

OPTIMISATION ET VALIDATION D'UNE METHODE DE DOSAGE PAR HPLC/DAD D'UN ANTIHYPERTENSEUR LE ZOFENOPRIL

Wafa BOUAISSI^{a*}, Mbarek ABIDI^b et Najib BEN HAMIDA^a

^aLaboratoire de Chimie Analytique et Electrochimie, Département de Chimie, Faculté des Sciences de Tunis
Campus Universitaire El Manar, 2092 Tunis, Tunisie.

^bLaboratoire National de Contrôle des Médicaments et de Dépistage du Dopage,
11 bis rue Djebel Lakhdar, Bab Saadoun, 1006 Tunis, Tunisie.

(Reçu le 21 Décembre 2012, accepté le 04 Mars 2013)

RESUME : L'objet de ce travail est la validation d'une méthode de dosage du Zofénopril par HPLC/DAD à polarité de phases inversée selon les recommandations d'ICH (International Conference On Harmonisation). Les effets du débit, pH, pourcentage en solvant organique et température de la colonne sur le temps de rétention du Zofénopril ont été étudiés. La séparation chromatographique a été réalisée sur une colonne ProntoSIL LC18 Knauer (250 mm * 4,6 mm et une granulométrie de 5 µm) à 25 °C à 205 nm avec une phase mobile constituée d'acétonitrile-tampon phosphate KH₂PO₄ 10 mM de pH 2,5 (80:20, v/v) et à débit 2 mL min⁻¹. La méthode est linéaire dans une gamme de concentration de 90 à 210 µg mL⁻¹. Les coefficients de corrélation (R²) des équations de régression sont supérieurs à 0,995. La précision de la méthode est démontrée par les valeurs des coefficients de variance inférieurs à 2%. Aucune interférence des excipients ou des produits de dégradation d'une formulation pharmaceutique n'a été observée. Selon les résultats de la validation, la méthode proposée est simple, spécifique, linéaire, précise, exacte et peut être appliquée à l'analyse du médicament « Zofénil » avec un excellent taux de recouvrement.

Mots-clés: Zofénopril, HPLC/DAD, Validation.

ABSTRACT: The objective of the current study is to develop and validate a reverse-phase HPLC according to the recommendations of International Conference On Harmonization (ICH) for the determination of Zofenopril. The effects of flow, pH, percentage of organic solvent and column temperature on the retention time of Zofenopril are studied by HPLC / DAD. Chromatographic separation was performed on a column of type ProntoSIL LC18 Knauer (250 mm * 4.6 mm grain size of 5 µm) at 25 °C using a diode array detector (DAD) at 205 nm and a mobile phase was composed of acetonitrile-phosphate buffer 10 mM at pH 2.5 (80:20, v/v) delivered at flow 2 mL min⁻¹. The method is linear in a concentration range from 90 to 210 µg mL⁻¹. The correlation coefficients (R²) regression equations are greater than 0.995. The precision of the method is demonstrated by the values of coefficients of variance are less than 2%. No interference from any components of dosage forms or degradation products were observed. The results of the validation, the proposed method is simple, specific, linear, precise, accurate and could be applied to the analysis of commercial tablets « Zofénil » with an excellent recovery.

Key words: Zofenopril, HPLC/DAD, Validation.

INTRODUCTION

Le Zofénopril calcium est un inhibiteur de l'enzyme de conversion (ECA). Il agit sur le système rénine-angiotensine-aldostérone [1,2]. Il entre dans la formulation des médicaments comme le "Zofénil". Il est indiqué dans le traitement de l'hypertension artérielle essentielle légère et modérée et d'un infarctus du myocarde en phase aiguë [3,4]. Des études précliniques ont montré que le Zofénopril entraînait une inhibition significative et persistante de l'ECA cardiaque grâce à sa lipophilie [5] et sa forte pénétration tissulaire [5]. En outre, il présente des propriétés antioxydantes qui sont développées grâce à la capture des radicaux libres par le groupe sulfhydryle [3,6,7]. Les travaux menés sur le Zofénopril ont débuté dès 1995, à travers un vaste programme d'études SMILE (Survival of Myocardial Infarction Long Term Evaluation). Ces travaux ont montré l'effet du Zofénopril sur la réduction de la morbidité due à un infarctus du myocarde (IDM) [8]. Le

* Correspondant, e-mail : foufa-bouissi@hotmail.fr

Zofénopril est rapidement et complètement absorbé par voie orale ; il est transformé par hydrolyse de la fonction thioester par des estérases situées dans le foie en son métabolite actif le Zofénoprilate [9,10] (Fig.1). Ce dernier, un inhibiteur de l'enzyme de conversion de l'angiotensine I en angiotensine II, est un puissant vasoconstricteur [11] qui stimule la libération d'aldostérone.

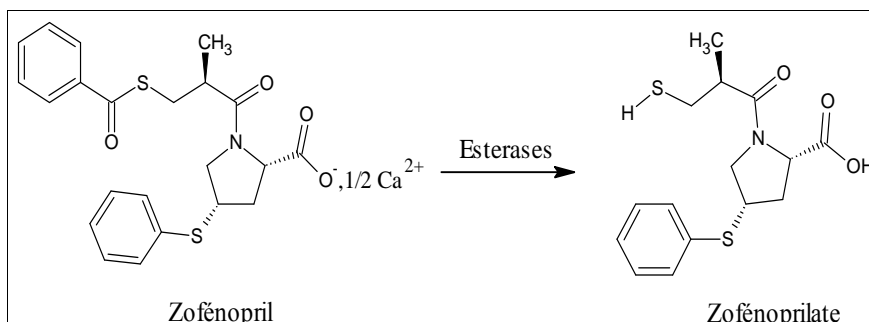


Figure 1: Hydrolyse enzymatique du Zofénopril en Zofénoprilate

Le Zofénopril ou (4S)-N-[(2S)-3-(benzoylthio)-2-méthylpropionyl-4-(phénylthio)]-L-proline calcium est sous forme d'une poudre blanche de p_f (°C) = 250, de masse molaire 448,59 g mol⁻¹. Sa solubilité dans l'eau est de 0,3 mg mL⁻¹. Il est légèrement soluble dans un mélange de diméthylformamide et de méthanol et pratiquement insoluble dans l'isopropanol, le butanol, l'acétone, l'acétonitrile et l'acétate d'éthyle [4].

Plusieurs méthodes ont été utilisées pour l'analyse du Zofénopril. En effet la méthode LC-MS² a été développée pour la détermination de Zofénopril et de son métabolite le Zofénoprilate dans le plasma humain. Elle a été réalisée sur une colonne C18 et une phase mobile composée d'un mélange acétonitrile-tampon acétate d'ammonium (26 mM) de pH = 4,5 [12]. Une méthode par HPLC/DAD a été utilisée pour la détermination simultanée du Zofénopril et de l'hydrochlorothiazide comprimés [13].

PARTIE EXPERIMENTALE

1. Produits chimiques et réactifs

Le Zofénopril fourni auprès de Sigma-Aldrich est de pureté supérieure à 99 %. L'Acétonitrile (LabScan), l'eau (LabScan), le dihydrogénophosphate de potassium KH₂PO₄ (Fluka), l'acide orthophosphorique (85 %) (Panreac), l'hydroxyde de sodium (Acros organics) sont de grandes puretés. Le médicament « Zofénil » 30 mg est sous forme de comprimés sécables.

2. Instrumentation et conditions chromatographiques

L'instrument utilisé est un appareil HPLC de type Varian G1600A équipé d'un injecteur manuel d'une boucle d'injection de 20 µL, d'un four (25 à 90 °C), d'une pompe d'injection (4 à 400 bar) et d'un détecteur UV/Vis à barrette de diodes de longueurs d'ondes 200 à 800 nm.

Toutes les analyses ont été effectuées à température ambiante (25 °C) dans des conditions isocratiques. La séparation est réalisée en utilisant une colonne de type ProntoSil LC18 Knauer (4,6*250 mm ; 5µm). La phase mobile est constituée d'acétonitrile - tampon phosphate (pH 2,5; 10 mM) (80:20; v/v). La détection UV est 205 nm à un débit 2,0 mL min⁻¹. Le pH de la solution tampon a été mesuré avec un pH-mètre (Metrohm). Le temps de rétention du Zofénopril est de 4,27 min.

3. Préparation de la solution tampon phosphate de pH 2,5

La solution tampon (10 mM) de pH = 2,5 est préparée par dissolution de 136,09 mg du dihydrogénophosphate de potassium KH₂PO₄ dans 100 mL d'eau ultrapure. Le pH a été ajusté à 2,5 avec l'acide orthophosphorique.

4. Préparation des solutions étalons

On prépare trois séries de cinq concentrations allant de 60 % et 140 % de la concentration théorique de dosage ($300 \mu\text{g mL}^{-1}$) (sur le principe actif seul et la forme pharmaceutique reconstituée). La solution mère du Zofénopril de concentration $300 \mu\text{g mL}^{-1}$ est préparée par dissolution de 30 mg de produit dans 100 mL d'eau ultrapure.

a. Préparation du placebo

Le placebo (ou matrice) constitue une forme pharmaceutique reconstituée qui comprend tous les composants présents dans la forme pharmaceutique à l'exception des substances à analyser.

Le placebo est préparé par le mélange des excipients : lactose monohydrate, hypromellose, cellulose microcristalline, amidon de maïs, macrogol 400, macrogol 6000, silice colloïdale et stéarate de magnésium dans 100 mL d'eau ultrapure.

b. Préparation de la solution forme pharmaceutique reconstituée

La forme pharmaceutique reconstituée de concentration $150 \mu\text{g mL}^{-1}$ est préparée en mélangeant le principe actif et le placebo dans 100 mL d'eau ultrapure.

5. Préparation de l'échantillon

Un lot de 20 comprimés de 30 mg de Zofénopril est broyé et pesé. Un équivalent de 15 mg de Zofénopril est pesé et placé dans une fiole de 100 mL, puis 80 mL d'eau ultrapure et 20 mL de la phase mobile sont ajoutés. Avant l'injection, la solution de concentration finale de $150 \mu\text{g mL}^{-1}$ est traitée à l'ultrason pendant 20 minutes, puis filtrée sur un filtre seringue de $0,22 \mu\text{m}$.

6. Validation de la méthode

Le procédé a été validé par la détermination de la spécificité, la linéarité, fidélité, exactitude, limites de détection (LD) et de quantification (LQ) selon les directives de l'Internationale Conférence sur l'Harmonisation (ICH) [14,15].

a. Spécificité

La spécificité d'une méthode d'analyse consiste à montrer que le pic mesuré ne provient que du composé à analyser, sans aucune interférence avec sa matrice (excipients, produits de dégradation, impuretés, ...).

L'étude de la spécificité de la méthode passe par la comparaison effectuée sur les chromatogrammes de la forme pharmaceutique reconstituée et du placebo.

b. Linéarité

La linéarité est la capacité d'obtenir à l'intérieur d'un certain intervalle des résultats directement proportionnels à la concentration de la substance analysée dans un échantillon.

La linéarité est étudiée sur un intervalle de mesure couvert par une série de cinq concentrations allant de 60 % et 140 % de la concentration théorique de dosage ($300 \mu\text{g mL}^{-1}$). On effectue trois séries de mesures cinq concentrations ($90 \mu\text{g mL}^{-1}$; $120 \mu\text{g mL}^{-1}$; $150 \mu\text{g mL}^{-1}$; $180 \mu\text{g mL}^{-1}$ et $210 \mu\text{g mL}^{-1}$) pendant trois jours consécutifs. Chaque solution est injectée 5 fois avec un volume de $30 \mu\text{L}$.

Avant l'injection des solutions, la colonne était équilibrée pendant au moins 20 min avec la phase mobile. Les aires des pics des substances ont été tracées en fonction des concentrations du Zofénopril. Les résultats doivent être évalués au moyen de la méthode des moindres carrés pour calculer les paramètres de régression (équations d'étalonnage et coefficients de détermination).

L'étude doit être réalisée sur le principe actif seul et sur la forme pharmaceutique reconstituée.

c. Exactitude

L'exactitude correspond au degré de concordance entre la valeur de la méthode obtenue et la valeur de référence ou la valeur considérée comme véritable par convention. Elle est déterminée sur les cinq échantillons utilisés dans l'étude de la linéarité. Le principe de l'exactitude est de calculer les valeurs de recouvrements en % entre les quantités retrouvées et les quantités introduites.

d. Fidélité

La fidélité de la procédure d'analyse exprime l'étroitesse de l'accord entre une série de mesures provenant de multiples prises d'un même échantillon homogène dans des conditions prescrites. Elle s'exprime par la mesure de la répétabilité et de fidélité intermédiaire.

La répétabilité se rapporte à des essais de la même grandeur effectuée dans des conditions aussi stables que possible. Le travail sera effectué sur 3 solutions de concentration 100 % dans le même jour, par le même opérateur et dans les mêmes conditions expérimentales. Chaque solution est injectée 6 fois.

La fidélité intermédiaire a été évaluée en étudiant deux groupes de résultats obtenus en deux jours consécutifs. Chaque groupe comporte les résultats obtenus sur 3 solutions.

En pratique, la fidélité du Zofénopril dans la solution témoin est étudiée pendant trois jours successifs tout en conservant le même opérateur et le même appareil.

La précision a été déterminée par le calcul de recouvrement moyen et des coefficients de variation sur les 6 injections de trois solutions de concentration 100 %.

e. Limite de détection et limite de quantification

La limite de détection (LD) et la limite de quantification (LQ) ont été déterminées à partir de la courbe analytique et expérimentalement selon le rapport signal-bruit tel que défini par ICH [16]. [16,17].

RESULTATS ET DISCUSSION

A. Développement de la méthode de dosage

1. Choix de la longueur d'onde de détection

L'analyse du spectre d'absorption UV d'une solution aqueuse du Zofénopril à une concentration de $100 \mu\text{g mL}^{-1}$ a montré la présence de deux bandes d'absorption maximales, aux longueurs d'ondes 200 nm et 241,8 nm.

Par suite, la détection de l'antihypertenseur a été effectuée à longueur d'onde fixe $\lambda = 205 \text{ nm}$ (Fig.2).

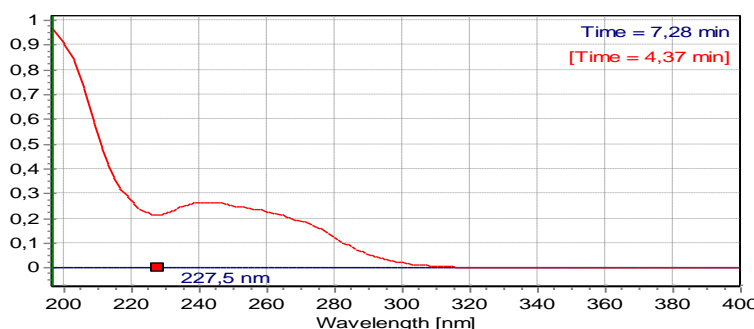


Figure 2 : Spectre UV de Zofénopril de concentration $100 \mu\text{g mL}^{-1}$.

2. Choix de la composition de la phase mobile acétonitrile-tampon phosphate

La variation de la composition de la phase mobile acétonitrile-tampon phosphate KH_2PO_4 10 mM de pH = 2,5 sur la rétention du Zofénopril a donné les enregistrements chromatographiques représentés par la figure 3.

Les chromatogrammes de la figure 3 illustrent l'effet de la variation du pourcentage du solvant organique (ACN) sur la rétention du Zofénopril. En effet, l'augmentation du pourcentage de l'ACN dans la phase mobile induit une élution rapide du Zofénopril. Ceci est expliqué par la grande affinité du Zofénopril vis à vis du solvant organique. On choisit donc une phase mobile constituée d'un mélange acétonitrile-tampon phosphate 10 mM de composition (80:20; v/v) pour le dosage du Zofénopril.

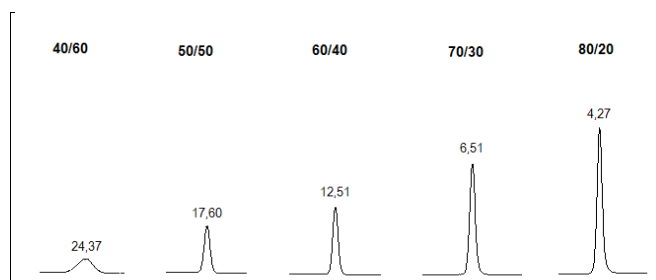


Figure 3 : Effet de la variation de la composition de la phase mobile sur la rétention du Zofénopril : ACN/tampon de phosphate 10 mM de pH = 2,5 sur la rétention du Zofénopril; débit = 2 mL min⁻¹ ; T = 25 °C.

3. Effet du débit de la phase mobile

Le temps de rétention du Zofénopril dépend fortement du débit de la phase mobile. Plus le débit est élevé, plus le temps de rétention est réduit et donc la durée de l'analyse est plus courte.

L'effet de la variation du débit de la phase mobile de composition acétonitrile-tampon phosphate de composition (80:20; v/v) sur la rétention du Zofénopril a été étudié entre 0,5 et 2 mL min⁻¹ (Fig.4).

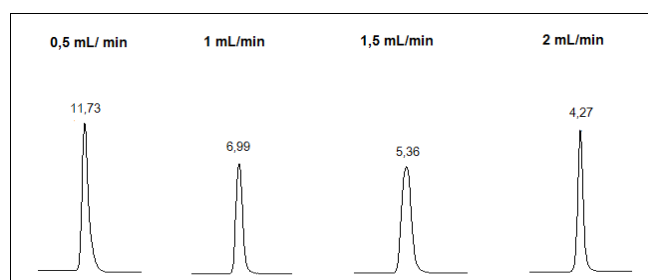


Figure 4: Effet du débit de la phase mobile sur la rétention du Zofénopril; Phase mobile : ACN/tampon phosphate 10 mM de pH = 2,5 (80:20; v/v); T = 25 °C

D'après les chromatogrammes de la figure 4 nous avons donc choisi le débit 2 mL min⁻¹ qui permet une élution rapide du Zofénopril (4,27 min).

4. Effet du pH de la phase mobile

En Chromatographie Liquide Haute Performance à polarité de phases inversées, la rétention augmente avec l'hydrophobie du produit : les composés ionisables sont donc plus retenus sous leur forme neutre que sous leur forme ionique. L'ionisation étant un phénomène dépendant du pH, il est important de tester l'influence de ce facteur sur la rétention de Zofénopril. Pour cela nous avons utilisé une phase mobile composée d'acétonitrile-tampon phosphate 10 mM de pH ajusté avec l'acide orthophosphorique (80:20; v/v) pour obtenir les valeurs suivants de pH : 2,5 ; 3 ; 4 ; 5 et 6.

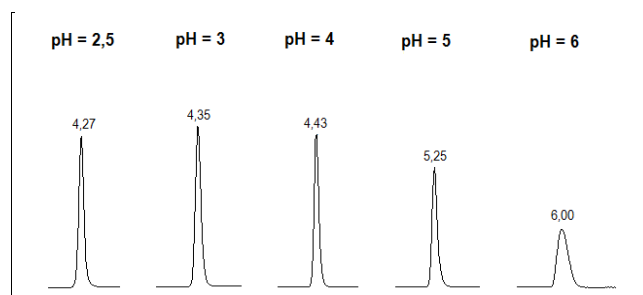


Figure 5: Influence du pH de la phase mobile sur la rétention du Zofénopril Phase mobile : ACN/tampon phosphate 10 mM (80:20; v/v); débit = 2 mL min⁻¹ ; T = 25 °C

La figure 5 représente les chromatogrammes enregistrés en faisant varier le pH de la phase mobile de 2,5 à 6 à débit 2 mL min^{-1} et à 25°C .

A partir des chromatogrammes de la figure 6 nous avons tracé la courbe représentant la variation du temps de rétention du Zofénopril en fonction du pH de la phase mobile.

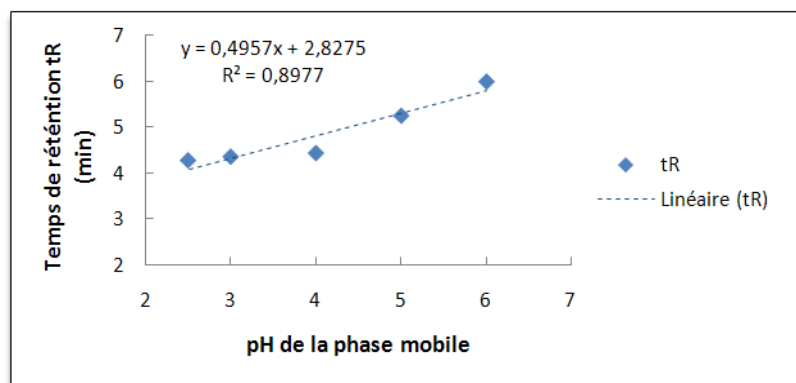


Figure 6 : Effet du pH sur le temps de rétention du Zofénopril.

Le traçage de la courbe $t_R = f(\text{pH})$ montre que la variation de t_R du Zofénopril en fonction du pH de la phase mobile est linéaire. Nous avons choisi un pH de 2,5 pour une élution rapide du Zofénopril.

5. Effet de la température de la colonne sur la rétention du principe actif

La température ambiante est la mieux adaptée pour le développement d'une méthode chromatographique. Une augmentation de celle-ci entraîne une diminution du temps de rétention du Zofénopril malgré l'amélioration de l'efficacité de la colonne suite à une diminution de la viscosité de la phase mobile donnée par l'équation d'ANDRODE [18] : $\ln \eta = A + B/T$ avec η : viscosité de la phase mobile, T : température absolue, A et B : constantes.

Les Chromatogrammes enregistrés représentant l'effet de la variation de la température de la colonne sur la rétention du Zofénopril sont données par la figure 7.

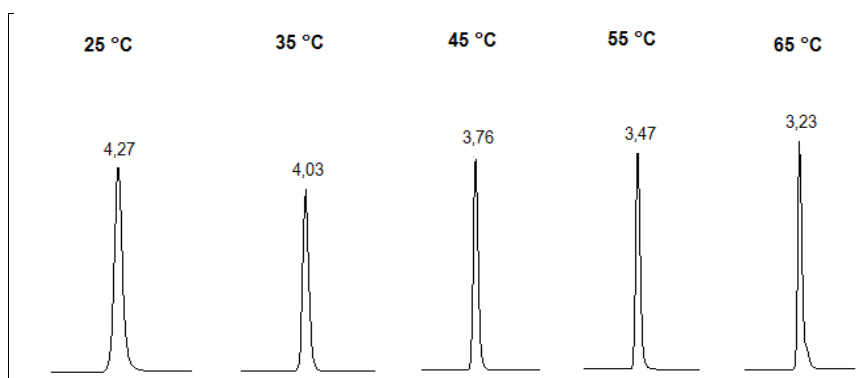


Figure 7 : Effet de la température de la colonne sur la rétention du Zofenopril; Phase mobile : ACN/tampon phosphate 10 mM de pH 2,5 (80:20; v/v); débit = 2 mL.min^{-1}

D'après ces chromatogrammes on remarque que l'augmentation de la température de la colonne réduit le temps de rétention du Zofénopril et permet d'augmenter l'efficacité de la colonne chromatographique et ainsi d'obtenir des pics plus fins.

B. Validation de la méthode

Linéarité

La courbe d'étalonnage du Zofénopril est linéaire sur toute la gamme de concentration de 90,0 à 210,0 $\mu\text{g mL}^{-1}$ (5 concentrations différentes ont été utilisées, et chaque solution a été injectée 5 fois). L'équation de la droite de régression est de la forme : $y = a + b \cdot x$ (x: concentration du Zofénopril en $\mu\text{g mL}^{-1}$ et y: aire du pic).

Tableau I : Paramètres de la linéarité

Paramètres étudiés	Zofénopril dans la solution témoin	Zofénopril dans la FPR
Pente de la droite (b)	0,082	0,079
Ordonnée à l'origine (a)	-0,129	1,493
Coefficient de corrélation (r^2)	0,999	0,998

La figure 8 représente les courbes de régression correspondant aux Zofénopril dans la solution témoin et dans la forme pharmaceutique reconstituée.

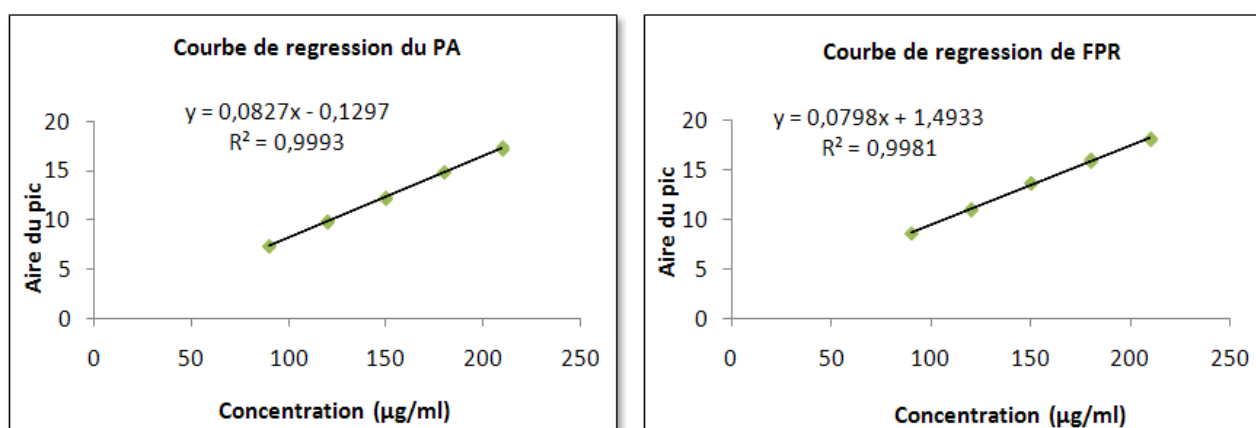


Figure 8 : Courbes d'étalonnage du Zofénopril dans la solution témoin et dans la solution FPR

Les coefficients de corrélations des droites de régression correspondant aux Zofénopril dans la solution témoin et dans la forme pharmaceutique reconstituée sont supérieurs à 0,995. On peut donc conclure, que la méthode de dosage du Zofénopril par HPLC est linéaire. Celle-ci doit être vérifiée par les tests statistiques de Cochran, de Fischer et de Student.

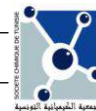
▪ Test de Cochran : test d'homogénéité des variances

L'objectif de ce test est de vérifier l'homogénéité des variances constitutives de l'erreur expérimentale et ainsi de détecter la présence de valeurs suspectes.

Les valeurs du critère de Cochran $C_{\text{calculé}}$ pour le Zofénopril dans la solution témoin sont regroupées dans le tableau II.

Tableau II : Homogénéité des variances du Zofénopril

	$S_{j\text{max}}^2$	$\sum S_j^2$	$C_{\text{calculé}} = S_{j\text{max}}^2 / \sum S_j^2$	$C_{(0,05 ; k ; n-1)}$ (n = 3)
PA	0,02333	0,0503	0,463	0,684
$C_{\text{calculé}} < C_{(0,05 ; 5 ; 2)}$				
<i>C/C : les variances sont homogènes au risque 5%</i>				



Conclusion : les variances des différents groupes sont homogènes au risque de 5%.

▪ **Tests de Fisher : test de l'existence d'une pente significative et test de validité de la droite de régression**

Le test de l'existence d'une pente significative consiste à comparer les variations dues à la régression et aux erreurs expérimentales et d'ajustement. On peut conclure l'existence d'une pente, donc une dépendance linéaire au seuil de probabilité considérée α si l'inégalité suivante est vérifiée :

$$F_1 = \frac{S_I^2}{S_R^2} > F_{(\alpha;1;N-2)}$$

Ce test consiste à vérifier l'hypothèse nulle : $H_0 : b = 0$ contre $H_1 : b \neq 0$

Tableau III : Test de l'existence d'une pente significative.

Origine de la variation	DDL	SCE	Variances	$F_{1\text{calculé}}$	$F_{\text{tabulé}} (0,05 ; 1 ; 13)$
Variation due à la régression	1	184,8593	184,8593		
Variation résiduelle	13	0,1366	0,0105		
Variation totale	14	184,9960			
$F_{1\text{calculé}} > F_{\text{tabulé}} (0,05 ; 1 ; 13)$					

En utilisant le test de Fischer, à partir des résultats bruts, $F_{1\text{calculé}} > F_{\text{tabulé}}$ avec $p < 0,05$ nous pouvons conclure l'existence d'une pente significative, donc à une dépendance linéaire entre la variable dépendante et la variable indépendante, au seuil de probabilité considérée.

▪ **Test de validité de la droite de régression**

Ce test de Fischer permet de comparer les erreurs d'ajustement (S_L^2) et expérimentale (S_E^2). Si l'inégalité suivante est vérifiée, l'ajustement est considéré comme valide au seuil α :

$$F_2 = \frac{S_E^2}{S_L^2} < F_{(\alpha;p-2;N-p)}$$

Les résultats du test F_2 de validité de la droite de régression pour le Zofénopril dans la solution témoin et dans la FPR sont regroupés dans ce tableau:

Tableau IV : Test de validité de la droite de régression.

Origine de la variation	DDL	SCE	Variances	$F_{2\text{calculé}}$	$F_{\text{tabulé}} (0,05 ; 3 ; 10)$
Erreur expérimentale	3	0,1006	0,0335	0,1075	3,71
Erreur de la régression	10	0,0360	0,0036		
$F_{2\text{calculé}} < F_{\text{tabulé}} (0,05 ; 3 ; 10)$					

L'ajustement est valide au seuil de probabilité considéré (on accepte l'hypothèse nulle).

▪ **Test de Student : test de comparaison de l'ordonnée à l'origine avec 0**

Ce test permet de vérifier si l'ordonnée à l'origine est équivalente à 0. Si $t_{\text{calculé}}$ est inférieur ou égal à la valeur critique $t_{(0,05; N-2)}$ lue dans la table de Student au risque 5 %, il est possible de conclure que l'ordonnée à l'origine n'est pas différente de 0 et que la méthode est spécifique.

Tableau V : Test de Student.

$ a $	Sa	$t_{\text{calculé}} = a /Sa$	$t_{\text{tabulé}} (0,05 ; N-2)$
0,1296	0,0972	1,3330	2,160
$t_{\text{calculé}} < t_{\text{tabulé}} (0,05 ; 13)$			

Conclusion : l'ordonnée à l'origine n'est pas significativement différent de 0 au seuil de probabilité $\alpha = 5\%$ et la méthode est spécifique.

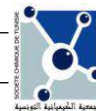
Exactitude

Elle s'exprime par les pourcentages de recouvrement par rapport à la quantité introduite en principe actif dans les échantillons.

Les résultats obtenus lors de l'étude de l'exactitude relatifs aux Zofénopril sont rassemblés dans le tableau ci-après :

Tableau VI : Paramètres de l'exactitude

Groupe	Concentration théorique ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	Concentration retrouvée ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	Recouvrement (%)
60%	90	90,4858	100,5398
	90	90,4800	100,5333
	90	89,6124	99,5693
80%	120	119,6356	99,6963
	120	120,4800	100,4000
	120	120,2543	100,2119
100%	150	148,7854	99,1902
	150	148,0800	98,7200
	150	150,1695	100,1130
120%	180	181,5789	100,8771
	180	180,4800	100,2666
	180	180,4481	100,2489
140%	210	209,5141	99,7686
	210	210,4800	100,2285
	210	209,5155	99,7693
Moyenne % = 100,009			
CV % = 0,5621			



Le coefficient de variation relatif au Zofénopril étant inférieur à 2 %, et l'intervalle de confiance du recouvrement moyen : IC = 100,009 % \pm 0,311 comprend le 100 %, donc la méthode est exacte.

Fidélité

La répétabilité et la fidélité intermédiaire du Zofénopril sont évaluées à l'aide du Coefficients de Variation calculés sur les 6 injections de trois solutions de concentration 100 %. Ils doivent être inférieurs à 2%. Les résultats sont présentés dans le tableau VII. Les valeurs obtenues montrent une précision convenable pour la méthode analytique.

Tableau VII : Etude de la fidélité.

Nombre de groupes	k	3
Nombre de mesures/groupe	N	6
Variance de répétabilité	s_r^2	0,9562
Variance de reproductibilité	s_R^2	3,1614
Moyenne générale du recouvrement %	M	98,2266
Coefficient de variation de répétabilité (CV_r)	$100 * s_r/m$	0,9955
Coefficient de variation de reproductibilité (CV_R)	$100 * s_R/m$	1,8101

Les coefficients de variation de la répétabilité et de la fidélité intermédiaire obtenus pour le Zofénopril dans la solution témoin sont inférieurs à 2 % (valeur fixée par les normes pharmaceutiques). La fidélité de la méthode est jugée acceptable.

Limite de détection (LD) et limite de quantification (LQ)

Les limites de détection LD et de quantification LQ ont été calculées en utilisant les équations: $LD = 3,3 * s/S$; $LQ = 10 * s/S$, où s est l'écart type de la réponse et S la pente de la courbe d'étalonnage [16,17]. La LD est de $0,38 \mu\text{g mL}^{-1}$ et la LQ est de $1,28 \mu\text{g mL}^{-1}$.

Expérimentalement, la limite de détection correspond à la concentration permettant d'obtenir un pic d'amplitude supérieure ou égale à trois fois celle de bruit de fond et la limite de quantification est égale à 10/3 fois la limite de détection [16] donc $LD = 0,03 \mu\text{g mL}^{-1}$ et $LQ = 0,1 \mu\text{g mL}^{-1}$. Ces valeurs sont adéquates pour la détermination du Zofénopril dans l'industrie pharmaceutique.

Sélectivité ou Spécificité

La sélectivité a également été évaluée par l'observation de toute interférence des excipients utilisés dans les médicaments. Chaque échantillon de produit commercial analysé, ne montre aucune interférence avec le pic correspondant au Zofénopril (Fig.9) prouvant ainsi une sélectivité de la méthode proposée.

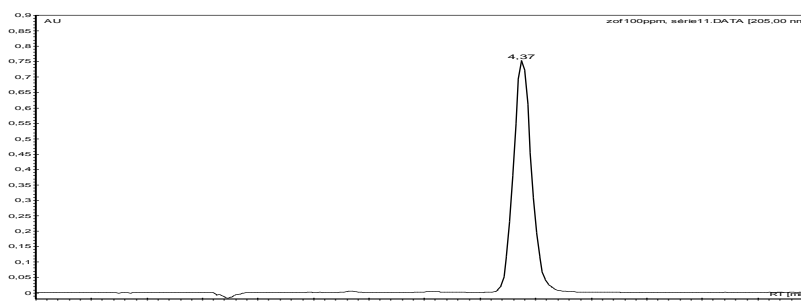


Figure 9: Chromatogramme de la forme pharmaceutique reconstituée (FPR) ; Phase mobile : ACN/tampon phosphate 10 mM de pH = 2,5 (80:20 ; v/v); débit = 2 mL min⁻¹ ; T = 25°C.

APPLICATION : Dosage par HPLC/DAD d'un médicament «Zofénil»

La méthode validée a été utilisée pour le dosage d'un médicament le «Zofénil» comprimés 30 mg. Le taux de recouvrement en Zofénopril (104,3 % ± 0,27 pour n = 3) étant dans l'intervalle [95 ,105 %] et le coefficient de variance (0,074 % < 2 %) montrent que le médicament "Zofénil" 30 mg est conforme à la norme.

CONCLUSION

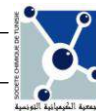
On s'est intéressé dans le présent travail à l'analyse et à la validation d'une méthode de dosage d'un antihypertenseur le Zofénopril par Chromatographie Liquide Haute Performance à polarité de phases inversée couplée à un détecteur à barrette de diodes.

Dans la première partie, nous avons déterminée les paramètres optimaux permettant l'analyse du Zofénopril par HPLC/DAD avec une colonne de type ProntoSIL LC18 Knauer (4,6*250 mm ; 5µm), à λ = 205 nm, une phase mobile constituée d'un mélange binaire acétonitrile-tampon phosphate KH₂PO₄ 10 mM de pH 2,5 (80:20 ; v/v), à débit 2 mL min⁻¹ et une température de 25°C.

Nous avons, par ailleurs, validé la méthode de dosage du Zofénopril. Ainsi, nous avons pu montrer que la méthode de dosage adoptée est spécifique, exacte, fidèle et linéaire entre 90 µg mL⁻¹ et 210 µg mL⁻¹. La limite de détection et de quantification du Zofénopril sont respectivement de 0,03 µg mL⁻¹ et 0,1 µg mL⁻¹. Cette méthode validée est appliquée pour le dosage d'une forme pharmaceutique le «Zofénil» avec un excellent taux de recouvrement.

REFERENCES

- [1] S.H. Ferreira, *Br. J. Pharmacol. Chemother.* Vol. 24, **1965**, p 164.
- [2] R. Ferrari, A. Cargnoni, S. Currello, C. Ceconi, A. Boraso, O. Visioli, *Protection of the ischemic myocardium by the converting-enzyme inhibitor zofenopril: insight into its mechanism of action*, *J. Cardiovasc. Pharmacol.* Vol. 20, **1992**, pp 694–704.
- [3] C. Napoli, V. Sica, F. Nigris, O. Pignatola, M. Condorelli, L.J. Ignarro L, et al. *Sulfhydryl angiotensin-converting enzyme inhibition induces sustained reduction of systemic oxidative stress and improves the nitric oxide pathway in patients with essential hypertension*. *Am Heart J*; 148:e5, **2004**.
- [4] A. Subissi, S. Evangelista, A. Giachetti, *Preclinical profile of Zofenopril: an angiotensin converting enzyme inhibitor with peculiar cardioprotective properties*, *Cardiovasc. Drug Rev.* Vol. 17, **1999**, p 115–133.
- [5] P. Anna Fratta, U. Garbin, M. Cristina Nava, C. Stranieri, M. Pellegrini, V. Boccioletti, M.L. Luchetta, P. Fabrizzi, V. Lo Cascio, and L. Cominacini, *American Journal of Hypertension*, Vol. 20, **2007**, pp 443–450.
- [6] L.B. Brunton, J.S Lazo, et K.L. Parker (Eds.) *Goodman and Gilman's The Pharmacological Basis of Therapeutics*, 11th Edn, McGraw Hill Publishing, New York **2005**.
- [7] E. Malacco, S. Omboni, *Adv. Ther.* Vol.24, **2007**, pp 1006–1015.
- [8] A. Teyssedou / *Annales de Cardiologie et d'Angéiologie*, vol. 56, **2007**, pp 137–144.
- [9] J.G. Kelly, K. O'Malley, *Clin. Pharmacokinet.* Vol. 19, **1990**, p 177.
- [10] X. Liu, R.M. Engelman, J.A. Rousou et al. , *Cardiov. Drugs Ther.* Vol. 6, **1992**, p 437.
- [11] J.C Fasciolo, *Hypertension*. Vol. 16, **1990**, pp 194-198.



- [12] L. Dal Bo, P. Mazzucchelli and A. Marzo, *Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications*. Issue 2, Vol. 749, **12 January 2000**, pp 287-294.
- [13] G. Carlucci, L. Di Federico, P. Iuliani, Dipartimento di Scienze del Farmaco, Università degli Studi "G. D'Annunzio" Chieti-Pescara, Chieti, Italy *J. Sep. Sci.* Vol. 33, **2010**, pp 1717–1722.
- [14] International Conference on Harmonization, ICH Q2B, *Validation of Analytical Procedures, Methodology*, **1996**.
- [15] *Conférence internationale sur l'harmonisation (ICH). Texte et méthodologie Q2(R1)*. **2005**, pp 1-13.
- [16] J. Ermer; C. Burgess, *Limite de détection et de quantification. Validation de la méthode dans l'analyse des produits pharmaceutiques. Une Guide de bonnes pratiques*; Wiley-VCH: Weinheim, **2005**.
- [17] GP. Carr, JC. Wahlich, *A practical approach to method validation in pharmaceutical analysis*. *J Pharm. Biomed Anal.* **1990**, Vol. 86, pp 613-618.
- [18] E.N.C. *Andrade Nature (London)*, 125 (**1930**), p. 582.