

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

UNIVERSITÉ SAAD DAHLAB -BLIDA1-



FACULTÉ DE MEDECINE
DÉPARTEMENT DE PHARMACIE

MÉMOIRE DE FIN D'ÉTUDES
PRÉSENTÉ EN VUE DE L'OBTENTION DU DIPLÔME DE DOCTEUR
EN PHARMACIE

DOSAGE COLORIMETRIQUE DU ROUGE DE PHENOL DANS
LE PERFUSÂT INTESTINAL DE RAT

Session : Juin 2014

Présenté par :

- BENDIMERAD Samia
- DRAIS Zahida

Devant le jury :

Président de jury :	Pr A. GHARBI	Maître de conférences en Chimie analytique
Promoteur :	Dr S. DJELLOULI	Maître assistant en Pharmacologie
Examineur :	Dr K. REGGABI	Maître assistante en Pharmacologie
Examineur :	Dr H. IMOUDACHE	Maître assistant en Chimie minérale



Dédicace

Je dédie ce travail

A mon défunt père qui nous a quittés trop tôt.

A ma mère qui a su m'encadrer, me soutenir, m'encourager et faire de moi ce que
je suis aujourd'hui.

A mes deux grandes sœurs Soraya et Batoul qui m'ont soutenue et encouragée.

A mes deux grands frères Zoher et Mohammed El Hadi qui ont toujours su
comment m'entourer.

A mon jeune frère Adel Reda qui a su être présent pour moi dans les bons comme
dans les mauvais moments.

A ma meilleure amie et mon binôme DRAIS Zahida.

A tous mes ami(e)s et collègues.

BENDIMERAD Samia



Dédicace

Je dédie ce travail

A mes très chers parents qui ont toujours été là pour moi, et qui m'ont donnée un magnifique modèle de labeur et de persévérance. J'espère qu'ils trouveront dans ce travail toute ma reconnaissance et tout mon amour. Que Dieu leur procure longue vie et bonne santé.

A ma chère sœur Zineb pour son soutien moral.

A mes deux frères Abdelkader et Hamza.

A ma meilleure amie et mon binôme BENDIMERAD Samia.

Et à toutes les personnes qui m'ont soutenue durant cette année.

DRAIS Zahida



REMERCIEMENTS

Ce travail a été réalisé dans le cadre du projet de fin d'études, au

Département de Pharmacie de Blida.

Premièrement nous remercions Dieu de nous avoir donné foi, force et santé. Ensuite, nous remercions en particulier nos parents qui n'ont pas cessés de nous soutenir tout le long de nos études.

Nous remercions spécialement notre encadreur de mémoire, Dr DJELLOULI .S, maitre-assistant en pharmacologie, pour la chance qu'il nous a offerte de travailler sous sa responsabilité, pour la confiance qu'il nous a témoignée tout au long de notre travail, pour ses conseils scientifiques et pour sa générosité qui nous a permis de découvrir un peu plus le monde de la recherche et de l'industrie pharmaceutique.

Nous remercions les examinateurs d'avoir accepté l'invitation pour intégrer le jury de ce travail de mémoire.

Nous voulons exprimer notre gratitude pour le Professeur MANSOURI .K, chef de service de bioéquivalence au LNCPP pour tous ses conseils.

Nous tenons à remercier Dr MAHFOUD .M directeur d'études du département de pharmacie de Blida pour son encouragement et ses conseils.

Nous remercions aussi Melle NABI Ikram, ingénieur au niveau du laboratoire de pharmacologie de l'université de Blida pour ses conseils scientifiques, pour les bons moments que nous avons partagés pendant notre pratique et pour sa très grande gentillesse.

Et enfin à tous nos collègues de la promotion 2014.

Table des Matières

Liste des tableaux

Liste des figures

Liste des symboles

Page

Introduction

Introduction 01

Etude bibliographique

Chapitre I

Absorption intestinale des médicaments

I.	Absorption des médicaments.....	03
a)	Définition de l'absorption des médicaments.....	03
b)	Mécanismes de l'absorption intestinale des médicaments.....	04
c)	Facteurs modifiant l'absorption intestinale des médicaments	04
d)	Evaluation quantitative de l'absorption des médicaments.....	05
II.	Etude de la perméabilité intestinale.....	05
A.	Système BCS.....	05
a)	Définition.....	05
b)	Principe	05
c)	Intérêt	06
B.	Intérêt des études de la perméabilité intestinale.....	06
C.	Méthodes d'étude de la perméabilité intestinale	06
1)	Méthodes sur l'animal.....	07
a)	Méthodes in vivo.....	07
b)	Méthodes in situ.....	07
2)	Méthodes in vitro.....	08
a)	Modèles cellulaires.....	08
b)	Modèles tissulaires.....	08

Chapitre II

Rouge de phénol

1. Identification.....	09
2. Propriétés chimiques.....	10
3. Propriétés physiques.....	10
4. Utilisation.....	10
5. Stabilité.....	10
6. Incompatibilité.....	10
7. Manipulation.....	10
8. Entreposage.....	10
9. Propriétés toxicologiques.....	11

Chapitre III

Dosage colorimétrique et bioanalyse

I. Analyse colorimétrique.....	12
1) Domaine spectral.....	12
2) Principe du dosage spectrophotométrique.....	13
3) Loi de Beer-Lambert.....	13
4) Déviation de la loi de Beer-Lambert.....	14
5) Spectrophotomètre UV-visible.....	14
II. Dosage et bioanalyse.....	16
1) Définition du dosage.....	16
2) Types de dosage.....	16
3) Notion de blanc.....	16
4) Notion de standard (ou étalon).....	17
5) Notion de contrôle de qualité (CQ).....	17

Chapitre IV

Validation d'une méthode bioanalytique

1) But de validation.....	18
2) Différents types de validation.....	18
A. Validation complète.....	19
B. Validation partielle.....	19

C. Validation croisée.....	20
3) Paramètres de validation.....	20
a) Spécificité.....	20
b) Sélectivité.....	21
c) Exactitude (justesse).....	21
d) Fidélité.....	21
e) Courbe d'étalonnage.....	21
f) Linéarité.....	22
g) Rendement	23
h) Stabilité	23

Etude expérimentale

I. Objectif	26
II. Choix de la molécule.....	26
III. Choix de la méthode.....	26
IV. Protocole expérimental.....	27
A. Partie animal.....	27
But.....	27
Principe.....	27
Matériels et méthodes.....	27
a) Matériels.....	27
➤ Réactif animal.....	27
➤ Réactif chimique.....	27
➤ Equipement.....	27
➤ Accessoires	27
b) Méthodes.....	27
➤ Préparation de la solution pour perfusion intestinale.....	27
➤ Préparation et manipulation de l'animal.....	28
➤ Passage de la solution de perfusion au niveau de l'intestin.....	28
B. Partie bioanalytique.....	29
But	29
Principe	29
Matériels et méthodes.....	29
a) Matériels.....	29
➤ Equipement	29

➤ Accessoires.....	29
➤ Réactifs.....	29
b) Méthodes.....	30
1) Choix des points de la gamme d'étalonnage.....	30
2) Choix des concentrations des échantillons de CQ.....	30
3) Préparation de la gamme d'étalonnage	31
✓ Préparation de la solution mère du rouge de phénol.....	31
✓ Préparation des standards de la gamme d'étalonnage en milieu aqueux.....	31
✓ Préparation des standards de la gamme d'étalonnage en milieu biologique.....	31
✓ Préparation des échantillons de contrôle qualité.....	32
✓ Préparation de la solution d'hydroxyde de sodium.....	33
✓ Traitement des échantillons.....	33
✓ Dosage.....	33
4) Paramètres de validation bioanalytique étudiés.....	33
i. Courbe d'étalonnage.....	34
ii. Linéarité.....	34
iii. Spécificité.....	35
iv. Sélectivité.....	35
v. Exactitude.....	36
vi. Fidélité.....	37
vii. Rendement	37
viii. Stabilité.....	38
V. Résultats et Interprétation.....	39
VI. Discussion.....	50

<i>Conclusion</i>

Conclusion.....	52
-----------------	----

Références bibliographiques.

Annexes.

Résumé et mots-clés.

Liste des tableaux

	Page
Tableau I : Système de classification biopharmaceutique des substances actives.....	06
Tableau II : Concentrations des 7 standards aqueux et le volume à prélever de la solution mère.....	31
Tableau III : Concentrations des 7 standards biologiques et le volume à prélever des standards aqueux et du perfusât intestinal.....	32
Tableau IV : Concentrations des échantillons de contrôle qualité en milieu aqueux et le volume à prélever de la solution mère.....	32
Tableau V : Concentrations des échantillons de contrôle qualité en milieu biologique et le volume à prélever des échantillons CQ aqueux.....	33
Tableau VI : Concentration des solutions des différents principes actifs utilisés pour l'étude de la sélectivité.....	36
Tableau VII : Valeurs de la DO du blanc des trois séries des trois jours.....	39
Tableau VIII : Interférence du blanc par rapport au Std 1 et au Std 2 du 1 ^{er} jour.....	39
Tableau IX : Interférence du blanc par rapport au Std 1 et au Std 2 du 2 ^{ème} jour.....	39
Tableau X : Interférence du blanc par rapport au Std 1 et au Std 2 du 3 ^{ème} jour.....	40
Tableau XI : Valeurs moyennes des DO des différents standards des trois séries des 3 jours.....	40
Tableau XII : Concentrations des différents standards de la courbe d'étalonnage.....	41
Tableau XIII : Paramètres de la régression linéaire des courbes d'étalonnage des 3 séries des 3 jours.....	42
Tableau XIV : Moyenne des biais relatifs des 3 séries des trois jours pour l'étude de la linéarité.....	43
Tableau XV : Résultats du CV et de l'interférence du blanc/LIQ pour l'étude de la spécificité.....	44

Tableau XVI : Absorbance des différentes molécules étudiées a 560 nm.....	45
Tableau XVII : Biais relatifs moyens des 3 séries des 3 jours.....	45
Tableau XVIII : Coefficient de variation moyen des 3 séries des 3 jours pour l'étude de la répétabilité.....	46
Tableau XIX : Coefficient de variation moyen des 3 jours pour les 3 séries pour l'étude de la fidélité intermédiaire.....	47
Tableau XX : Biais relatif des trois séries pour l'étude de la stabilité de congélation/décongélation.....	48
Tableau XXI : Biais relatif des trois séries pour l'étude de la stabilité à court terme.....	48
Tableau XXII : Biais relatif des trois séries pour l'étude de la stabilité à l'abri de la lumière.....	49
Tableau XXIII : Biais relatif des trois séries pour l'étude de la stabilité à long terme.....	49

Liste des figures

	Page
Figure 1 : Trajet des médicaments administré per Os.....	03
Figure 2 : Technique in vivo chez le rat.....	07
Figure 3 : Technique in situ chez le rat.....	07
Figure 4 : Différents domaines du spectre électromagnétique.....	13
Figure 5 : Principe du dosage colorimétrique.....	13
Figure 6 : Principe du spectrophotomètre UV-visible monofaisceau.....	15
Figure 7 : Courbe d'étalonnage de la série 1 du 1er jour.....	41
Figure 8 : Spectre d'absorption par balayage entre 400 et 600 nm.....	44

Liste des symboles, abréviations et unités

ATP	: Adénosine triphosphate.
BCS	: Système de classification biopharmaceutique.
cm	: Centimètre soit 10^{-3} mètre.
C	: Concentration.
CO ₂	: Dioxyde de carbone.
CQ	: Contrôle Qualité.
CV	: Coefficient de Variation.
DO	: Densité Optique ou absorbance.
EMA	: Agence Européenne des Médicaments.
FDA	: Food and Drug Administration.
g	: Gramme.
h	: Heure.
HPLC	: Chromatographie Liquide à Haute Performance.
H ₂ O	: Eau.
IM	: Voie intramusculaire.
IR	: Infrarouge.
IV	: Voie intraveineuse.
KCl	: Chlorures de potassium.
KJ	: Kilojoule soit 10^3 Joule.
l	: Litre.
LC/MS	: Chromatographie en phase liquide couplée à la spectroscopie de masse.
LIQ	: Limite inférieure de quantification.
M	: Molaire.
MDCK	: Madin-darby canine kidney.
mg	: Milligramme soit 10^{-3} gramme.
min	: Minute.

ml	: Millilitre soit 10^{-3} l.
Mol	: Mole.
NaCl	: Chlorures de sodium.
NaOH	: Hydroxyde de sodium.
NaH ₂ PO ₄	: Dihydrogénophosphate de sodium.
Na ₂ HPO ₄	: Hydrogénophosphate de sodium.
nm	: Nanomètre soit 10^{-9} mètre.
O ₂	: Oxygène.
PA	: Principe Actif.
Per os	: Voie orale.
pH	: Potentiel hydrogène.
PTM	: Photomultiplicateur.
QSP	: Quantité suffisante pour.
RP	: Rouge de phénol.
s	: Seconde.
SC	: Voie sous-cutanée.
SFSTP	: Société Française des Sciences et Techniques Pharmaceutiques.
Std	: Standard.
UV	: Ultra-violet.
WHO	: World Health Organisation.
λ	: Lambda.
μg	: Microgramme soit 10^{-6} gramme.
μl	: Microlitre soit 10^{-6} litre.
%	: Pourcentage.
°C	: Degré Celsius.

Introduction :

Un médicament générique est un équivalent à la molécule innovante du point de vue pharmaceutique (même PA, même dosage, même voie d'administration et la même forme pharmaceutique) et thérapeutique (efficacité et sécurité similaire).

L'équivalence thérapeutique peut être étudiée de plusieurs façons, soit par des essais in vivo : comprenant les études pharmacocinétiques comparatives (bioéquivalence), les études pharmacodynamiques comparatives et les études cliniques comparatives. Ou bien par des essais in vitro : permettant la comparaison des profils de dissolution in vitro dans le cas des médicaments administrés par voie orale.

Le recours à la comparaison des profils de dissolution est basé entre autres sur le système de classification biopharmaceutique BCS. Ce système permet de classer les molécules selon leur solubilité et leur perméabilité intestinale.

La méthode in situ chez le rat constitue une méthode intéressante pour l'étude de la perméabilité intestinale, mais cette dernière nécessite le dosage des médicaments étudiés dans le perfusât intestinal du rat.

Le dosage des médicaments chez le rat doit être associé au dosage d'un marqueur de la perméabilité qui est entre autres le rouge de phénol.

Notre travail consiste à valider une méthode de dosage colorimétrique du rouge de phénol (marqueur d'absorption) dans le perfusât intestinal de rat selon des critères de validation en milieu biologique.

Etude bibliographique

Chapitre I : Absorption intestinale des médicaments

Le médicament administré par voie orale subit d'abord une phase biopharmaceutique qui permet de libérer le PA de sa forme galénique, ensuite une phase pharmacocinétique pour qu'il atteigne enfin sa cible où il pourra exercer son action.

La phase pharmacocinétique est représentée par l'absorption, la distribution, le métabolisme et l'excrétion.

I. Absorption des médicaments :

a) Définition de l'absorption des médicaments :

L'absorption est le processus par lequel le médicament inchangé passe de son site d'administration à la circulation générale.

Les voies d'administration les plus importantes sont : la voie orale, la voie IV, la voie intramusculaire, la voie sous-cutanée, la voie rectale, la voie pulmonaire ainsi que la voie nasale (Loichot et M. Grima 2005/2006).

☉ Données générales.

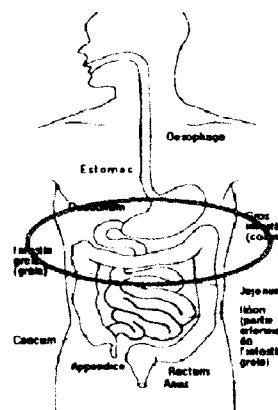


Figure 1 : Trajet des médicaments administrés per Os (VANDAMME,2010).

L'absorption du médicament au niveau de l'estomac est très limitée car l'épithélium est très épais, riche en cholestérol et en mucus, contrairement à l'intestin grêle où l'absorption est très importante surtout au niveau de l'iléon vu sa grande surface.

b) Mécanismes de l'absorption intestinale des médicaments:

Il peut s'agir soit d'une absorption par voie paracellulaire à travers le complexe de jonction intercellulaire ou par voie transcellulaire par multiples mécanismes de passage :

- Diffusion passive : c'est le mode de transport le plus fréquent. Il existe un gradient de concentration de part et d'autre de la membrane plasmique. Ce transport suit la loi de Fick (passage du milieu le plus concentré vers le moins concentré). Ce système de transport est non saturable.

- Transport actif : il se fait à l'aide d'un transporteur (protéine qui permet le passage de la molécule à travers la membrane), contre le gradient de concentration. Il nécessite de l'énergie sous forme d'ATP. Il s'agit d'un transport saturable et spécifique (le nombre de transporteurs est limité, de même que l'utilisation d'énergie).

- Transport facilité : c'est un transfert à l'aide d'un transporteur, dans le sens du gradient de concentration. Le phénomène est passif, spécifique et saturable. Il concerne des molécules non ionisées et liposolubles.

- Endocytose et exocytose : ce sont des processus selon lesquels une cellule fait pénétrer (endocytose) ou sortir (exocytose) de son cytoplasme des molécules incapables de la traverser par invagination de la membrane plasmique (Loichot et M. Grima, 2005/2006).

c) Facteurs modifiant l'absorption intestinale des médicaments :

L'absorption est influencée par :

- ❖ les caractéristiques des médicaments :

- Le p_k (la forme non ionisée est absorbée plus facilement).
- L'hydrosolubilité et la liposolubilité.
- La taille et la morphologie de la molécule.
- La forme galénique (sirop, comprimés et gélules), qui détermine la vitesse de dissolution du médicament.

- ❖ Les caractéristiques liées à l'individu :

- Le pH digestif (le pH augmente l'ionisation des acides faibles et diminue l'ionisation des bases faibles).
- La vitesse de vidange gastrique et mobilité intestinale.
- L'alimentation : repas riche en graisse.
- La prise associée de médicaments.

- L'âge : certaines modifications physiologiques influent sur le comportement du PA dans l'organisme.
- Les pathologies associées : digestives, cardiaques provoquant une diminution du débit sanguin (VANDAMME, 2010).

d) Evaluation quantitative de l'absorption des médicaments :

Les paramètres pharmacocinétiques qui permettent de quantifier le processus de résorption sont le coefficient de résorption, défini comme la fraction du médicament administré qui franchit la membrane gastro-intestinale, et le facteur de biodisponibilité qui décrit l'ensemble du phénomène de résorption. La biodisponibilité est définie comme étant la quantité de médicament qui atteint la circulation générale (ou systémique), elle est fonction de la quantité absorbée par l'épithélium digestif (VANDAMME, 2010).

II. Etude de la perméabilité intestinale :

A. Système de Classification Biopharmaceutique (BCS) :

a. Définition :

Le système BCS est un cadre scientifique permettant la classification des substances médicamenteuses selon leur solubilité et leur perméabilité intestinale.

Ce système a été proposé pour la première fois par Amidon et son équipe (Amidon et al, 1995).

b. Principe :

Le principe du système BCS est basé sur l'hypothèse stipulant : si deux produits (le princeps et son générique) donnent le même profil de concentration le long du tractus gastro-intestinal, le profil plasmatique qui résulte après leurs administrations orales sera le même.

Selon ce système, une substance médicamenteuse peut être classée en fonction de sa solubilité et de sa perméabilité en une des classes suivantes :

Tableau I : Système de classification biopharmaceutique des substances actives (BSC). (Amidon et al, 1995).

	Solubilité du principe actif	Perméabilité de l'épithélium intestinale
Classe I	importante	Importante
Classe II	faible	Importante
Classe III	importante	Faible
Classe IV	faible	faible

c. Intérêt :

Depuis l'an 2000, la Food and Drug Administration (FDA) a précisé que le BCS peut être utilisé comme un outil de développement des médicaments en particulier pour les demandes de dispense des essais de bioéquivalences pour les substances de classe I (Benet, 2013).

Intégré dans ce cadre réglementaire, le BCS est alors très largement utilisé par l'industrie pharmaceutique comme référence initiale dans l'orientation du développement des formes orales à libération immédiate (J. M. Butler, J. B. Dressman, 2010).

B. Intérêt des études de la perméabilité intestinale :

Les études de la perméabilité intestinale sont incontournables dans le processus de développement des médicaments destinés à une administration orale. Notamment dans la démonstration de l'équivalence thérapeutique entre un médicament princeps et un autre générique.

C. Méthodes d'étude de la perméabilité intestinale :

Le moyen le plus commun pour évaluer l'absorption des médicaments chez l'homme, est la réalisation des études de biodisponibilité, qui permettent par la suite de calculer la vitesse d'absorption. Cependant, vu les dépenses élevées nécessaires pour la réalisation de ce genre d'études, et comme une simple détermination de la perméabilité permet facilement d'estimer l'absorption, des études ont été menées dans ce sens afin de mettre au point des techniques d'études de la perméabilité intestinale.

Ces techniques peuvent être des méthodes prédictives, physicochimiques ou biologiques qui à leur tour se subdivisent en méthodes in vitro, in situ et in vivo.

En général, plus la technique est compliquée, plus l'estimation de l'absorption chez l'homme serait précise et fiable.

1. Méthodes sur l'animal :

a) Méthodes in vivo :

Les méthodes in vivo sont réalisées par des administrations de composés chez l'animal de manières différentes : voie orale, voie intraveineuse et autres voies. L'animal le plus fréquemment utilisé pour ces études est le rat.

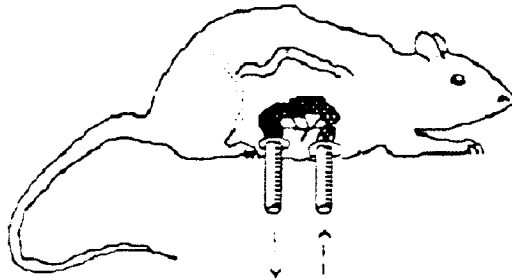


Figure 2 : Technique in vivo chez le rat (Poelma and Tukker, 1987).

b) Méthodes in situ :

Ces méthodes consistent à administrer chez un animal vivant, un composé par perfusion dans un segment intestinal. Elles permettent l'étude de la perméabilité intestinale et la cinétique de nouvelles molécules.

Pour réaliser ce modèle, l'animal doit être anesthésié afin d'atteindre la cavité abdominale et d'installer une perfusion d'une solution contenant une substance à tester, en concentration connue, dans un segment intestinal cathétérisé en boucle fermée ou ouverte. On observe ensuite la disparition de la substance afin de calculer l'absorption intestinale.

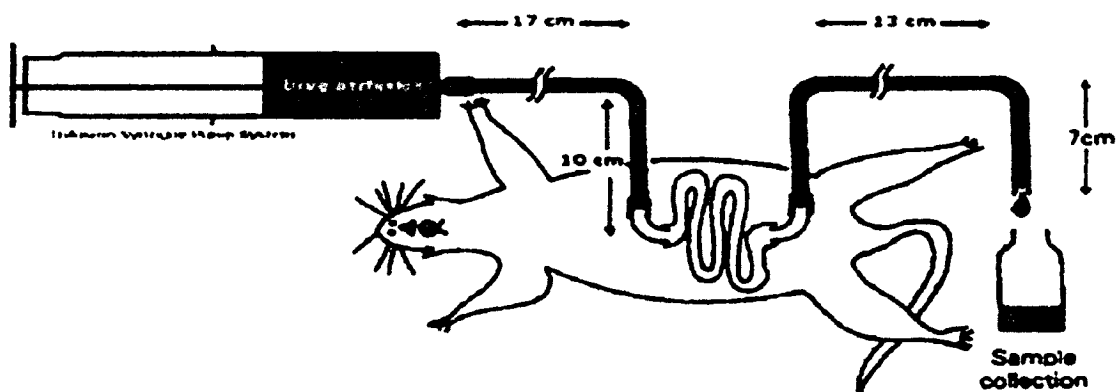


Figure 3 : Technique in situ chez le rat (THIRION Catherine - Claire Chantal, 2002).

2. Méthodes in vitro :

Les méthodes in vitro comportent les modèles s'appuyant sur le passage de la molécule à travers une culture **cellulaire** ou **tissulaire**. Concernant les cellules, les plus utilisées sont : les cellules Caco-2 et les cellules porcines IPEC-1. Concernant les tissus, les sacs éversés et la chambre d'Ussing seront décrits.

a) Modèles cellulaires :

❖ Cellules Caco-2 :

Elles sont issues du côlon humain, et sont bien adaptées pour l'étude de la différenciation intestinale mais aussi pour le transport et le passage des composés.

Les cellules Caco-2 sont mises en croissance en une monocouche de cellules différenciées formant ainsi une membrane semi-perméable afin d'étudier les mouvements des produits testés.

❖ MDCK : (Madin- Darby- Canin Kidney):

C'est un autre modèle de culture cellulaire des plus utilisés dans l'évaluation de la perméabilité. Contrairement aux Caco-2, ces cellules dérivent des cellules rénales du chien, c'est pourquoi l'expression des transporteurs intestinaux est différente entre les deux.

b) Modèles tissulaires :

❖ Sacs intestinaux éversés :

Cette technique a été mise au point par WILSON et WISEMAN en 1954, sur des rats et des hamsters. L'intestin est prélevé de l'animal et est retourné sous forme de sacs et la région étudiée est plongée dans un milieu salin avec les molécules à étudier. Cette technique peut être utilisée pour déterminer les paramètres cinétiques avec une grande fiabilité et reproductibilité.

❖ Chambre d'Ussing :

Cette technique a été mise au point par USSING et ZEHRAN en 1951 utilisée pour l'étude de transport intestinal. Cette technique est réalisée en isolant des tissus intestinaux qui sont découpés en bandes de taille appropriée. Après ablation de la couche musculaire le fragment d'intestin est placé entre deux compartiments où l'on pourra mesurer le passage d'une molécule à travers cette barrière.

(THIRION Catherine -Claire Chantal, 2002.), (LE FERREC Et al, 2001).

Chapitre II : Rouge de phénol

L'absorption intestinale peut être définie sur le plan opérationnel comme la disparition complète d'une substance à partir de la lumière intestinale, et de nombreuses études sont basées sur cette définition (Schedl et al, 1966).

Une substance de référence, est également nécessaire pour la mesure expérimentale de l'absorption. Le rouge de phénol est l'indicateur le plus fréquemment utilisé qui a été étudié (Schedl et al, 1966).

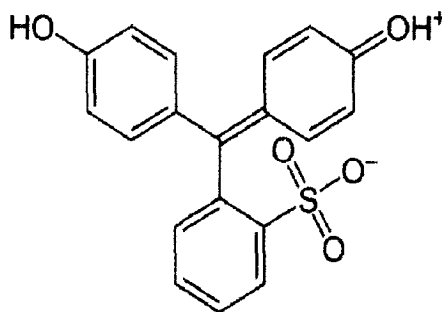
Le rouge de phénol est un colorant de triphénylméthane, la molécule est trop grosse pour passer à travers les pores dans la membrane intestinale. Puisque le rouge de phénol est un électrolyte solide, insoluble dans les lipides et hydrophile au pH de l'intestin grêle, il est lentement absorbé d'après une étude faite en 1966 sur l'utilisation du polyéthylène glycol et le rouge de phénol comme indicateur de l'absorption intestinale (H. Schedl et al, 1966).

Le passage de l'eau dans l'intestin est un phénomène physiologique, qui va modifier la concentration des substances dosées dans l'intestin. Dans les études de la perméabilité intestinale, le rouge de phénol est utilisé pour corriger la concentration des médicaments qu'on veut doser dans le perfusât intestinal.

Le rouge de phénol (également connu sous les noms de phénolsulfonephtaléine ou PSP) est un indicateur coloré utilisé en chimie dans les dosages acido-basiques.

1. Identification :

- Nom chimique : triphénylméthane
Phenol, 4, 4'-(3H-2, 1-benzoxathiol-3-ylidene) bis-, S,S-dioxide.
- Formule moléculaire brute : $C_{19}H_{14}O_5S$.
- Structure chimique :



- Apparence : Solide sous forme de cristaux, rouge et inodore.
- Nom français : Rouge de phénol.
- Nom anglais : Phenol red.

2. Propriétés chimiques :

- pKa est de 8,0.
- Sa forme acide est rouge orange.
- Sa forme basique est violette.
- Sa zone de virage dans l'échelle de pH est située entre 6,6 et 8,4.

3. Propriétés physiques :

- État physique : Solide.
- Masse moléculaire : 354,37.
- Solubilité dans l'eau : 0,76 g/l à 20 °C.
- Peut s'enflammer s'il est chauffé fortement.

4. Utilisation :

- Indicateur coloré.
- Marqueur non-absorbé de la perméabilité.

5. Stabilité :

Le rouge de phénol est instable lorsqu'il est chauffé jusqu'à sa décomposition, il peut émettre des gaz toxiques d'oxydes de soufre, de dioxyde de carbone et de monoxyde de carbone.

6. Incompatibilité :

Le rouge de phénol est incompatible avec les agents oxydants forts.

7. Manipulation :

Porter un appareil de protection des yeux et en cas de ventilation insuffisante, un appareil respiratoire approprié.

8. Entreposage :

- Conserver dans un endroit frais, sec et bien ventilé.
- Conserver dans un récipient hermétique, à l'abri des matières oxydantes.
- Conserver à l'écart de toute source de chaleur.

9. Propriétés toxicologiques :

Le rouge de phénol peut engendrer des effets toxiques aigus. Il est irritant pour les yeux, la peau et les voies respiratoires.

Chapitre III : Dosage colorimétrique et bioanalyse

I. Analyse colorimétrique :

Parmi les nombreuses méthodes instrumentales utilisées pour déterminer la concentration d'une espèce chimique en solution, les méthodes les plus courantes sont celles basées sur la mesure de l'intensité d'absorption ou d'émission (spectrophotométrie) d'un rayonnement électromagnétique par les espèces à doser. Les rayonnements les plus souvent utilisés sont l'ultraviolet (UV), la lumière visible et l'infrarouge (IR). Le domaine du visible et de l'UV a été abondamment étudié et ce depuis longtemps. Mais s'il est indispensable pour une approche expérimentale de la nature de la liaison chimique, il est pauvre en information structurale. Son emploi est de plus en plus réservé à l'analyse quantitative via la loi de Beer-Lambert (Williams, 2003).

1) Domaine spectral :

Le spectre électromagnétique représente la répartition des ondes électromagnétiques en fonction de leur longueur d'onde, de leur fréquence ou bien encore de leur énergie.

En partant des ondes les plus énergétiques, on distingue successivement :

- Les rayons gamma (γ) : < 10 pm.
- Les rayons X : 10 pm – 10 nm.
- Les ultraviolets : 10 nm – 390 nm.
- Le domaine visible : 390 nm – 780 nm.
- L'infrarouge : 780 nm – 0,1 mm.
- Le domaine submillimétrique : 0,1mm – 1mm.
- Les micro-ondes : 1mm – 1m.
- Les ondes radio : 1 m – 100,000 km.

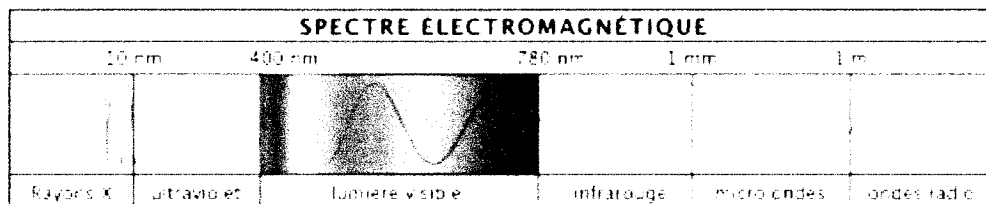


Figure 4 : Différents domaines du spectre électromagnétique.

2) Principe du dosage spectrophotométrique :

Dans une molécule, les transitions électroniques UV-visibles mettent en jeu les énergies les plus importantes de la chimie (environ de 13000 à 50000 cm⁻¹ soit 160 à 665 kJ.mol⁻¹). L'ordre de grandeur des énergies mises en jeu est celui des énergies de liaison des molécules et ces rayonnements peuvent parfois provoquer des ruptures de liaisons. Plus généralement, ils provoquent des transitions électroniques entre les différents niveaux d'énergie des molécules (F. Guedira, 2010).

3) Loi de Beer-Lambert :

Le principe de l'utilisation de la spectrophotométrie pour l'analyse quantitative est basé sur le fait que l'intensité d'absorption (ou d'émission) est fonction de la concentration de la particule qui absorbe (ou qui émet) de la lumière.

Lorsqu'une lumière monochromatique d'intensité I₀ traverse un milieu homogène, l'intensité de la lumière émergente I décroît selon une fonction exponentielle lorsque l'épaisseur l du milieu absorbant augmente. Si on étudie principalement des solutions, la loi de Beer fait intervenir les concentrations et s'exprime sous la forme suivante :

$$A = \log (I_0/I) = \epsilon . l . C$$

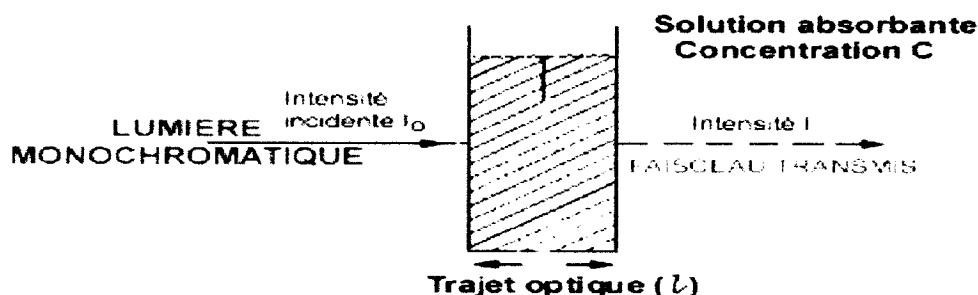


Figure 5 : Principe du dosage colorimétrique.

- A = absorbance sans unité (ou Densité Optique).
- I_0 = intensité lumineuse incidente (avant interaction avec le soluté).
- I = intensité lumineuse transmise.
- ε = coefficient d'extinction (qui dépend de la longueur d'onde, de la température, et de la nature du soluté et du solvant).
- l = longueur du trajet optique (en cm).
- C = concentration du soluté (l'unité dépend de celle du coefficient d'extinction).

(F. Guedira, 2010)

4) Déviation de la loi de Beer-Lambert :

De nombreux paramètres peuvent provoquer une déviation de la loi de Beer-Lambert. Celle-ci n'est plus vraie quand la concentration devient trop élevée, quand une réaction modifie la composition ou le pH, ou quand il reste des impuretés. En outre elle doit être adaptée en cas de liaisons hydrogène avec le solvant, de solvataion, d'interactions molécule-molécule aux fortes concentrations, ou de fluorescence. Le calibrage doit alors faire appel à des méthodes non linéaires (F. Guedira, 2010).

5) Spectrophotomètre UV-visible :

Un spectrophotomètre est un appareil qui permet de mesurer l'absorbance d'une solution à une longueur d'onde donnée ou sur une région donnée du spectre. Selon la loi de Beer-Lambert, l'absorbance d'une solution est proportionnelle à la concentration des substances en solution, à condition de se placer à la longueur d'onde à laquelle la substance absorbe les rayons lumineux. C'est pourquoi la longueur d'onde est réglée en fonction de la substance dont on veut connaître la concentration.

Le spectrophotomètre UV-visible comprend :

- ❖ Une source ou des sources de lumière : lumière blanche pour la mesure dans le spectre visible (lumière polychromatique) et/ou lumière UV.
- ❖ La lampe UV est généralement de type deutérium (domaine de 195 à 380 nm, durée de vie de la lampe de 2 000 h, par exemple).
- ❖ La lampe visible est généralement de type halogène (domaine de 320 à 1 000 nm, durée de vie de 500 h, par exemple).

- ❖ Un monochromateur formé d'un réseau ou d'un prisme diffractant la lumière de la source. Il permet de sélectionner la longueur d'onde de la lumière qui traversera la solution à doser.
- ❖ Une fente de largeur fixe ou variable pour régler la bande passante.
- ❖ Un porte-cuvette pouvant permettre le maintien à température souhaitée de la solution à analyser, cette température est maintenue, si nécessaire, par un circuit d'eau ou un effet Peltier. Ce maintien à température fixée est très utile dans les mesures de cinétique enzymatique, en effet, la vitesse de réaction dépend de la température.
- ❖ Une cuvette transparente dans laquelle on place la solution à étudier. Suivant la qualité et la quantité d'échantillon, il existe différentes cuvettes, généralement en plastique (spectre visible, UV proche) ou en quartz (UV, mais elles sont très chères).
- ❖ Une cellule photoélectrique, restituant un courant proportionnel au nombre de photons reçus. Sur des modèles récents, le détecteur unique de type photodiode est parfois remplacé par une barrette CCD, ou une barrette de diode (chaque cellule sensible reçoit une couleur fixe). Les modèles les plus sensibles utilisent un détecteur de type photomultiplicateur ou PMT.
- ❖ Un détecteur électronique dont la réponse est proportionnelle à ce courant électrique et permet une mesure relative de l'intensité lumineuse.

Il existe deux types de spectrophotomètres : le mono faisceau et le double faisceau, le deuxième est plus performant que le premier. Dans un instrument à double faisceau, la lumière est séparée en deux faisceaux avant d'atteindre l'échantillon. L'un des faisceaux est utilisé comme référence et traverse un « blanc » (même cuve et même solvant que l'échantillon), l'autre passe par l'échantillon.

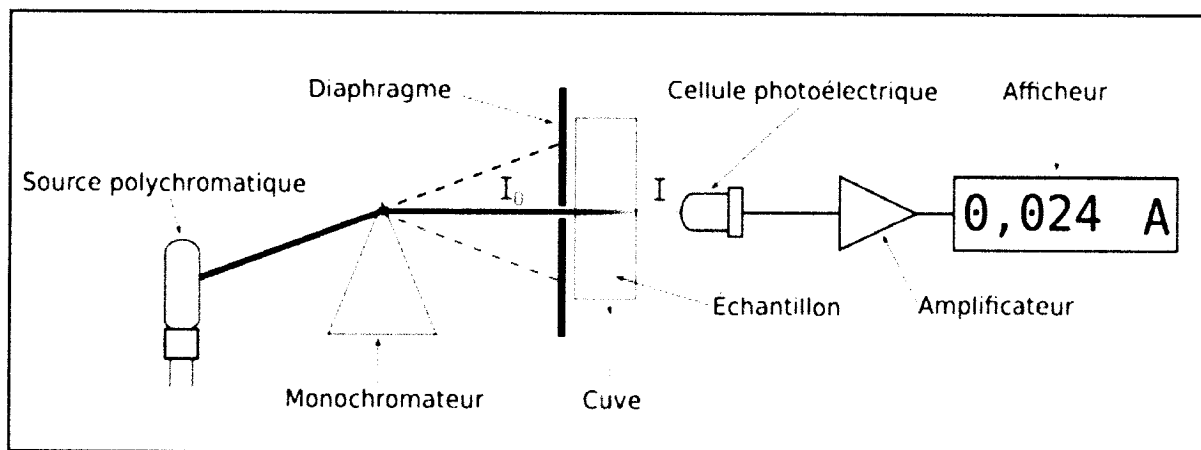


Figure 6 : Principe du spectrophotomètre UV-visible monofaisceau.

II. Dosage et bioanalyse :

En chimie, l'analyse est l'action d'identifier dans une substance les éléments constitutants (analyse qualitative) et d'en déterminer la teneur (analyse quantitative ou dosage).

1) Définition du dosage :

Le dosage est l'action qui consiste à déterminer 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).

2) Types de dosage :

Selon la matrice dans laquelle le dosage sera effectué, on distingue deux types de dosage :

a) Dosage analytique :

C'est l'analyse quantitative effectuée dans un milieu analytique, c'est-à-dire le dosage d'une substance dans une matrice non-biologique.

b) Dosage bioanalytique :

Le dosage bioanalytique est l'analyse quantitative de substances (médicaments ou autres) effectuée dans une matrice biologique telle que le sang, le plasma, le sérum ou l'urine.

3) Notion de blanc :

En spectrophotométrie, lorsqu'une espèce chimique est solubilisée dans un solvant et placée dans une cellule de mesure, l'absorption mesurée correspond à trois absorptions différentes :

- l'absorption due à la cellule qui peut être en verre, en quartz ou en polymère.
- l'absorption due au solvant.
- l'absorption due à l'espèce chimique dissoute.

Les deux premières absorptions ne sont pas dues à l'analyte. Il faut donc les retrancher. Pour ce faire, on mesure l'absorbance de la cellule avec du solvant et on soustrait l'absorbance ainsi obtenue (le blanc) à l'absorbance mesurée avec l'espèce que l'on veut étudier. Ceci est rendu possible par l'additivité des absorbances (P. Galez, 2001).

4) Notion de standard (étalon) :

Lors de l'analyse des échantillons d'une étude, une matrice biologique vierge est enrichie avec l'analyte (s) en utilisant des solutions standards (de référence) pour préparer des étalons, des échantillons de contrôle qualité et les échantillons de stabilité.

En outre, un étalon interne approprié (IS) peut être ajouté pendant le traitement des échantillons dans des procédés chromatographiques.

La pureté de l'étalon de référence utilisé pour préparer les échantillons peut affecter les données de l'étude. Pour cette raison, un étalon de référence d'une identité et d'une pureté connue doit être utilisé pour préparer des solutions de concentrations connues. L'étalon de référence doit être identique à l'analyte (FDA, 2001).

5) Notion d'échantillon de CQ :

Afin d'assurer qu'un essai est validé et les résultats sont fiables, les échantillons de contrôle qualité doivent être utilisés dans l'exécution de chaque essai.

Les échantillons de contrôle qualité doivent être traités de la même manière que les échantillons d'essai et sont utilisés pour valider l'essai. Chaque laboratoire devrait établir des critères d'acceptation fondés sur des directives (WHO, 2014).

Chapitre IV : Validation d'une méthode bioanalytique

Selon la matrice dans laquelle l'analyse sera effectuée, on distingue la validation d'une méthode analytique (matrice de nature chimique) de la validation d'une méthode bioanalytique (matrice de nature biologique). La procédure des deux types de validation et l'exploitation des résultats sont différentes. Mais les paramètres de la validation sont les mêmes.

La validation de la méthode bioanalytique comprend toutes les procédures qui démontrent qu'un procédé particulier utilisé pour la mesure quantitative de substances à analyser dans une matrice biologique donnée, tel que le sang, le plasma, le sérum, ou l'urine, est fiable et reproductible pour l'utilisation prévue. Les paramètres fondamentaux pour cette validation comprennent (1) l'exactitude, (2) la fidélité, (3) la spécificité, (4) la sensibilité, (5) la reproductibilité, et (6) la stabilité. La validation comprend la documentation, à travers l'utilisation des examens de laboratoire spécifiques, les caractéristiques de performance de la méthode sont appropriées et fiables pour les applications analytiques destinées. L'acceptabilité des données analytiques correspond directement aux critères utilisés pour valider la méthode (FDA, 2001).

I. But de la validation :

Le but de la validation d'une procédure analytique est de démontrer qu'elle correspond à l'usage pour lequel elle est prévue. En bioanalyse, la validation a pour objectif de démontrer les performances de la procédure de dosage et de prouver que les résultats obtenus sont fiables, et ce dans des limites bien définies.

En effet, ces méthodes, employées pour la détermination quantitative de faibles concentrations en principes actifs et métabolites, jouent un rôle considérable dans l'évaluation et l'interprétation des études de la pharmacocinétique, du métabolisme, de la biodisponibilité et de la bioéquivalence d'un médicament (SFSTP, 1997).

II. Différents types de validation :

Les méthodes publiées d'analyse sont souvent modifiées pour convenir aux exigences de la réalisation de l'essai du laboratoire. Ces modifications doivent être validées pour garantir la performance appropriée de la méthode analytique.

Lorsque des modifications sont apportées à une méthode validée précédemment, l'analyste doit faire preuve de jugement pour savoir si la validation supplémentaire est nécessaire. Au

cours d'un programme de développement d'un médicament, une méthode bioanalytique définie subit de nombreuses modifications. Les changements évolutifs pour soutenir des études spécifiques et les différents niveaux de validation démontrent la validité de la performance d'un test. Différents types et niveaux de validation sont définis et caractérisés comme suit :

A. Validation complète :

La validation complète est importante lors de l'élaboration et de la mise en œuvre d'une méthode de bioanalyse pour la première fois.

B. Validation partielle :

Les validations partielles sont des modifications des méthodes bioanalytiques déjà validées. La validation partielle peut aller de la détermination de l'exactitude et de la fidélité d'une analyse à une validation presque complète. Les modifications de la méthode bioanalytique qui entrent dans cette catégorie comprennent, mais ne sont pas limités aux:

- Les transferts de la méthode bioanalytique entre laboratoires ou analystes.
- Le changement d'une méthode d'analyse (par exemple, les changements dans les systèmes de détection).
- Le changement d'anticoagulant dans le prélèvement d'un liquide biologique.
- Le changement de la matrice au sein des espèces (par exemple, le plasma humain à l'urine humaine).
- Le changement dans les procédures de traitement des échantillons.
- Le changement d'espèces sans le changement de la matrice (par exemple, du plasma du rat au plasma de la souris).
- Le changement d'intervalle de concentration.
- Les variations des instruments et/ou des plates-formes des logiciels.
- Un volume d'échantillon limité (par exemple, étude pédiatrique).
- Des matrices rares.
- La démonstration de la sélectivité d'un analyte en présence de médicaments concomitants.
- La démonstration de la sélectivité d'un analyte en présence de métabolites spécifiques.

C. Validation croisée :

La validation croisée est une comparaison des paramètres de la validation lorsque deux ou plusieurs méthodes bioanalytiques sont utilisés pour générer des données dans la même étude ou à travers différentes études. Un exemple de la validation croisée serait une situation où une méthode bioanalytique validée originale sert de référence et la méthode de bioanalyse révisée est le comparateur. Les comparaisons doivent être effectuées dans les deux sens (FDA, 2001).

III. Paramètres de validation :

Les paramètres fondamentaux pour une validation de la méthode de bioanalyse sont l'exactitude, la fidélité, la spécificité, la sensibilité, la reproductibilité et la stabilité. Les mesures de chaque analyte dans la matrice biologique doivent être validées. En outre, la stabilité de la substance à analyser dans des échantillons enrichis doit être déterminée. Le développement de la méthode et l'établissement d'une méthode de bioanalyse comprennent la détermination de (1) la spécificité, (2) l'exactitude et la fidélité (3) la courbe d'étalonnage, et (4) la stabilité de l'analyte dans des échantillons enrichis (FDA, 2001).

a) Spécificité :

La spécificité est la capacité d'une méthode bioanalytique à différencier et à quantifier l'analyte en présence d'autres composants de la matrice. Pour la spécificité, les analyses des échantillons blancs de la matrice biologique appropriée (le plasma, l'urine, ou une autre matrice) doivent être obtenues à partir d'au moins six sources. Chaque échantillon témoin doit être testé pour les interférences, et la spécificité doit être assurée à la limite inférieure de quantification (LIQ). Les substances susceptibles d'interférer dans une matrice biologique comprennent les composants endogènes de la matrice, les métabolites, les produits de décomposition, et dans l'étude réelle, la médication concomitante et d'autres xénobiotiques exogènes. Si le procédé est destiné à quantifier plus d'un analyte, chaque analyte doit être testé pour s'assurer qu'il n'y ait pas d'interférence (FDA, 2001).

Critères d'acceptation :

- Coefficient de variation ou $CV \leq 20\%$ entre les LIQ.
- Interférences des blancs $\leq 20\%$ de la réponse de la LIQ.

b) Sélectivité :

La sélectivité d'une procédure bioanalytique est sa capacité à établir de manière univoque l'existence de la substance à analyser en présence d'autres composants potentiellement présents (SFSTP, 1997).

c) Exactitude :

L'exactitude d'une méthode d'analyse décrit la proximité des résultats moyens des dosages obtenus par la méthode de la valeur réelle (concentration) de la substance à analyser. L'exactitude est déterminée par une analyse en double des échantillons contenant des quantités connues de l'analyte. L'exactitude doit être mesurée en utilisant au moins cinq déterminations par concentration. Un minimum de trois concentrations dans l'intervalle des concentrations attendues est recommandé. La valeur moyenne doit être dans les 15% de la valeur réelle, sauf à la limite inférieure de quantification, où elle ne devrait pas s'écarter de plus de 20% (FDA, 2001).

d) Fidélité :

La fidélité d'une méthode d'analyse décrit la proximité des mesures individuelles d'un analyte lorsque la procédure est appliquée de manière répétée à plusieurs aliquotes d'un volume homogène de la matrice biologique. La fidélité doit être mesurée en utilisant au moins cinq déterminations par concentration. Un minimum de trois concentrations dans l'intervalle des concentrations attendues est recommandé. La fidélité déterminée pour chaque niveau de concentration ne doit pas dépasser 15% du coefficient de variation (CV) à l'exception de la limite inférieure de quantification, où elle ne doit pas dépasser 20% du coefficient de variation. La fidélité peut être évaluée à deux niveaux : la répétabilité et la reproductibilité (intralaboratoire). La manière dont la reproductibilité doit être établie dépend des circonstances dans lesquelles la procédure est utilisée. Les variations typiques à étudier sont les effets jour, opérateur, équipement, etc.... (FDA, 2001).

e) Courbe d'étalonnage :

Une courbe d'étalonnage est la relation entre la réponse de l'instrument et les concentrations connues de l'analyte. Une courbe d'étalonnage doit être générée pour chaque analyte dans l'échantillon. Un nombre suffisant de standards doit être utilisé pour définir de façon adéquate la relation entre la concentration et la réponse. Une courbe d'étalonnage doit être préparée dans la même matrice biologique que les échantillons de l'étude en ensemençant la matrice avec des concentrations connues de l'analyte. Le nombre de standards utilisés dans la construction d'une courbe d'étalonnage est fonction de l'intervalle prévu des valeurs

analytiques et la nature de la relation analyte / réponse. Les concentrations des standards doivent être choisies sur la base de l'intervalle de concentration attendu dans une étude particulière. Une courbe d'étalonnage devrait être composée d'un échantillon blanc (un échantillon de la matrice), un échantillon zéro (un échantillon de la matrice traitée avec un étalon interne), et de six à huit échantillons non zéro couvrant l'intervalle prévu, y compris la limite inférieure de quantification (FDA, 2001).

e. 1. Limite inférieure de quantification (LIQ) :

Le plus bas standard de la courbe d'étalonnage doit être accepté comme la limite inférieure de quantification si les conditions suivantes sont remplies:

- La réponse de l'analyte à la LIQ devrait être au moins 5 fois par rapport à la réponse du blanc.
- La réponse de l'analyte doit être identifiable, discrète, et reproductible avec une fidélité de 20% et une exactitude de 80 à 120%.

e. 2. Points de la courbe d'étalonnage :

Le modèle le plus simple qui décrit correctement la relation concentration-réponse devrait être utilisé. La sélection de la pondération et l'utilisation d'une équation de régression complexe doit être justifiée. Les conditions suivantes doivent être respectées dans l'élaboration d'une courbe d'étalonnage:

- 20% d'écart de la LIQ de la concentration nominale.
- 15% d'écart des étalons autres que la LIQ de la concentration nominale.

Au moins quatre des six standards non-zéro doivent répondre aux critères ci-dessus, y compris la LIQ et le standard à la plus forte concentration. L'exclusion des standards ne devrait pas changer le modèle utilisé.

f) Linéarité (des résultats) :

La linéarité d'une procédure d'analyse est sa capacité à l'intérieur d'un certain intervalle de dosage d'obtenir des résultats directement proportionnels à la concentration (quantité) en substance à examiner dans l'échantillon (SFSTP, 1997).

Le coefficient de corrélation R doit être d'au moins 0,98.

g) Rendement :

Le rendement d'un analyte dans un dosage est la réaction du détecteur obtenue à partir d'une quantité de l'analyte ajoutée et extraite de la matrice biologique, par rapport à la réaction du détecteur pour obtenir la concentration réelle de l'étalon pur. Le rendement se rapporte à l'efficacité de l'extraction d'une méthode analytique dans les limites de la variabilité. Le rendement de l'analyte ne doit pas atteindre forcément 100%, mais l'ampleur du rendement d'un analyte et de l'étalon interne doit être cohérente, précise et reproductible. Les expériences de rendement doivent être effectuées en comparant les résultats d'analyse des échantillons prélevés à trois concentrations (faible, moyenne et élevée) aux étalons non extraits qui représentent 100% de rendement.

h) Stabilité :

La stabilité d'une substance dans un fluide biologique est une fonction des conditions de stockage, des propriétés chimiques de la substance, de la matrice et du récipient. La stabilité d'un analyte dans une matrice particulière et dans un récipient est pertinente seulement pour cette matrice et ce récipient et ne doit pas être extrapolée à d'autres matrices et d'autres récipients. Les procédures de stabilité doivent évaluer la stabilité des analytes pendant la collecte des échantillons et leur manutention, à long terme (congelé à la température de stockage prévu) et à court terme de stockage (sur pailleasse, température ambiante), et après être passé par les cycles de congélation et de décongélation et le processus d'analyse. Les conditions utilisées dans les expériences de stabilité doivent refléter les situations susceptibles d'être rencontrées lors de la manipulation de l'échantillon réel et l'analyse. La procédure devrait également inclure une évaluation de la stabilité de l'analyte dans la solution mère.

Toutes les déterminations de la stabilité doivent utiliser un ensemble d'échantillons préparés à partir d'une solution mère de l'analyte fraîchement préparée, la matrice biologique est sans interférence. Les solutions mères de l'analyte utilisées pour l'évaluation de la stabilité doivent être préparées dans un solvant approprié, à des concentrations connues (FDA, 2001).

h. 1. Stabilité de congélation et de décongélation :

La stabilité de l'analyte doit être déterminée après trois cycles de congélation et de décongélation. Au moins trois aliquotes à chacune des concentrations basses et élevées doivent être conservés à la température de stockage prévue pendant 24 heures et décongelés sans aide à température ambiante. Quand ils sont complètement décongelés, les échantillons doivent être congelés à nouveau pendant 12 à 24 heures dans les mêmes conditions. Le cycle de congélation-décongélation doit être répété deux fois de plus, puis les analytes sont analysés

sur le troisième cycle. Si un analyte est instable à la température de stockage prévue, l'échantillon de stabilité doit être congelé à -70°C au cours des trois cycles de congélation et de décongélation (FDA, 2001).

h. 2. Stabilité à court-terme :

Trois aliquotes de chacune des concentrations basses et élevées doivent être décongelés à température ambiante et maintenus à cette température pendant 4 à 24 heures et ils seront analysés par la suite (FDA, 2001).

h. 3. Stabilité à long terme :

La durée de stockage dans une évaluation de la stabilité à long terme doit être supérieure à la durée entre la date de la première collection de l'échantillon et la date de la dernière analyse de l'échantillon. La stabilité à long terme doit être déterminée par le stockage d'au moins de trois aliquotes de chacune des concentrations basses et élevées dans les mêmes conditions que les échantillons de l'étude. Le volume des échantillons devrait être suffisant pour l'analyse à trois reprises. Les concentrations de tous les échantillons de stabilité doivent être comparées à la moyenne des valeurs calculées pour les étalons aux concentrations appropriées à partir du premier jour de l'essai de stabilité à long terme (FDA, 2001).

h. 4. Stabilité de la solution mère :

La stabilité des solutions mères doit être évaluée à la température ambiante pendant au moins 6 heures. Si les solutions mères sont réfrigérées ou congelées pour la période correspondante, la stabilité doit être documentée. Après l'achèvement de la durée de stockage souhaitée, la stabilité doit être testée en comparant la réponse de l'instrument avec celle des solutions fraîchement préparées (FDA, 2001).

Etude expérimentale

I. Objectif :

L'objectif de cette étude est de valider une méthode de dosage du rouge de phénol appliqué aux études de la perméabilité intestinale chez le rat par spectrophotométrie visible.

Cette validation va contribuer dans l'étude de la perméabilité intestinale des médicaments administrés par voie orale lors des études in vitro dans la détermination de l'équivalence thérapeutique entre un princeps et un générique.

II. Choix de la molécule :

L'absorption intestinale peut être définie sur le plan opérationnel comme la disparition complète de la substance à partir de la lumière intestinale.

Cependant, la mesure expérimentale de cette substance ne peut être réalisée qu'en présence d'un indicateur non absorbé qui est le ROUGE DE PHENOL.

Notre étude va se baser sur le dosage colorimétrique du rouge de phénol appliqué aux études de perméabilité intestinale chez le rat.

III. Choix de la méthode:

Une variété de méthodes bioanalytiques peuvent être utilisées pour le dosage du rouge de phénol dans un milieu biologique.

La méthode utilisée dans notre étude est la spectrophotométrie visible qui est une méthode colorimétrique.

Cette méthode a été choisie parce que c'est une méthode d'analyse quantitative qui permet la mesure de l'intensité de coloration du rouge de phénol en milieu alcalin à une longueur d'onde de 560 nm. Cette intensité de coloration est proportionnelle à la concentration du rouge de phénol.

C'est une méthode peu coûteuse et le matériel nécessaire pour sa réalisation est disponible au niveau de notre laboratoire.

IV. Protocole expérimental :

A. Partie préanalytique :

Cette partie s'est déroulée au niveau de l'animalerie du service de pharmacotoxicologie au Laboratoire National de Contrôle des Produits Pharmaceutiques.

But :

Le but de cette étape est de recueillir le perfusât intestinal de rat qui va nous servir de blanc pour le dosage de rouge de phénol.

Principe :

Le principe de cette étape est de faire passer une solution de perfusion intestinale à travers une portion du jéjunum chez un rat anesthésié (méthode in situ) et de recueillir le perfusât intestinal.

Matériels et méthodes :

a) Matériels :

- **Réactif animal :** 3 rats mâles albinos de poids entre 300 et 400g
- **Réactif chimique :**
 - solution pour perfusion intestinale : NaCl, KCl, NaH₂PO₄ (2H₂O), Na₂HPO₄ (2H₂O), glucose, eau purifiée.
 - Thiopental.
- **Equipement :**
 - Pompe HPLC.
 - Bain marie.
 - Plaque chauffante à 37 °C.
- **Accessoires :**
 - Matériel de dissection.

b) Méthode :

- Préparation de la solution pour perfusion intestinale.
 - ❖ NaCl : 2805 mg.
 - ❖ KCl : 402,6 mg.
 - ❖ NaH₂PO₄ (2H₂O) : 480 mg.
 - ❖ Na₂HPO₄ (2H₂O) : 498,18 mg.

- ❖ Glucose : 20 ml d'une solution à 5%.
- ❖ Eau purifiée : QSP 1 L.

Le pH de la solution est ajusté à 6,5.

➤ Préparation et manipulation de l'animal :

Le rat est mis à jeun pendant 12 à 18 h (eau ad libitum), anesthésié par une dose de 50 mg/kg de thiopental par voie intra-péritonéale et placé sur une plaque chauffante (afin de maintenir sa température à 37°C).

Une incision médiane est pratiquée au niveau de la cavité abdominale, afin d'isoler une portion de 10 cm du jéjunum proximal. Ensuite deux cathéters sont placés au niveau de l'entrée et la sortie de la portion intestinale, maintenus en place par un fil de suture, tout en veillant à maintenir l'irrigation et l'innervation intactes.

Le cathéter d'entrée est relié de l'autre côté à la pompe péristaltique liée elle-même par une tubulure à la solution de perfusion qui se trouve au bain marie à 37 °C.

Le cathéter de sortie permet de recueillir les prélèvements.

➤ Passage de la solution pour perfusion au niveau de l'intestin :

- On rince d'abord la portion intestinale et on jette le premier tube
- On récolte après, 10 prélèvements sur 10 tubes numérotés
- Les prélèvements sont conservés à -80 °C en attendant le dosage.

B. Partie bioanalytique :

But:

Le but de cette étape est de mesurer la concentration du rouge de phénol dans les échantillons préparés à partir du perfusât intestinal par spectrophotométrie à une longueur d'onde $\lambda = 560 \text{ nm}$.

Principe :

Le principe de cette étape repose sur le dosage de l'absorbance du rouge de phénol par colorimétrie.

Matériels et méthodes :

a) Matériels :

➤ Equipement :

- Spectrophotomètre UV-visible : JENWAY 7305.
- Vortex.
- Balance : KERN ABS.

➤ Accessoires :

- Pipettes et micropipettes.
- Fioles jaugées.
- Tubes secs en plastique de 5 ml.
- Portoirs.
- Béchers.

➤ Réactifs :

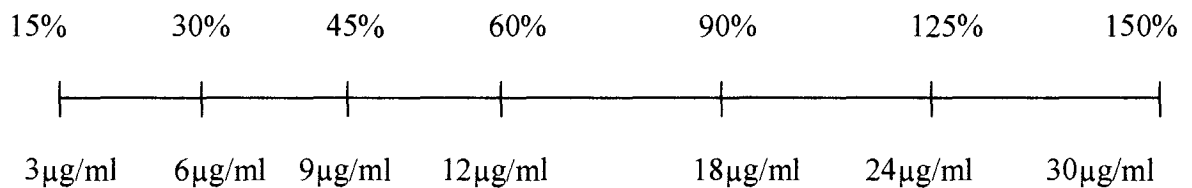
- Méthanol, grade analytique.
- Hydroxyde de sodium.
- Rouge de phénol.
- Eau distillée.

b) Méthodes :

1. Choix des points de la gamme d'étalonnage :

La concentration cible du rouge de phénol lors de l'expérimentation de routine est de 20µg/ml. Sept (07) points de la gamme d'étalonnage ont été choisis sur un intervalle de 15 à 150 % comme suit :

- Une concentration minimale détectable d'une valeur de 15% : $x = 3\mu\text{g/ml}$.
- Une concentration maximale d'une valeur de 150% : $y = 30\mu\text{g/ml}$.
- Des concentrations intermédiaires :
 - $2x = 6\mu\text{g/ml}$.
 - $3x = 9\mu\text{g/ml}$.
 - $4x = 12\mu\text{g/ml}$.
 - $y+2x/2 = 18\mu\text{g/ml}$.
 - $[(y+2x/2) + y]/2 = 24\mu\text{g/ml}$.



2. Choix des concentrations des échantillons de CQ :

Les concentrations des échantillons de CQ ont été choisies de la manière suivante :

- CQI : une concentration équivalente à 25% de la concentration maximale = 7,5 µg/ml.
- CQM : une concentration équivalente à 50% de la concentration maximale = 15µg/ml.
- CQS : une concentration équivalente à 85% de la concentration maximale = 25,5 µg/ml.

3. Préparation de la gamme d'étalonnage :

✓ Préparation de la solution mère du rouge de phénol :

Dissoudre 75 mg du rouge de phénol dans une fiole de 50 ml d'un mélange eau-méthanol pour obtenir une solution mère de 1,5 mg/ml.

✓ Préparation des standards de la gamme d'étalonnage en milieu aqueux :

Sept (07) standards aqueux sont préparés à partir d'une solution mère (1,5mg /ml). Pour chaque standard aqueux, un volume correspondant de la solution mère est dilué dans une fiole de 10 ml par l'eau distillée. Les standards seront par la suite agités au vortex pendant 20 secondes. Les concentrations de ces standards sont respectivement : 30 ,60 ,90 ,120 ,180 ,240 et 300 µg/ml.

Le tableau II représente le volume à prélever de la solution mère de rouge de phénol pour chaque concentration des 7 standards aqueux.

Tableau II : Concentrations des 7 standards aqueux et le volume à prélever de la solution mère.

	Concentration (µg/ml)	Volume prélevé de la solution mère (µl)	Volume final (µl)
Standard 1	30	200	10000
Standard 2	60	400	10000
Standard 3	90	600	10000
Standard 4	120	800	10000
Standard 5	180	1200	10000
Standard 6	240	1600	10000
Standard 7	300	2000	10000

✓ Préparation des standards de la gamme d'étalonnage en milieu biologique :

Sept (07) standards en milieu biologique sont préparés à partir des standards aqueux précédents, en diluant au 1 /10ème ces derniers dans le perfusât intestinal (recueilli à la fin de la phase de rinçage). Les standards seront agités au vortex pendant 20 secondes par la suite. Les concentrations de ces standards sont respectivement : 3, 6, 12, 18, 24 et 30 µg /ml.

Le tableau III représente les volumes des standards aqueux et du perfusât intestinal nécessaires pour la préparation des 7 standards biologiques.

Tableau III : Concentrations des 7 standards biologiques et le volume à prélever des standards aqueux et du perfusât intestinal.

	Concentration ($\mu\text{g/ml}$)	Volume prélevé du standard aqueux (μl)	Volume du perfusât intestinal (μl)
Standard 1'	3	20	200
Standard 2'	6	20	200
Standard 3'	9	20	200
Standard 4'	12	20	200
Standard 5'	18	20	200
Standard 6'	24	20	200
Standard 7'	30	20	200

✓ **Préparation des échantillons de contrôle qualité (CQ) :**

Trois (03) CQ sont préparés de la même manière que les standards :

➤ **Préparation des échantillons CQ en milieu aqueux :**

3 échantillons de contrôle qualité en milieu aqueux sont préparés à partir de la solution mère précédente.

Le tableau IV représente le volume à prélever de la solution mère de rouge de phénol pour chaque concentration des échantillons de CQ en milieu aqueux.

Tableau IV : Concentrations des échantillons de contrôle qualité en milieu aqueux et le volume à prélever de la solution mère.

CQ	Concentration ($\mu\text{g/ml}$)	Volume prélevé de la solution mère (μl)	V final μl
CQI	75	500	10000
CQM	150	1000	10000
CQS	255	1700	10000

➤ **Préparation des échantillons CQ en milieu biologique :**

Les échantillons de CQ en milieu biologique sont préparés par dilution des CQ aqueux au $1/10^{\text{ème}}$.

Le tableau V représente les volumes des CQ aqueux et du perfusât intestinal nécessaires pour la préparation des CQ en milieu biologique.

Tableau V : Concentrations des échantillons de contrôle qualité en milieu biologique et le volume à prélever des échantillons CQ aqueux.

CQ	Concentration (µg/ml)	Volume prélevé des CQ aqueux (µl)	Volume du perfusât intestinal (µl)
CQI	7.5	20	200
CQM	15	20	200
CQS	25.5	20	200

✓ **Préparation de la solution d'hydroxyde de sodium 5M :**

La solution d'hydroxyde de sodium est préparée en dissolvant 10g d'hydroxyde de sodium (NaOH) dans une fiole de 50ml d'eau distillée pour obtenir une solution 5M.

✓ **Traitement des échantillons :**

Chaque échantillon (standards biologique, contrôle qualité) est additionné de :

- 100 µl de solution d'hydroxyde de sodium 5M.
- 2 ml d'eau distillée.

✓ **Dosage :**

L'absorbance de la coloration violette formée est mesurée par un spectrophotomètre à une longueur d'onde $\lambda=560$ nm.

4. Paramètres de validation bioanalytique étudiés :

Les paramètres de validation bioanalytique étudiés lors de notre travail sont : la linéarité, la spécificité, la sélectivité, l'exactitude, la fidélité et la stabilité.

Les critères d'acceptation adoptés dans cette étude seront ceux exigés par l'EMA (2011).

Trois séries sont préparées à partir de 3 sources de blanc différentes, chaque série contient les 7 standards biologiques et les 3 niveaux de contrôle qualité.

Chaque jour, ces trois séries sont préparées, pendant trois jours.

i. Courbe d'étalonnage :

Une courbe d'étalonnage est la relation entre la réponse de l'instrument et les concentrations connues de l'analyte.

Les sept standards préparés en milieu biologique sont utilisés pour établir la courbe d'étalonnage.

Cette courbe est établie par rapport à :

- ❖ Un échantillon blanc préparé par mélange de 200 µl de perfusât intestinal avec 100 µl de NaOH et 2 ml d'eau distillée pour chaque série de chaque jour.
- ❖ Des standards mesurés au moins 3 fois pour chacune des trois séries des trois jours.
- ❖ Une LIQ déterminée entre le standard 1 et le standard 2 à condition que la réponse du blanc soit inférieure à 20 % de la LIQ.

L'interférence du blanc par rapport aux standards 1 et 2 est calculée pour les 3 séries des trois jours en utilisant la relation suivante :

$$\text{L'interférence (\%)} = \frac{DO \text{ du blanc}}{DO \text{ du standard}} \times 100$$

Ainsi, la régression linéaire est déterminée à l'aide du logiciel STATISTICA 8.

Trois courbes d'étalonnage sont établies pour les trois séries, chaque jour et ce, durant les trois jours.

ii. Linéarité :

La linéarité d'une procédure d'analyse est sa capacité à l'intérieur d'un certain intervalle de dosage d'obtenir des résultats directement proportionnels à la concentration de l'analyte.

La linéarité est estimée pour les trois séries des 3 jours. Une gamme d'étalonnage est réalisée pour chaque série. Chaque standard est dosé 3 fois. Dans les données bioanalytiques et statistiques, les trois lectures de chaque standard sont utilisées pour vérifier les critères d'acceptation de la linéarité. Une analyse de régression linéaire (fonction, pente, interception à l'origine et le coefficient de corrélation R) est effectuée, et les concentrations des standards sont estimées.

Le coefficient de corrélation (R) doit être supérieur à 0,98.

Le biais relatif est calculé par la relation suivante :

$$\text{Biais relatif (\%)} = \frac{\text{concentration théorique} - \text{concentration estimée}}{\text{concentration théorique}} \times 100$$

Le biais relatif ne doit pas dépasser 20% pour la LIQ, et 15% pour les autres standards. 75% des points de la gamme doivent répondre à ces critères.

iii. Spécificité :

La spécificité est la capacité d'une méthode bioanalytique à différencier et à quantifier l'analyte en présence d'autres composants de la matrice.

La spécificité est déterminée à partir du CV des LIQ et de l'interférence des blancs par rapport aux LIQ pour les trois séries du 2^{ème} jour.

Le coefficient de variation (CV) des LIQ est calculé de la façon suivante :

$$CV (\%) = \frac{\text{Ecart type}}{\text{Moyenne des LIQ}} \times 100$$

Le CV ne doit pas dépasser 20%.

L'interférence des blancs par rapport à la LIQ est calculée de la façon suivante :

$$\text{Interférence (\%)} = \frac{DO \text{ du blanc}}{DO \text{ de la LIQ}} \times 100.$$

L'interférence des blancs par rapport à la LIQ doit être inférieure à 20%.

iv. Sélectivité :

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

Pour la sélectivité, le spectre d'absorption par balayage entre 400 et 600 nm pour plusieurs principes actifs est déterminé, avec une mesure d'absorbance à 560 nm pour chaque préparation.

Les échantillons de perfusât intestinal préparés contenait les solutions citées dans le tableau suivant :

Tableau VI : Concentration des solutions des différents principes actifs utilisés pour l'étude de la sélectivité.

Principe actif	Concentration de la solution
Rouge de phénol	20µg/ml
Naproxène	100µg/ml
Furosémide	20µg/ml
Métoprolol	40µg/ml
Aténolol	40µg/ml
Hydrochlorolthiazide	20µg/ml
Esoméprazole	20µg/ml

v. Exactitude :

L'exactitude d'une méthode d'analyse décrit la proximité des résultats moyens des dosages obtenus par la méthode de la valeur réelle de l'analyte.

Pour l'exactitude, trois courbes d'étalonnage pour les trois différentes séries sont établies sur les trois jours successifs, avec six lectures des trois niveaux de CQ (CQI, CQM et CQS) et de la LIQ.

Pour chaque série, une courbe d'étalonnage est établie et la régression linéaire est estimée, cette dernière sert à l'estimation des concentrations de CQ et de la LIQ.

Pour la détermination de l'exactitude, le biais relatif de chacune des trois séries des trois jours est calculé d'après la relation suivante :

$$\text{Biais relatif (\%)} = \frac{\text{concentration théorique} - \text{concentration estimée}}{\text{concentration théorique}} \times 100$$

Le biais relatif ne doit pas dépasser 15 % pour tous les niveaux de concentration (CQI, CQM, CQS) et 20 % pour la LIQ. Un minimum de 3 concentrations sur 5 doit correspondre aux critères.

vi. Fidélité :

La fidélité d'une méthode d'analyse décrit la proximité des mesures individuelles d'un analyte lorsque la procédure est appliquée de manière répétée à plusieurs aliquotes d'un volume homogène de la matrice biologique.

Pour la fidélité, trois courbes d'étalonnage pour les trois différentes séries sont établies sur trois jours successifs, avec six lectures par niveau de CQI, CQM, CQS et de la LIQ.

Pour chaque série, une courbe d'étalonnage est établie et la régression linéaire est estimée, cette dernière sert à l'estimation des concentrations de CQ et de la LIQ.

➤ **Répétabilité :**

C'est l'analyse du même échantillon 6 fois dans les mêmes conditions : même opérateur, même réactif, même instrument, et au cours d'une même série.

Le CV de chaque série pour les 3 jours est calculé par rapport à la relation suivante

$$CV (\%) = \frac{\text{Ecart type}}{\text{Moyenne des concentrations estimées}} \times 100$$

Le CV ne doit pas dépasser 15 % pour tous les niveaux de CQ (CQI, CQM, CQS), et 20 % pour la LIQ.

Un minimum de 3 concentrations sur 5 doit correspondre aux critères.

➤ **Fidélité intermédiaire :**

C'est l'analyse de la variabilité due au facteur jour.

Le CV est déterminé entre les concentrations estimées de CQ préparés en 3 jours différents. Le CV est calculé, et il ne doit pas dépasser 15 % pour tous les niveaux de concentration de CQ (CQI, CQM, CQS) et 20 % pour la LIQ.

Un minimum de 3 concentrations sur 5 doit correspondre aux critères.

vii. Rendement :

Le rendement d'un analyte dans un dosage est la réaction du détecteur obtenue à partir d'une quantité de l'analyte ajoutée et extraite de la matrice biologique, par rapport à la réaction du détecteur pour obtenir la concentration réelle de l'étalon pur

La détermination du rendement n'est pas applicable à cette méthode, car cette dernière ne nécessite pas d'extraction.

viii. Stabilité:

La stabilité d'une substance dans un fluide biologique est une fonction des conditions de stockage, des propriétés chimiques de la substance, de la matrice et du récipient.

➤ **Stabilité de congélation et de décongélation :**

Pour chacune des séries, les concentrations supérieures et inférieures de contrôle qualité ont été préparées puis dosées après 3 cycles de congélation et de décongélation. Lors de chaque cycle, les échantillons sont conservés à -20°C pendant 18h, puis décongelés sans aide sur la paillasse à température ambiante pendant 4h, ensuite recongelés pour un prochain cycle. Le biais relatif est calculé par rapport à la concentration théorique.

➤ **Stabilité à court terme :**

Les échantillons de contrôle qualité supérieur et inférieur sont préparés et congelés pendant 4 jours, puis décongelés et laissés à température ambiante pendant 24h. Ils sont dosés et le biais relatif est calculé par rapport à la concentration théorique.

➤ **Stabilité à l'abri de la lumière :**

Les échantillons de contrôle qualité supérieur et inférieur sont préparés à l'abri de la lumière dans des tubes recouverts de papier aluminium, puis congelés pendant 4 jours et décongelés pendant 24h à température ambiante. Ils sont dosés et le biais relatif est calculé par rapport à la concentration théorique.

➤ **Stabilité à long terme :**

Les échantillons de contrôle qualité supérieur et inférieur sont préparés et congelés pendant 1 mois à une température de -20°C . Ils sont dosés après décongélation et le biais relatif est calculé par rapport à la concentration théorique.

Les concentrations des CQ inférieurs et supérieurs des 4 étapes de l'étude de la stabilité sont estimées par rapport à la courbe d'étalonnage établie le 1^{er} jour.

Les échantillons de CQ inférieur et supérieur sont conservés après mélange avec la soude (NaOH) pour les 4 étapes d'étude de la stabilité.

V. Résultats et interprétation:

i. Courbe d'étalonnage :

➤ **Dosage du blanc :**

Les valeurs de la DO obtenues suite au dosage du blanc des 3 séries pour les 3 jours sont représentées dans le tableau VII.

Tableau VII : Valeurs de la DO du blanc des trois séries des trois jours.

Série	DO du blanc du jour 1	DO du blanc du jour 2	DO du blanc du jour 3
Série 1	0,010	0,006	0,011
Série 2	0,011	0,009	0,016
Série 3	0,010	0,010	0,011

➤ **Limite inférieure de quantification :**

Les résultats obtenus suite au calcul de l'interférence du blanc par rapport au Std 1 et au Std 2 sont représentés dans les tableaux VIII, IX et X.

Tableau VIII : Interférence du blanc par rapport au Std 1 et au Std 2 du 1^{er} jour.

Jour 1	DO du Std 1	DO du Std 2	DO du blanc	Interférence blanc/ Std1 (%)	Interférence blanc/ Std2 (%)	Limites d'acceptation (%)
Série 1	0,041	0,063	0,010	24	15,84	20,00
Série 2	0,045	0,062	0,011	24	17,74	20,00
Série 3	0,038	0,069	0,010	26	14,49	20,00

Tableau IX : Interférence du blanc par rapport au Std 1 et au Std 2 du 2^{ème} jour.

Jour 2	DO du Std 1	DO du Std 2	DO du blanc	Interférence blanc/ Std1 (%)	Interférence blanc/ Std2 (%)	Limites d'acceptation (%)
Série 1	0,031	0,072	0,006	19,35	8,33	20,00
Série 2	0,040	0,072	0,009	22,5	12,5	20,00
Série 3	0,034	0,074	0,010	29,41	13,51	20,00

Tableau X : Interférence du blanc par rapport au Std 1 et au Std 2 du 3^{ème} jour.

Jour 3	DO du Std 1	DO du Std 2	DO du blanc	Interférence blanc/ Std1 (%)	Interférence blanc/ Std2 (%)	Limites d'acceptation (%)
Série 1	0,031	0,074	0,011	35,48%	14,86%	20,00
Série 2	0,045	0,083	0,016	35,55%	19,27%	20,00
Série 3	0,050	0,081	0,011	22,00%	13,58%	20,00

L'interférence du blanc par rapport au Standard 1 varie de 19,35 à 35,55%. Ces valeurs sont supérieures à la limite d'acceptation qui est de 20%.

L'interférence du blanc par rapport au Standard 2 varie de 8,33 à 19,27%. Ces valeurs sont inférieures à la limite d'acceptation (20%).

D'après ces résultats, le standard 2 correspond le mieux aux critères d'acceptation de la LIQ, donc les courbes d'étalonnage sont réalisées avec une limite inférieure de quantification représentée par le standard 2.

➤ **Standards :**

Les valeurs moyennes des DO obtenues lors du dosage des différents standards des trois séries des trois jours sont représentées dans le tableau suivant :

Tableau XI : Valeurs moyennes des DO des différents standards des trois séries des 3 jours.

Std	[] théorique (µg/ml)	Moyenne des DO 1 ^{er} jour			Moyenne des DO 2 ^{ème} jour			Moyenne des DO 3 ^{ème} jour		
		Série 1	Série 2	Série 3	Série 1	Série 2	Série 3	Série 1	Série 2	Série 3
Std 1	3	0,041	0,045	0,038	0,030	0,039	0,034	0,031	0,045	0,049
Std 2	6	0,063	0,062	0,068	0,072	0,072	0,074	0,074	0,083	0,081
Std 3	9	0,118	0,128	0,123	0,109	0,106	0,092	0,106	0,120	0,102
Std 4	12	0,158	0,148	0,156	0,138	0,136	0,130	0,143	0,153	0,158
Std 5	18	0,234	0,219	0,265	0,213	0,193	0,193	0,208	0,218	0,202
Std 6	24	0,301	0,296	0,300	0,278	0,299	0,278	0,248	0,264	0,263
Std 7	30	0,382	0,384	0,391	0,337	0,344	0,334	0,347	0,356	0,366

Les valeurs brutes des DO obtenues lors du dosage des différents standards des trois séries des trois jours sont représentées dans les tableaux 1, 3 et 5 dans l'annexe A.

Du fait que le standard 1 soit inférieur à la LIQ et que cette dernière soit fixée au standard 2, la courbe d'étalonnage est déterminée avec les 6 standards suivants :

Tableau XII: Concentrations des différents standards de la courbe d'étalonnage.

Standards	Concentration (µg/ml)
Std 2	6
Std 3	9
Std 4	12
Std 5	18
Std 6	24
Std 7	30

Les courbes d'étalonnage des 3 séries des 3 jours sont représentés dans les figures (a), (b), (c), (d), (e), (f), (g), (h) et (i) dans l'annexe B.

Exemple d'une courbe d'étalonnage :

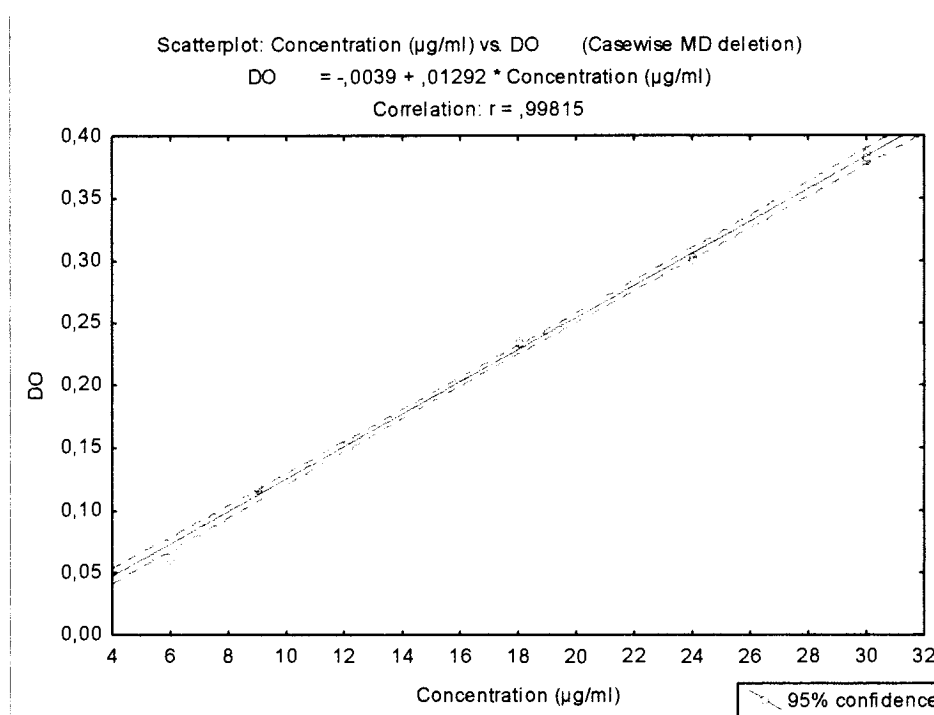


Figure 7 : Courbe d'étalonnage de la série 1 du 1er jour.

ii. Linéarité :

Les paramètres de la régression linéaire des différentes courbes d'étalonnage sont représentés dans le tableau suivant :

Tableau XIII : Paramètres de la régression linéaire des courbes d'étalonnage des 3 séries des 3 jours.

Jour	Série	Pente (a)	Interception à l'origine (b)	Coefficient de corrélation	Limites d'acceptation de R
Jour 1	1	0,01292	-0,0039	0,998	0,980
	2	0,01279	-0,0051	0,996	
	3	0,1305	0,00175	0,991	
Jour 2	1	0,1115	0,00720	0,999	
	2	0,1172	-0,0017	0,993	
	3	0,1113	0,00065	0,997	
Jour 3	1	0,1089	0,008	0,993	
	2	0,01085	0,02002	0,996	
	3	0,01145	0,00648	0,991	

La fonction de chaque courbe est donnée par la relation suivante : $DO = a.C + b$.

Le coefficient de corrélation est supérieur à la limite d'acceptation.

Les résultats du biais relatif pour l'étude de la linéarité des 3 séries des différents jours sont représentés par les tableaux 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18 et 19 dans l'annexe B.

La moyenne des biais relatifs des 3 séries des 3 jours est représentée dans le tableau suivant :

Tableau XIV : Moyenne des biais relatifs des 3 séries des trois jours pour l'étude de la linéarité.

	Standard	Biais relatif moyen (%)			Limites d'acceptation (%)
		Série 1	Série 2	Série 3	
Jour 1	std 2	14,56	13,43	14,96	20,00
	std3	4,55	15,34	2,95	15,00
	std4	4,64	0,46	1,50	15,00
	std5	2,15	2,80	12,07	15,00
	std6	1,56	1,80	4,99	15,00
	std7	0,35	1,41	0,66	15,00
Jour 2	std 2	3,14	4,81	9,84	20,00
	std3	1,11	2,42	0,51	15,00
	std4	2,24	2,09	3,40	15,00
	std5	2,54	7,87	5,98	15,00
	std6	1,20	6,90	3,70	15,00
	std7	1,31	1,68	0,06	15,00
Jour 3	std 2	0,01	2,23	7,99	20,00
	std3	0,01	2,39	7,31	15,00
	std4	3,31	2,39	10,52	15,00
	std5	2,03	1,37	5,13	15,00
	std6	8,05	6,31	6,53	15,00
	std7	3,87	3,12	4,66	15,00

Le biais relatif est inférieur à 20% pour la LIQ et inférieur à 15% pour les autres standards, et plus de 75% des résultats (98%) correspondent aux critères.

D'après ces résultats, la régression linéaire est significative et les valeurs du biais relatif sont inférieures aux limites d'acceptation, donc la méthode est linéaire sur le domaine 6µg/ml- 30µg/ml.

iii. Spécificité :

La spécificité est estimée le 2^{ème} jour pour les trois séries. Le coefficient de variation de la LIQ et l'interférence entre le blanc et la LIQ sont représentés dans le tableau suivant :

Tableau XV : Résultats du CV et de l'interférence du blanc/LIQ pour l'étude de la spécificité.

Jour 2	Coefficient de variation des LIQ (%)			Interférence du blanc/LIQ (%)			Limites d'acceptation (%)
	Série 1	Série 2	Série 3	Série 1	Série 2	Série 3	
	0,568	0,566	0	8,35	13,39	14,41	20,00

Les résultats détaillés sont représentés par le tableau 20 et 21 dans l'annexe C.

Le CV de la LIQ des 3 séries du 2^{ème} jour sont inférieurs aux limites d'acceptation.

L'interférence du blanc par rapport à la LIQ ne dépasse pas les limites d'acceptation.

D'après ces résultats, on peut dire que c'est une méthode spécifique.

iv. Sélectivité :

Le spectre d'absorption par balayage entre 400 et 600 nm pour les différentes substances actives est représenté par la figure 8 :

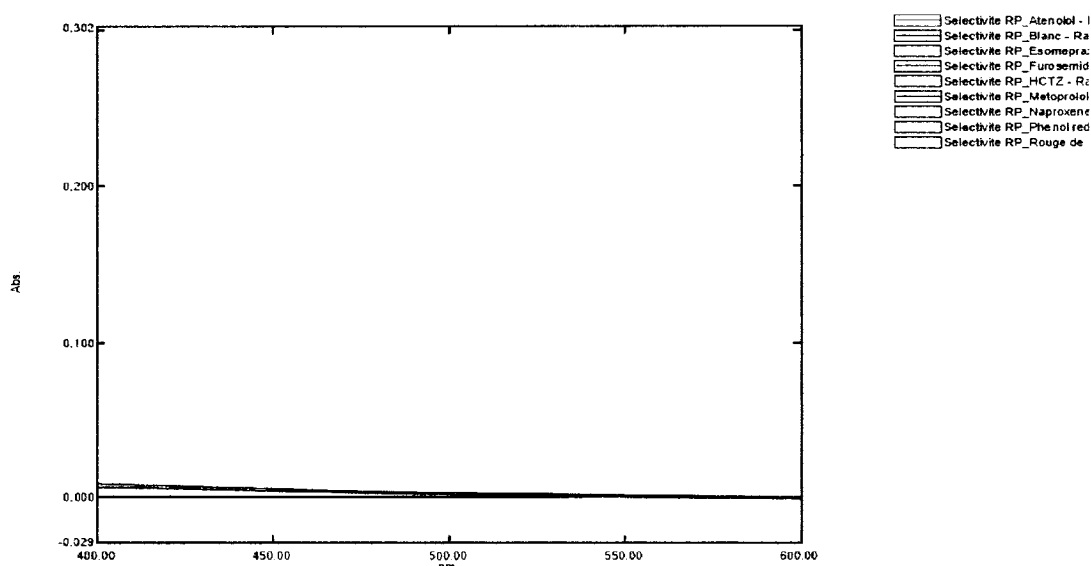


Figure 8 : Spectre d'absorption par balayage entre 400 et 600 nm.

La mesure de l'absorbance des différentes molécules étudiées à 560 nm est représentée par le tableau XVI:

Tableau XVI : Absorbance des différentes molécules étudiées à 560 nm.

Molécules	Absorbance à 560 nm
Blanc	0,001
Rouge de phénol	0,273
Naproxène	0,000
Furosémide	0,000
Métoprolol	0,000
Aténolol	0,000
Hydrochlorothiazide	0,001
Esoméprazole	0,000

La comparaison du spectre d'absorption du rouge de phénol avec les substances actives testées n'a démontré aucune interférence entre 400 et 600 nm. Et seul le rouge de phénol absorbe à la longueur d'onde de 560 nm.

D'après ces résultats, on peut conclure que la méthode est sélective par rapport aux 6 molécules testées.

v. Exactitude :

Le biais relatif de la LIQ et des différents niveaux des échantillons de contrôle qualité des 3 séries des 3 jours est représenté dans le tableau XVII:

Tableau XVII : Biais relatifs moyens des 3 séries des 3 jours.

Jour		Biais relatif moyen (%)			Limites d'acceptation (%)
		Série1	Série 2	Série 3	
Jour 1	LIQ	16,28	13,86	14,96	20,00
	CQI	27,00	28,85	3,70	15,00
	CQM	9,08	0,04	6,55	15,00
	CQS	2,80	2,29	5,96	15,00
Jour 2	LIQ	3,13	4,66	9,83	20,00
	CQI	0,18	13,80	5,84	15,00
	CQM	3,05	0,91	1,55	15,00
	CQS	11,42	1,11	0,12	15,00
Jour 3	LIQ	0,24	2,74	8,47	20,00
	CQI	7,33	19,17	5,65	15,00
	CQM	17,64	14,88	3,91	15,00
	CQS	2,05	10,07	1,24	15,00

Les résultats détaillés sont représentées dans les tableaux 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29 et 30 dans l'annexe D.

Le biais relatif est inférieur à 20% pour la LIQ et inférieur à 15% pour les trois niveaux de contrôle qualité (CQI, CQM et le CQS). Avec plus de 60% des résultats (91%) correspondant aux critères d'acceptations.

D'après ces résultats, les valeurs du biais relatif sont inférieures aux limites d'acceptation donc la méthode est exacte sur le domaine 6µg/ml- 30µg/ml.

vi. Fidélité :

➤ **Répétabilité :**

Le coefficient de variation moyen de la LIQ et des différents niveaux de control qualité des 3 séries des 3 jours est représenté dans le tableau XVIII :

Tableau XVIII : Coefficient de variation moyen des 3 séries des 3 jours pour l'étude de la répétabilité.

Jour		Coefficient de Variation (%)			Limites d'acceptation (%)
		Série 1	Série 2	Série 3	
Jour 1	LIQ	1,63	1,79	2,05	20,00
	CQI	1,08	0,44	0,00	15,00
	CQM	1,14	0,76	0,28	15,00
	CQS	0,37	0,25	0,16	15,00
Jour 2	LIQ	0,63	0,55	0,00	20,00
	CQI	0,97	2,94	0,00	15,00
	CQM	0,31	0,31	0,86	15,00
	CQS	0,00	0,18	0,26	15,00
Jour 3	LIQ	0,84	0,82	0,85	20,00
	CQI	0,93	0,00	1,29	15,00
	CQM	0,21	0,00	0,33	15,00
	CQS	0,00	0,59	0,26	15,00

Les résultats détaillés sont représentées dans les tableaux 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38 et 39 dans l'annexe E.

Le CV est inférieur à 20% pour la LIQ et inférieur à 15% pour les trois niveaux de contrôle qualité (CQI, CQM et le CQS). Avec plus de 60% des résultats (100%) correspondant aux critères.

D'après ces résultats on conclut que la méthode est répétable dans le domaine 6-30µg/ml.

➤ **Fidélité intermédiaire :**

Le coefficient de variation moyen de la LIQ et des différents niveaux de contrôle qualité des 3 jours pour les 3 séries est représenté dans le tableau XIX :

Tableau XIX : Coefficient de variation moyen des 3 jours pour les 3 séries pour l'étude de la fidélité intermédiaire.

		CV (%)			Limites d'acceptation (%)
		Série 1	Série 2	Série 3	
LIQ	J1	7,7	8,89	13,79	15,00
	J2				
	J3				
CQI	J1	12,61	6,32	6,22	20,00
	J2				
	J3				
CQM	J1	9,64	8,46	2,61	20,00
	J2				
	J3				
CQS	J1	7,83	6,98	3,28	20,00
	J2				
	J3				

Les résultats détaillés sont représentés dans les tableaux 40, 41 et 42 dans l'annexe E.

Le CV est inférieur à 20% pour la LIQ et inférieur à 15% pour les trois niveaux de contrôle qualité (CQI, CQM et le CQS). Avec plus de 60% des résultats (100%) correspondant aux critères.

D'après ces résultats on conclut que la méthode est fidèle dans le domaine 6 µg/ml - 30µg/ml.

vii. Stabilité :

➤ **Stabilité de congélation/ décongélation :**

Le biais relatif des échantillons de contrôle qualité inférieurs et supérieurs des 3 séries de l'étude de la stabilité de congélation/décongélation est représenté dans le tableau XX :

Tableau XX : Biais relatif des trois séries pour l'étude de la stabilité de congélation/décongélation.

CQ	Biais relatif (%)			Limite d'acceptation (%)
	Série 1	Série 2	Série 3	
CQI	27,52	33,87	51,72	15,00
CQS	51,47	29,45	44,13	

Les résultats détaillés sont représentées dans les tableaux 43, 44 et 45 dans l'annexe F.

Le CV est supérieur à 15% pour les niveaux supérieur et inférieur de contrôle qualité.

D'après ces résultats, on conclut que les échantillons ne sont plus stables après trois cycles de congélation et de décongélation.

➤ **Stabilité à court terme :**

Le biais relatif des échantillons de contrôle qualité inférieur et supérieur des 3 séries préparées pour la stabilité à court terme est représenté dans le tableau XXI :

Tableau XXI : Biais relatif des trois séries pour l'étude de la stabilité à court terme.

CQ	Biais relatif (%)			Limite d'acceptation (%)
	Série 1	Série 2	Série 3	
CQI	57,45	65,15	68,41	15,00
CQS	62,90	48,87	55,35	

Les résultats détaillés sont représentées dans les tableaux 49, 50 et 51 dans l'annexe F.

Le CV est supérieur à 15% pour les niveaux supérieur et inférieur de contrôle qualité.

D'après ces résultats, on conclut que les échantillons ne sont pas stables après une période de décongélation de 24 heures sur paillasse.

➤ **Stabilité à l'abri de la lumière :**

Le biais relatif des échantillons de contrôle qualité inférieur et supérieur des 3 séries préparées à l'abri de la lumière est représenté dans le tableau XXII :

Tableau XXII : biais relatif des trois séries pour l'étude de la stabilité à l'abri de la lumière.

CQ	Biais relatif (%)			Limite d'acceptation (%)
	Série 1	Série 2	Série 3	
CQI	55,73	5,03	54,45	15,00
CQS	65,23	52,04	46,44	

Les résultats détaillés sont représentées dans les tableaux 46, 47 et 48 dans l'annexe F.

Le CV est supérieur à 15% pour les niveaux supérieur et inférieur de contrôle qualité.

D'après ces résultats, on conclut que les échantillons ne sont pas stables à température ambiante après 24 h même à l'abri de la lumière.

➤ **Stabilité à long terme :**

Le biais relatif des échantillons de contrôle qualité inférieur et supérieur des 3 séries préparées pour la stabilité à long terme est représenté dans le tableau XXIII :

Tableau XXIII : Biais relatif des trois séries pour l'étude de la stabilité à long terme.

CQ	Biais relatif (%)			Limite d'acceptation (%)
	Série 1	Série 2	Série 3	
CQI	95,98	94,68	100,77	15,00
CQS	98,82	96,39	100,53	

Les résultats détaillés sont représentées dans les tableaux 52, 53 et 54 dans l'annexe F.

Le CV est supérieur à 15% pour les niveaux supérieur et inférieur de contrôle qualité.

D'après ces résultats, on conclut que les échantillons ne sont pas stables après une période de conservation d'un mois à - 20 °C.

VI. Discussion :

La méthode à valider lors de notre travail est la méthode de dosage colorimétrique à 560 nm du rouge de phénol dans le perfusât intestinal de rat.

La technique s'est avérée linéaire sur le domaine 6-30 µg/ml, car le coefficient de corrélation entre les valeurs attendues et les valeurs obtenues est de 0.99, et le biais relatif des 6 standards (de 0,01 à 14,96%) est inférieur aux limites d'acceptation.

Des études précédentes avec une méthode chromatographique avaient fourni des résultats à peu près similaires. L'étude de Rajesh et al réalisée en 2007 par une méthode HPLC avait démontrée également une excellente linéarité de la technique sur le domaine 2-200µg/ml, ce dernier est beaucoup plus large que celui déterminé par notre étude car la méthode de dosage chromatographique est beaucoup plus sensible et plus développée que la méthode colorimétrique. Mais la méthode colorimétrique reste plus accessible et plus facile à réaliser.

La méthode s'est avérée spécifique en présence des composants de la matrice, car les valeurs du coefficient de variation calculées sont inférieures aux limites d'acceptation.

La sélectivité de la méthode a été aussi déterminée en présence de six autres substances actives. Cependant, ce paramètre doit être révérifié à chaque fois que le rouge de phénol soit amené à être utilisé en présence d'autres substances actives lors de l'étude de la perméabilité intestinale.

Dans l'étude de Rajesh et al, la sélectivité et la spécificité a été estimée par une détermination de la résolution chromatographique et la méthode s'est avérée spécifique et sélective.

La méthode s'est avérée exacte étant donné que les biais des échantillons de CQ des différents niveaux sont compris dans un intervalle inférieur aux limites d'acceptation.

Pour la fidélité, deux paramètres, la répétabilité (fidélité intra-série) et la fidélité intermédiaire (fidélité entre les jours) ont été étudiés.

La méthode s'est avérée bien répétable étant donné que le CV de la LIQ et des CQ inférieur, moyen et supérieur est inférieur aux limites d'acceptation.

Dans l'étude de Rajesh et al, des résultats similaires ont été trouvés et la méthode par HPLC s'est avérée exacte et fidèle.

Pour la stabilité, les 3 cycles de congélation/ décongélation, la conservation à température ambiante, à l'abri de la lumière et pendant un mois ont affecté les concentrations du rouge de phénol dans les échantillons de contrôle qualité inférieur et supérieur.

Pour la stabilité de congélation/décongélation, le CV varie de 27,52 à 51,72% pour le CQI et de 29,45 à 51,47% pour les CQS, qui sont largement supérieurs aux limites d'acceptation.

L'étude de Rajesh et al réalisée par HPLC pour 5 cycles de congélation / décongélation a fourni des résultats contraire à notre étude avec un CV inférieur aux limites d'acceptation pour les échantillons de contrôle qualité inférieur et supérieur.

Pour la stabilité sur paillasse ou à l'abri de la lumière, le CV des CQI et CQS est aussi supérieur aux limites d'acceptation, contrairement aux résultats trouvés dans l'étude de Rajesh et al.

Pour la stabilité à long terme, le CV varie de 95 à 100% pour le CQI et de 98 à 100% pour le CQS, ce qui prouve que la solution de rouge de phénol a été complètement dégradée, alors que dans l'étude de Rajesh et al la solution est restée stable après 1 mois de conservation à -20°C .

Il est à signaler que la dégradation du rouge de phénol lors des différents essais de stabilité peut être due à l'ajout du NaOH et l'eau distillée avant la conservation. Car dans l'étude de Rajesh et al les échantillons ont été conservés avant tout traitement, ce qui est plus juste et qui reproduit le traitement des échantillons lors d'une étude de la perméabilité intestinale.

Donc, il est important de vérifier la stabilité du rouge de phénol à court terme, long terme, à l'abri de la lumière et après congélation/ décongélation sans traitement des échantillons par le NaOH avant la mise en stabilité.

Conclusion :

L'équivalence thérapeutique entre un médicament générique et un princeps peut être étudiée par des essais in vivo ou bien par des essais in vitro. Les essais in vitro permettent de comparer les profils de dissolution des médicaments administrés par voie orale.

L'utilisation des profils de dissolution est basée entre autres sur le système de classification biopharmaceutique. Ce système classe les molécules selon leur solubilité et leur perméabilité intestinale.

L'étude de la perméabilité intestinale peut se faire avec la méthode in situ chez le rat, cette méthode nécessite le dosage des médicaments dans le perfusât intestinal de rat.

Le dosage des médicaments dans le perfusât intestinal est associé au dosage du rouge de phénol qui est un biomarqueur. Le dosage du rouge de phénol va donc nous permettre de corriger la concentration des médicaments dosés dans le perfusât intestinal chez le rat.

Notre étude expérimentale a permis de valider partiellement la méthode colorimétrique de dosage du rouge de phénol dans le perfusât intestinal de rat.

La technique s'est avérée, linéaire, spécifique, sélective, exacte et fidèle.

D'autre part, nous avons pu étudier l'effet des conditions de conservation sur les concentrations de rouge de phénol dans les échantillons, ce qui nous a permis de conclure que la conservation des solutions de rouge de phénol doit se faire sans l'ajout de NaOH.

Donc, cette méthode est fiable et peut être utilisée lors des études de la perméabilité intestinale chez le rat sous réserve de déterminer les conditions de conservation des échantillons.

Références Bibliographiques

Ouvrages :

1. Amidon G.L., Lennernas H., Shah V.P., Crison J.R.: a theoretical basis for a biopharmaceutical drug classification: the correlation of in vitro drug product dissolution and in vivo bioavailability. *Pharm. Res.*, 12(3): 413-420.
2. Carsten Ehrhardt Kwang-Jin Kim, 2008: Drug Absorption Studies In Situ, In Vitro and In Silico Models.
3. Kirschstein, R. L., «Toxicology and Carcinogenicity of Preservatives used in the Preparation of Biological Products » *Developments in Biological Standardization*. Vol. 24, p. 203-212. (1973). [AP-028059].
4. LE FERREC E., CHESNE C., ARTUSSON P., BRAYDEN D., FABRE G., GIRES P., GUILLOU F., ROUSSET M., RUBAS W., SCARINO M.L. : In Vitro Models of the Intestinal Barrier, The report and recommendations of ECVAM Workshop. *ATLA*, 2001, 29, 649-668.
5. Poelma FGJ and Tukker JJ (1987) Evaluation of a Chronically Isolated Internal Loop in the Rat for the Study of Drug Absorption Kinetics. *J Pharm Sci* 76: p433–436.
6. T. F. VANDAMME | Y. RIVAL | J-Y. PABST | C. HEITZ | Editeur : EM INTER / LAVOISIER Initiation à la connaissance du médicament Année : 05/2010, page 103-108.

Articles:

7. L. Z. Benet, The role of BCS (Biopharmaceutics Classification System) and BDDCS (Biopharmaceutics Drug Disposition Classification System) in drug development, *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 102 (2013) 34-42.
8. J. M. Butler, J. B. Dressman, The developability classification system: application of biopharmaceutics concepts to formulation development, *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 99 (2010) 4940-4954.
9. EMA, 2011: Guideline on bioanalytical method validation. European Medicines Agency.

10. FDA, 2001: Guidance for Industry: Bioanalytical Method Validation, Food and Drug Administration, May 2001.
11. Philippe Galez, 2001 : Techniques spectroscopiques d'analyse / Spectrophotométrie UV/visible, université de Savoie.
12. F. Guedira, 2010 : Pr F. Guedira, cours de spectroscopie, Université Mohammed V-Agdal, Rabat, Maroc.
13. Guidance for Industry Waiver of In Vivo Bioavailability and Bioequivalence Studies for Immediate-Release Solid Oral Dosage Forms Based on a Biopharmaceutics Classification System 2013.
14. C. Loichot et M. Grima Faculté de Médecine de Strasbourg, Module de Pharmacologie Générale DCEM1 2005/2006 « Résorption - Absorption » - - Mise à jour : septembre 2004.
15. H. Schedl et al, 1966 : « Use of polyethylene glycol and phenol red as unabsorbed indicators for intestinal absorption studies in man » - HAROLD P. SCHEDL with the technical assistance of DUANE MILLER and DONALD WHITE - From the Gastroenterology Research Laboratory, Department of Medicine, University of Iowa College of Medicine, Iowa City, Iowa, U.S.A-
16. Rajesh et al, 2007: "Simultaneous determination of hydrazinocurcumin and phenol red in samples from rat intestinal permeability studies : HPLC method development and validation ". Rajesh Rathore, Jay Parkash Jain, Amit Srivastava, S.M. Jachak, Neeraj Kumar.
17. SFSTP, 1997 : « Méthodes chromatographiques de dosage dans les milieux biologiques : stratégie de validation. Rapport d'une commission SFSTP ».
18. THIRION Catherine Claire Chantal: Evaluation et développement de modèles expérimentaux de sélection des composés: approches in silico, in vitro, in situ et in vivo de l'absorption intestinale. 75 pages, 2002.
19. Williams, 2003 : Pr Alan Williams, Spectrophotométrie-Colorimétrie, Université de Genève (Sciences II), 2003.

Sites internet :

20. <http://gut.bmj.com/content/7/2/159.citation#related-urls>
21. http://www.who.int/diagnostics_laboratory/quality/control/en/

Liste des Annexes

Annexe A : Données brutes de la partie bioanalytique.

Annexe B : Résultats de la linéarité.

Annexe C : Résultats de la spécificité.

Annexe D : Résultats de l'exactitude.

Annexe E : Résultats de la fidélité.

Annexe F : Résultats de la stabilité.

Annexe A :

Cette annexe regroupe les données brutes de la partie bioanalytique.

Tableau 1 : DO des standards des 3 séries du 1^{er} jour.

Jour 1	Concentration théorique	Série 1	Série 2	Série 3
Standard	[] µg/ml	DO	DO	DO
Std1	3	0,041	0,045	0,039
	3	0,043	0,045	0,039
	3	0,043	0,045	0,039
	3	0,040	0,045	0,035
	3	0,042	0,044	0,038
	3	0,039	0,043	0,039
Std2	6	0,061	0,061	0,069
	6	0,063	0,061	0,068
	6	0,063	0,062	0,068
	6	0,063	0,064	0,066
	6	0,064	0,063	0,070
	6	0,064	0,063	0,069
Std3	9	0,117	0,127	0,122
	9	0,118	0,129	0,123
	9	0,118	0,127	0,123
Std4	12	0,159	0,147	0,154
	12	0,158	0,148	0,158
	12	0,158	0,148	0,156
Std5	18	0,233	0,217	0,265
	18	0,235	0,220	0,265
	18	0,233	0,219	0,265
Std6	24	0,302	0,295	0,299
	24	0,301	0,296	0,299
	24	0,301	0,298	0,300
Std7	30	0,380	0,382	0,390
	30	0,385	0,385	0,391
	30	0,382	0,385	0,391

Tableau 2 : DO des échantillons de CQ des 3 séries du 1^{er} jour.

Jour 1	Concentration théorique	Série 1	Série 2	Série 3
CQ	[] µg/ml	DO	DO	DO
CQI	7,5	0,120	0,119	0,096
	7,5	0,118	0,119	0,096
	7,5	0,121	0,119	0,096
	7,5	0,118	0,118	0,096
	7,5	0,120	0,118	0,096
	7,5	0,118	0,118	0,096
CQM	15	0,204	0,188	0,185
	15	0,205	0,185	0,184
	15	0,209	0,185	0,184
	15	0,210	0,188	0,185
	15	0,209	0,188	0,185
	15	0,208	0,187	0,185
CQS	25,5	0,318	0,328	0,314
	25,5	0,317	0,328	0,315
	25,5	0,315	0,330	0,315
	25,5	0,317	0,328	0,315
	25,5	0,315	0,328	0,315
	25,5	0,316	0,329	0,314

Tableau 3 : DO des standards des 3 séries du 2^{ème} jour.

Jour 2	Concentration théorique	Série 1	Série 2	Série 3
Standard	[] µg/ml	DO	DO	DO
Std1	3	0,028	0,039	0,033
	3	0,028	0,039	0,033
	3	0,029	0,040	0,033
	3	0,031	0,040	0,034
	3	0,031	0,039	0,034
	3	0,032	0,039	0,034
Std2	6	0,072	0,072	0,074
	6	0,072	0,072	0,074
	6	0,072	0,072	0,074
	6	0,072	0,072	0,074
	6	0,071	0,072	0,074
	6	0,072	0,073	0,074
Std3	9	0,108	0,105	0,101
	9	0,109	0,105	0,101
	9	0,109	0,109	0,102
Std4	12	0,139	0,135	0,129
	12	0,138	0,136	0,130
	12	0,137	0,137	0,130
Std5	18	0,213	0,192	0,187
	18	0,213	0,193	0,190
	18	0,213	0,193	0,190
Std6	24	0,278	0,297	0,277
	24	0,278	0,298	0,278
	24	0,278	0,302	0,278
Std7	30	0,338	0,344	0,334
	30	0,337	0,344	0,334
	30	0,337	0,344	0,335

Tableau 4 : DO des échantillons de CQ des 3 séries du 2^{ème} jour.

Jour 2	Concentration théorique	Série 1	Série 2	Série 3
CQ	[] µg/ml	DO	DO	DO
CQI	7,5	0,090	0,095	0,089
	7,5	0,090	0,096	0,089
	7,5	0,090	0,096	0,089
	7,5	0,091	0,101	0,089
	7,5	0,091	0,101	0,089
	7,5	0,092	0,101	0,089
CQM	15	0,169	0,173	0,164
	15	0,169	0,173	0,165
	15	0,169	0,173	0,165
	15	0,169	0,172	0,166
	15	0,170	0,172	0,167
	15	0,170	0,172	0,163
CQS	25,5	0,324	0,300	0,284
	25,5	0,324	0,301	0,284
	25,5	0,324	0,301	0,285
	25,5	0,324	0,300	0,285
	25,5	0,324	0,301	0,285
	25,5	0,324	0,300	0,286

Tableau 5 : DO des standards des 3 séries du 3^{ème} jour.

Jour 3	Concentration théorique	Série 1	Série 2	Série 3
Standard	[] µg/ml	DO	DO	DO
Std1	3	0,031	0,044	0,048
	3	0,030	0,044	0,048
	3	0,031	0,044	0,048
	3	0,031	0,044	0,050
	3	0,031	0,046	0,050
	3	0,029	0,046	0,050
Std2	6	0,074	0,083	0,080
	6	0,073	0,084	0,081
	6	0,073	0,084	0,081
	6	0,073	0,083	0,081
	6	0,074	0,083	0,081
	6	0,074	0,083	0,082
Std3	9	0,106	0,120	0,102
	9	0,106	0,120	0,102
	9	0,106	0,120	0,102
Std4	12	0,143	0,153	0,158
	12	0,143	0,153	0,158
	12	0,143	0,154	0,159
Std5	18	0,208	0,217	0,202
	18	0,208	0,219	0,202
	18	0,208	0,218	0,202
Std6	24	0,248	0,264	0,263
	24	0,248	0,264	0,263
	24	0,249	0,264	0,264
Std7	30	0,348	0,355	0,366
	30	0,347	0,355	0,366
	30	0,347	0,357	0,366

Tableau 6 : DO des échantillons de CQ des 3 séries du 3^{ème} jour.

Jour 3	Concentration théorique	Série 1	Série 2	Série 3
CQ	[] µg/ml	DO	DO	DO
CQI	7,5	0,095	0,117	0,086
	7,5	0,095	0,117	0,087
	7,5	0,095	0,117	0,087
	7,5	0,096	0,117	0,088
	7,5	0,096	0,117	0,088
	7,5	0,097	0,117	0,089
CQM	15	0,200	0,207	0,171
	15	0,200	0,207	0,171
	15	0,200	0,207	0,172
	15	0,200	0,207	0,172
	15	0,200	0,207	0,172
	15	0,201	0,207	0,171
CQS	25,5	0,280	0,267	0,294
	25,5	0,280	0,267	0,294
	25,5	0,280	0,269	0,295
	25,5	0,280	0,270	0,295
	25,5	0,280	0,270	0,295
	25,5	0,280	0,270	0,296

Tableau 7 : DO des échantillons de CQ pour l'étude de la stabilité à court terme.

	Concentration théorique	Série 1	Série 2	Série 3
CQ	[] µg/ml	DO	DO	DO
CQI	7,5	0,037	0,029	0,032
	7,5	0,038	0,028	0,033
	7,5	0,037	0,028	0,033
CQS	25,5	0,118	0,163	0,152
	25,5	0,119	0,161	0,149
	25,5	0,118	0,161	0,150

Tableau 8 : DO des échantillons de CQ pour l'étude de la stabilité à l'abri de la lumière.

	Concentration théorique	Série 1	Série 2	Série 3
CQ	[] µg/ml	DO	DO	DO
CQI	7,5	0,039	0,086	0,047
	7,5	0,038	0,086	0,046
	7,5	0,040	0,086	0,046
CQS	25,5	0,108	0,150	0,181
	25,5	0,112	0,152	0,180
	25,5	0,112	0,152	0,179

Tableau 9 : DO des échantillons de CQ pour l'étude de la stabilité de congélation/décongélation.

	Concentration théorique	Série 1	Série 2	Série 3
CQ	[] µg/ml	DO	DO	DO
CQI	7,5	0,065	0,057	0,049
	7,5	0,068	0,059	0,049
	7,5	0,066	0,059	0,049
CQS	25,5	0,155	0,225	0,188
	25,5	0,156	0,225	0,188
	25,5	0,157	0,225	0,187

Tableau 10 : DO des échantillons de CQ pour l'étude de la stabilité à long terme.

	Concentration théorique	Série 1	Série 2	Série 3
CQ	[] µg/ml	DO	DO	DO
CQI	7,5	0,000	0,000	0,001
	7,5	0,000	0,000	0,001
	7,5	0,000	0,000	0,001
CQS	25,5	0,000	0,000	0,000
	25,5	0,000	0,000	0,000
	25,5	0,000	0,000	0,000

Annexe B :

Cette annexe regroupe les tableaux des résultats de l'étude de la linéarité des trois séries des trois jours avec les courbes d'étalonnage.

Tableau 11 : Résultats de la linéarité de la série 1 (J₁).

Standard	Concentration théorique (µg/ml)	DO	Concentration estimée (µg/ml)	Biais relatif (%)	Limites d'acceptation (%)
LIQ	6	0,061	5,023	16,27	20,00
	6	0,063	5,178	13,69	
	6	0,063	5,178	13,69	
Std 3	9	0,117	9,357	3,97	15,00
	9	0,118	9,434	4,83	
	9	0,118	9,434	4,83	
Std 4	12	0,159	12,608	5,06	15,00
	12	0,158	12,530	4,42	
	12	0,158	12,530	4,42	
Std 5	18	0,233	18,335	1,86	15,00
	18	0,235	18,490	2,72	
	18	0,233	18,335	1,86	
Std 6	24	0,302	23,676	1,34	15,00
	24	0,301	23,599	1,67	
	24	0,301	23,599	1,67	
Std 7	30	0,380	29,713	0,95	15,00
	30	0,385	30,100	0,33	
	30	0,382	29,868	0,43	

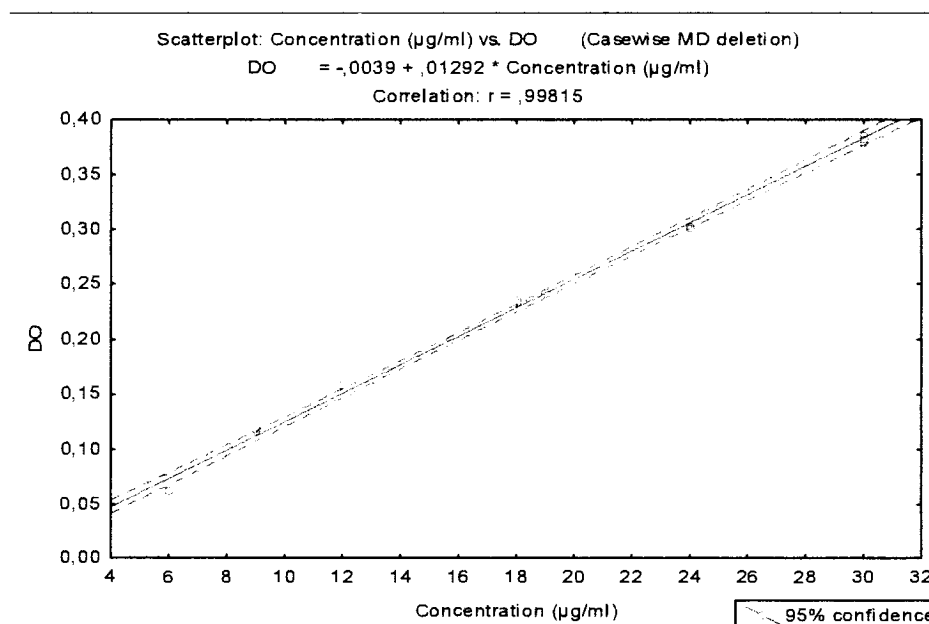
**Figure (a) : Courbe d'étalonnage de la série 1 du 1^{er} jour.**

Tableau 12 : Résultats de la linéarité de la série 2 (J₁).

Standard	Concentration théorique (µg/ml)	DO	Concentration estimée (µg/ml)	Biais relatif (%)	Limites d'acceptation (%)
LIQ	6	0,061	5,168	13,86	20,00
	6	0,061	5,168	13,86	
	6	0,062	5,246	12,56	
Std 3	9	0,127	10,328	14,75	15,00
	9	0,129	10,484	16,49	
	9	0,127	10,328	14,75	
Std 4	12	0,147	11,892	0,89	15,00
	12	0,148	11,970	0,24	
	12	0,148	11,970	0,24	
Std 5	18	0,217	17,365	3,52	15,00
	18	0,22	17,599	2,22	
	18	0,219	17,521	2,65	
Std 6	24	0,295	23,463	2,23	15,00
	24	0,296	23,541	1,90	
	24	0,298	23,698	1,25	
Std 7	30	0,382	30,265	0,88	15,00
	30	0,385	30,500	1,66	
	30	0,385	30,500	1,66	

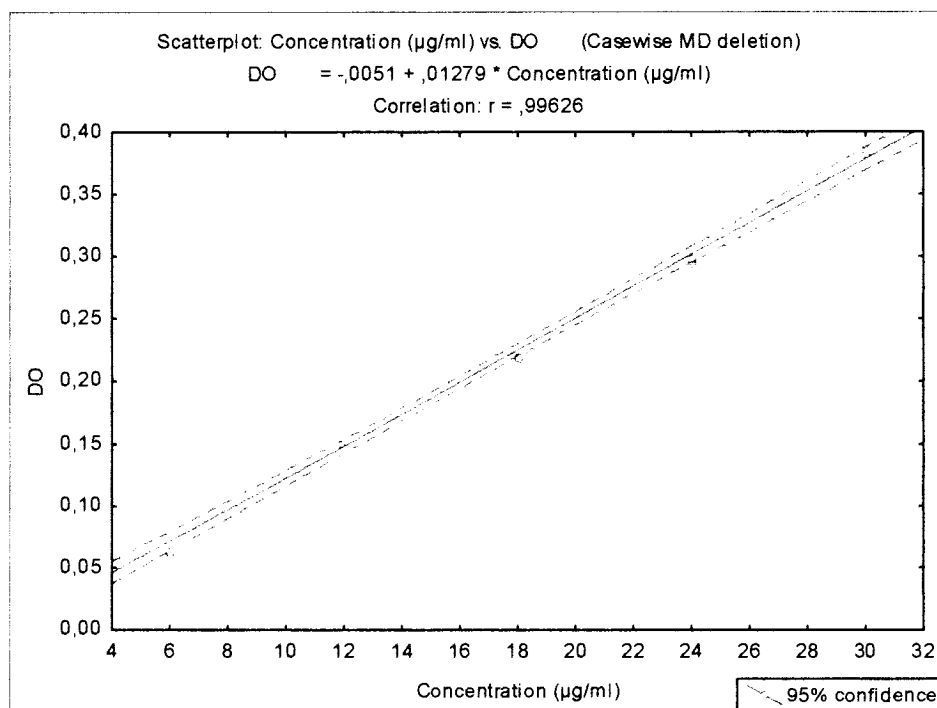
Figure (b) : Courbe d'étalonnage de la série 2 du 1^{er} jour.

Tableau 13 : Résultats de la linéarité de la série 3 (J₁).

Standard	Concentration théorique (µg/ml)	DO	Concentration estimée (µg/ml)	Biais relatif (%)	Limites d'acceptation (%)
LIQ	6	0,069	5,153	14,11	20,00
	6	0,068	5,076	15,38	
	6	0,068	5,076	15,38	
Std 3	9	0,122	9,214	2,38	15,00
	9	0,123	9,291	3,23	
	9	0,123	9,291	3,23	
Std 4	12	0,154	11,666	2,77	15,00
	12	0,158	11,973	0,22	
	12	0,156	11,819	1,50	
Std 5	18	0,265	20,172	12,00	15,00
	18	0,265	20,172	12,06	
	18	0,265	20,172	12,06	
Std 6	24	0,299	22,777	5,09	15,00
	24	0,299	22,777	5,09	
	24	0,3	22,854	4,77	
Std 7	30	0,39	29,750	0,83	15,00
	30	0,391	29,827	0,57	
	30	0,391	29,827	0,57	

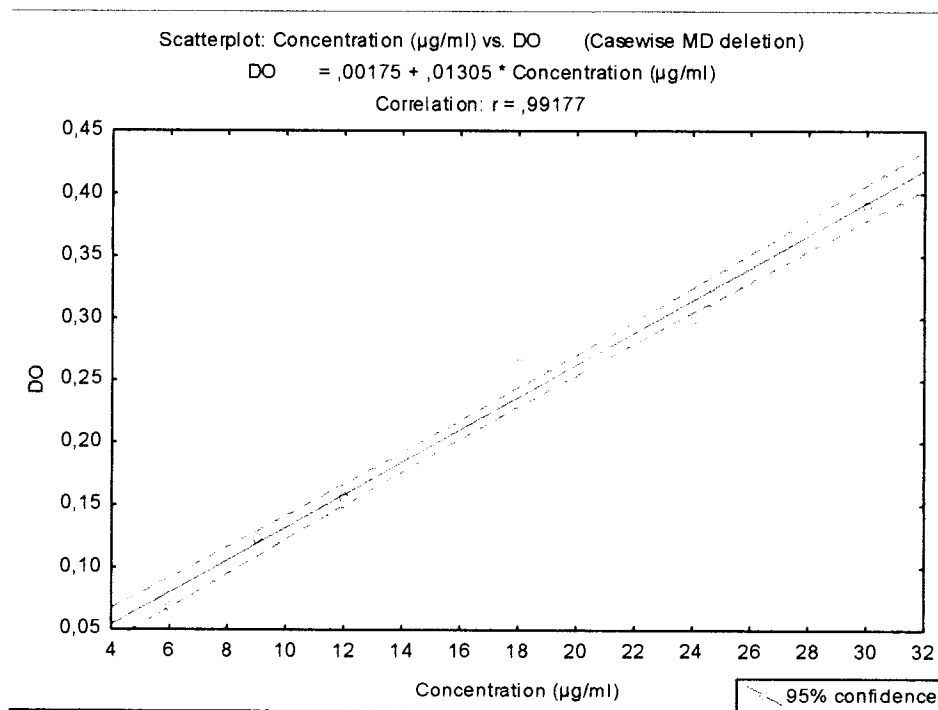
Figure (c) : Courbe d'étalonnage de la série 3 du 1^{er} jour.

Tableau 14 : Résultats de la linéarité de la série 1 (J₂).

Standard	Concentration théorique (µg/ml)	DO	Concentration estimée (µg/ml)	Biais relatif (%)	Limites d'acceptation (%)
LIQ	6	0,072	5,811	3,13	20,00
	6	0,072	5,811	3,13	
	6	0,072	5,811	3,13	
Std 3	9	0,108	9,04	0,44	15,00
	9	0,109	9,130	1,44	
	9	0,109	9,130	1,44	
Std 4	12	0,139	11,820	1,49	15,00
	12	0,138	11,730	2,24	
	12	0,137	11,641	2,98	
Std 5	18	0,213	18,457	2,54	15,00
	18	0,213	18,457	2,54	
	18	0,213	18,457	2,54	
Std 6	24	0,278	24,286	1,19	15,00
	24	0,278	24,286	1,19	
	24	0,278	24,286	1,19	
Std 7	30	0,338	29,668	1,10	15,00
	30	0,337	29,578	1,40	
	30	0,337	29,578	1,40	

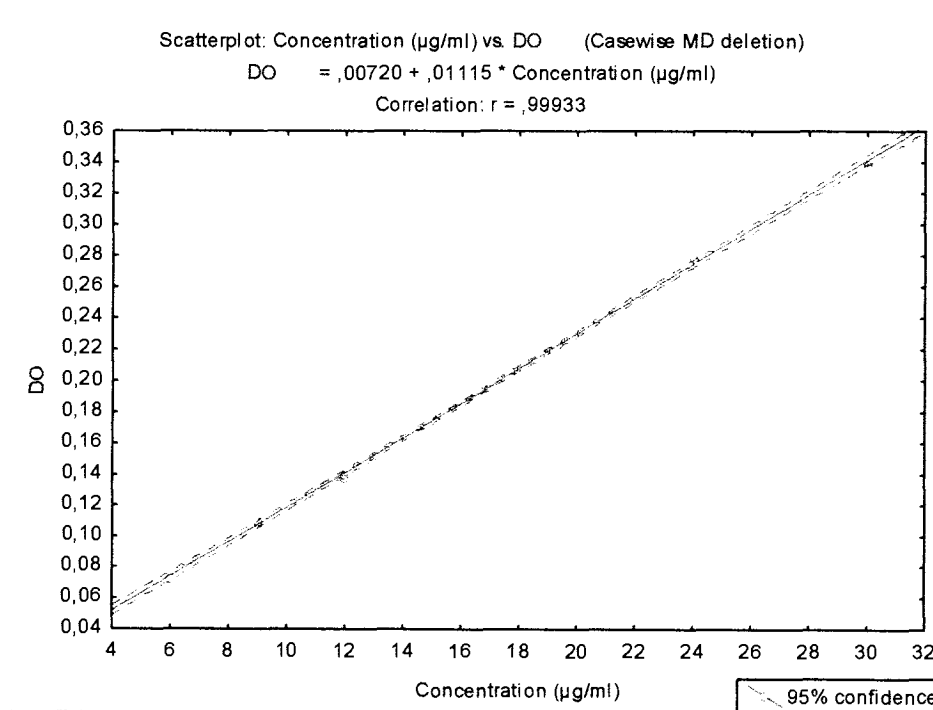
Figure (d) : Courbe d'étalonnage de la série 1 du 2^{ème} jour.

Tableau 15 : Résultats de la linéarité de la série 2 (J₂).

Standard	Concentration théorique (µg/ml)	DO	Concentration estimée (µg/ml)	Biais relatif (%)	Limites d'acceptation (%)
LIQ	6	0,072	6,288	4,80	20,00
	6	0,072	6,288	4,80	
	6	0,072	6,288	4,80	
Std 3	9	0,105	9,104	1,15	15,00
	9	0,105	9,104	1,15	
	9	0,109	9,445	4,94	
Std 4	12	0,135	11,663	2,80	15,00
	12	0,136	11,749	2,09	
	12	0,137	11,831	1,37	
Std 5	18	0,192	16,527	8,18	15,00
	18	0,193	16,612	7,70	
	18	0,193	16,612	7,70	
Std 6	24	0,297	25,486	6,19	15,00
	24	0,298	25,571	6,54	
	24	0,302	25,912	7,97	
Std 7	30	0,344	29,496	1,67	15,00
	30	0,344	29,496	1,67	
	30	0,344	29,496	1,67	

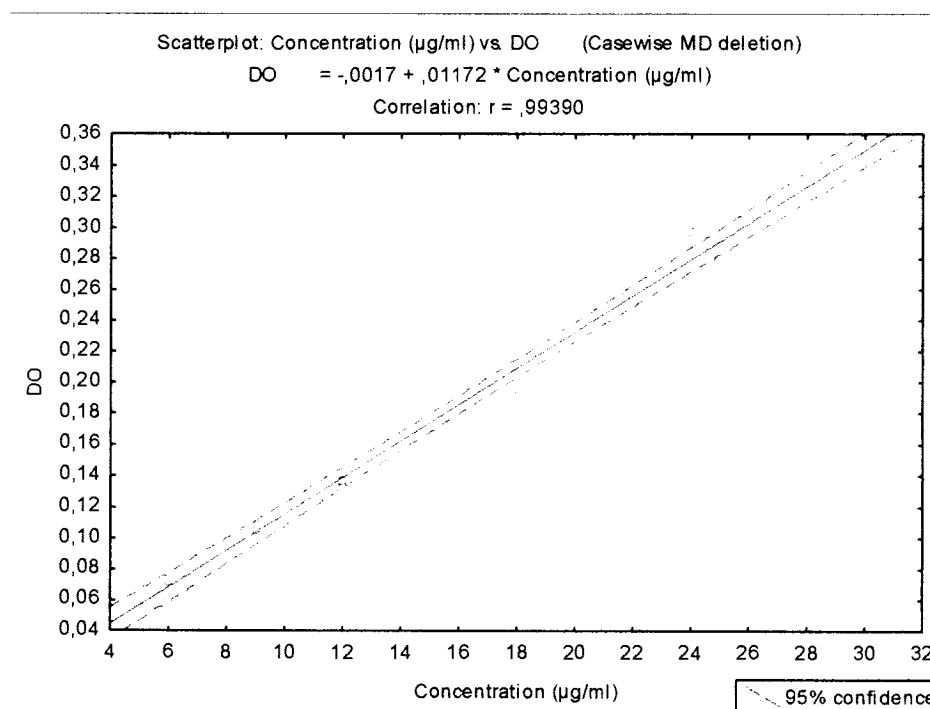
Figure (e) : Courbe d'étalonnage de la série 2 du 2^{ème} jour.

Tableau 16 : Résultats de la linéarité de la série 3 (J₂).

Standard	Concentration théorique (µg/ml)	DO	Concentration estimée (µg/ml)	Biais relatif (%)	Limites d'acceptation (%)
LIQ	6	0,074	6,590	9,83	20,00
	6	0,074	6,590	9,83	
	6	0,074	6,590	9,83	
Std 3	9	0,101	9,016	0,17	15,00
	9	0,101	9,016	0,17	
	9	0,102	9,106	1,17	
Std 4	12	0,129	11,531	3,90	15,00
	12	0,13	11,621	3,15	
	12	0,13	11,621	3,15	
Std 5	18	0,187	16,743	6,98	15,00
	18	0,19	17,012	5,48	
	18	0,19	17,01	5,48	
Std 6	24	0,277	24,829	3,45	15,00
	24	0,278	24,919	3,82	
	24	0,278	24,919	3,82	
Std 7	30	0,334	29,950	0,16	15,00
	30	0,334	29,950	0,16	
	30	0,335	30,0404	0,13	

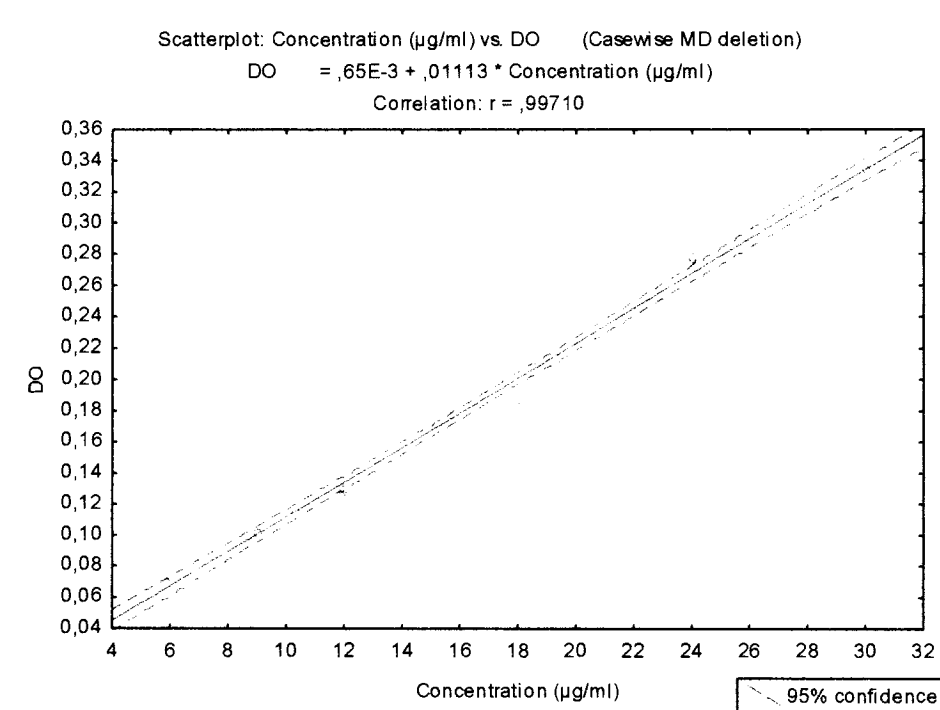
Figure (f) : Courbe d'étalonnage de la série 3 du 2^{ème} jour.

Tableau 17: Résultats de la linéarité de la série 1 (J₃).

Standard	Concentration théorique (µg/ml)	DO	Concentration estimée (µg/ml)	Biais relatif (%)	Limites d'acceptation (%)
LIQ	6	0,074	6,060	1,01	20,00
	6	0,073	5,968	0,52	
	6	0,073	5,968	0,52	
Std 3	9	0,106	8,999	0,01	15,00
	9	0,106	8,999	0,01	
	9	0,106	8,999	0,01	
Std 4	12	0,143	12,396	3,30	15,00
	12	0,143	12,396	3,30	
	12	0,143	12,396	3,30	
Std 5	18	0,208	18,365	2,03	15,00
	18	0,208	18,365	2,03	
	18	0,208	18,365	2,03	
Std 6	24	0,248	22,038	8,17	15,00
	24	0,248	22,038	8,17	
	24	0,249	22,130	7,79	
Std 7	30	0,348	31,221	4,07	15,00
	30	0,347	31,129	3,76	
	30	0,347	31,129	3,76	

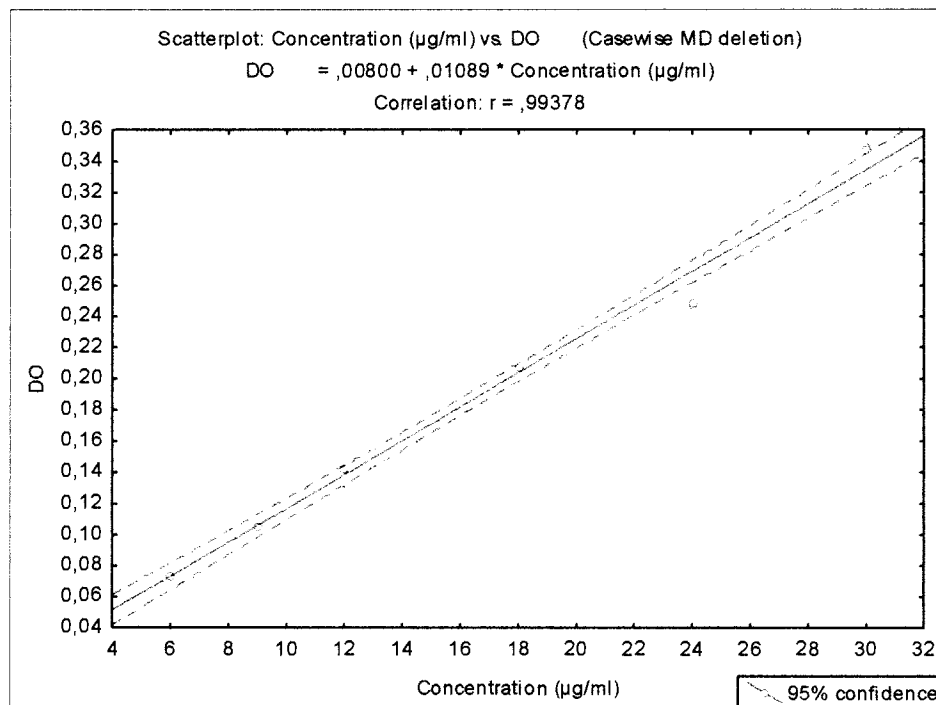
Figure (g) : Courbe d'étalonnage de la série 1 du 3^{ème} jour.

Tableau 18: Résultats de la linéarité de la série 2 (J₃).

Standard	Concentration théorique (µg/ml)	DO	Concentration estimée (µg/ml)	Déviaton (%)	Limites d'acceptation (%)
LIQ	6	0,083	5,804	3,25	20,00
	6	0,084	5,896	1,72	
	6	0,084	5,896	1,72	
Std 3	9	0,12	9,214	2,38	15,00
	9	0,12	9,214	2,38	
	9	0,12	9,214	2,38	
Std 4	12	0,153	12,256	2,13	15,00
	12	0,153	12,256	2,13	
	12	0,154	12,348	2,90	
Std 5	18	0,217	18,154	0,86	15,00
	18	0,219	18,339	1,88	
	18	0,218	18,247	1,37	
Std 6	24	0,264	22,486	6,30	15,00
	24	0,264	22,486	6,30	
	24	0,264	22,486	6,30	
Std 7	30	0,355	30,873	2,91	15,00
	30	0,355	30,873	2,91	
	30	0,357	31,058	3,52	

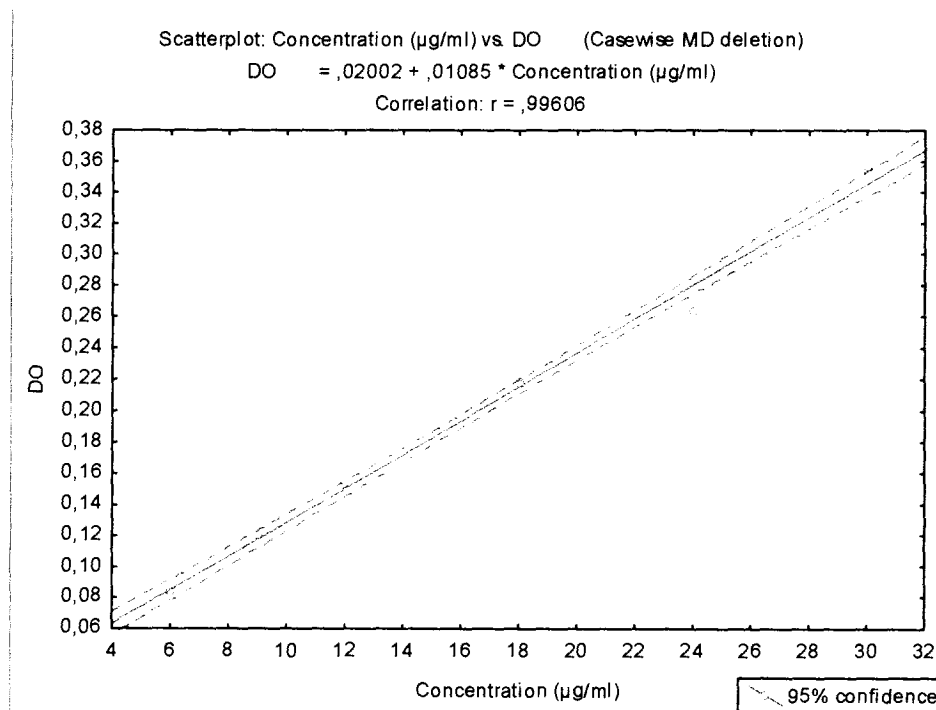
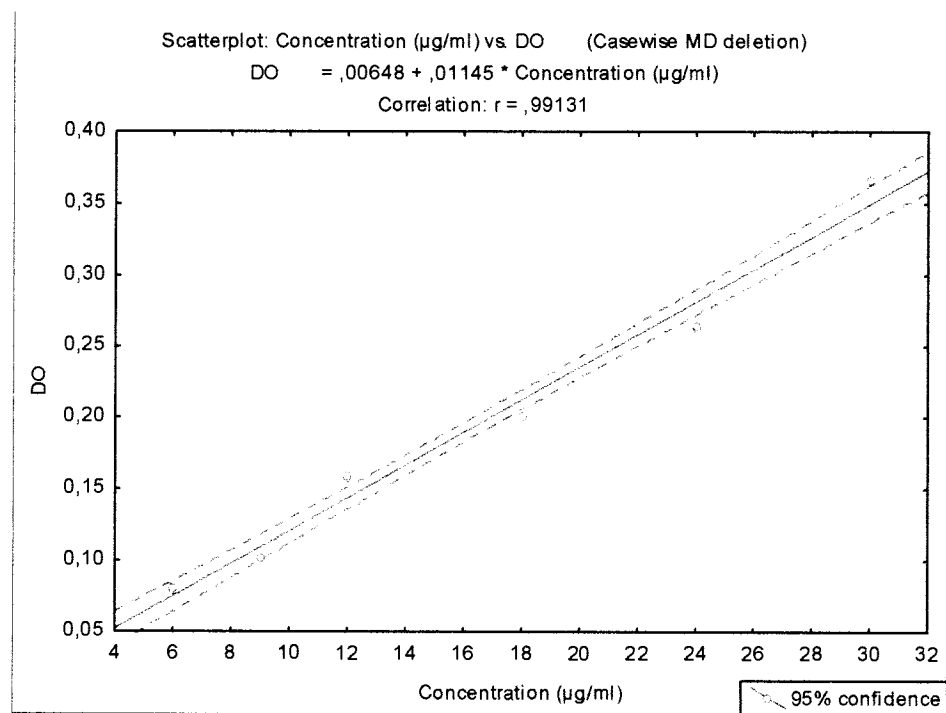
Figure (h) : Courbe d'étalonnage de la série 2 du 3^{ème} jour.

Tableau 19: Résultats de la linéarité de la série 3 (J₃).

Standard	Concentration théorique (µg/ml)	DO	Concentration estimée (µg/ml)	Biais relatif (%)	Limites d'acceptation (%)
LIQ	6	0,08	6,420	7,01	20,00
	6	0,081	6,508	8,47	
	6	0,081	6,502	8,47	
Std 3	9	0,102	8,342	7,30	15,00
	9	0,102	8,342	7,30	
	9	0,102	8,342	7,30	
Std 4	12	0,158	13,233	10,27	15,00
	12	0,158	13,233	10,27	
	12	0,159	13,320	11,00	
Std 5	18	0,202	17,075	5,13	15,00
	18	0,202	17,075	5,13	
	18	0,202	17,075	5,13	
Std 6	24	0,263	22,403	6,65	15,00
	24	0,263	22,403	6,65	
	24	0,264	22,490	6,28	
Std 7	30	0,366	31,399	4,66	15,00
	30	0,366	31,399	4,66	
	30	0,366	31,399	4,66	

Figure (i) : Courbe d'étalonnage de la série 3 du 3^{ème} jour.

Annexe C :

Cette annexe regroupe les tableaux des résultats de l'étude de la spécificité pour les trois séries au cours du 2^{ème} jour.

Tableau 20: Résultats du coefficient de variation des LIQ (J₂).

Jour 2	Moyenne des DO			Ecart type			Coefficient de Variation (%)			Limites d'acceptation (%)
	Série 1	Série 2	Série 3	Série 1	Série 2	Série 3	Série 1	Série 2	Série 3	
LIQ	0,072	0,072	0,074	0,00	0,00	0,00	0,56	0,56	0,00	20,00

Tableau 21: Résultats de l'interférence du blanc/LIQ (J₂).

Jour 2	Moyenne des DO de la LIQ			Moyenne des blancs			Interférence Blanc/LIQ			Limite d'acceptation (%)
	Série 1	Série 2	Série 3	Série 1	Série 2	Série 3	Série 1	Série 2	Série 3	
	0,072	0,072	0,074	0,006	0,010	0,011	8,35	13,39	14,41	20,00

Annexe D :

Cette annexe regroupe les tableaux des résultats de l'étude de l'exactitude des trois séries des trois jours.

Tableau 22 : Résultats de l'exactitude de la série 1 (J₁).

CQ	Concentration théorique (µg/ml)	DO	Concentration estimée (µg/ml)	Moyenne des concentrations estimées (µg/ml)	Biais relatif (%)	Limites d'acceptation (%)
LIQ	6	0,061	5,023	5,178	13,69	20,00
	6	0,063	5,178			
	6	0,063	5,178			
	6	0,063	5,178			
	6	0,064	5,255			
	6	0,064	5,255			
CQI	7,5	0,12	9,589	9,525	27,00	15,00
	7,5	0,118	9,434			
	7,5	0,121	9,667			
	7,5	0,118	9,434			
	7,5	0,12	9,589			
	7,5	0,118	9,434			
CQM	15	0,204	16,091	16,362	9,08	15,00
	15	0,205	16,168			
	15	0,209	16,478			
	15	0,21	16,555			
	15	0,209	16,478			
	15	0,208	16,400			
CQS	25,5	0,318	24,914	24,785	2,80	15,00
	25,5	0,317	24,837			
	25,5	0,315	24,682			
	25,5	0,317	24,837			
	25,5	0,315	24,682			
	25,5	0,316	24,760			

Tableau 23 : Résultats de l'exactitude de la série2 (J₁).

CQ	Concentration théorique (µg/ml)	DO	Concentration estimée (µg/ml)	Moyenne des concentrations estimées (µg/ml)	Biais relatif (%)	Limites d'acceptation (%)
LIQ	6	0,061	5,168	5,272	12,12	20,00
	6	0,061	5,168			
	6	0,062	5,246			
	6	0,064	5,402			
	6	0,063	5,324			
	6	0,063	5,324			
CQI	7,5	0,119	9,702	9,663	28,85	15,00
	7,5	0,119	9,702			
	7,5	0,119	9,702			
	7,5	0,118	9,624			
	7,5	0,118	9,624			
	7,5	0,118	9,624			
CQM	15	0,188	15,097	15,006	0,04	15,00
	15	0,185	14,863			
	15	0,185	14,863			
	15	0,188	15,097			
	15	0,188	15,097			
	15	0,187	15,019			
CQS	25,5	0,328	26,043	26,082	2,28	15,00
	25,5	0,328	26,043			
	25,5	0,33	26,200			
	25,5	0,328	26,043			
	25,5	0,328	26,043			
	25,5	0,329	26,121			

Tableau 24: Résultats de l'exactitude de la série 3 (J₁).

CQ	Concentration théorique (µg/ml)	DO	Concentration estimée (µg/ml)	Moyenne des concentrations estimées (µg/ml)	Biais relatif (%)	Limites d'acceptation (%)
LIQ	6	0,069	5,153	5,102	14,96	20,00
	6	0,068	5,076			
	6	0,068	5,076			
	6	0,066	4,923			
	6	0,07	5,229			
	6	0,069	5,153			
CQI	7,5	0,096	7,222	7,222	3,70	15,00
	7,5	0,096	7,222			
	7,5	0,096	7,222			
	7,5	0,096	7,222			
	7,5	0,096	7,222			
	7,5	0,096	7,222			
CQM	15	0,185	14,042	14,016	6,55	15,00
	15	0,184	13,965			
	15	0,184	13,965			
	15	0,185	14,042			
	15	0,185	14,042			
	15	0,185	14,042			
CQS	25,5	0,314	23,927	23,978	5,96	15,00
	25,5	0,315	24,003			
	25,5	0,315	24,003			
	25,5	0,315	24,003			
	25,5	0,315	24,003			
	25,5	0,314	23,927			

Tableau 25 : Résultats de l'exactitude de la série 1 (J₂).

CQ	Concentration théorique (µg/ml)	DO	Concentration estimée (µg/ml)	Moyenne des concentrations estimées (µg/ml)	Biais relatif (%)	Limites d'acceptation (%)
LIQ	6	0,072	5,811	5,8116	3,13	20,00
	6	0,072	5,811			
	6	0,072	5,811			
	6	0,072	5,811			
	6	0,071	5,720			
	6	0,072	5,811			
CQI	7,5	0,09	7,426	7,485	0,18	15,00
	7,5	0,09	7,426			
	7,5	0,09	7,426			
	7,5	0,091	7,515			
	7,5	0,091	7,515			
	7,5	0,092	7,605			
CQM	15	0,169	14,511	14,541	3,05	15,00
	15	0,169	14,511			
	15	0,169	14,511			
	15	0,169	14,511			
	15	0,17	14,600			
	15	0,17	14,600			
CQS	25,5	0,324	28,412	28,412	11,42	15,00
	25,5	0,324	28,412			
	25,5	0,324	28,412			
	25,5	0,324	28,412			
	25,5	0,324	28,412			
	25,5	0,324	28,412			

Tableau 26 : Résultats de l'exactitude de la série 2 (J₂).

CQ	Concentration théorique (µg/ml)	DO	Concentration estimée (µg/ml)	Moyenne des concentrations estimées (µg/ml)	Biais relatif (%)	Limites d'acceptation (%)
LIQ	6	0,072	6,288	6,302	4,66	20,00
	6	0,072	6,288			
	6	0,072	6,288			
	6	0,072	6,288			
	6	0,072	6,288			
	6	0,073	6,373			
CQI	7,5	0,095	8,250	8,535	13,80	15,00
	7,5	0,096	8,336			
	7,5	0,096	8,336			
	7,5	0,101	8,762			
	7,5	0,101	8,762			
	7,5	0,101	8,762			
CQM	15	0,173	14,906	14,863	0,91	15,00
	15	0,173	14,906			
	15	0,173	14,906			
	15	0,172	14,820			
	15	0,172	14,820			
	15	0,172	14,820			
CQS	25,5	0,3	25,742	25,784	1,11	15,00
	25,5	0,301	25,827			
	25,5	0,301	25,827			
	25,5	0,3	25,742			
	25,5	0,301	25,827			
	25,5	0,3	25,742			

Tableau 27 : Résultats de l'exactitude de la série 3 (J₂).

CQ	Concentration théorique (µg/ml)	DO	Concentration estimée (µg/ml)	Moyenne des concentrations estimées (µg/ml)	Biais relatif (%)	Limites d'acceptation (%)
LIQ	6	0,074	6,590	6,590	9,83	20,00
	6	0,074	6,590			
	6	0,074	6,590			
	6	0,074	6,590			
	6	0,074	6,590			
	6	0,074	6,590			
CQI	7,5	0,089	7,938	7,938	5,84	15,00
	7,5	0,089	7,938			
	7,5	0,089	7,938			
	7,5	0,089	7,938			
	7,5	0,089	7,938			
	7,5	0,089	7,938			
CQM	15	0,164	14,6765	14,766	1,55	15,00
	15	0,165	14,766			
	15	0,165	14,766			
	15	0,166	14,856			
	15	0,167	14,946			
	15	0,163	14,586			
CQS	25,5	0,284	25,458	25,533	0,12	15,00
	25,5	0,284	25,458			
	25,5	0,285	25,548			
	25,5	0,285	25,548			
	25,5	0,285	25,548			
	25,5	0,286	25,637			

Tableau 28: Résultats de l'exactitude de la série 1 (J₃).

CQ	Concentration théorique (µg/ml)	DO	Concentration estimée (µg/ml)	Moyenne des concentrations estimées (µg/ml)	Biais relatif (%)	Limites d'acceptation (%)
LIQ	6	0,074	6,060	6,014	0,24	20,00
	6	0,073	5,968			
	6	0,073	5,968			
	6	0,073	5,968			
	6	0,074	6,060			
	6	0,074	6,060			
CQI	7,5	0,095	7,988	8,050	7,33	15,00
	7,5	0,095	7,988			
	7,5	0,095	7,988			
	7,5	0,096	8,080			
	7,5	0,096	8,080			
	7,5	0,097	8,1726			
CQM	15	0,2	17,630	17,646	17,64	15,00
	15	0,2	17,630			
	15	0,2	17,630			
	15	0,2	17,630			
	15	0,2	17,630			
	15	0,201	17,722			
CQS	25,5	0,28	24,977	24,977	2,05	15,00
	25,5	0,28	24,977			
	25,5	0,28	24,977			
	25,5	0,28	24,977			
	25,5	0,28	24,977			
	25,5	0,28	24,977			

Tableau 29: Résultats de l'exactitude de la série 2 (J₃).

CQ	Concentration théorique (µg/ml)	DO	Concentration estimée (µg/ml)	Moyenne des concentrations estimées (µg/ml)	Biais relatif (%)	Limites d'acceptation (%)
LIQ	6	0,083	5,804	5,835	2,74	20,00
	6	0,084	5,896			
	6	0,084	5,896			
	6	0,083	5,804			
	6	0,083	5,804			
	6	0,083	5,804			
CQI	7,5	0,117	8,938	8,938	19,17	15,00
	7,5	0,117	8,938			
	7,5	0,117	8,938			
	7,5	0,117	8,938			
	7,5	0,117	8,932			
	7,5	0,117	8,938			
CQM	15	0,207	17,233	17,233	14,88	15,00
	15	0,207	17,233			
	15	0,207	17,233			
	15	0,207	17,233			
	15	0,207	17,233			
	15	0,207	17,233			
CQS	25,5	0,267	22,763	22,932	10,07	15,00
	25,5	0,267	22,763			
	25,5	0,269	22,947			
	25,5	0,27	23,039			
	25,5	0,27	23,039			
	25,5	0,27	23,039			

Tableau 30: Résultats de l'exactitude de la série 3 (J₃).

CQ	Concentration théorique (µg/ml)	DO	Concentration estimée (µg/ml)	Moyenne des concentrations estimées (µg/ml)	Biais relatif (%)	Limites d'acceptation (%)
LIQ	6	0,08	6,420	6,508	8,47	20,00
	6	0,081	6,508			
	6	0,081	6,508			
	6	0,081	6,508			
	6	0,081	6,508			
	6	0,082	6,595			
CQI	7,5	0,086	6,944	7,075	5,65	15,00
	7,5	0,087	7,032			
	7,5	0,087	7,032			
	7,5	0,088	7,119			
	7,5	0,088	7,119			
	7,5	0,089	7,206			
CQM	15	0,171	14,368	14,412	3,91	15,00
	15	0,171	14,368			
	15	0,172	14,455			
	15	0,172	14,455			
	15	0,172	14,455			
	15	0,171	14,368			
CQS	25,5	0,294	25,110	25,183	1,24	15,00
	25,5	0,294	25,110			
	25,5	0,295	25,198			
	25,5	0,295	25,198			
	25,5	0,295	25,198			
	25,5	0,296	25,285			

Annexe E :

Cette annexe regroupe les tableaux des résultats de l'étude de la fidélité des trois séries des trois jours.

- **Résultats de la répétabilité :**

Tableau 31: Résultats de la répétabilité de la série 1 (J₁).

CQ	Concentration théorique (µg/ml)	DO	Concentration estimée (µg/ml)	Moyenne des concentrations estimées (µg/ml)	Ecart type	CV (%)	Limites d'acceptation (%)
LIQ	6	0,061	5,023	5,178	0,08	1,63	20,00
	6	0,063	5,178				
	6	0,063	5,178				
	6	0,063	5,178				
	6	0,064	5,255				
	6	0,064	5,255				
CQI	7,5	0,12	9,589	9,525	0,10	1,08	15,00
	7,5	0,118	9,434				
	7,5	0,121	9,667				
	7,5	0,118	9,434				
	7,5	0,12	9,589				
	7,5	0,118	9,434				
CQM	15	0,204	16,091	16,362	0,18	1,14	15,00
	15	0,205	16,168				
	15	0,209	16,478				
	15	0,21	16,555				
	15	0,209	16,478				
	15	0,208	16,400				
CQS	25,5	0,318	24,914	24,785	0,09	0,37	15,00
	25,5	0,317	24,837				
	25,5	0,315	24,682				
	25,5	0,317	24,837				
	25,5	0,315	24,682				
	25,5	0,316	24,760				

Tableau 32: Résultats de la répétabilité de la série 2 (J₁).

CQ	Concentration théorique (µg/ml)	DO	Concentration estimée (µg/ml)	Moyenne des concentrations estimées (µg/ml)	Ecart type	CV (%)	Limites d'acceptation (%)
LIQ	6	0,061	5,168	5,272	0,09	1,79	20,00
	6	0,061	5,168				
	6	0,062	5,246				
	6	0,064	5,402				
	6	0,063	5,324				
	6	0,063	5,324				
CQI	7,5	0,119	9,702	9,663	0,04	0,44	15,00
	7,5	0,119	9,702				
	7,5	0,119	9,702				
	7,5	0,118	9,624				
	7,5	0,118	9,624				
	7,5	0,118	9,624				
CQM	15	0,188	15,097	15,006	0,11	0,76	15,00
	15	0,185	14,863				
	15	0,185	14,863				
	15	0,188	15,097				
	15	0,188	15,097				
	15	0,187	15,019				
CQS	25,5	0,328	26,043	26,082	0,06	0,25	15,00
	25,5	0,328	26,043				
	25,5	0,33	26,200				
	25,5	0,328	26,043				
	25,5	0,328	26,043				
	25,5	0,329	26,121				

Tableau 33: Résultats de la répétabilité de la série3 (J₁).

CQ	Concentration théorique (µg/ml)	DO	Concentration estimée (µg/ml)	Moyenne des concentrations estimées (µg/ml)	Ecart type	CV (%)	Limites d'acceptation (%)
LIQ	6	0,069	5,153	5,102	0,10	2,05	20,00
	6	0,068	5,076				
	6	0,068	5,076				
	6	0,066	4,923				
	6	0,07	5,229				
	6	0,069	5,153				
CQI	7,5	0,096	7,222	7,222	0,00	0,00	15,00
	7,5	0,096	7,222				
	7,5	0,096	7,222				
	7,5	0,096	7,222				
	7,5	0,096	7,222				
	7,5	0,096	7,222				
CQM	15	0,185	14,042	14,016	0,03	0,28	15,00
	15	0,184	13,965				
	15	0,184	13,965				
	15	0,185	14,042				
	15	0,185	14,042				
	15	0,185	14,042				
CQS	25,5	0,314	23,927	23,978	0,03	0,16	15,00
	25,5	0,315	24,003				
	25,5	0,315	24,003				
	25,5	0,315	24,003				
	25,5	0,315	24,003				
	25,5	0,314	23,927				

Tableau 34: Résultats de la répétabilité de la série1 (J₂).

CQ	Concentration théorique (µg/ml)	DO	Concentration estimée (µg/ml)	Moyenne des concentrations estimées (µg/ml)	Ecart type	CV (%)	Limites d'acceptation (%)
LIQ	6	0,072	5,811	5,811	0,03	0,63	20,00
	6	0,072	5,811				
	6	0,072	5,811				
	6	0,072	5,811				
	6	0,071	5,721				
	6	0,072	5,811				
CQI	7,5	0,09	7,426	7,485	0,07	0,97	15,00
	7,5	0,09	7,426				
	7,5	0,09	7,426				
	7,5	0,091	7,515				
	7,5	0,091	7,515				
	7,5	0,092	7,605				
CQM	15	0,169	14,511	14,541	0,04	0,31	15,00
	15	0,169	14,511				
	15	0,169	14,511				
	15	0,169	14,511				
	15	0,17	14,600				
	15	0,17	14,600				
CQS	25,5	0,324	28,412	28,412	0	0	15,00
	25,5	0,324	28,412				
	25,5	0,324	28,412				
	25,5	0,324	28,412				
	25,5	0,324	28,412				
	25,5	0,324	28,412				

Tableau 35: Résultats de la répétabilité de la série 2 (J₂).

CQ	Concentration théorique (µg/ml)	DO	Concentration estimée (µg/ml)	Moyenne des concentrations estimées (µg/ml)	Ecart type	CV (%)	Limites d'acceptation (%)
LIQ	6	0,072	6,288	6,303	0,03	0,55	20,00
	6	0,072	6,288				
	6	0,072	6,288				
	6	0,072	6,288				
	6	0,072	6,288				
	6	0,073	6,374				
CQI	7,5	0,095	8,251	8,535	0,25	2,94	15,00
	7,5	0,096	8,336				
	7,5	0,096	8,336				
	7,5	0,101	8,763				
	7,5	0,101	8,763				
	7,5	0,101	8,763				
CQM	15	0,173	14,906	14,863	0,05	0,31	15,00
	15	0,173	14,906				
	15	0,173	14,906				
	15	0,172	14,821				
	15	0,172	14,821				
	15	0,172	14,821				
CQS	25,5	0,3	25,742	25,785	0,05	0,18	15,00
	25,5	0,301	25,828				
	25,5	0,301	25,828				
	25,5	0,3	25,742				
	25,5	0,301	25,828				
	25,5	0,3	25,742				

Tableau 36: Résultats de la répétabilité de la série 3 (J₂).

CQ	Concentration théorique (µg/ml)	DO	Concentration estimée (µg/ml)	Moyenne des concentrations estimées (µg/ml)	Ecart type	CV (%)	Limites d'acceptation (%)
LIQ	6	0,074	6,590	6,590	0	0	20,00
	6	0,074	6,590				
	6	0,074	6,590				
	6	0,074	6,590				
	6	0,074	6,590				
	6	0,074	6,590				
CQI	7,5	0,089	7,938	7,938	0	0	15,00
	7,5	0,089	7,938				
	7,5	0,089	7,938				
	7,5	0,089	7,938				
	7,5	0,089	7,938				
	7,5	0,089	7,938				
CQM	15	0,164	14,677	14,766	0,13	0,86	15,00
	15	0,165	14,766				
	15	0,165	14,766				
	15	0,166	14,856				
	15	0,167	14,946				
	15	0,163	14,587				
CQS	25,5	0,284	25,458	25,533	0,07	0,26	15,00
	25,5	0,284	25,458				
	25,5	0,285	25,548				
	25,5	0,285	25,548				
	25,5	0,285	25,548				
	25,5	0,286	25,638				

Tableau 37: Résultats de la répétabilité de la série 1 (J₃).

CQ	Concentration théorique (µg/ml)	DO	Concentration estimée (µg/ml)	Moyenne des concentrations estimées (µg/ml)	Ecart type	CV (%)	Limites d'acceptation (%)
LIQ	6	0,074	6,061	6,015	0,05	0,84	20,00
	6	0,073	5,969				
	6	0,073	5,969				
	6	0,073	5,969				
	6	0,074	6,061				
	6	0,074	6,061				
CQI	7,5	0,095	7,989	8,050	0,07	0,93	15,00
	7,5	0,095	7,989				
	7,5	0,095	7,989				
	7,5	0,096	8,081				
	7,5	0,096	8,081				
	7,5	0,097	8,173				
CQM	15	0,2	17,631	17,646	0,04	0,21	15,00
	15	0,2	17,631				
	15	0,2	17,631				
	15	0,2	17,631				
	15	0,2	17,631				
	15	0,201	17,723				
CQS	25,5	0,28	24,977	24,977	0,00	0,00	15,00
	25,5	0,28	24,977				
	25,5	0,28	24,977				
	25,5	0,28	24,977				
	25,5	0,28	24,977				
	25,5	0,28	24,977				

Tableau 38: Résultats de la répétabilité de la série 2 (J₃).

CQ	Concentration théorique (µg/ml)	DO	Concentration estimée (µg/ml)	Moyenne des concentrations estimées (µg/ml)	Ecart type	CV (%)	Limites d'acceptation (%)
LIQ	6	0,083	5,805	5,835	0,05	0,82	20,00
	6	0,084	5,897				
	6	0,084	5,897				
	6	0,083	5,805				
	6	0,083	5,805				
	6	0,083	5,805				
CQI	7,5	0,117	8,938	8,938	0,00	0,00	15,00
	7,5	0,117	8,938				
	7,5	0,117	8,938				
	7,5	0,117	8,938				
	7,5	0,117	8,938				
	7,5	0,117	8,938				
CQM	15	0,207	17,233	17,233	0,00	0,00	15,00
	15	0,207	17,233				
	15	0,207	17,233				
	15	0,207	17,233				
	15	0,207	17,233				
	15	0,207	17,233				
CQS	25,5	0,267	22,763	22,932	0,14	0,59	15,00
	25,5	0,267	22,763				
	25,5	0,269	22,947				
	25,5	0,27	23,040				
	25,5	0,27	23,040				
	25,5	0,27	23,040				

Tableau 39: Résultats de la répétabilité de la série3 (J₃).

CQ	Concentration théorique (µg/ml)	DO	Concentration estimée (µg/ml)	Moyenne des concentrations estimées (µg/ml)	Ecart type	CV (%)	Limites d'acceptation (%)
LIQ	6	0,08	6,421	6,508	0,06	0,85	20,00
	6	0,081	6,508				
	6	0,081	6,508				
	6	0,081	6,508				
	6	0,081	6,508				
	6	0,082	6,596				
CQI	7,5	0,086	6,945	7,076	0,09	1,29	15,00
	7,5	0,087	7,032				
	7,5	0,087	7,032				
	7,5	0,088	7,120				
	7,5	0,088	7,120				
	7,5	0,089	7,207				
CQM	15	0,171	14,369	14,412	0,05	0,33	15,00
	15	0,171	14,369				
	15	0,172	14,456				
	15	0,172	14,456				
	15	0,172	14,456				
	15	0,171	14,369				
CQS	25,5	0,294	25,111	25,184	0,07	0,26	15,00
	25,5	0,294	25,111				
	25,5	0,295	25,198				
	25,5	0,295	25,198				
	25,5	0,295	25,198				
	25,5	0,296	25,286				

▪ *Résultats de la fidélité intermédiaire :*

Tableau 40: Résultats de la fidélité intermédiaire de la série 1.

CQ		Concentration théorique (µg/ml)	DO	Concentration estimée	Moyenne	Ecart type	CV (%)	Limites d'acceptation (%)
LIQ	J1	6	0,063	5,178	5,668	0,44	7,70	20,00
	J2	6	0,072	5,812				
	J3	6	0,074	6,015				
CQI	J1	7,5	0,119	9,525	8,354	1,05	12,61	15,00
	J2	7,5	0,091	7,486				
	J3	7,5	0,095	8,050				
CQM	J1	15	0,208	16,362	16,183	1,56	9,64	15,00
	J2	15	0,169	14,541				
	J3	15	0,200	17,646				
CQS	J1	25,5	0,316	24,786	26,058	2,04	7,83	15,00
	J2	25,5	0,324	28,413				
	J3	25,5	0,280	24,977				

Tableau 41: Résultats de la fidélité intermédiaire de la série 2.

CQ		Concentration théorique (µg/ml)	DO	Concentration estimée	Moyenne	Ecart type	CV (%)	Limites d'acceptation (%)
LIQ	J1	6	0,062	5,272	5,803	0,52	8,89	20,00
	J2	6	0,072	6,303				
	J3	6	0,074	5,835				
CQI	J1	7,5	0,119	9,664	9,046	0,57	6,32	15,00
	J2	7,5	0,098	8,535				
	J3	7,5	0,096	8,938				
CQM	J1	15	0,187	15,007	15,701	1,33	8,46	15,00
	J2	15	0,173	14,863				
	J3	15	0,200	17,233				
CQS	J1	25,5	0,329	26,083	24,933	1,74	6,98	15,00
	J2	25,5	0,301	25,785				
	J3	25,5	0,280	22,932				

Tableau 42: Résultats de la fidélité intermédiaire de la série 3.

CQ		Concentration théorique (µg/ml)	DO	Concentration estimée	Moyenne	Ecart type	CV (%)	Limites d'acceptation (%)
LIQ	J1	6	0,068	5,102	6,067	0,84	13,79	20,00
	J2	6	0,074	6,590				
	J3	6	0,081	6,508				
CQI	J1	7,5	0,096	7,222	7,412	0,46	6,22	15,00
	J2	7,5	0,089	7,938				
	J3	7,5	0,088	7,076				
CQM	J1	15	0,185	14,017	14,398	0,38	2,61	15,00
	J2	15	0,165	14,766				
	J3	15	0,172	14,412				
CQS	J1	25,5	0,315	23,978	24,898	0,82	3,28	15,00
	J2	25,5	0,285	25,533				
	J3	25,5	0,295	25,184				

Annexe F :

Cette annexe regroupe les résultats de l'étude de la stabilité des trois séries.

Stabilité de congélation/ décongélation :**Tableau 43 :** Résultats de la stabilité de congélation/décongélation de la série 1.

CQ	Concentration théorique (µg/ml)	DO	Concentration estimée (µg/ml)	Moyenne des concentrations estimées (µg/ml)	Biais relatif (%)	Limites d'acceptation (%)
CQI	7,5	0,065	5,333	5,436	27,52	15,00
	7,5	0,068	5,565			
	7,5	0,066	5,410			
CQS	25,5	0,155	12,299	12,376	51,47	15,00
	25,5	0,156	12,376			
	25,5	0,157	12,454			

Tableau 44 : Résultats de la stabilité de congélation/décongélation de la série 2.

CQ	Concentration théorique (µg/ml)	DO	Concentration estimée (µg/ml)	Moyenne des concentrations estimées (µg/ml)	Biais relatif (%)	Limites d'acceptation (%)
CQI	7,5	0,057	4,855	4,960	33,87	15,00
	7,5	0,059	5,012			
	7,5	0,059	5,012			
CQS	25,5	0,225	17,991	17,991	29,45	15,00
	25,5	0,225	17,991			
	25,5	0,225	17,991			

Tableau 45 : Résultats de la stabilité de congélation/décongélation de la série 3.

CQ	Concentration théorique (µg/ml)	DO	Concentration estimée (µg/ml)	Moyenne des concentrations estimées (µg/ml)	Biais relatif (%)	Limites d'acceptation (%)
CQI	7,5	0,049	3,621	3,621	51,72	15,00
	7,5	0,049	3,621			
	7,5	0,049	3,621			
CQS	25,5	0,188	14,272	14,246	44,13	15,00
	25,5	0,187	14,195			
	25,5	0,188	14,272			

Stabilité à l'abri de la lumière :**Tableau 46 : Résultats de la stabilité à l'abri de la lumière de la série 1.**

CQ	Concentration théorique (µg/ml)	DO	Concentration estimée (µg/ml)	Moyenne des concentrations estimées (µg/ml)	Biais relatif (%)	Limites d'acceptation (%)
CQI	7,5	0,039	3,320	3,320	55,73	15,00
	7,5	0,038	3,243			
	7,5	0,040	3,398			
CQS	25,5	0,108	8,661	8,867	65,23	15,00
	25,5	0,112	8,971			
	25,5	0,112	8,971			

Tableau 47 : Résultats de la stabilité à l'abri de la lumière de la série 2.

CQ	Concentration théorique (µg/ml)	DO	Concentration estimée (µg/ml)	Moyenne des concentrations estimées (µg/ml)	Biais relatif (%)	Limites d'acceptation (%)
CQI	7,5	0,086	7,123	7,123	5,03	15,00
	7,5	0,086	7,123			
	7,5	0,086	7,123			
CQS	25,5	0,150	12,127	12,231	52,04	15,00
	25,5	0,152	12,283			
	25,5	0,152	12,283			

Tableau 48 : Résultats de la stabilité à l'abri de la lumière de la série 3.

CQ	Concentration théorique (µg/ml)	DO	Concentration estimée (µg/ml)	Moyenne des concentrations estimées (µg/ml)	Biais relatif (%)	Limites d'acceptation (%)
CQI	7,5	0,047	3,467	3,416	54,45	15,00
	7,5	0,046	3,391			
	7,5	0,046	3,391			
CQS	25,5	0,181	13,736	13,659	46,44	15,00
	25,5	0,180	13,659			
	25,5	0,179	13,582			

Stabilité à court terme :**Tableau 49: Résultats de la stabilité à court terme de la série 1.**

CQ	Concentration théorique (µg/ml)	DO	Concentration estimée (µg/ml)	Moyenne des concentrations estimées (µg/ml)	Biais relatif (%)	Limites d'acceptation (%)
CQI	7,5	0,037	3,166	3,191	57,45	15,00
	7,5	0,038	3,243			
	7,5	0,037	3,166			
CQS	25,5	0,118	9,435	9,461	62,90	15,00
	25,5	0,119	9,512			
	25,5	0,118	9,435			

Tableau 50 : Résultats de la stabilité à court terme de la série 2.

CQ	Concentration théorique (µg/ml)	DO	Concentration estimée (µg/ml)	Moyenne des concentrations estimées (µg/ml)	Biais relatif (%)	Limites d'acceptation (%)
CQI	7,5	0,029	2,666	2,614	65,15	15,00
	7,5	0,028	2,588			
	7,5	0,028	2,588			
CQS	25,5	0,163	13,143	13,039	48,87	15,00
	25,5	0,161	12,987			
	25,5	0,161	12,987			

Tableau 51 : Résultats de la stabilité à court terme de la série 3.

CQ	Concentration théorique (µg/ml)	DO	Concentration estimée (µg/ml)	Moyenne des concentrations estimées (µg/ml)	Biais relatif (%)	Limites d'acceptation (%)
CQI	7,5	0,032	2,318	2,369	68,41	15,00
	7,5	0,033	2,395			
	7,5	0,033	2,395			
CQS	25,5	0,152	11,513	11,386	55,35	15,00
	25,5	0,149	11,284			
	25,5	0,150	11,360			

Stabilité à long terme :**Tableau 52 : Résultats de la stabilité à long terme de la série 1.**

CQ	Concentration théorique (µg/ml)	DO	Concentration estimée (µg/ml)	Moyenne des concentrations estimées (µg/ml)	Biais relatif (%)	Limites d'acceptation (%)
CQI	7,5	0,000	0,302	0,302	95,98	15,00
	7,5	0,000	0,302			
	7,5	0,000	0,302			
CQS	25,5	0,000	0,302	0,302	98,82	15,00
	25,5	0,000	0,302			
	25,5	0,000	0,302			

Tableau 53 : Résultats de la stabilité à long terme de la série 2.

CQ	Concentration théorique (µg/ml)	DO	Concentration estimée (µg/ml)	Moyenne des concentrations estimées (µg/ml)	Biais relatif (%)	Limites d'acceptation (%)
CQI	7,5	0,000	0,399	0,399	94,68	15,00
	7,5	0,000	0,399			
	7,5	0,000	0,399			
CQS	25,5	0,010	1,181	0,920	96,39	15,00
	25,5	0,000	0,399			
	25,5	0,010	1,181			

Tableau 54 : Résultats de la stabilité à long terme de la série 3.

CQ	Concentration théorique (µg/ml)	DO	Concentration estimée (µg/ml)	Moyenne des concentrations estimées (µg/ml)	Biais relatif (%)	Limites d'acceptation (%)
CQI	7,5	0,001	-0,057	-0,057	100,77	15,00
	7,5	0,001	-0,057			
	7,5	0,001	-0,057			
CQS	25,5	0,000	-0,134	-0,134	100,53	15,00
	25,5	0,000	-0,134			
	25,5	0,000	-0,134			

Résumé

L'objectif de ce travail est la validation d'une méthode colorimétrique de dosage du rouge de phénol dans le perfusât intestinal de rat appliquée dans l'étude de la perméabilité intestinale des médicaments par méthode in situ. Dans l'étude expérimentale, le rouge de phénol a été dosé par un spectrophotomètre à une longueur d'onde de 560 nm, pour 3 séries de perfusât intestinal de 3 rats différents. La technique a montré une bonne linéarité ($R = 0,99$) sur un domaine de 6-30 $\mu\text{g/ml}$. Les études de l'exactitude et de la fidélité (répétabilité et fidélité intermédiaire) se sont avérées concluantes avec des CV inférieurs aux limites d'acceptation. Cette méthode a montrée aussi une bonne spécificité et une bonne sélectivité, par contre les conditions de conservation ont montrés une mauvaise stabilité de la solution de rouge de phénol due au mélange avec la soude avant la conservation.

Mots-clés : Validation bioanalytique - Perméabilité intestinale - Rouge de phénol - Dosage colorimétrique.

Abstract

The objective of this work is the validation of a colorimetric assay for the determination of phenol red in the rat intestinal perfusate applied in the study of the intestinal permeability of drugs by in situ method. In experimental studies, the phenol red was measured by a spectrophotometer at a wavelength of 560 nm, for 3 runs of 3 different rat intestinal perfusate. The method showed good linearity ($R = 0.99$) over a range of 6-30 $\mu\text{g} / \text{ml}$. Studies of the accuracy and precision (repeatability and intermediate precision) have proven successful with CV lower than acceptance criteria. This method has also shown a high specificity and a good selectivity. However, the storage conditions have shown poor stability of the phenol red solution due to the mixture with sodium hydroxide before storage.

Keywords: Bioanalytical validation - Intestinal permeability – Phenol red - Colorimetric assay.

NOM ET PRENOM :
BENDIMERAD SAMIA

Adresse mail :
bendi-91@hotmail.fr

NOM ET PRENOM :
DRAIS ZAHIDA

Adresse mail :
zahida.drais@gmail.com

Résumé

L'objectif de ce travail est la validation d'une méthode colorimétrique de dosage du rouge de phénol dans le perfusât intestinal de rat appliquée dans l'étude de la perméabilité intestinale des médicaments par méthode in situ. Dans l'étude expérimentale, le rouge de phénol a été dosé par un spectrophotomètre à une longueur d'onde de 560 nm, pour 3 séries de perfusât intestinal de 3 rats différents. La technique a montré une bonne linéarité ($R = 0,99$) sur un domaine de 6-30 $\mu\text{g/ml}$. Les études de l'exactitude et de la fidélité (répétabilité et fidélité intermédiaire) se sont avérées concluantes avec des CV inférieurs aux limites d'acceptation. Cette méthode a montrée aussi une bonne spécificité et une bonne sélectivité, par contre les conditions de conservation ont montrés une mauvaise stabilité de la solution de rouge de phénol due au mélange avec la soude avant la conservation.

Mots-clés : Validation bioanalytique - Perméabilité intestinale - Rouge de phénol - Dosage colorimétrique.

Abstract

The objective of this work is the validation of a colorimetric assay for the determination of phenol red in the rat intestinal perfusate applied in the study of the intestinal permeability of drugs by in situ method. In experimental studies, the phenol red was measured by a spectrophotometer at a wavelength of 560 nm, for 3 runs of 3 different intestinal perfusate rats. The method showed good linearity ($R = 0.99$) over a range of 6-30 $\mu\text{g} / \text{ml}$. Studies of the accuracy and precision (repeatability and intermediate precision) have proven successful with CV lower than acceptance criteria. This method has also shown a high specificity and a good selectivity. However, the storage conditions have shown poor stability of the phenol red solution due to the mixture with sodium hydroxide before storage.

Keywords: Bioanalytical validation - Intestinal permeability - Phenol red - Colorimetric assay.

