



الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية  
REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET  
POPULAIRE  
وزارة التعليم العالي والبحث العلمي  
MINISTERE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR ET DE LA  
RECHERCHE SCIENTIFIQUE  
جامعة صالح بونبندر قسنطينة 3  
UNIVERSITE SALAH BOUBNIDER CONSTANTINE 3  
كلية الطب - قسم الصيدلة  
FACULTE DE MEDECINE - DEPARTEMENT DE PHARMACIE



**Mémoire de fin d'études en vue de l'obtention du  
diplôme de  
DOCTEUR EN PHARMACIE**

**DEVELOPPEMENT, VALIDATION ET  
EVALUATION DE LA ROBUSTESSE D'UNE  
METHODE ANALYTIQUE**

**Encadré par :**

Pr. LALAOUNA Abd El Djalil

**Présenté par :**

- ASSAM Widjdane
- DENECHÉ Radja
- LAMRI Ilhem

**Composition du jury :**

- Dr. TITEL Chimie analytique
- Dr. ALLAOUA Chimie thérapeutique

**ANNEE UNIVERSITAIRE : 2020 - 2021**

# Table des matières

Liste des figures .....	I
Liste des tableaux .....	III
Liste des annexes .....	IV
Liste des abréviations et des acronymes .....	V
Liste des définitions .....	VII
Introduction générale .....	1

## ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE

### Chapitre I. SPECTROPHOTOMETRIE D'ABSORPTION DANS L'ULTRAVIOLET ET LE VISIBL.....3

1. Définition.....	3
2. Domaine spectral .....	3
3. Principe .....	4
4. Détermination de l'absorbance .....	5
5. Equipements .....	6
6. Application de la spectrophotométrie dans l'UV visible .....	9

### Chapitre II. CYCLE DE VIE D'UNE MÉTHODE ANALYTIQUE .....10

1. Définition.....	10
2. Différentes phases du cycle de vie d'une méthode analytique.....	10
2.1. Sélection de la méthode.....	10
2.2. Développement et optimisation .....	11
2.3. Validation .....	11
2.4. Utilisation en routine .....	12

### Chapitre III. VALIDATION DES METHODES ANALYTIQUES .....14

1. Définition.....	14
2. Objectif de la validation .....	14
3. Types de méthodes d'analyses à valider .....	14
4. Aspects réglementaires.....	14
4.1. Norme ISO 17025 .....	14
4.2. Norme ISO 5725 .....	15
4.3. Guidelines de la FDA .....	15
4.4. Normes AFNOR « NF V 03-110 » .....	15
4.5. Guidelines ICH .....	15
4.6. Documents des commissions de la SFSTP.....	15
5. Prévalidation.....	16

5.1.	Linéarité de la fonction de réponse .....	16
5.2.	Vérification de l'effet de matrice .....	17
6.	Critères de la validation .....	18
6.1.	Choix des critères de la validation .....	18
6.2.	Différents critères de la validation .....	18
6.2.1.	Spécificité ou sélectivité .....	19
6.2.2.	Linéarité .....	20
6.2.3.	Justesse .....	20
6.2.4.	Fidélité .....	20
6.2.5.	Exactitude .....	20
6.2.6.	Limite de détection (LOD) .....	21
6.2.7.	Limite de quantification (LOQ) .....	21
6.2.8.	Domaine d'utilisation .....	21
6.2.9.	Robustesse .....	21
7.	Revalidation des méthodes analytiques .....	22
<b>Chapitre IV. PLANS D'EXPERIENCES .....</b>		<b>23</b>
1.	Définition.....	23
2.	Vocabulaire employé lors d'une étude réalisée par des plans d'expériences.....	23
2.1.	Réponse .....	23
2.2.	Facteur, niveau et domaine de variation d'un facteur .....	23
2.3.	Espace expérimental et domaine d'étude .....	23
2.4.	Matrice d'expérience .....	24
2.5.	Interactions factorielles .....	244
3.	Démarches méthodologiques.....	25
4.	Différents types de plans d'expériences.....	26
4.1.	Plans de mélanges .....	26
4.2.	Plans pour surfaces de réponse .....	26
4.3.	Plans de criblage .....	26
4.3.1.	Plans factoriels complets .....	27
A.	Définition .....	27
B.	Construction des plans factoriels complets.....	27
4.3.2.	Plans factoriels fractionnaires .....	27
A.	Définition .....	27
B.	Construction des plans factoriels fractionnaires .....	27
5.	Evaluation des modèles.....	30
5.1.	Analyse de la variance.....	30
5.2.	Adéquation du modèle.....	31
5.2.1.	Ajustement du modèle .....	31
5.2.2.	Précision .....	31
5.3.	Analyse des résidus .....	31

## PARTIE PRATIQUE

1.	Lieu et période de l'étude .....	32
2.	Présentation des produits.....	32
2.1.	Matière première : AAS .....	32
2.1.1.	Structure et dénomination.....	32
2.1.2.	Propriétés physico-chimiques .....	32
2.1.3.	Propriétés thérapeutiques.....	33
A.	Effet anti-inflammatoire .....	33
B.	Action antalgique .....	33
C.	Effet antipyrétique.....	34
D.	Effet hématologique .....	34
E.	Effet gastro-intestinale.....	34
F.	Effet gynéco-obstétricale .....	34
2.1.4.	Indications.....	34
2.1.5.	Propriétés spectrales .....	34
2.2.	Produit fini .....	35
2.3.	Matériels .....	38
2.3.1.	Produit .....	38
2.3.2.	Equipements.....	38
A.	Spectrophotomètre UV-Visible.....	38
B.	Balance Analytique .....	38
C.	Agitateur magnétique avec plaque chauffante .....	38
D.	Logiciels .....	38
2.4.	Réactifs .....	38
3.	Développement de la méthode de dosage .....	39
3.1.	Choix de la méthode de dosage .....	39
3.2.	Choix du solvant .....	41
3.2.1.	Solubilité.....	41
3.2.2.	Transparence .....	41
3.3.	Paramètres de l'analyse spectrale .....	42
3.4.	Optimisation du protocole de préparation des solutions .....	433
3.4.1.	Concentration du réactif de dérivation .....	433
3.4.2.	Absorbances.....	44
3.4.3.	Intervalle de dosage (ou écart d'utilisation) de la méthode.....	44
4.	Prévalidation.....	44
4.1.	Préparation des solutions.....	44
4.2.	Préparation de la solution mère.....	45
4.3.	Gamme sans matrice .....	45
4.4.	Gamme avec matrice .....	45
4.5.	Mesure des absorbances .....	46
4.6.	Evaluation de la linéarité .....	47
4.7.	Evaluation de l'effet de matrice .....	50
4.8.	Stabilité.....	52

5.	Validation .....	53
5.1.	Spécificité .....	53
5.2.	Evaluation de la justesse, de la fidélité et de la linéarité .....	55
5.2.1.	Fonction de réponse.....	55
5.2.2.	Prédictions inverse .....	56
5.2.3.	Calcul de la justesse, de la fidélité et de l'erreur totale .....	57
5.2.4.	Profil d'exactitude .....	59
5.2.5.	Interprétation des résultats et choix de la fonction de réponse .....	62
5.2.6.	Limite de quantification.....	63
5.2.7.	Evaluation de la linéarité .....	63
5.2.8.	Limites de détection et de quantification.....	65
6.	Evaluation de la robustesse .....	66
6.1.	Objectif .....	66
6.2.	Choix de la réponse à analyser.....	66
6.3.	Choix des facteurs .....	66
6.4.	Définition des niveaux des facteurs .....	67
6.5.	Choix du plan d'expérience .....	67
6.6.	Matrice d'expérimentation.....	67
6.7.	Modèle mathématique .....	69
6.8.	Résultats obtenus lors de l'étude de la robustesse .....	70
6.8.1.	Résultats des essais.....	70
6.8.2.	Calcul des effets .....	70
6.8.3.	Evaluation du modèle .....	71
A.	Analyse de la variance .....	71
B.	Adéquation du modèle.....	71
C.	Analyse des résidus .....	72
6.8.4.	Modèle mathématique .....	73
6.8.5.	Criblage.....	73
A.	Contribution des facteurs.....	73
B.	Représentation graphique des effets.....	74
	<b>Conclusion générale.....</b>	<b>76</b>

## **REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES**

## **ANNEXES**

### **Résumé**

### **Abstract**

# Résumé

La validation est une étape cruciale lors du développement d'une méthode analytique. Son importance et sa nécessité sont décrites dans plusieurs textes réglementaires. L'un des critères de la validation est l'étude de la robustesse. Cette étude permet de révéler quels paramètres influents sur les résultats de la méthode étudiée. Par conséquent, elle détermine le degré de précision et les précautions que l'analyste doit prendre en compte lors de l'analyse.

Cette étude a permis le développement et la validation d'une méthode de dosage spectrophotométrique de l'acide acétylsalicylique dans le produit fini ACEPRAL comprimé dosé 500 mg. L'approche du profil d'exactitude décrite dans les guidelines de la SFSTP (2003-2006) a permis de valider la méthode. Les résultats obtenus ont dévoilé que la méthode de dosage est valide en termes de spécificité, linéarité, justesse, fidélité et d'exactitude.

L'estimation de la robustesse a été exécutée en se basant sur la méthodologie des plans d'expériences. Grace au plan de criblage factoriel complet ( $2^3$ ) employé, les résultats obtenus ont montré que les facteurs qui influencent l'absorbance des solutions sont la concentration de NaOH, le volume de la solution de  $\text{FeCl}_3$  et le temps de l'hydrolyse avec des pourcentages de contribution respectifs de 72,11%, 11,26% et 1,20%. Cette expertise permet de conclure que la concentration de NaOH et le volume de la solution de  $\text{FeCl}_3$  doivent être mesurés avec la plus grande précision. La méthode peut être considérée comme robuste à la variation du temps d'hydrolyse à un risque de 1,20% dans l'intervalle 5 à 15 min.

La stratégie des plans d'expériences est économique en essais et généreuse en renseignements. Effectivement, cette méthodologie a permis d'établir un modèle mathématique valide, de discerner les facteurs influents sur la réponse et révéler leurs interactions ainsi que le pourcentage de contribution de chacun, et d'estimer la robustesse de la méthode dans les limites du domaine étudié.

**Mots clés :** Robustesse, validation, plan d'expérience, criblage, aspirine, spectrophotomètre.

# Abstract

Validation is a crucial step in the development of an analytical method. Its importance and necessity are described in several regulatory texts. One of the criteria of the validation is the study of the robustness. This study reveals which parameters influence the results of the studied method. Consequently, it determines the degree of precision and the precautions that the analyst must take into account during the analysis.

This study allowed the development and validation of a spectrophotometric dosage of acetylsalicylic acid in the finished product ACEPRAL 500 mg tablets. The accuracy profile approach described in the SFSTP guidelines (2003-2006) was used to validate this method. The results obtained revealed that the analyze method is valid in terms of specificity, linearity, trueness, precision and accuracy.

The robustness estimation was performed based on the design of experiments methodology. Thanks to the complete factorial screening design ( $2^3$ ) employed, the results obtained showed that the factors that influence the absorbance of the solution are the concentration of NaOH, the volume of the  $\text{FeCl}_3$  solution and the time of hydrolysis with respective contribution percentages of 72.11%, 11.26% and 1.20%. From this expertise, it can be concluded that the concentration of NaOH and the volume of the  $\text{FeCl}_3$  solution should be measured with the utmost precision. The method can be considered robust to the variation of hydrolysis time at a risk of 1.20% in the interval of 5 to 15 min.

The design of experiments strategy is cost-effective in testing and generous in information. Indeed, this methodology allowed to establish a valid mathematical model, to detect the factors influencing the response and reveal their interactions as well as the percentage of their contribution, and to estimate the robustness of the method within the limits of the studied domain.

**Key words:** Robustness, validation, experimental design, screening, aspirin, spectrophotometer.