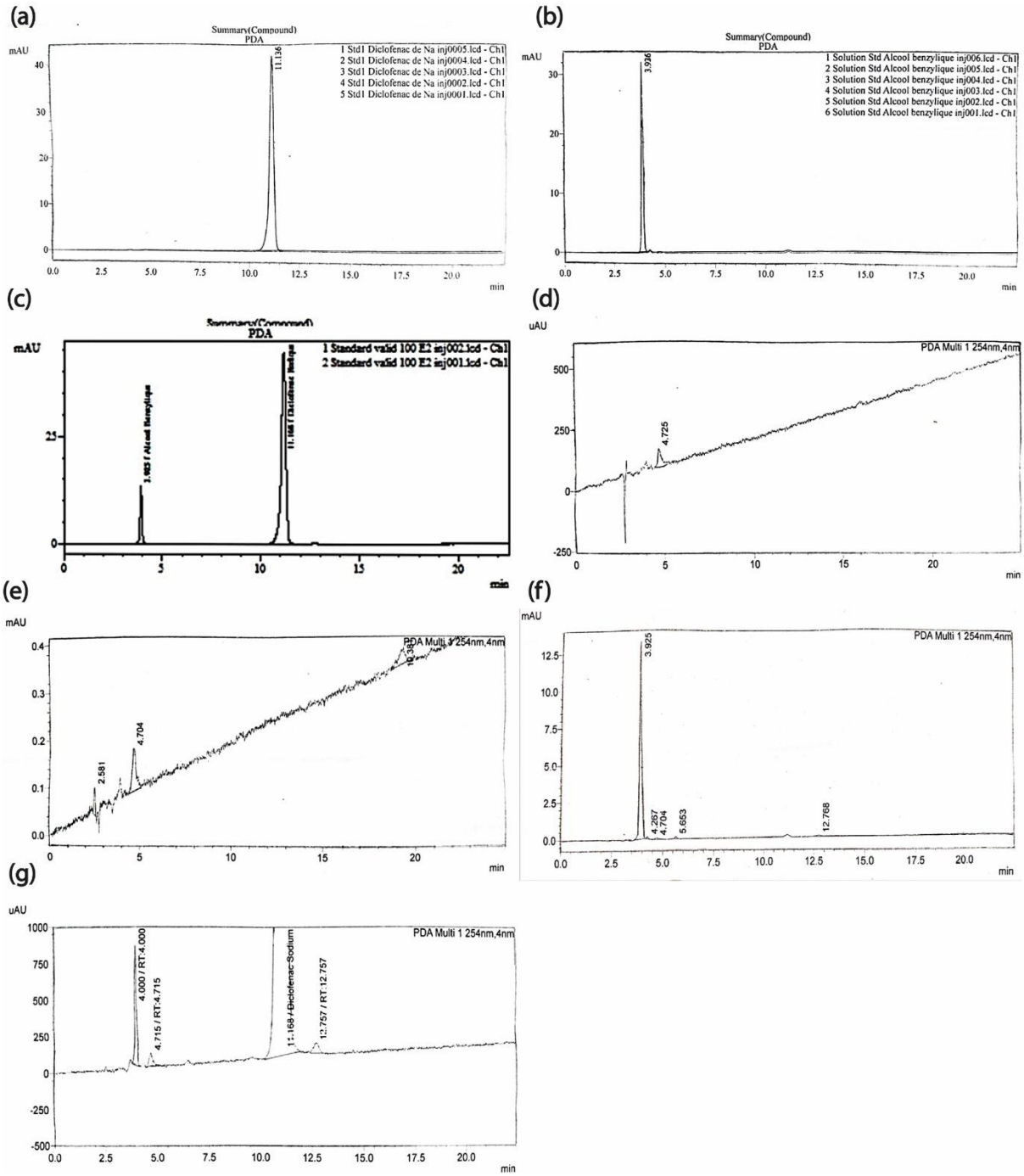


Figure IV. 2. Les chromatogrammes HPLC de (a) la solution standard diclofenac sodique, (b) la solution standard alcool benzylique, (c) de la solution standard de validation, (d) de la

phase mobile, (e) de la solution du diluant, (f) de la solution placebo diclofenac sodique, et (g) de la solution placebo alcool benzylique.

IV.2.2 Résultats de l'étude statistique

Cette étude statistique, récapitulé dans le Tableau IV. 2, présente les résultats de l'analyse de l'alcool benzylique et du diclofénac sodique par HPLC. L'objectif était de vérifier la précision, la reproductibilité et l'efficacité de la méthode HPLC utilisée. Les paramètres évalués incluent la surface des pics, le temps de rétention, l'écart type relatif (RSD), le facteur de symétrie et le nombre de plateaux théoriques.

Tableau IV. 2. Récapitulation des résultats chromatographiques.

Essai	**Surface des pics de l'alcool benzylique**	**Surface des pics du diclofénac sodique**
1	76729	652572
2	76800	652228
3	76638	652000
4	76746	652568
5	76783	653152
6	76636	652504
Temps de rétention	3.927	11.132
Moyenne des surfaces	76739.2	652504
Ecart type	63.26	436
Ecart type relatif des surfaces RSD (%) ≤ 2	0,082	0.067
Ecart type relatif des temps de retentions RSD (%) ≤ 2	0.11	0.052
Facteur de symétrie [0,7-2,0]	0.995	0.82
Nombre de plateaux théorique	8151	12592

Les résultats obtenus pour les surfaces des pics de l'alcool benzylique et du diclofénac sodique (Tableau IV. 2) montrent une grande cohérence et précision. La surface des pics de l'alcool benzylique varie légèrement autour d'une moyenne de 76739,2 avec un écart type de 63,26. De même, la surface des pics du diclofénac sodique se situe autour d'une moyenne de 652504 avec un écart type de 436. Ces faibles écarts types indiquent une répétabilité élevée des mesures.

Les temps de rétention observés sont de 3,927 minutes pour l'alcool benzylique et de 11,132 minutes pour le diclofénac sodique. La stabilité de ces temps de rétention est confirmée par les faibles écarts types relatifs (RSD) de 0,11% pour l'alcool benzylique et de 0,052% pour le diclofénac sodique, tous deux biens en dessous du seuil de 2% fixé. Ces résultats montrent que la méthode HPLC est stable et précise en termes de séparation temporelle des composants.

L'écart type relatif des surfaces (RSD) est de 0,082% pour l'alcool benzylique et de 0,067% pour le diclofénac sodique, tous deux biens inférieurs à la limite acceptable de 2%. Cela indique une excellente précision de la méthode, avec une variation minimale entre les essais.

Les facteurs de symétrie sont respectivement de 0,995 pour l'alcool benzylique et de 0,82 pour le diclofénac sodique. Ces valeurs se situent dans l'intervalle acceptable de 0,7 à 2,0, suggérant que les pics chromatographiques sont bien formés et symétriques, ce qui est essentiel pour une bonne quantification.

Le nombre de plateaux théoriques, indicateur de l'efficacité de la colonne chromatographique, est de 8151 pour l'alcool benzylique et de 12592 pour le diclofénac sodique. Ces valeurs élevées indiquent une bonne efficacité de séparation, avec une résolution suffisante pour les deux substances.

En conclusion, les résultats de cette étude montrent que la méthode HPLC utilisée pour l'analyse de l'alcool benzylique et du diclofénac sodique est précise, reproductible et efficace. Les faibles écarts types relatifs des surfaces et des temps de rétention, ainsi que les facteurs de symétrie et le nombre élevé de plateaux théoriques, confirment la qualité et la fiabilité de cette méthode analytique. Ces résultats valident la méthode pour une utilisation dans des analyses régulières de ces composés dans des produits pharmaceutiques.

IV.2.3 Plans d'expérience

Les données brutes des standards d'étalonnage pour le diclofénac sodique sont résumées dans le Tableau IV. 3. Pour chaque niveau de concentration, trois séries de mesures ont été effectuées. Les résultats montrent des signaux obtenus qui varient légèrement autour des valeurs introduites. Par exemple, au niveau de concentration de 80%, la concentration introduite de 0,0480 mg/ml a généré des signaux de 556793, 541390 et 547623 pour les trois séries

respectivement. Ces données illustrent la consistance et la reproductibilité des mesures effectuées.

Tableau IV. 3. Données brutes des standards d'étalonnage de diclofénac sodique.

Niveau de C en (%)	Série N°1		Série N°2		Série N°3	
	Concentration introduite (mg/ml)	Signal obtenu	Concentration introduite (mg/ml)	Signal obtenu	Concentration introduite (mg/ml)	Signal obtenu
80	0,0480	556793 533710,5	0,0480	541390 540319	0,0480	547623 550406
90	0,0540	596644,5 594445	0,0540	598304 595831	0,0540	597139 591608
100	0,0600	659439 658670	0,0600	664960 662297	0,0600	666783 664482
110	0,0660	725260 724827	0,0660	723851 724137	0,0660	734726 734088
120	0,0720	786368 789485	0,0720	788759 785566	0,0720	790303 792439

Les données brutes des standards d'étalonnage pour l'alcool benzylique sont présentées dans le Tableau IV. 4. De manière similaire au diclofénac sodique, les mesures ont été prises pour différents niveaux de concentration avec trois séries de répétitions. Par exemple, au niveau de concentration de 80%, la concentration introduite de 0,0768 mg/ml a produit des signaux de 64888, 63366 et 63403 pour les trois séries respectivement. Ces résultats indiquent également une bonne reproductibilité des mesures.

Tableau IV. 4. Données brutes des standards d'étalonnage d'alcool benzylique.

Niveau de C en (%)	Série N°1		Série N°2		Série N°3	
	Concentration introduite (mg/ml)	Signal obtenu	Concentration introduite (mg/ml)	Signal obtenu	Concentration introduite (mg/ml)	Signal obtenu
80	0,07688	64888 62441	0,0768	63366 63316	0,0768	63403 63513
90	0,0864	69943 69691	0,0864	70145 70327	0,0864	70652 70140
100	0,0960	79683 78809	0,0960	80184 80088	0,0960	79777 79676
110	0,1056	87450 85324	0,1056	87073 87539	0,1056	86101 85973

120	0,1152	93836 93650	0,1152	94828 94770	0,1152	93494 95807

Les données brutes des standards de validation pour le diclofénac sodique sont indiquées dans le Tableau IV. 5. Ces données montrent les résultats de validation pour différentes concentrations introduites. Par exemple, à une concentration de 80%, les signaux obtenus étaient 530220, 532450 et 535637 pour les trois séries respectivement. Cela démontre que la méthode d'analyse est capable de produire des résultats fiables et précis.

Tableau IV. 5. Données brutes des standards de validation de diclofénac sodique.

Niveau de C (%)	Série N°1		Série N°2		Série N°3	
	Concentration introduite (mg/ml)	Signal obtenu	Concentration introduite (mg/ml)	Signal obtenu	Concentration introduite (mg/ml)	Signal obtenu
80	0,048	530220 531529 530583	0,048	532450 532023 531821	0,048	535637 534826 535758
90	0,054	600266 599096 596870	0,054	595668 599210 595006	0,054	597602 597447 598518
100	0,060	656653 658626 656220	0,060	659506 653068 657168	0,060	656679 658808 660425
110	0,066	729741 728722 728036	0,066	730045 730875 731111	0,066	733305 735167 733305
120	0,072	799666 798757 796495	0,072	807441 808118 802768	0,072	797472 795072 801320

Pour l'alcool benzylique, les données brutes des standards de validation sont présentées dans le Tableau IV. 6. Les résultats montrent, par exemple, qu'à une concentration de 80%, les signaux obtenus étaient 63576, 63232 et 63843 pour les trois séries respectivement. Ces résultats confirment la fiabilité de la méthode d'analyse utilisée pour mesurer les concentrations d'alcool benzylique.

Tableau IV. 6. Données brutes des standards de validation d'alcool benzylique.

Niveau de C (%)	Série N°1		Série N°2		Série N°3	
	Concentration introduite (mg/ml)	Signal obtenu	Concentration introduite (mg/ml)	Signal obtenu	Concentration introduite (mg/ml)	Signal obtenu
80	0,0768	63576	0,0768	63232	0,0768	63843
		62911		63408		63695,5
		63157		63131		63573
90	0,0864	70239	0,0864	70642	0,0864	70967
		70049		70722		70758
		70517		70307		70550
100	0,0960	79298	0,0960	78604	0,0960	78152
		79426		79313		79061
		78245		78776		78822
110	0,1056	86487	0,1056	86776	0,1056	86409
		86427		86452		86822
		85868		86837		86919
120	0,1152	93532	0,1152	94280	0,1152	94781
		93512		94832		94700
		93829		94316		93789

IV.2.4 Fonctions de réponse

La fonction de réponse est déterminée sur la base des données brutes des standards d'étalonnage « SE ». La relation entre la réponse Y (signal de l'instrument) et la quantité X (concentration) est modélisée. Trois modèles mathématiques linéaires ont été choisis (Equations IV. 1-IV. 3).

$$y = ax + b \quad \text{(IV.1)}$$

$$y = bx \quad \text{(IV.2)}$$

$$y = a_{100\%}x \quad \text{(IV.3)}$$

Pour le diclofénac sodique, les données des fonctions de réponses sont présentées dans le Tableau IV. 7.

Tableau IV. 7. Données des fonctions de réponses du diclofénac sodique.

Série N°1		Série N°2		Série N°3	
Concentration introduite (mg/ml)	**Signal obtenu**	**Concentration introduite (mg/ml)**	**Signal obtenu**	**Concentration introduite (mg/ml)**	**Signal obtenu**
0,048	545251,75	0,048	540854,50	0,048	549014,50
0,054	595544,75	0,054	597067,50	0,054	594373,50
0,060	659054,50	0,060	663628,50	0,060	665632,50
0,066	725043,50	0,066	723994,00	0,066	734407,00
0,072	787926,50	0,072	787162,50	0,072	791371,00

Les séries de mesures montrent des résultats cohérents pour différentes concentrations introduites, par exemple, à 0,048 mg/ml, les signaux obtenus étaient 545251,75, 540854,50, et 549014,50 pour les séries N°1, N°2, et N°3 respectivement. Les paramètres de validation pour le premier modèle (Equation IV. 1) sont résumés dans le Tableau IV. 8, montrant des coefficients de détermination R^2 très élevés (> 0.99), indiquant une bonne corrélation. Cela est confirmé dans la Figure IV. 3(a), montrant tous les points dans une droite. Pour le modèle ($Y = bx$), les paramètres de validation (Tableau IV. 9 et Figure IV. 3(b)) montrent également des coefficients de détermination élevés. Le modèle optimal $Y = 100\%$ présente des coefficients R^2 de 1,000 pour toutes les séries (Tableau IV. 10 et Figure IV. 3(c)), garantissant que la procédure d'analyse produira en moyenne au moins 90% de résultats acceptables.

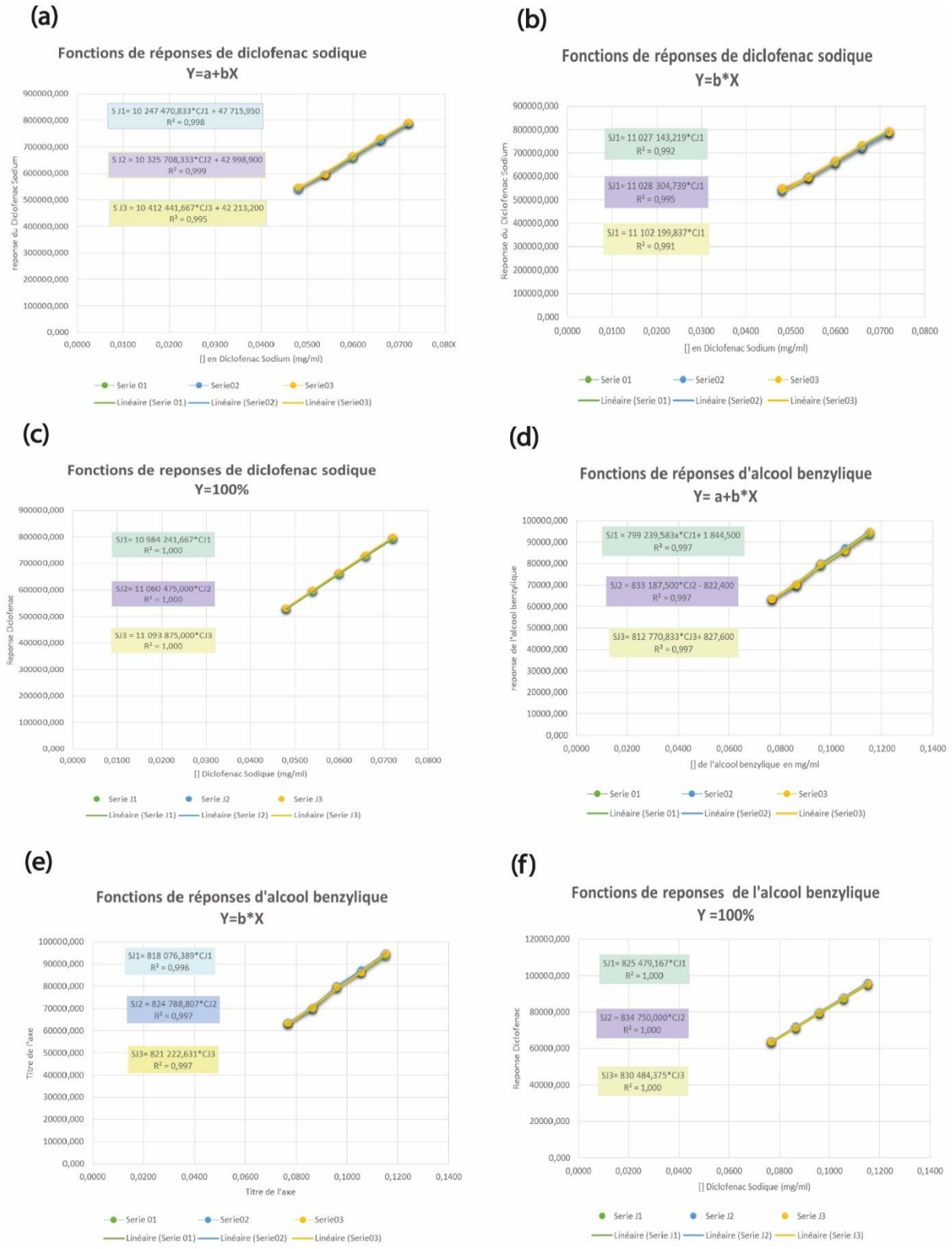


Figure IV. 3. représentation graphique des fonctions de réponses du diclofénac sodique (a) : $Y = a + bx$, (b) : $Y = bx$, et (c) : $Y = 100\%$, lors des essais d'étalonnage et de Validation, les aires en fonction de la concentration. Les représentations graphiques des fonctions de réponses pour l'alcool benzylique sont représentées, respectivement (d-f), dans le même ordre.

Tableau IV. 8. Paramètres d'étalonnage obtenus pour le diclofénac sodique pour $Y = a + bx$.

Modèle mathématique	Séries	Pente (b)	Interception (a)	Coefficient de détermination R^2
$Y = a + bx$	N°1	10247470,83	47715,95	0,9978
	N°2	10325708,33	42998,90	0,9995
	N°3	10412441,67	42213,20	0,9955

Tableau IV. 9. Paramètres d'étalonnage obtenus pour le diclofénac sodique pour $Y = bx$.

Modèle mathématique	Séries	Pente b	Coefficient de détermination R^2
$Y = bx$	N°1	11027143,219	0,992
	N°2	11028304,739	0,995
	N°3	11102199,837	0,991

Tableau IV. 10. Paramètres d'étalonnage obtenus pour le diclofénac sodique pour $Y = 100\%$.

Modèle mathématique	Séries	Pente	Coefficient de détermination R^2
$Y = 100\%$	N°1	10984241,667	1,000
	N°2	11060475,000	1,000
	N°3	11093875,000	1,000

Pour l'alcool benzylique, les fonctions de réponse sont illustrées dans le Tableau IV. 11. Les résultats montrent une bonne consistance des signaux obtenus pour les différentes concentrations introduites. Par exemple, à 0,0768 mg/ml, les signaux obtenus étaient 63664,5, 63341, et 63458,0 pour les séries N°1, N°2, et N°3 respectivement. Les paramètres de validation pour le modèle $Y = a + bx$, (Tableau IV. 12, Figure IV. 3(d)) et le modèle $Y = bx$ (Tableau

IV. 13, Figure IV. 3(e)) montrent des coefficients de détermination élevés, indiquant une bonne corrélation. Le modèle optimal $Y = 100\%$ pour l'alcool benzylique présente également des coefficients de 1,000 pour toutes les séries (Tableau IV. 14, Figure IV. 3(e)).

Tableau IV. 11. Les fonctions de réponses pour l'alcool benzylique.

Niveau de C (%)	Série N°1		Série N°2		Série N°3	
	Concentration introduite (mg/ml)	Signal obtenu	Concentration introduite (mg/ml)	Signal obtenu	Concentration introduite (mg/ml)	Signal obtenu
80	0,0768	63664,5	0,0768	63341	0,0768	63458,0
90	0,0864	69817,0	0,0864	70236	0,0864	70396,0
100	0,0960	79246,0	0,0960	80136	0,0960	79726,5
110	0,1056	86387,0	0,1056	87306	0,1056	86037,0
120	0,1152	93743,0	0,1152	94799	0,1152	94650,5

Tableau IV. 12. Paramètres d'étalonnage obtenus pour l'alcool benzylique pour $Y = a + bx$.

Modèle mathématique	Séries	Pente b	a	COEF DE DET
$Y = a + bx$	N°1	799239,58	1844,50	0,9968
	N°2	833187,50	-822,40	0,9969
	N°3	812770,83	827,60	0,9973

Tableau IV. 13. Paramètres d'étalonnage obtenus pour l'alcool benzylique $Y = bx$.

Modèle mathématique	Séries	Pente	Coefficient de détermination R^2
$Y = bx$	N°1	818076,389	0,996
	N°2	824788,807	0,997
	N°3	821222,631	0,997

Tableau IV. 14. Paramètres d'étalonnage obtenus pour l'alcool benzylique pour $Y = 100\%$.

Modèle mathématique	Séries	Pente	Coefficient de détermination R^2
$Y = 100\%$	N°1	825479,167	1,000
	N°2	834750,000	1,000
	N°3	830484,375	1,000

IV.2.5 Prédiction inverse

Le calcul des concentrations prédites a été effectué en utilisant les réponses des standards de validation « SV » et en se basant sur la fonction de réponse obtenue à partir des standards d'étalonnage « SE ». Les concentrations prédites sont calculées comme suit (Equation IV. 4) :

$$x_{ij,c} = \frac{y_{ij,k} - \alpha}{\beta_i} \quad \text{(IV.4)}$$

Pour le diclofénac sodique, les résultats obtenus sont regroupés dans le Tableau IV. 15. Par exemple, pour une concentration introduite de 0,0480 mg/ml, les concentrations calculées étaient très proches des valeurs introduites, montrant une bonne précision de la méthode.

Tableau IV. 15. Les résultats de concentrations calculées pour diclofénac sodique.

Série N°1		Série N°2		Série N°3	
Concentration introduite (mg/ml)	C calculée (mg/ml)	Concentration introduite (mg/ml)	C calculée (mg/ml)	Concentration introduite (mg/ml)	C calculée (mg/ml)
0,0480	0,0483	0,0480	0,0481	0,0480	0,0483
	0,0484		0,0481		0,0482
	0,0483		0,0481		0,0483
0,0540	0,0546	0,0540	0,0539	0,0540	0,0539
	0,0545		0,0542		0,0539
	0,0543		0,0538		0,0540
0,0600	0,0598	0,0600	0,0596	0,0600	0,0592
	0,0600		0,0590		0,0594
	0,0597		0,0594		0,0595
0,0660	0,0664	0,0660	0,0660	0,0660	0,0661
	0,0663		0,0661		0,0663
	0,0663		0,0661		0,0661

0,0720	0,0728	0,0720	0,0730	0,0720	0,0719
	0,0727		0,0731		0,0717
	0,0725		0,0726		0,0722

Pour l'alcool benzylique, les résultats sont présentés dans le Tableau IV. 16. Les concentrations calculées pour les différentes concentrations introduites montrent également une bonne précision et cohérence, confirmant la fiabilité de la méthode.

Tableau IV. 16. Les résultats de concentrations calculées pour alcool benzylique.

Série N°1		**Série N°2**		**Série N°3**	
Concentration introduite (mg/ml)	**C calculée (mg/ml)**	**Concentration introduite (mg/ml)**	**C calculée (mg/ml)**	**Concentration introduite (mg/ml)**	**C calculée (mg/ml)**
0,0768	0,0770	0,0768	0,0757	0,0768	0,0769
	0,0762		0,0760		0,0767
	0,0765		0,0756		0,0765
0,0864	0,0851	0,0864	0,0846	0,0864	0,0855
	0,0849		0,0847		0,0852
	0,0854		0,0842		0,0850
0,0960	0,0961	0,0960	0,0942	0,0960	0,0941
	0,0962		0,0950		0,0952
	0,0948		0,0944		0,0949
0,1056	0,1048	0,1056	0,1040	0,1056	0,1040
	0,1047		0,1036		0,1045
	0,1040		0,1040		0,1047
0,1152	0,1133	0,1152	0,1129	0,1152	0,1141
	0,1133		0,1136		0,1140
	0,1137		0,1130		0,1129

IV.2.6 Estimation de la justesse et de la fidélité

a) Estimation de la justesse

Le biais et le recouvrement ont été calculés (Equations IV. 5-6) pour évaluer la justesse de la méthode.

$$Biais\ (\%) = \frac{\bar{x}_{j,c} - \bar{x}_j}{\bar{x}_j} \times 100 \quad \text{(IV.5)}$$

$$Recouvrement\ (\%) = \frac{\bar{x}_{j,c}}{\bar{x}_j} \times 100 \quad \text{(IV.6)}$$

Les résultats pour le diclofénac sodique sont résumés dans le Tableau IV. 17, montrant que le biais de chaque niveau ne dépasse pas 5% en valeur absolue, ce qui valide la méthode. Par exemple, pour un niveau de concentration de 80%, le biais était de 0,48% et le recouvrement de 100,48%.

Tableau IV. 17. Justesse calculée pour chaque niveau de concentration pour le diclofénac sodique.

Niveaux de concentration (%)	Biais (%)	Recouvrement (%)
80	0,48	100,48
90	0,21	100,21
100	-0,80	99,20
110	0,29	100,29
120	0,69	100,69

Pour l'alcool benzylique, les résultats sont présentés dans le Tableau IV. 18. Le biais de chaque niveau ne dépasse pas 5% en valeur absolue, validant également la méthode. Par exemple, pour un niveau de concentration de 80%, le biais était de -0,58% et le recouvrement de 99,42%.

Tableau IV. 18. Justesse calculée pour chaque niveau de concentration pour l'alcool benzylique.

Niveaux de concentration (%)	Biais (%)	Recouvrement (%)
80	-0.58	99.42
90	-1.68	98.32
100	-1.06	98.94
110	-1.27	98.73
120	-1.54	98.46

b) Estimation de la fidélité

La fidélité de la méthode de dosage a été exprimée en fonction du pourcentage du coefficient de variation (CV) obtenu à partir de la répétabilité et de la fidélité intermédiaire, pour tous les niveaux de concentration en utilisant les modèles d'étalonnage déjà établis. Les résultats obtenus sont résumés dans les Tableaux IV. 19 et IV. 20. La répétabilité et la fidélité intermédiaire ont été calculées en utilisant les équations suivantes (Equations IV. 7-8) pour la Répétabilité et la Fidélité intermédiaire, respectivement.

$$\hat{\sigma}^2{}_{Re,j} = \hat{\sigma}^2{}_{w,j} \quad \text{(IV.7)}$$

$$\hat{\sigma}^2{}_{IP,j} = \hat{\sigma}^2{}_{W,j} + \hat{\sigma}^2{}_{B,j} \quad \text{(IV.8)}$$

- ***Estimation de la fidélité de la méthode de dosage du Diclofénac Sodique***

Les résultats obtenus sont présentés dans le Tableau IV. 19.

Tableau IV. 19. Fidélité calculée pour chaque niveau de concentration pour le diclofénac sodique.

Niveaux de concentration (%)	CV répétabilité (%)	CV fidélité intermédiaire (%)
80	0.10	0.41
90	0.28	1.13
100	0.35	0.85
110	0.12	0.41

120	0.33	1.25

- ***Estimation de la fidélité de la méthode de dosage de l'alcool benzylique***

Les résultats obtenus sont présentés dans le Tableau IV. 20.

Tableau IV. 20. Fidélité calculée pour chaque niveau de concentration pour l'alcool benzylique.

Niveaux de concentration (%)	**CV répétabilité (%)**	**CV fidélité intermédiaire (%)**
80	0.36	1.19
90	0.31	0.82
100	0.65	1.31
110	0.32	0.67
120	0.40	0.56

Ce test permet à l'analyste d'estimer la dispersion associée à la mesure (erreur aléatoire). Cette dispersion peut être évaluée dans différentes conditions, telles que la répétabilité (intra-série ou intra-jour) et la fidélité intermédiaire (inter-jours). Dans cette approche, seules les conditions de répétabilité et de fidélité intermédiaire ont été prises en compte.

Les valeurs du coefficient de variation (CV) de la répétabilité et de la fidélité intermédiaire ne dépassent pas 2% en valeur absolue pour le diclofénac sodique et l'alcool benzylique à tous les niveaux. Ainsi, la méthode est donc fidèle.

c. Estimation de l'exactitude

Le profil d'exactitude (Equation IV. 9) est une méthode qui permet de définir un intervalle de quantification pour chaque fonction de réponse étudiée, cela par l'intersection entre les limites de tolérance et d'acceptabilité. L'exactitude a été évaluée par la détermination de l'erreur totale entre les pesées introduites et celles retrouvées pour les différentes séries.

$$Exactitude = |Biais\,\%| + fidélité\,intermédiaire = Erreur\,totale = justesse + Fidélité \quad \text{(IV.9)}$$

Tableaux IV. 21 et IV. 22 représentent une estimation de l'exactitude de la méthode de dosage du diclofénac sodique et de l'alcool benzylique, respectivement.

Tableau IV. 21. Profil d'exactitude obtenu pour le diclofénac sodique.

Niveaux de concentration (%)	Biais (%)	CV fidélité intermédiaire (%)	Erreur totale (%)
80	0.48	0.41	0.89
90	0.21	1.13	1.35
100	-0.80	0.85	1.65
110	0.29	0.41	0.69
120	0.69	1.25	1.93

Tableau IV. 22. Profil d'exactitude obtenu pour l'alcool benzylique.

Niveaux de concentration (%)	Biais (%)	CV fidélité intermédiaire (%)	Erreur totale (%)
80	-0.58	1.19	1.77
90	-1.68	0.82	2.50
100	-1.06	1.31	2.37
110	-1.27	0.67	1.94
120	-1.54	0.56	2.10

En se basant sur les résultats obtenus, les valeurs pour chaque niveau de concentration montrent que la méthode utilisée est considérée comme valide sur l'intervalle de dosage où le profil d'exactitude est compris dans les limites d'acceptation. Aucune valeur de l'erreur totale ne dépasse l'intervalle de tolérance [-5%, +5%] pour le diclofénac sodique et l'alcool benzylique, ce qui indique que la méthode est précise.

IV.2.7 Intervalle de tolérance

Les limites de tolérance de biais ont été calculées pour chaque niveau de concentration en utilisant les Equations IV. 10-13.

$$L = Biais_j\ (\%) \pm t\left(v; \frac{1+\beta}{2}\right)\sqrt{\left(1 + \frac{1}{pnB_j}\right) CV_{FI,j}} \qquad \text{(IV.10)}$$

Avec :

$$R_j = \frac{\hat{\sigma}^2{}_{B,j}}{\hat{\sigma}^2{}_{W,j}} \qquad \text{(IV.11)}$$

$$B_j = \sqrt{\frac{R+1}{nR_j+1}} \quad \text{(IV.12)}$$

$$v = \frac{(R+1)^2}{\frac{\left(R+\frac{1}{n}\right)^2}{p-1}+\frac{1-\frac{1}{n}}{pn}} \quad \text{(IV.13)}$$

Les résultats de l'intervalle de tolérance (Biais) pour la méthode de dosage du diclofénac sodique sont présentés dans le Tableau IV. 23.

Tableau IV. 23. Limites de tolérance de Biais du diclofénac sodique.

Niveaux de concentration (%)	Min (%)	Biais (%)	Max (%)
80	-1,66	0,48	2,62
90	-3,36	0,21	3,78
100	-3,87	-0,80	2,27
110	-1,84	0,29	2,42
120	-3,05	0,69	4,43

Les résultats de l'intervalle de tolérance (Biais) pour la méthode de dosage de l'Alcool benzylique sont présentés dans le Tableau IV. 24.

Tableau IV. 24. Limites de tolérance de Biais de l'alcool benzylique.

Niveaux de concentration (%)	Min (%)	Biais (%)	Max (%)
80	-4,24	-0,58	3,08
90	-4,69	-1,68	1,33
100	-4,84	-1,06	2,72
110	-3,98	-1,27	1,43
120	-3,96	-1,54	0,89

Selon les valeurs de l'intervalle de tolérance, aucune valeur ne dépasse les limites du risque de 5% en valeur absolue. Par conséquent, la méthode reste considérée comme valide

dans le temps, tant que la concentration du principe actif « diclofénac sodique » et de « l'alcool benzylique » sont situées entre 80% et 120% de la concentration nominale.

IV.2.8 Intervalle de tolérance (Concentration)

Les limites de tolérance de concentration pour la méthode de dosage du Diclofénac Sodique et pour la méthode de dosage de l'alcool benzylique ont été calculées pour chaque niveau de concentration et sont présentées dans les Tableaux IV. 25 et IV 26, respectivement.

Tableau IV. 25. Limites de tolérance de concentration du diclofénac sodique.

Limite intervalle tolérance basse en (mg/ml)	Limite intervalle tolérance basse en (%)	Concentration moyenne calculée (mg/ml)	Recouvrement (%)	Limite intervalle tolérance haute en (mg/ml)	Limite intervalle tolérance haute en (%)	Concentration moyenne calculée (mg/ml)
0,0477	99,42	0,0482	100,48	0,0487	101,54	0,0480
0,0525	97,27	0,0541	100,21	0,0557	103,16	0,0540
0,0582	97,03	0,0595	99,20	0,0608	101,37	0,0600
0,0655	99,24	0,0662	100,29	0,0669	101,34	0,0660
0,0702	97,44	0,0725	100,69	0,0748	103,93	0,0720

Tableau IV. 26. Limites de tolérance de concentration d'alcool benzylique.

Limite intervalle tolérance basse en (mg/ml)	Limite intervalle tolérance basse en (%)	Concentration moyenne calculée (mg/ml)	Recouvrement (%)	Limite intervalle tolérance haute en (mg/ml)	Limite intervalle tolérance haute en (%)	Concentration moyenne calculée (mg/ml)
0,0740	96,35	0,0764	99,42	0,0787	102,49	0,0768
0,0832	96,25	0,0850	98,32	0,0867	100,39	0,0864
0,0918	95,64	0,0950	98,94	0,0981	102,24	0,0960
0,1025	97,04	0,1043	98,73	0,1060	100,41	0,1056
0,1118	97,08	0,1134	98,46	0,1150	99,85	0,1152

Selon les valeurs de l'intervalle de tolérance, aucune valeur ne dépasse les limites du risque de 5% en valeur absolue. Par conséquent, la méthode restera considérée comme valide dans le temps, tant que la concentration du principe actif « diclofénac sodique » et de l'excipient « alcool benzylique » soient situées entre 80% et 120% de la concentration nominale.

IV.2.9 Profil d'exactitude

Figure IV.4(a) montre l'intervalle de tolérance aux biais pour le diclofénac sodique à différents niveaux de concentration, en particulier de 85 % à 125 % de la concentration nominale. Les trois lignes tracées représentent les valeurs minimales (MIN%), maximales (MAX%) et de biais (BIAIS%). Le graphique montre que les valeurs de biais se situent systématiquement dans les limites de tolérance de ± 5 %, ce qui indique que la méthode maintient la précision sur une large plage de concentrations. Les écarts entre les valeurs minimales et maximales sont minimes, renforçant la fiabilité de la méthode en termes de biais.

Figure IV.4(b) illustre l'intervalle de tolérance pour la concentration de diclofénac sodique, en se concentrant sur la concentration calculée en mg/ml. Les pourcentages de recouvrement (récupération) sont tracés à côté des limites d'acceptabilité en termes de pourcentage. Le pourcentage de récupération oscille autour de 100 % et les limites haute et basse d'acceptabilité restent bien dans la plage de ± 5 %. Cela indique que la méthode récupère systématiquement la concentration attendue de diclofénac sodique, confirmant ainsi son exactitude et sa robustesse.

Semblable à la Figure IV.4(a), Figure IV.4(c) montre l'intervalle de tolérance de biais pour l'alcool benzylique et diclofénac sodique à des concentrations allant de 85 % à 125 % de la concentration nominale. Les valeurs de biais (BIAIS %) se situent bien dans les limites de tolérance de ± 5 %, les valeurs minimales (MIN %) et maximales (MAX %) montrant une fluctuation limitée. Cette stabilité des valeurs de biais à différentes concentrations souligne la précision constante de la méthode pour l'alcool benzylique.

Figure IV.4(d) présente l'intervalle de tolérance de concentration pour l'alcool benzylique, en traçant la concentration calculée en mg/ml par rapport au pourcentage de récupération et aux limites d'acceptabilité. Les pourcentages de récupération sont proches de 100 % et les limites d'acceptabilité restent dans la fourchette de ± 5 %. Cela suggère que la méthode fournit des mesures précises de la concentration d'alcool benzylique sur la plage testée.

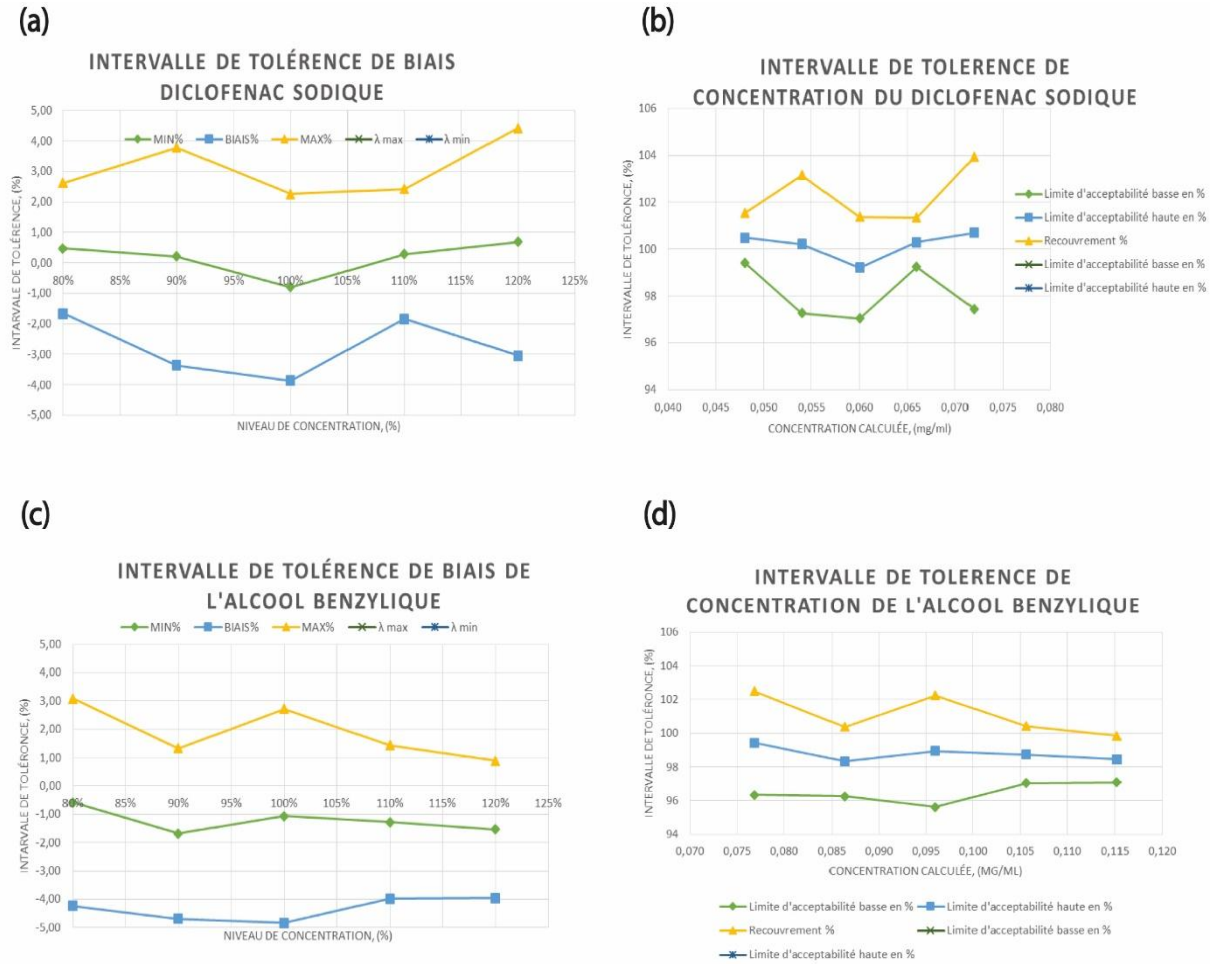


Figure IV. 4. (a) profil d'exactitude de biais de diclofénac sodique pour $\lambda = \pm 5\%$ et $\beta = 90\%$, (b) profil d'exactitude des concentrations du diclofénac sodique pour $\lambda = \pm 5\%$ et $\beta = 90\%$, (c) profil d'exactitude de biais de l'alcool benzylique pour $\lambda = \pm 5\%$ et $\beta = 90\%$, (d) profil d'exactitude des concentrations de l'alcool benzylique pour $\lambda = \pm 5\%$ et $\beta = 90\%$.

Les statistiques présentées démontrent collectivement que les méthodes utilisées pour doser le diclofénac sodique et l'alcool benzylique sont à la fois précises et fiables. Les intervalles de tolérance de biais et de concentration se situent dans des limites acceptables, renforçant la validité de ces méthodes pour le contrôle qualité pharmaceutique. La cohérence des résultats pour diverses concentrations soutient en outre la robustesse des procédures analytiques utilisées.

IV.2.10 Estimation de la linéarité et des limites de quantification

a. Estimation de la linéarité de la méthode de dosage du diclofénac sodique

L'évaluation de la linéarité pour la méthode de dosage du diclofénac sodique a impliqué le calcul du coefficient de détermination (R^2) entre les concentrations calculées (prédictions inverses) et les concentrations introduites. L'analyse a été réalisée sur cinq niveaux de concentration, chacun avec trois répétitions indépendantes, comme montré dans le Tableau IV. 27. Les droites de régression obtenues étaient (Equations IV. 14 - IV. 16) :

$$C_{Calculée\,1} = 1.0092 * C_{Introduite\,1} + 0.0002\ ;\ R^2 = 0.999 \quad \text{(IV.14)}$$

$$C_{Calculée\,2} = 1.0278 * C_{Introduite\,2} + 0.0016\ ;\ R^2 = 0.9976 \quad \text{(IV.15)}$$

$$C_{Calculée\,3} = 0.9933 * C_{Introduite\,3} + 0.0003\ ;\ R^2 = 0.9987 \quad \text{(IV.16)}$$

Tableau IV. 27. Concentrations prédites en fonction des concentrations introduites pour les trois séries.

Niveaux	Concentration théorique (mg/ml)	Concentration moyenne calculée S1 (mg/ml)	Concentration moyenne calculée S2 (mg/ml)	Concentration moyenne calculée S3 (mg/ml)
1	0,048	0,0483	0,0481	0,0483
2	0,054	0,0545	0,0539	0,0539
3	0,060	0,0598	0,0594	0,0594
4	0,066	0,0664	0,0661	0,0662
5	0,072	0,0727	0,0729	0,0719

Ces valeurs élevées de R^2 indiquent que plus de 99% de la variabilité totale de la concentration prédite peut être expliquée par la variabilité de la concentration introduite. Cela confirme la validité et l'acceptabilité de la relation linéaire, comme montré dans la Figure IV.5 (a). Les droites de régression suivent de près la ligne idéale $y = x$, suggérant que la pente n'est pas statistiquement différente de 1, et l'interception n'est pas statistiquement différente de 0. Ce degré élevé de linéarité assure l'exactitude et la fiabilité de la méthode de dosage du diclofénac sodique.

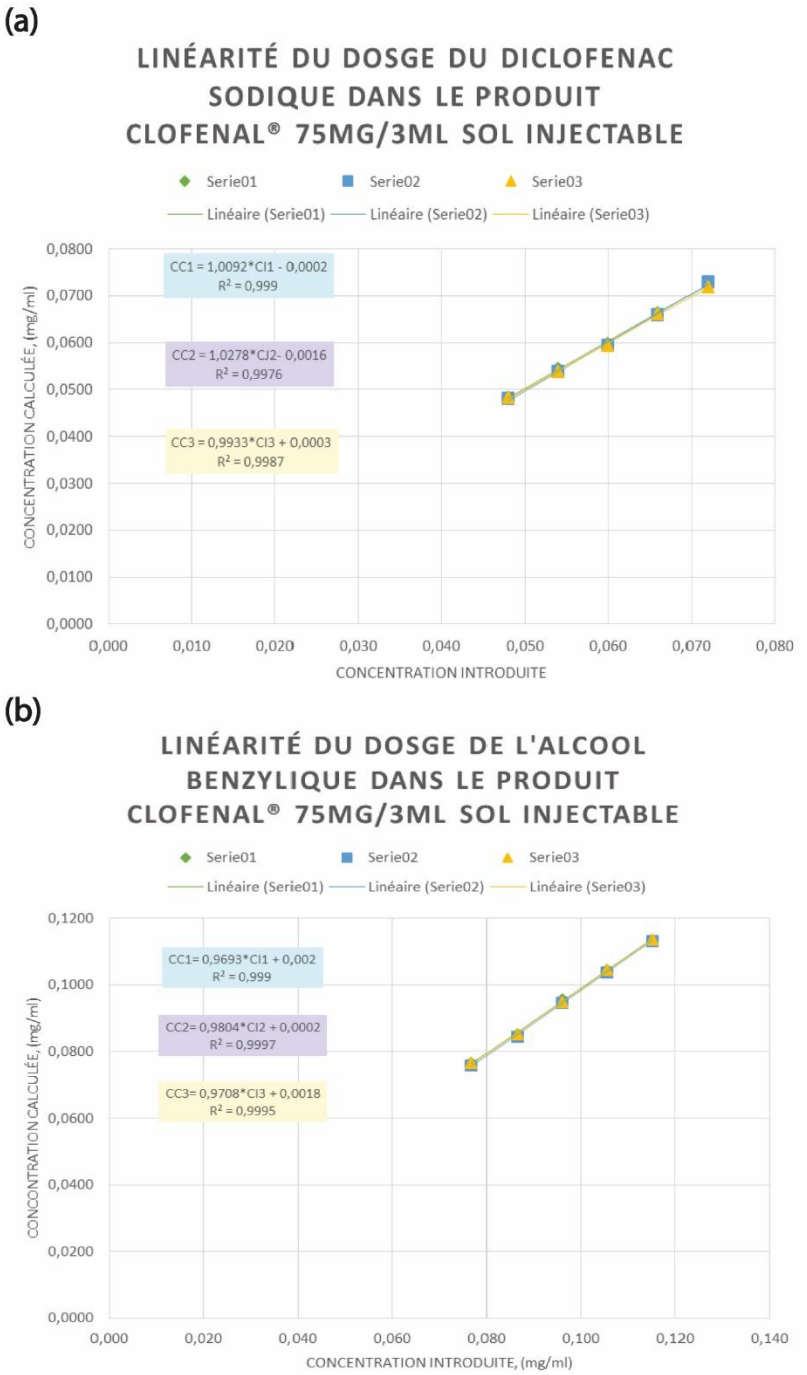


Figure IV. 5. Représentation graphique de la linéarité du (a) diclofénac sodique et (b) de l'alcool benzylique lors des essais d'étalonnage et validation, les concentrations introduites en fonction de concentrations calculées.

b. Estimation de la linéarité de la méthode de dosage de l'alcool benzylique

De même, la linéarité de la méthode de dosage de l'alcool benzylique a été évaluée en utilisant cinq niveaux de concentration, avec trois répétitions indépendantes, comme détaillé dans le Tableau IV. 28. Les droites de régression obtenues étaient (Equations IV. 17 - IV. 19) :

$$C_{Calculée\,1} = 0.9693 * C_{Introduite\,1} + 0.002\,;\ R^2 = 0.999 \quad \text{(IV.17)}$$

$$C_{Calculée\,2} = 0.9804 * C_{Introduite\,2} + 0.0002\,;\ R^2 = 0.9997 \quad \text{(IV.18)}$$

$$C_{Calculée\,3} = 0.9708 * C_{Introduite\,3} + 0.0018\,;\ R^2 = 0.9995 \quad \text{(IV.19)}$$

Tableau IV. 28. Concentrations prédites en fonction des concentrations introduites pour les trois séries.

Niveaux	Concentration théorique (mg/ml)	Concentration moyenne calculée S1 (mg/ml)	Concentration moyenne calculée S2 (mg/ml)	Concentration moyenne calculée S3 (mg/ml)
1	0.077	0.0766	0.0758	0.0767
2	0.086	0.0851	0.0845	0.0852
3	0. 096	0.0957	0.0945	0.0947
4	0.106	0.1045	0.1038	0.1044
5	0.115	0.1134	0.1132	0.1137

Comme pour le diclofénac sodique, les valeurs de R^2 étaient proches de 1, indiquant que les modèles de régression linéaire sont très valides et que les concentrations prédites correspondent étroitement aux concentrations introduites, comme montré dans la Figure IV. 5 (b). Les pentes et les interceptions des droites de régression confirment encore la précision de la méthode, la rendant adéquate pour la quantification de l'alcool benzylique.

IV.3 Critères complémentaires

IV.3.1 Limites de quantification du diclofénac sodique

Les limites de quantification ont été déterminées sur la base des niveaux de concentration élevés (120%) et bas (80%), assurant que les limites de l'intervalle de tolérance se situent dans la plage d'acceptabilité de ±5%. Pour le diclofénac sodique, les limites de quantification calculées sont présentées dans le Tableau IV. 29, et la Figure IV. 6(a) illustre ce processus. Les paramètres de régression linéaire sont :

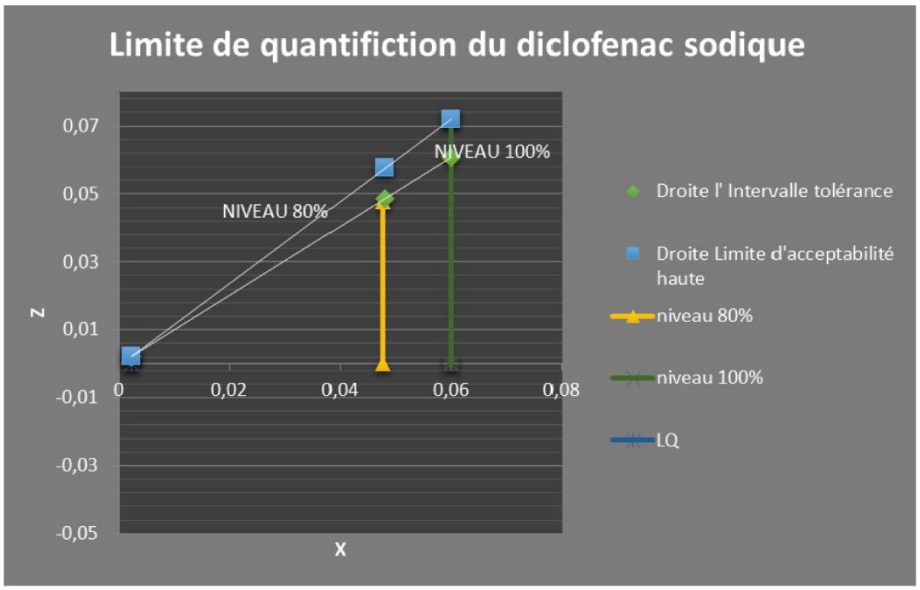
- Pente de l'intervalle de tolérance : 1.007,
- Interception de l'intervalle de tolérance : 0.0004,
- Pente de la limite d'acceptabilité haute : 1.2,
- Interception de la limite d'acceptabilité haute : 0.0.

Tableau IV. 29. Calcul des limites de quantification de diclofénac sodique.

Ligne	**80%**	**100%**
Concentration moyenne théorique	0.048	0.06
Limite intervalle tolérance haute	0.0487	0.0608
Limite d'acceptabilité haute	0.0576	0.0720
Droite	**Pente**	**Origine**
Intervalle tolérance	1.007	0.0004
Limite d'acceptabilité haute	1.2	0.0
Limite de quantification en mg/ml	**0.002**	

La Figure IV.6 (a) illustre le calcul de la limite de quantification pour le diclofénac sodique. Les lignes représentant les limites d'acceptabilité haute (en jaune) et l'intervalle de tolérance (en vert) montrent que les concentrations à 80% et 100% se trouvent bien dans la plage d'acceptabilité fixée à ±5%. Les points de données montrent une dispersion minimale, ce qui indique une précision élevée dans cette plage de concentration. La limite de quantification pour le diclofénac sodique est calculée à 0.002 mg/ml, confirmant que la méthode répond aux normes de précision requises à des niveaux de concentration élevés et bas.

(a)



(b)

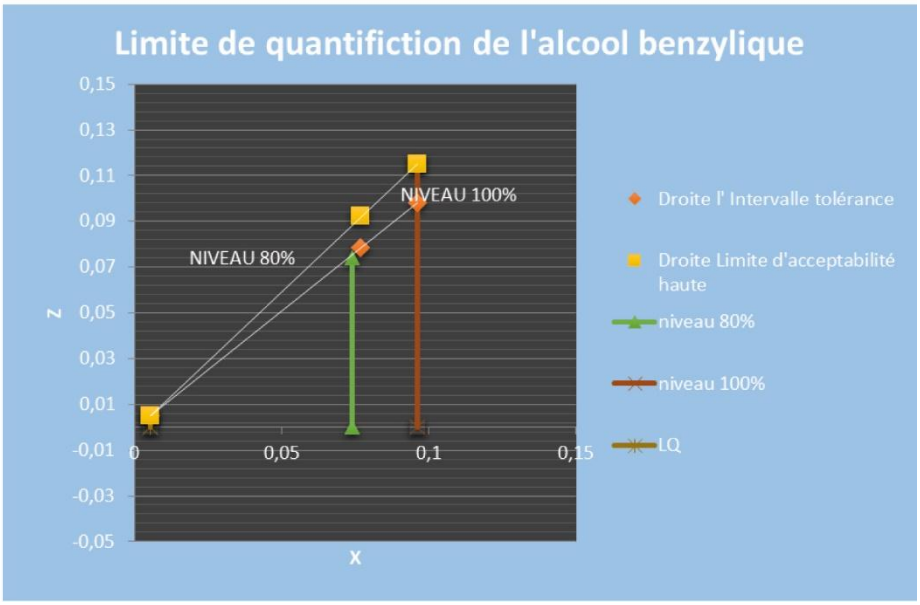


Figure IV. 6. Limites de quantification de (a) diclofénac sodique et (b) l'alcool benzylique.

IV.3.2 Limites de quantification de l'alcool benzylique

De même, les limites de quantification pour l'alcool benzylique ont été établies en utilisant les mêmes critères. Le Tableau IV. 30 et la Figure IV. 6(b) fournissent les détails. Les paramètres de régression linéaire sont :

- Pente de l'intervalle de tolérance : 1.012,

- Interception de l'intervalle de tolérance : 0.00096,
- Pente de la limite d'acceptabilité haute : 1.2,
- Interception de la limite d'acceptabilité haute : 0.0.

Tableau IV. 30. Calcul des limites de quantification d'alcool benzylique.

Ligne	**80%**	**100%**
Concentration moyenne théorique	0.0768	0.0960
Limite intervalle tolérance haute	0.0787	0.0981
Limite d'acceptabilité haute	0.0922	0.1152
Droite	**Pente**	**Origine**
Intervalle tolérance haute	1.012	0.00096
Limite d'acceptabilité haute	1.2	0
Limite de quantification en mg/ml	**0.005**	

La Figure IV. 6(b) montre les limites de quantification pour l'alcool benzylique. Les limites d'acceptabilité et les intervalles de tolérance sont clairement définis, et les niveaux de concentration à 80% et 100% se situent bien à l'intérieur de ces limites. La limite de quantification pour l'alcool benzylique est déterminée à 0.005 mg/ml. Les résultats confirment que la méthode analytique est précise et fiable pour une large gamme de concentrations.

Les analyses graphiques des Figures IV. 5(a et b) et Figures IV. 6(a et b) renforcent la validité des méthodes analytiques pour le diclofénac sodique et l'alcool benzylique. La linéarité élevée et les limites de quantification définies démontrent que ces méthodes sont robustes et fiables. Les coefficients de détermination proches de 1 et les pentes et interceptions appropriées des droites de régression montrent que les méthodes respectent les critères de précision requis pour l'analyse de ces substances dans des formulations pharmaceutiques. En conclusion, ces méthodes analytiques sont bien adaptées pour garantir la qualité et l'efficacité des produits contenant du diclofénac sodique et de l'alcool benzylique.

IV.4 CONCLUSION

La validation d'une méthode analytique nécessite une analyse approfondie des performances et une vérification des paramètres, cela montre l'importance de vérifier ses paramètres pour garantir la fiabilité et la précision des résultats obtenus. Dans notre travail, nous avons abordé l'expérimentation par deux techniques analytiques (HPLC et UV/VIS), ce qui a entraîné des résultats différents.

L'analyse des résultats de spécificité montre que la méthode d'identification du principe actif Diclofenac Sodique dans le produit CLOFENAL® par spectrophotomètre d'absorption UV/VIS est spécifique. Cependant, l'analyse des résultats de spécificité du placebo montre que la méthode de dosage du principe actif Diclofenac Sodique dans le produit CLOFENAL® par spectrophotomètre d'absorption UV/VIS est non spécifique. Cela signifie que la méthode d'identification du Diclofenac Sodique dans le produit CLOFENAL® par UV/VIS est capable de détecter spécifiquement le principe actif, sans interférences d'autres composants. Néanmoins, la méthode de dosage quantitatif du Diclofenac Sodique dans le même produit par cette même technique n'est pas spécifique. Cela est dû à la présence d'autres substances dans le placebo (excipients, impuretés, etc.) qui interfèrent avec la mesure du principe actif et faussent les résultats du dosage.

Quant aux résultats obtenus par la deuxième méthode, la spécificité, la linéarité et l'exactitude de la méthode de dosage du CLOFENAL® dans une solution injectable dosés à 75mg/3ml par HPLC mise au point dans le présent travail sont démontrés dans l'intervalle de dosage de 0.06mg/ml à 0.072mg/ml en diclofénac sodique et de 0.0768mg/ml a 0.1152mg/ml en l'alcool benzylique avec une probabilité de confiance de 90% dans les limites d'acceptation définies ±5 %. Autrement dit, la justesse varie également car le biais de justesse varie entre 0.69% et 1.93% pour le diclofénac sodique, et entre 1.77% et 2.50% pour l'alcool benzylique. 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 comme méthode de dosage a permis d'obtenir des résultats exacts, précis et spécifiques (méthode séparative).

Cette deuxième méthode analytique par HPLC s'est révélée concluante et valide selon les critères de performance prédéfinis, démontrant ainsi sa pertinence pour l'analyse de cette préparation pharmaceutique.

CONCLUSION GENERALE

Conclusion générale

Les règles en place dans l'industrie pharmaceutique sont strictes et complexes pour assurer une protection maximale aux patients et aux entreprises. Le contrôle et la validation des méthodes sont essentiels pour la mise sur le marché des médicaments. La validation des procédures analytiques est désormais un principe largement accepté et appliqué dans tous les secteurs d'activité et pour la production de résultats de mesure.

La validation d'une méthode d'analyse implique différentes étapes visant à tester la normalité de la distribution des mesures, estimer les composantes de l'incertitude de mesure, fidélité, justesse, spécificité et définir des tests de contrôle de la non dégradation des performances de la méthode. L'objectif de la validation vise à fournir des preuves suffisantes de l'accomplissement des objectifs de l'analyse, définis à travers un ensemble approprié de paramètres de performance et de critères pertinents. Ces derniers peuvent varier en fonction de l'objectif spécifique de l'analyse et de la méthode technique sélectionnée.

Ainsi, le but de notre étude a été de valider une méthode de dosage du CLOFENAL® dans une solution injectable à 75 mg/3 ml par chromatographie liquide à haute performance (HPLC) et par UV-visible en utilisant le profil d'exactitude et l'intervalle de tolérance comme outil de décision de validation.

En premier lieu, nous avons évalué la spécificité de la méthode analytique par spectroscopie UV-visible en injectant des solutions de placebo et de l'échantillon dans l'intervalle de longueurs d'onde de 240 à 300 nm. Les résultats indiquent l'absence de pic d'absorbance significatif à 275 nm pour la solution placebo, tandis qu'une absorbance maximale est observée à cette longueur d'onde pour la solution contenant l'échantillon. De plus, l'absorbance moyenne du placebo à 275 nm est de 0.0144, présentant ainsi une différence significative par rapport à zéro. Cela signifie que la méthode d'analyse par spectroscopie UV-visible est spécifique pour le principe actif Diclofenac Sodique, car elle est capable de détecter une absorbance significative à 275 nm uniquement dans la solution contenant l'échantillon et non dans la solution placebo. Cette spécificité est essentielle pour garantir la fiabilité des résultats analytiques et éviter les erreurs de dosage.

D'autre part, la méthode de l'HPLC à barrette de diode consiste en la construction d'un modèle statistique, d'un plan d'expérience et l'utilisation des équipements de référence certifiés, utilisée pour évaluer le biais ou « l'erreur systématique », pour calculer « l'incertitude composée » (somme de l'incertitude sur la moyenne « erreur aléatoire ») et de l'incertitude sur

la valeur exacte. Cette méthode est appliquée au dosage du diclofénac sodique (principe actif) et de l'alcool benzylique (excipient) dans le produit CLOFENAL® 75mg/3ml solution injectable, et le modèle choisi est linéaire. Les résultats montrent : (i) que les distributions ne sont pas significativement différentes de la loi normale ; (ii) qu'il existe généralement un biais significativement différent de zéro nécessitant une correction ; (iii) qu'il n'existe aucune liaison entre le biais et la concentration de l'analyte ; (iv) que l'intervalle de confiance peut être calculé par application de la loi de Student avec l'incertitude composée. La représentation graphique suivant la méthode du « profil d'exactitude » aide à visualiser les performances de la méthode pour chacun des analytes. La méthode des ajouts dosés permet de vérifier la spécificité de la méthode et d'établir le pourcentage de recouvrement. Les droites de régression obtenues permettent de corriger les concentrations brutes de l'erreur systématique. Les cartes de contrôle permettent de détecter une éventuelle dégradation des performances dans le temps et la stabilité des étalonnages.

Suite aux résultats obtenus, on peut conclure que la méthode de dosage du diclofénac sodique (principe actif) et de l'alcool benzylique (excipient) dans le produit CLOFENAL® 75mg/3ml solution injectable peut être considérée comme valide au risque de 5% dans l'intervalle de mesure allant de 0.06 mg/ml à 0.072 mg/ml en diclofénac sodique et de 0.0768 mg/ml à 0.1152 mg/ml en alcool benzylique avec une probabilité de 90%. On observe que la limite inférieure (limite de quantification) sera calculée, si nécessaire, de façon plus exacte. Par ailleurs, on constate que, d'une part, la fidélité varie en fonction de la concentration puisque son coefficient de variation de fidélité passe de 0.41% à 1.25% pour le diclofénac sodique et de 0.56% à 1.31% pour l'alcool benzylique ; d'autre part, la justesse varie aussi puisque le biais de justesse varie de 0.69% à 1.93% pour le diclofénac sodique et de 1.77% à 2.50% pour l'alcool benzylique. Cette remarque souligne l'intérêt de procéder aux calculs niveau par niveau. Cependant, ce biais n'a pas d'influence importante sur la validité de la méthode.

Les résultats obtenus prouvent que toutes les exigences spécifiques élaborées dans cette approche harmonisée sont remplies, ce qui atteste la validité de la méthode mise au point dans le présent travail. Cela signifie que l'analyste peut garantir la fiabilité des résultats de cette méthode de dosage et qu'elle est apte à être utilisée et appliquée en routine pour le dosage du Diclofenac Sodique.

REFERENCES BIBILOGRAPHIQUES

Références bibliographique

[1] OMS, Organisation mondiale de la santé, (2011). https://www.who.int/fr.

[2] C.A. Anne, Les bases législatives et réglementaires du développement de l'industrie pharmaceutique en Afrique : le cas de la Côte d'Ivoire., 2018. https://theses.hal.science/tel-02307405/document.

[3] R. Gervais, G. Willoquet, J. Calop, M. Talbert, GPC Guide Pharmaco Clinique, Les Éditions Le Moniteur des pharmacies Newsmed, 2017. https://books.google.dz/books?id=wUsPtAEACAAJ.

[4] A.R. Sallmann, The history of diclofenac., Am. J. Med. 80 (1986) 29–33. https://doi.org/10.1016/0002-9343(86)90076-8.

[5] C. Goethals, M. Wunderle, Le secteur pharmaceutique en Belgique, 2018. https://doi.org/10.3917/cris.2366.0005.

[6] L. Champsaur, Mise sur le marché d'un médicament générique : effets sur la confiance-patient, les analyses biologiques des patients et les stratégies marketing des firmes pharmaceutiques, 2020. https://dumas.ccsd.cnrs.fr/dumas-02948046.

[7] M. NAIMA, LA COMPARAISON DES PROFILS DE DISSOLUTION DE DEUX MEDICAMENTS : PRINCEPS ET GENERIQUE, 2023. https://toubkal.imist.ma/handle/123456789/30942?show=full.

[8] É. Nouguez, La définition des médicaments génériques entre enjeux thérapeutiques et économiques, Rev. Fr. Aff. Soc. (2007) 99–121. https://doi.org/10.3917/rfas.073.0099.

[9] A.D. Mawé, Evaluation de la qualité de la gentamicine injectable dispensée dans les centres de santé et officines privées de Bamako, 2022. https://www.bibliosante.ml/handle/123456789/13063.

[10] J. Chargois, Obligation légale de prescription en Dénomination Commune Internationale : identification des connaisances et croyances des partients To cite this version : HAL Id : hal-01932053 soutenance et mis à disposition de l ' ensemble de la Contact : ddoc-thesese, 2018. https://hal.univ-lorraine.fr/hal-01932053/document.

[11] S. De Rhumatologie, Initiation à la Connaissance du, 5èm Ed, 2008.

[12] E.C. M. Albert, Evaluation de la Situation des Produits Pharmaceutiques Périmés ou

Avariés au CHU Gabriel Touré de Bamako, 2022. https://bibliosante.ml/bitstream/handle/123456789/12714/22P53.pdf?sequence=1&isAllowed=y.

[13] H. Kalasz, I. Antal, Drug Excipients, Curr. Med. Chem. 13 (2006) 2535–2563. https://doi.org/http://dx.doi.org/10.2174/092986706778201648.

[14] VIDAL, Les excipient à effet notoire, Vidal. (2011). https://www.vidal.fr/medicaments/utilisation/prendre-traitement/excipients-effet-notoire.html.

[15] T. Marc, W. Gérard, L. Denis, Guide pharmaco, Lamarre, 2004.

[16] L. Valérie, Conditionnement et contrôle de la qualité, 1994.

[17] D. Jacques, Pharmacologie générale, 2006. https://www.pharmacobx.fr/documents/pharmacologie-generale/poly_pharmacologie_generale.pdf.

[18] M. Halima-Fadia, ETUDE DE LA DISTRIBUTION DU MEDICAMENT VETERINAIRE EN ALGERIE., 2018. https://di.univ-blida.dz/jspui/handle/123456789/867.

[19] C. EVA, Préparation et administration des produits de santé injectables : De l'évaluation des pratiques à la réalisation d'une simulation numérique en santé, 2021. https://www.adiph.org/rechercher/qualite-gestion-des-risques/memoire-de-des-simuperf-eva-coulpier.

[20] W. Pascal, Pharmacie galénique: formulation et technologie pharmaceutique, 2007.

[21] M.J. Mycek, R.A. Harvey, P.C. Champe, Pharmacology, 2èm Ed, 2000.

[22] D. Brossard, C. Charrueau, L.H. Jean-Claude, Chaumeil Sylvie, Crauste-Manciet Alain, Pharmacie galénique: Bonnes pratiques de fabrication des médicaments, 10èm Ed, 2016.

[23] L. Yves, Initiation à la connaissance du médicament - UE6: PACES, 2èm Ed, 2012.

[24] B. Michel, J. Pascale, Pharmacologie générale et pratique, 3èm Ed, 1999.

[25] C. Jean, Immunité chez les animaux et les végétaux, Lavoisier, 2012. https://books.google.dz/books?id=3iqkAgAAQBAJ.

[26] M. Nozha, Propriétés antioxydante, anti-inflammatoire et immunomodulatrice des extraits d'Asphodelus microcarpus, 2019. http://dspace.univ-setif.dz:8888/jspui/bitstream/123456789/3550/1/These doctorat Nozha Mayouf.pdf.

[27] G. Marcel, D. Valéry, D. Jean, D. Jacques, D. François, M. Garnier, D. Jacques, D. François, Dictionnaire des termes de médecine / Marcel Garnier, Valéry Delamare, Jean Delamare... [et al.], 24e éd. re, Maloine, Paris, 1995.

[28] V. Louis, L. Vidal, O.-E. du Vidal, Dictionnaire des spécialités pharmaceutiques / Vidal et George, Office de vulgarisation pharmaceutique, Paris, 1914.

[29] M.J. Neal, L. Giurgea, M.P. Mingeot, Pharmacologie médicale, De Boeck université, 1999. https://books.google.dz/books?id=bGuEPQAACAAJ.

[30] M. Talbert, G. Willoquet, R. Gervais, Guide pharmaco: étudiants et professionnels en soins infirmiers, Lamarre, 2012. https://books.google.dz/books?id=bpNEMgEACAAJ.

[31] S. Ushiyama, T. Yamada, Y. Murakami, S. Kumakura, S. Inoue, K. Suzuki, A. Nakao, A. Kawara, T. Kimura, Preclinical pharmacology profile of CS-706, a novel cyclooxygenase-2 selective inhibitor, with potent antinociceptive and anti-inflammatory effects, Eur. J. Pharmacol. 578 (2008) 76–86. https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2007.08.034.

[32] M. Barbarić, M. Kralj, M. Marjanović, I. Husnjak, K. Pavelić, J. Filipović-Grčić, D. Zorc, B. Zorc, Synthesis and in vitro antitumor effect of diclofenac and fenoprofen thiolated and nonthiolated polyaspartamide-drug conjugates, Eur. J. Med. Chem. 42 (2007) 20–29. https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2006.08.009.

[33] J.M. Chevallier, S. Kernbaum,) J.P.G., Dictionnaire de Médecine Flammarion, Médecine Sciences Publications, 2001. https://books.google.dz/books?id=v4OIAAAACAAJ.

[34] Site du Collège National de Pharmacologie Médicale, Pharmacologie Médicale, (2024). https://pharmacomedicale.org/.

[35] Vidal 2010: le dictionnaire, Vidal, 2010. https://books.google.dz/books?id=rF1lMwEACAAJ.

[36] Y. Cohen, C. Jacquot, Pharmacologie, Elsevier Masson, 2008. https://books.google.dz/books?id=-F_LwAEACAAJ.

[37] H.J. G., L.L. E., G.A. Goodman, T. Jean-Paul, J.G. Hardman, H.J. G., L.L. E., G.A. Goodman, T. Jean-Paul, Goodman & Gilman : les bases pharmacologiques de l'utilisation des médicaments / ed. in chief Joel G. Hardman,... [et] Lee E. Limbird,... ; consulting ed. Alfred Goodman Gilman,... révision scientifique de l'éd. française par Jean-Paul Tillement, Pierre , 9e éd., McGraw-Hill, London New York San Francisco [etc, 1998.

[38] National Center for Biotechnology Information. PubChem Compound Summary for CID 5018304, Diclofenac sodium., (2024). https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Diclofenac-sodium.

[39] C. de l'Europe, Pharmacopée européenne / publiée sous la direction du Conseil de l'Europe (accord partiel) selon la Convention sur l'élaboration d'une Pharmacopée européenne (Traités européens, Série n° 50), Pharmacopée Eur. / Publiée Sous La Dir. Du Cons. l'Europe (Accord Partiel) Selon La Conv. Sur l'élaboration d'une Pharmacopée Eur. (Traités Eur. Série N° 50). (1969).

[40] A.L. Hir, Pharmacie galénique: bonnes pratiques de fabrication des médicaments, Masson, 2001. https://books.google.dz/books?id=kJ3VwAEACAAJ.

[41] A. ARTIGES, La pharmacopée européenne et la direction européenne de la qualité du médicament au Conseil de l'Europe, Bull. Acad. Natl. Med. 190 (2006) 1903–1911. https://doi.org/10.1016/s0001-4079(19)33131-0.

[42] R.E. Small, Diclofenac sodium., Clin. Pharm. 8 (1989) 545–558.

[43] R.N. Brogden, R.C. Heel, G.E. Pakes, T.M. Speight, G.S. Avery, Diclofenac Sodium: A Review of its Pharmacological Properties and Therapeutic Use in Rheumatic Diseases and Pain of Varying Origin, Drugs. 20 (1980) 24–48. https://doi.org/10.2165/00003495-198020010-00002.

[44] B. Nunes, D. Daniel, G.G. Canelas, J. Barros, A.T. Correia, Toxic effects of environmentally realistic concentrations of diclofenac in organisms from two distinct trophic levels, Hediste diversicolor and Solea senegalensis, Comp. Biochem. Physiol. Part C Toxicol. Pharmacol. 231 (2020) 108722. https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.cbpc.2020.108722.

[45] H. Stierlin, J.W. Faigle, A. Colombi, Pharmacokinetics of Diclofenac Sodium (Voltaren)

And Metabolites in Patients with Impaired Renal Function, Scand. J. Rheumatol. 7 (1978) 30–35. https://doi.org/10.3109/03009747809097213.

[46] T.J. Gan, Diclofenac: an update on its mechanism of action and safety profile, Curr. Med. Res. Opin. 26 (2010) 1715–1731. https://doi.org/10.1185/03007995.2010.486301.

[47] DICLOFENAC DELBERT 75 mg/3 ml, solution injectable Diclofénac sodique, BASE DONNÉES PUBLIQUE DES MÉDICAMENTS. (2023). https://base-donnees-publique.medicaments.gouv.fr/affichageDoc.php?specid=66279344&typedoc=N.

[48] DICLOFÉNAC injectable, Guid. Médicaux MSF. (2024). https://medicalguidelines.msf.org/en/viewport/EssDr/english/diclofenac-injectable-16682656.html.

[49] Gamme de médicaments DICLOFENAC SANDOZ, Vidal. (2024). https://www.vidal.fr/medicaments/gammes/diclofenac-sandoz-25227.html.

[50] DICLOFENAC DELBERT 75 mg/3 mL : nouvelle spécialité à base de diclofénac injectable, Vidal. (2022). https://www.vidal.fr/actualites/29657-diclofenac-delbert-75-mg-3-ml-nouvelle-specialite-a-base-de-diclofenac-injectable.html.

[51] A Review on Novel Analytical Method Development and Validation by RP-HPLC Method, Indian J. Forensic Med. Toxicol. 15 (2021) 3479–3486. https://doi.org/10.37506/ijfmt.v15i4.17798.

[52] P. Ravisankar, C.N. Navya, D. Pravallika, D.N. Sri, A review on step-by-step analytical method validation, IOSR J Pharm. 5 (2015) 7–19.

[53] European Medicines Agency, Q 2 (R1) Validation of Analytical Procedures, (1995). https://www.ema.europa.eu/en/documents/scientific-guideline/ich-guideline-q2r1-validation-analytical-procedures-text-methodology-step-5-first-version_en.pdf.

[54] ISO/IEC 17025:2017 Exigences générales concernant la compétence des laboratoires d'étalonnages et d'essais, (2017). https://www.iso.org/fr/standard/66912.html.

[55] GUIDELINE ON GENERAL PRINCIPLES OF PROCESS VALIDATION, (1987). https://variation.com/wp-content/uploads/guidance/FDA-Process-Validation-Guidance-1987.pdf.

[56] U.S.P. Convention, Usp35-Nf30, United States Pharmacopeia, 2011.

https://www.uspnf.com/official-text/proposal-statuscommentary/usp-35-nf-30.

[57] J. Leclerc, Stratégie de validation de procédés de nettoyage dans l'industrie pharmaceutique : évolution de l'annexe 15 des BPF, introduction de la notion de PDE et gestion de la transition sur un site de production de médicaments liquides non stériles, 2019. https://hal.univ-lorraine.fr/hal-03297875.

[58] P. Isabelle, Validation analytique : application de la procédure SFSTP 2003-2006 au domaine de la phytothérapie, 2015. https://dumas.ccsd.cnrs.fr/dumas-01188779/document.

[59] F. Max, Validation des méthodes d'analyse quantitatives au moyen du profil d'exactitude, (2023). https://www.techniques-ingenieur.fr/base-documentaire/mesures-analyses-th1/qualite-au-laboratoire-42497210/validation-des-methodes-d-analyse-quantitatives-au-moyen-du-profil-d-exactitude-p224/.

[60] A. Siavelis, Analyse des différentes approches de validation de méthodes de dosage et proposition d'un guide de validation de méthode de dosage en pharmacie hospitalière, 2015. https://dune.univ-angers.fr/documents/dune3337.

[61] M. ALLACHE, M.A. CHABANE, M. CHEBALLAH, MISE AU POINT ET VALIDATION D'UNE METHODE DE DOSAGE DU PIROXICAM DANS DES COMPRIMES DE 20 mg PAR CHROMATOGRAPHIE LIQUIDE A HAUTE PERFORMANCE, 2020. https://dspace.ummto.dz/items/50092d50-f473-4934-abe1-2b9a41bf0443.

[62] F. BOUCHAMA, W. MAMMOU, Validation analytique d'une méthode de dosage simultané du Paracétamol et du Tramadol dans des comprimés par HPLC. Application de la démarche harmonisée, 2017. https://dspace.ummto.dz/items/422ec479-4060-4869-b3f0-fed9b42d5282.

[63] VALIDATION DE LA METHODE DE LA DILLUTION ISOTOPIQUE (METHODE PRIMAIRE) SUR UN MATERIAU DE REFERENCE CERTIFIE (ESPECES DU MERCURE DANS UNE MATRICE DE POISSON), LNE Le Progrès, Une Passion à Partag. (2009). https://www.aquaref.fr/system/files/LNE4_validation_MRC_mercure_poisson.pdf.

[64] Guide de validation des méthodes d'analyses, ANSES/PR3/07/01 Version A. (2015).

https://www.anses.fr/fr/system/files/ANSES_GuideValidation.pdf.

[65] L. Pierre, H. Cédric, H. Philippe, B. Bruno, Cycle de vie des méthodes, vers une maîtrise intégrée des performances quantitatives, 2017. https://orbi.uliege.be/bitstream/2268/210447/1/Hubert Afsep Lyon mai 2017 2.pdf.

[66] M. Feinberg, B. Boulanger, W. Dewé, P. Hubert, New advances in method validation and measurement uncertainty aimed at improving the quality of chemical data, Anal. Bioanal. Chem. 380 (2004) 502–514. https://doi.org/10.1007/s00216-004-2791-y.

[67] M. Feinberg, M. Laurentie, A global approach to method validation and measurement uncertainty, Accredit. Qual. Assur. 11 (2006) 3–9. https://doi.org/10.1007/s00769-005-0081-9.

[68] R.W. Mee, β-Expectation and β-Content Tolerance Limits for Balanced One-Way ANOVA Random Model, Technometrics. 26 (1984) 251–254. https://doi.org/10.1080/00401706.1984.10487962.

[69] H. Philippe, VALIDER UNE MÉTHODE ANALYTIQUE,... POURQUOI ET COMMENT?, (2017). https://orbi.uliege.be/bitstream/2268/218214/1/Francqui_Validation PH.pdf.

[70] S. V Gandhi, P.L. Khairnar, A.P. Chaudhari, RP-HPLC METHOD FOR SIMULTANEOUS ESTIMATION OF NITAZOXANIDE AND OFLOXACIN FROM BULK AND TABLET DOSAGE FORM., Int. J. ChemTech Res. 4 (2012). https://doi.org/10.21276/irjps.2018.5.1.17.

[71] G. Tiwari, R. Tiwari, Bioanalytical method validation: An updated review., Pharm. Methods. 1 (2010) 25–38. https://doi.org/10.4103/2229-4708.72226.

[72] C.K. Sahoo, M. Sudhakar, S.R.M. Rao, Validation of analytical methods: A review, J. Innov. Pharm. Sci. 2 (2018) 8–15.

[73] M. Taleuzzaman, S.J. Gilani, S. Ali, A. Hafeez, K. Nagarajan, Bio-Analytical Method Validation-A Review, Austin J Anal Pharm Chem. 2 (2015) 1053. https://doi.org/10.13140/RG.2.1.4409.9605.

[74] S. Sharma, S. Goyal, K. Chauhan, A review on analytical method development and validation, Int. J. Appl. Pharm. 10 (2018) 8–15.

[75] Tijare LK, R. Nt, M. Un, A REVIEW ON BIOANALYTICAL METHOD DEVELOPMENT AND VALIDATION, Asian J. Pharm. Clin. Res. 9 (2016) 6–10. https://doi.org/10.22159/ajpcr.2016.v9s3.14321.

[76] C. Ye, J. Liu, F. Ren, N. Okafo, Design of experiment and data analysis by JMP® (SAS institute) in analytical method validation, J. Pharm. Biomed. Anal. 23 (2000) 581–589. https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0731-7085(00)00335-6.

[77] NOTE FOR GUIDANCE ON VALIDATION OF ANALYTICAL PROCEDURES:TEXT AND METHODOLOGY (CPMP/ICH/381/95) ICH Topic Q 2 (R1)Validation of Analytical Procedures:Text and Methodology, Eur. Med. Agency. (1995).

[78] P.K. Sahu, N.R. Ramisetti, T. Cecchi, S. Swain, C.S. Patro, J. Panda, An overview of experimental designs in HPLC method development and validation, J. Pharm. Biomed. Anal. 147 (2018) 590–611. https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.jpba.2017.05.006.

[79] A. Kirthi, R. Shanmugam, M.S. Prathyusha, D.J. Basha, A review on bioanalytical method development and validation by RP-HPLC, J. Glob. Trends Pharm. Sci. 5 (2014) 2265–2271.

[80] A. Bouabidi, E. Ziemons, R. Marini, C. Hubert, M. Talbi, A. Bouklouze, H. Bourichi, M. El Karbane, B. Boulanger, P. Hubert, E. Rozet, Usefulness of capability indices in the framework of analytical methods validation, Anal. Chim. Acta. 714 (2012) 47–56. https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.aca.2011.11.019.

[81] B.M. Marson, V. Concentino, A.M. Junkert, M.M. Fachi, R.O. Vilhena, R. Pontarolo, Validation of analytical methods in a pharmaceutical quality system: An overview focused on HPLC methods, Quim. Nova. 43 (2020) 1190–1203. https://doi.org/10.21577/0100-4042.20170589.

[82] D.F. Gerald, R. Jérôme, P. Pascal, L. Camille, Analysis of the performance of analytical method, Risk Analysis for routine use, 2011.

[83] N. MIMOUN, N. SARAOUI, Validation analytique d'une méthode de dosage du diclofénac de sodium dans les suppositoires à 100 mg par HPLC. Application de la démarche harmonisée., 2016. https://dspace.ummto.dz/items/346f73f0-989f-45ba-89ab-cd4ff801e607.

[84] P. Hubert, J.-J. Nguyen-Huu, B. Boulanger, E. Chapuzet, N. Cohen, P.-A. Compagnon, W. Dewé, M. Feinberg, M. Laurentie, N. Mercier, G. Muzard, L. Valat, E. Rozet, Harmonization of strategies for the validation of quantitative analytical procedures: A SFSTP proposal–Part III, J. Pharm. Biomed. Anal. 45 (2007) 82–96. https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.jpba.2007.06.032.

[85] P. HUBERT, N. NGUYEN-HUU, J LAURENTIE, M MERCIER, G. MUZARD, C. NIVET, E. VALAT, L BOULANGER, B CHAPUZET, P. CHIAP, N. COHEN, W. COMPAGNON, P DEWE, M.C.S. FEINBERG, M LALLIER, Validation des procédures analytiques quantitatives harmonisation des démarches, 13 (2003) 101–138.

[86] P. Hubert, J.-J. Nguyen-Huu, B. Boulanger, E. Chapuzet, N. Cohen, P.-A. Compagnon, W. Dewé, M. Feinberg, M. Laurentie, N. Mercier, Validation des procédures analytiques quantitatives: harmonisation des démarches-Partie III. Exemples d'application, STP Pharma Prat. 16 (2006).

[87] L. ILLOUL, Y. ISSAD, L. KADRI, M. RICHE, VALIDATION D'UNE METHODE DE DOSAGE DE LA LAMOTRIGINE DANS DES COMPRIMES DE 50mg PAR CHROMATOGRAPHIE LIQUIDE HAUTE PERFORMANCE PAR L'APPROCHE CAPABILITE, 2021. https://dspace.ummto.dz/items/b3ea9be0-17f2-44ba-a136-4a817595e774.

[88] B. TAMAZIRT, Mise au point et validation d'une méthode de dosage du Diclofénac sodique dans des comprimés gastro-résistants de 50 mg par HPLC, en vue d'une étude du profil de dissolution, 2017. https://dspace.ummto.dz/items/44dd3f82-e163-4791-b228-167709cb53fc.