

Master Sciences et Techniques CAC Ageq

Chimiometrie et Analyse Chimique : Application à la gestion de la qualité

Mémoire de Fin d'Etudes

Pour l'Obtention du Diplôme de Master Sciences et Techniques

Validation de la méthode de quantification de lévamisole par HPLC dans les formes médicamenteuse vétérinaire

**Présenté par:
AANOUZ ILHAM**

**Encadré par:
Mr .ALI TALMI
Pr. BOUCHAIB IHSSANE**

Soutenu le 13 Juin 2016 devant le jury composé de:
- Pr. BOUCHAIB IHSSANE
- Pr. FOUAD KHALIL
- Pr. CHAKIB AMEZIANE HASSANI

**Stage effectué à : Division de la pharmacie et des intrants vétérinaire /ONSSA
Année Universitaire : 2015-2016**



∞ Dédicaces ∞

A ma très chère mère

Affable, honorable, aimable : Tu représentes pour moi le symbole de la bonté par excellence, la source de tendresse et l'exemple du dévouement qui n'a pas cessé de m'encourager et de prier pour moi.

A la mémoire de mon Père

Aucune dédicace ne saurait exprimer l'amour, l'estime, le dévouement et le respect que j'ai toujours eu pour vous. Rien au monde ne vaut les efforts fournis jour et nuit pour mon éducation et mon bien être. Ce travail est le fruit de tes sacrifices que tu as consentis pour mon éducation et ma formation.

A ma très chère sœur, son mari et leurs enfants

En témoignage de l'attachement, de l'amour et de l'affection que je porte pour vous.

A mon très cher oncle, son épouse Et leur fils

Vous avez toujours été présents pour les bons conseils. Votre affection et votre soutien m'ont été d'un grand secours au long de ma vie professionnelle et personnelle. Veuillez trouver dans ce modeste travail ma reconnaissance pour tous vos efforts.

A toute ma famille.

A tous mes amis.

A tous ceux qui ont confiance en moi.

A tous mes formateurs de la filière Chimie et Analyse Chimique d'analyse

A l'ensemble de personnel du Laboratoire National de Contrôle des Médicaments Vétérinaires qui m'a aidée

Pendant toute la durée de stage.



∞ REMERCIMENTS ∞

Au terme de ce travail, je tiens à remercier :

Mon encadrant le professeur *Mr. BouchaibIhssane*,

Vous avez bien voulu me confier ce travail riche d'intérêt et me guider à chaque étape de sa réalisation. Vous avez toujours réservé le meilleur accueil, malgré vos obligations professionnelles. Vos encouragements inlassables, votre amabilité. Je saisi cette occasion pour vous exprimer ma profonde gratitude tout en vous témoignant mes respects.

Je remercie également *Mr. Talmi Ali* chef de la section chimie j'ai eu le privilège de travailler parmi votre équipe et d'apprécier vos qualités et vos valeurs. Votre sérieux, votre compétence et votre sens du devoir nous ont énormément marqués. Veuillez trouver ici l'expression de mes respectueuses considérations et ma profonde admiration pour toutes vos qualités scientifiques et humaines.

A Mme. ID SIDI YAHIA Khadija et *Mr. DARKAOUI Sami* pour votre accueil.

A Mme Bouchra Moutkane, Mme Hanane El kouche, Mme Meriem Lamini, Mr Mohammed Ait Lachguer, Mr Driss Moujamir, Mr Fouad Zerabi, pour leurs conseils et aussi pour le temps qu'ils m'ont consacré durant ma période de stage.

Tout le personnel de la Division de la Pharmacie et des Intrants Vétérinaires qui ont mis à ma disposition toutes les informations et les connaissances nécessaire pour ma formation et aussi qui m'ont permis d'effectuer cette période de stage dans d'excellentes conditions.

Je tiens à remercier également les membres de jury *Mr.Ch Ameziane* et *Mr. F Khalil* qui m'avoit fait l'honneur d'examiner ce travail et de participer à ce jury.

Que tous ceux qui nous ont aidés de près ou de loin, trouvent ici l'expression de notre sincère reconnaissance.



Liste des Tableaux

<i>Tableau 1</i>	Les principaux anthelminthiques gastro-intestinaux
<i>Tableau 2</i>	Les Paramètres physicochimiques et pharmacocinétiques du lévamisole
<i>Tableau 3</i>	Les paramètres optimaux pour la validation
<i>Tableau 4</i>	Les Différentes injections de standard pour la précision de l'appareil
<i>Tableau 5</i>	Les données de standards d'étalonnage PA
<i>Tableau 6</i>	La Préparation de la gamme de validation par la méthode des ajouts dosés
<i>Tableau 7</i>	Les données de standards de validation (CQ1)
<i>Tableau 8</i>	Les données de standards de validation (CQ 2)
<i>Tableau 9</i>	Les résultats statistique au prés de chaque modèle généré
<i>Tableau 10</i>	Les Concentration retrouvée par la prédiction inverse (CQ1)
<i>Tableau 11</i>	Les Concentration retrouvée par la prédiction inverse (CQ2)
<i>Tableau 12</i>	L'Etude statistique de la justesse par niveau de concentration (CQ1)
<i>Tableau 13</i>	L'Etude statistique de la fidélité par niveau de concentration (CQ1)
<i>Tableau 14</i>	La Construction de profil d'exactitude (CQ1)
<i>Tableau 15</i>	L'Estimation des différentes incertitudes relatives pour chaque niveau de concentration, à travers l'utilisation du modèle de régression linéaire (CQ1)
<i>Tableau 16</i>	L'Etude statistique de la justesse par niveau de concentration (CQ2)
<i>Tableau 17</i>	L'Etude statistique de la fidélité par niveau de concentration (CQ2)
<i>Tableau 18</i>	La Construction de profil d'exactitude (CQ2)
<i>Tableau 19</i>	L'Estimation des différentes incertitudes relatives pour chaque niveau de concentration, à travers l'utilisation du modèle de régression linéaire (CQ 2)
<i>Tableau 20</i>	Concentration du PA dans deux médicaments différents
<i>Tableau 21</i>	Surfaces mesurées pour les deux médicaments CQ1 et CQ2



Liste des figures

<i>Figure 1</i>	Organigramme de la DPIV
<i>Figure 2</i>	Une pompe HPLC de type Perkin Elmer
<i>Figure 3</i>	Un injecteur HPLC de type Perkin Elmer
<i>Figure 4</i>	Une colonne HPLC de type Perkin Elmer
<i>Figure 5</i>	Détecteur UV HPLC de type Perkin Elmer
<i>Figure 6</i>	Les Chromatogramme de principe actif seul
<i>Figure 7</i>	Chromatogramme de la forme reconstitué pour deux principes actifs
<i>Figure 8</i>	Chromatogramme de la phase mobile
<i>Figure 9</i>	Profil d'exactitude de CQ1
<i>Figure 10</i>	Profil d'exactitude de CQ2



Liste des Abréviations

ONSSA	Office National de Sécurité Sanitaire et produit Alimentaire
DPIV	Division de la pharmacie et des Intrants Vétérinaire
HPLC	Chromatographie en phase liquide à haute performance
OIE	Organisation Mondiale de la santé animale
AMM	Autorisation de Mise sur le Marché
AHs	Anthelminthiques
Std	Standard
Ech	Echantillon
FDA	Food and Drug Administration
UV	Ultra-Violet
FR	Forme Reconstitué
PA	Principe Actif
SM	Solution mère
CQ	Contrôle de qualité
CV	Coefficient de Variation
pH	Potentiel d'Hydrogène
Ae	Air de l'échantillon
As	Air de standard
Pe	Poids d'échantillon
Ps	Poids de standard
T	Titre de Références
F	Facteur de dillution



SOMMAIRE

Introduction

Présentation de la Division de la Pharmacie et des Intrants Vétérinaire

Partie I : Synthèse Bibliographique

I-Généralité sur les médicaments vétérinaire.....	10
I-1 le Principe Fondamentale d'un médicament:.....	12
I-2 Quelques Définition d'un médicament vétérinaire :.....	12
I-3 -Les Anthelminthiques :.....	13
I-4 Le Lévamisole:.....	15
I-4-1 Définition Général du Lévamisole.....	15
II-Chromatographie en phase liquide à haute performance.....	15
1. Définition :.....	17
III-Validation Analytique :.....	19
III.1 Généralité sur la validation.....	17

Partie II : Synthèse Experimental

I-Introduction.....	24
II-Matériel et Réactifs :.....	25
II-1Verrerie :.....	25
II-2Appareillage :.....	25
II-3 Réactifs :.....	25
III-Les Conditions chromatographique :.....	26
IV-Validation dela méthode de dosage de Lévamisole par HPLC.....	26
IV-1 Pré-Validation :.....	27
1-Sélectivité :.....	27
2- Etude de la Précision de l'Appareil :.....	28
IV-2 Validation Analytique:.....	29
1. Préparation de la Gamme de Standard d'étalonnage:.....	29
2.Préparation de la Gamme de validation (Ajouts dosée).....	28
3.Fonction de Réponse.....	31
4. Prédiction inverse :.....	33
5. Etude de la fidélité et la justesse pour chaque échantillon :.....	35
6 Intervalle de tolérance et profil d'exactitude.....	36
conclusion.....	41
Référence.....	42



Introduction

La prévention et le contrôle appropriés des maladies animales reposent d'abord sur des politiques de bonne gouvernance vétérinaire. Ces politiques doivent comporter en tant que socle de base une législation inspirée des normes de l'OIE mais aussi les moyens de la faire appliquer, notamment par des services vétérinaires s'appuyant sur leurs composantes publiques et privées dont le partenariat a été parfaitement défini.

La nature de ce partenariat inclut bien des aspects, mais l'un des plus importants relève des conditions d'utilisation des produits vétérinaires par les vétérinaires privés et par les autres acteurs concernés par la santé animale⁽¹⁾.

Rappelons que la lutte contre les ennemis de la santé et du bien-être des animaux que sont les bactéries, les virus, les parasites et autres pathogènes ne peut se passer du recours à l'usage éclairé de médicaments, de vaccins et autres produits vétérinaires qui agissent sur la santé des animaux, que ceux-ci soient destinés à la production, aux loisirs ou à la compagnie des hommes.

Le contrôle des produits vétérinaires commence par l'adoption légale des définitions des différents produits utilisés (vaccins, antibiotiques, désinfectants, vitamines, antiparasitaires etc.) et des conditions de leur importation ou de leur fabrication s'ils sont élaborés dans le pays. C'est pourquoi les produits vétérinaires font l'objet d'un enregistrement officiel avant toute autorisation de commercialisation.

Actuellement toutes les activités avicoles sont conditionnées par l'obtention d'une autorisation d'exercer auprès des services vétérinaires provinciaux relevant de l'ONSSA.

Les travaux de laboratoire consistent à effectuer des tests galéniques et organoleptiques, à identifier et à doser les principes actifs par technique chromatographique HPLC, de chaque échantillon reçu.

Ce travail fait partie des activités de la DPIV, service du contrôle et des expertises, section chimie. Il porte sur la mise au point et la validation d'une méthode d'analyse de lévamisole, il comprend deux parties :

- Une partie bibliographique, rapportant les études et la littérature relatives au lévamisole.
- Une partie expérimentale, où on présente la validation par la méthode HPLC.



Présentation de la Division de la pharmacie et desintrants vétérinaire (DPIV):

La division de la pharmacie et des intrants vétérinaires est rattaché à la direction des services vétérinaires de l'ONSSA.

Elle comprend deux services :

- ✓ Le service de l'enregistrement et des inspections
- ✓ Le service du contrôle et des expertises

Le service du contrôle et des expertises est un service public rattaché à la division de la pharmacie et des intrants vétérinaires de la direction des services vétérinaires de l'ONSSA. Ses principales missions et attributions sont :

- L'expertise analytique et microbiologique des médicaments vétérinaires, y compris les vaccins, les produits biocides d'élevage et des additifs de l'alimentation animale.
- Analyse des résidus de médicaments vétérinaires dans les denrées animales et d'origine animale.
- Contribution aux travaux de recherches dans le domaine de la pharmacie vétérinaire et de la recherche des résidus de médicaments vétérinaires.
- Le diagnostic de certaines maladies animales (rage). (2)

Missions de la section chimie:

- Le contrôle analytique du médicament vétérinaire (antiparasitaire, antibiotique, vaccins...).
- La recherche des résidus de médicaments vétérinaires dans les denrées animales d'origine animale.

Organigramme :

La division de la pharmacie et des intrants vétérinaires se répartit comme indiqué dans la figure n°1 :

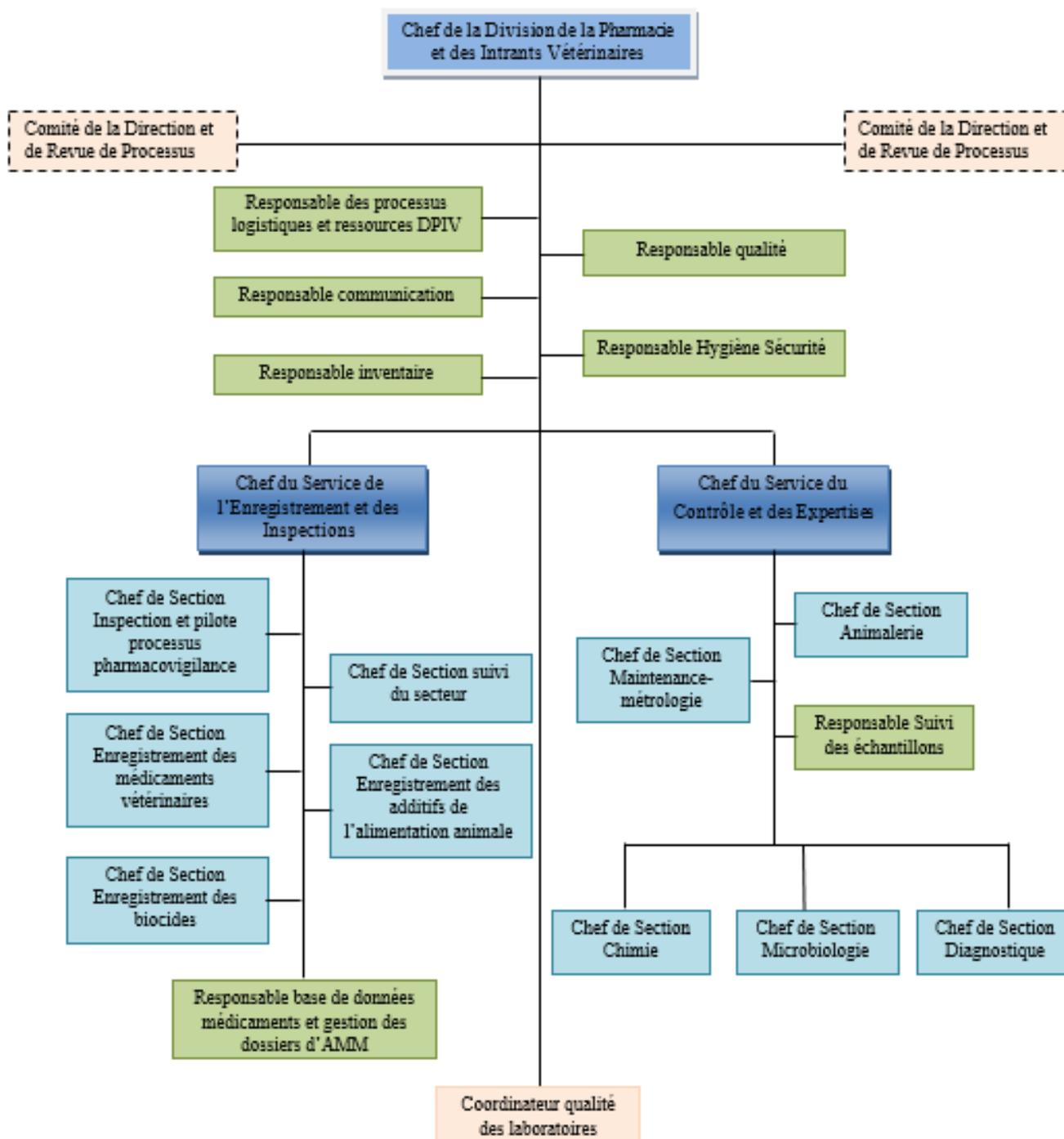


Figure 1 : Organigramme de la DPIV



Partie I : Synthèse Bibliographique



I-Généralités sur les médicaments vétérinaires :

I-1 le Principe Fondamentale d'un médicament:

Le médicament est un objet social très particulier. L'accès aux médicaments fait partie des droits de la personne à la santé. Le droit d'accès aux médicaments est l'un des facteurs principaux du développement social. Le médicament constitue une composante importante l'offre de soins. Sa disponibilité est fondamentale pour les soins de santé.

L'accessibilité au médicament est un élément déterminant et stratégique de toute politique de santé, donc de toute politique pharmaceutique nationale. Les politiques pharmaceutiques doivent garantir et promouvoir cette accessibilité.⁽³⁾

I-2 Quelques Définition d'un médicament vétérinaire :

La définition générale du médicament est commune au médicament humain et vétérinaire. « C'est toute substance ou composition possédant des propriétés curatives ou préventives à l'égard des maladies humaines ou animales, ainsi que toute substance ou composition pouvant être utilisée chez l'homme ou chez l'animal ou pouvant leur être administrée, en vue d'établir un diagnostic médical ou de restaurer, corriger ou modifier leurs fonctions physiologiques en exerçant une action pharmacologique, immunologique ou métabolique »⁽⁴⁾.

Les médicaments vétérinaires ne peuvent donc être utilisés qu'après avoir reçu une autorisation de mise sur le marché (AMM). Cette autorisation ne peut être délivrée par les services compétents qu'après une étude approfondie du dossier accompagnée d'une analyse des produits soumis à autorisation.

Le médicament vétérinaire est composé d'un ou plusieurs excipients et d'un ou de plusieurs principes actifs qui sont considérés comme une molécule qui possède les propriétés pharmacologiques responsables de l'effet thérapeutique du médicament, alors que l'excipient désigne l'ensemble des substances qui accueillent le principe actif, permettent la mise en forme du médicament, la protection du principe actif et sa libération dans l'organisme. Ainsi, à matière active identique, l'excipient fait la différence dans l'activité du médicament.

Chaque médicament vétérinaire possède une activité (ou plusieurs) appropriée, et une efficacité contre certaines maladies, on trouve parmi les médicaments les plus utilisés : les antibiotiques prenant l'exemple de l'enrofloxacin, les anticoccidiens contre la coccidiose, ou les anthelminthiques qui font l'objet de ce projet.



I-3 -Les Anthelminthiques :

L'Anthelminthique (AH) idéal peut être défini comme un traitement multivalent, non-toxique et rapidement éliminé par l'hôte, facile d'administration et d'un coût raisonnable. Pendant de nombreuses années, les Anthelminthiques de synthèse se sont avérés efficaces. (5)

Un Anthelminthique est un médicament antiparasitaire, ce mot désigne spécifiquement les médicaments luttant contre les helminthoses, c'est-à-dire détruisant les helminthes (chez l'homme, l'animal ou la plante), mais il désigne en réalité plus souvent les antiparasitaires ciblant les nématodes et trématodes susceptibles de parasiter les réseaux sanguin et lymphatique, des tissus conjonctifs ou des organes creux (cavités urogénitales, poumons avec parasite hématoophage des poumons des oiseaux), ainsi que tous les parasites intestinaux de type vers (oxyures, ascaris, lumbricoïdes chez l'Homme), ankylostome, anguillule et ténia en particulier). (6)

Les anthelminthiques désignent une classe de médicaments indiqués dans le traitement d'infections d'origine parasitaire provoquées par des vers, les helminthes et ils peuvent être définies aussi comme un traitement multivalent, non toxique. Leur action consiste à expulser les helminthes de l'organisme en les endormant ou en les détruisant.

Par extension, les anthelminthiques sont utilisés pour traiter toutes les infections parasitaires intestinales telles que l'oxyurose, l'anguillulose ou l'ascaridiose.

Les AHs sont regroupés en différentes familles selon leur mode d'action. En médecine Vétérinaire, trois grandes familles dites « à large spectre » sont utilisées chez les ruminants :

- Les Benzimidazoles et pro-benzimidazoles.
- Les imidazothiazoles et tétrahydropyrimidine.
- Les lactones macrocycliques.

Très récemment, une nouvelle molécule a été développée (le monepantel) qui représente le précurseur d'une quatrième famille, actuellement en voie de commercialisation (7).



Tableau 1 : Principaux anthelminthiques gastro –intestinaux⁽⁸⁾

Principale famille chimiques	Nom Générique	Mode d'action
Benzimidazoles	Thiabendazole	Action sur le métabolisme Energétique par inhibition de la fumarate réductase Mort des parasites cible
	Fenbendazole	
	Oxfendazole	
	Albendazole	
Probenzimidazoles	Fébantel	
Imidazothiazoles	Tétramisole	Cholinomimétiques: Paralyse des vers ciblé
	Lévamisole	
Tetrahydropyrimidis	Morentel	
Salicylanides Et Nitrophénols	Rafoxanide	Découpleurs de la phosphorylation oxydative: Paralyse des vers cibles
	Nitroxinil	
	Closantel	
Avermectines	Ivermectine	GABA Antagoniste: Paralyse des parasites cibles
	Doramectine	



I-4 Le Lévamisole:

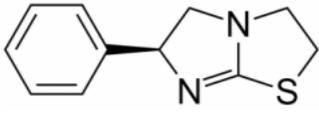
I-4-1 Définition Général du Lévamisole

Le Lévamisole est un anthelminthique de la famille des imidazothiazoles doué d'une grande activité sur les formes larvaires et adultes des strongles gastro-intestinaux et pulmonaires. Le mode d'action du Lévamisole est lié à une paralysie musculaire des parasites. Il est bien absorbé par voie orale, et il diffuse bien dans tous les tissus ce qui lui permet d'atteindre les nématodes pulmonaires. (9)

Son utilisation en médecine vétérinaire est généralement sous forme de chlorhydrate de lévamisole par exemple sous forme d'Ergamisol. Récemment, il a aussi été utilisé chez les aquariophiles pour traiter les poissons tropicaux contre certaines infestations par des vers Camallanus

Ce principe Actif à large spectre utilisé depuis longtemps chez les bovins, les ovins, les porcins et la volaille. Lors du premier examen de cette substance, l'effet indésirable le Plus grave était une agranulocytose chez l'homme. (10)

Tableau 2: Les Paramètres physico-chimiques et pharmacocinétiques du lévamisole⁽¹¹⁾

Paramètres	Commentaires
Substance	Lévamisole
Structure	
Nomenclature	(S)-6-Phenyl-2,3,5,6-tetrahydroimidazo[2,1- b][1,3]thiazole
Formule Brute	$C_{11}H_{12}N_2S$
Masse Molaire	204,292g/mol
Température de fusion	228°C
Caractéristique physiques	Poudre cristalline pratiquement inodore, blanc à blanc cassé
Caractéristique chimique	Imidazothiazoles, levo-isomère du Tétramisole
Absorption	Rapidement absorbé par le tractus gastro-intestinal

Comme la plupart des médicaments, ce produit est toxique au-delà d'une certaine dose, mais sa toxicité peut être renforcée dans certaines conditions.

Quand il est utilisé seul et comme médicament (et en cas de surdosage), des effets secondaires et indésirables ont été signalés :

- douleurs abdominales
- douleurs musculaires
- nausées
- vomissements

II-Chromatographie en Phase Liquide à Haute Performance:

1.Définition :

La chromatographie en phase liquide à haute performance (HPLC) est une technique utilisée dans un grand nombre de domaines Analytiques, et plus particulièrement dans les domaines de l'agroalimentaire, de l'environnement, de la pharmacie et de la biologie.

Un chromatographe en phase liquide, souvent appelé **chaîne HPLC**; est constitué de quatre Modules principaux : un système de pompage, un injecteur, une colonne et un détecteur. (12)

2. Principe :

Les composés à séparer (solutés) sont mis en solution dans un solvant. Ce mélange est introduit dans la phase mobile liquide (éluant). Suivant la nature des molécules, elles interagissent plus ou moins avec la phase stationnaire dans un tube appelé colonne chromatographique. La phase mobile poussée par une pompe sous haute pression, parcourt le système chromatographique.

Le mélange à analyser est injecté puis transporté au travers du système chromatographique. Les composés en solution se répartissent alors suivant leur affinité entre la phase mobile et la phase stationnaire.

En sortie de colonne grâce à un détecteur approprié les différents solutés sont caractérisés par un pic. L'ensemble des pics enregistrés est appelé chromatogramme.

➤ Le système de pompage :

Le système de pompage est la partie du chromatographe qui permet de pomper l'éluant, d'en réguler le débit et de maintenir la pression de l'ensemble. Sur une chaîne HPLC classique le système de pompage est capable de refouler le liquide jusqu'à une pression de 400 bars. En pratique, la pression de travail est généralement comprise entre 100 et 250 bars. Un système de pompage peut être utilisé soit en mode isocratique, soit en gradient d'élution.



Figure 2 : une pompe HPLC

➤ L'injecteur:

La pression en tête de colonne étant de plusieurs dizaines de bars, il n'est pas possible d'utiliser une seringue et de percer à travers d'un septum pour injecter l'échantillon comme cela se fait en chromatographie gazeuse. Il est donc indispensable d'utiliser une boucle d'échantillonnage montée sur une vanne d'injection.



Figure3 : Injecteur HPLC

➤ La colonne :

La colonne est le cœur du système caractérisée par sa phase stationnaire, sa longueur, son diamètre et la taille de ses particules. Typiquement, une colonne HPLC a des dimensions comprises entre 5 et 30 cm pour la longueur, 1 et 4,6 mm pour le diamètre et 3 à 5 μm pour la taille des particules. Le débit de solvant est adapté en fonction du diamètre de la colonne 20 à 100 $\mu\text{L}/\text{min}$ pour une colonne de 1 mm jusqu'à 0,5 à 2 mL/min pour une colonne de 4,6 mm de diamètre.



Figure 4: Une colonne HPLC

➤ Détecteur UV:

Différents systèmes de détection sont disponibles en chromatographie liquide. Le détecteur UV est l'un des plus utilisés en chromatographie liquide. Le principe est fondé sur la loi de Beer-Lambert, qui relie l'absorbance optique d'un composé à sa concentration. Les détecteurs de base permettent de faire la détection à une seule longueur d'onde à la fois, donc avec une radiation monochromatique. Il faut alors, préalablement à l'analyse, connaître le spectre d'absorption UV du ou des composés à analyser.



Figure5:Détecteur UV HPLC

III-Validation Analytique :

III.1 Généralité sur la Validation :

La validation d'une méthode analytique est l'opération par laquelle on s'assure que ses résultats répondent au problème de manière satisfaisante pour l'utilisateur. Elle s'efforce de détecter et contrôler les sources d'erreur possible liée à la méthode étudiée donc la définition générale est proposée par FDA : « **Valider une méthode consiste à démontrer, avec un degré de confiance élevé et sous une forme documentée, que la méthode permet d'obtenir un résultat analytique qui atteint les spécifications définies à l'avance** ». (13)

✓ Les Critères de la validation :

La décision 2002/657/EC de la Communauté Européenne détaille les techniques et la méthodologie au contrôle des médicaments vétérinaire. Elle déclare que toute méthode ou combinaison de méthodes autrement que celles décrites et validées pourrait être approuvée et utilisée comme outils de confirmation



Seulement si elle vérifie les critères de validation énoncés dans la Décision₍₁₆₎. Parmi ces critères de validation sont :

- **La Sélectivité:** Aptitude d'un système de mesure, utilisant une procédure opératoire spécifiée, à fournir des résultats de mesure pour un ou plusieurs mesurandes, qui ne dépendent pas les uns ou de toute autre grandeur existant dans le système en cours de mesurage.
- **La Spécificité:** Propriété d'une méthode d'analyse de convenir exclusivement à la détermination de la grandeur de l'analyte considéré, avec la garantie que le signal mesuré provient seulement de l'analyte.
- **La Linéarité:** d'une procédure d'analyse est sa capacité à prédire des concentrations retrouvées proportionnelles aux concentrations théoriques d'une série d'échantillons.
- **La Justesse :** d'une méthode exprime l'étroitesse de l'accord entre la valeur qui est acceptés soit comme vraie valeur, soit comme référence, et la valeur trouvée.
- **La Fidélité :** peut être évaluée à trois niveaux :
 - **La répétabilité :** exprime la fidélité sous des conditions opératoires Identiques et sur un court intervalle de temps.
 - **La fidélité intermédiaire :** exprime les variations intra-laboratoires : jours différents, analyses différents, équipements différents.
 - **la reproductibilité:** exprime la fidélité inter-laboratoire.
- **L'exactitude :** d'une méthode combine justesse et fidélité d'un mesurage est exprimée par l'intervalle de tolérance.
- **La limite d'acceptabilité :** d'une méthode sert à chiffrer ses objectifs .Il s'agit d'une valeur seule globale exprimée le plus souvent sous forme de pourcentage fixée de préférence par l'utilisateur du résultat.
- **L'incertitude :** est un paramètre associé au résultat d'une mesure qui caractérise la dispersion des valeurs que l'on peut raisonnablement attribuer à un mesurage.
- **L'intervalle de tolérance:** est l'intervalle dans lequel on s'attend à avoir une Proportion($\beta\%$) des futurs résultats conformes.
- **Le profil d'exactitude :** est la combinaison, sous la forme d'un graphique, de plusieurs intervalles de tolérance calculée à différents niveaux de concentration et d'une limite d'acceptabilité. Son but est d'estimer, à partir des résultats obtenus lors de la validation, quelle garantie aura l'utilisateur que la méthode utilisée en routine fournira des résultats acceptables.



- **Limite de quantification** : est la plus petite quantité de l'analyse dans un échantillon pouvant être dosée dans les conditions expérimentale décrites avec une exactitude définie.

✓ La validation par l'approche de l'erreur totale :

Les approches classiques fondées sur les tests d'hypothèse utilisent séparément les deux erreurs, aléatoires et systématique, pour la prise de décision .Elle sont en trois types à savoir approche descriptive, approche de différences et approche d'équivalence. Ces approches classiques de Validation qui sont largement appliqués se servent d'un nombre colossal de tests statistiques gênants.

A côté de ses approches classiques, une approche basée sur le concept de l'erreur totale proposant un outil graphique de prise de décision à la fois pratique et visuel, nommé profil d'exactitude.

Le profil d'exactitude construit à partir des intervalles de tolérance, permet donc, de décider de la capacité ou non d'une méthode analytique à fournir des résultats dans les limites d'acceptation.

La méthode de validation reposant sur le concept de l'erreur totale en combinant les deux erreurs, aléatoire et systématique, présente plusieurs avantages par rapport aux approches classiques :

- Elle est considérée comme une approche globale qui peut être appliquée quelque soit le domaine d'activité et la matrice étudiée.
- Cette approche propose une méthode d'interprétation graphique très simple et visuelle qui ne s'embarrasse pas de tests statistique toujours délicats à décrypter. Son objectif est de servir les analystes plutôt que de les transformer en statisticiens.
- Elle permet de minimiser considérablement le risque d'accepter une procédure qui ne serait pas suffisamment exacte ou, au contraire.
- Elle permet non seulement de simplifier l'approche de validation d'une procédure mais aussi l'estimation de l'incertitude de mesure sur la base des données de validation.
- Elle permet de générer différents modèles d'étalonnage et possibilité de choisir le plus adéquat pour calculer, par la prédiction inverse, la concentration en retour.

✓ Le calcul Statistique des différents paramètres :

✚ Le calcul de la fidélité :

La Fidélité fournit une indication sur les erreurs due au hasard. Elle a été estimée en calculant la répétabilité et la fidélité intermédiaire à chaque niveau de concentration utilisé en validation.

Pour le calcul des variances inter-série et intra-série, il suffit de réaliser une analyse de la variance « one-waybalanced ANOVA » pour chaque niveau de concentration.

La variance intra-série ($S^2_{w,j}$) s'estime comme suit :

$$\text{Si } CM_{\text{intra-série}} < CM_{\text{inter-série}} \text{ alors } S^2_{w,j} = CM_{\text{intra-série}} ; \text{ sinon } S^2_{w,j} = CM_{\text{total}} \quad \text{Eq(1)}$$



La variance inter-série ($S^2_{B,j}$) se calcul par :

$$\text{Si } CM_{\text{intra-série}} < CM_{\text{inter-série}} \text{ alors } S^2_{B,j} = (CM_{\text{intra-série}} - CM_{\text{inter-série}}) / n \quad \text{Eq(2)}$$

L'estimation de la variance intra-série donne une estimation de la variance de répétabilité tandis que la somme d'estimations des variances intra et inter-série donne une estimation de la variance de la fidélité intermédiaire :

Variance de Répétabilité : $S^2_{\text{rép}} = CM_{\text{intra groupe}} = S^2_{\text{intra-série}}$ Eq (3)

Variance de Fidélité intermédiaire : $S^2_{\text{FI}} = S^2_{\text{inter-série}} + S^2_{\text{intra-série}}$ Eq(4)

✚ Le calcul de la justesse :

La justesse ou le Biais fournit une indication sur les erreurs systématique de la procédure analytique et obtenu en calculant la différence entre la moyenne arithmétique des concentrations introduites et la moyenne des concentrations calculées. Le biais peut s'exprimer en terme absolu, relatif ou de recouvrement par rapport aux quantités introduites, comme suit :

Biais absolu $B_j = \bar{Z}_j - \bar{X}_j$ Eq(5)

Biais relatif $B_j(\%) = \frac{\bar{Z}_j - \bar{X}_j}{\bar{X}_j} * 100$ Eq(6)

Recouvrement $R_j(\%) = \frac{\bar{Z}_j}{\bar{X}_j} * 100$ Eq(7)

✚ Le calcul des intervalles de tolérance :

Ce qui nous importe en validation, n'est pas la validité des résultats obtenus avec l'erreur totale, mais plutôt la garantie ou une représentation de ce que la même procédure analytique pourra donner comme résultats dans le futur, c'est le rôle de l'intervalle de tolérance.

L'intervalle de tolérance sera calculé pour chaque niveau de concentration envisagé avec les standards de validation .Pratiquement, l'intervalle de tolérance se calcule comme suit :

$$U_j = \text{Biais } \% + Q_t(V, \frac{1+\beta}{2}) * \sqrt{(1 + (\frac{1}{pn * B_j^2})) * CV_{\text{FI}}} \quad \text{Eq(8)}$$

$$L_j = \text{Biais } \% - Q_t(V, \frac{1+\beta}{2}) * \sqrt{(1 + (\frac{1}{pn * B_j^2})) * CV_{\text{FI}}} \quad \text{Eq(9)}$$



Avec :

$$R_j = \frac{S^2 B_j}{S^2 w_j} \quad B_j = \sqrt{\frac{R_j + 1}{n R_j}} \quad V = \frac{(R_j + 1)^2}{\left(\frac{R_j + 1}{n}\right)^2 + \frac{1 - \frac{1}{n}}{p n}}$$

Eq(10)



Eq(11)



Eq(12)

$Q_t(V, \frac{1+\beta}{2})$ est le quantile β de la distribution t de student à V degrés de liberté.

Le calcul de l'incertitude :

Afin que les résultats fournis soient valablement interprétés, il faut qu'ils soient fiables : c'est-à-dire que leur incertitude de mesure soit connue. En utilisant les résultats de validation et la formule développée, on a pu calculer l'incertitude de mesure à chaque niveau de concentration.

L'incertitude de mesurandes Z est calculée de la manière suivante :

$$u_i(Z) = \frac{U_j - L_j}{2t} \quad \text{Eq(13)}$$



Avec

U_j : intervalle de tolérance haute

L_j : intervalle de tolérance basse

t : loi de student de ddl V

La construction du profil d'exactitude:

La stratégie d'interprétation de ce graphique est décrite en détail par Max Feinberg. Cependant, d'une part, les limites d'acceptabilité, d'autre part, la proportion β qui sert à calculer les intervalles de tolérance dépendent strictement du contexte d'utilisation de la méthode et doivent être adaptés à chaque cas. Sur le profil d'exactitude, dans le domaine de validité, délimité par les traits verticaux discontinus, la méthode est capable de produire une proportion moyenne attendue de résultats égale à β .

Comprises entre les limites d'acceptabilité : la méthode est dite valide dans ce domaine. Le domaine d'application représente le domaine initialement choisi pour conduire la validation.

D'une manière générale, pour être en cohérence avec les modèles statistiques utilisés, il faut disposer de répétitions effectuées sous condition de fidélité intermédiaire ou de reproductibilité sur des échantillons homogènes.



Partie II : Synthèse Expérimentale



I-Introduction :

Le lévamisole est un principe actif utilisé dans différents médicaments, son mode de dosage fait par la chromatographie en phase liquide à haute performance. Mais avant de mettre la méthode de dosage en application de routine, il faut d'abord chercher les paramètres optimaux de ce mode ainsi de faire une validation par le profil d'exactitude pour vérifier la capacité de notre méthode à donner suffisamment des résultats fiables et reproductibles.

II-Matériel et Réactifs :

II-1 Verrerie :

La verrerie est commune à celle utilisée dans le laboratoire de contrôle des médicaments vétérinaires. Elle est composée entre des micropipettes, de fioles jaugées de classe A, et des éprouvettes graduées de différentes capacités.

II-2 Appareillage :

Les principaux appareils utilisés sont:

- ✓ Une chaîne HPLC (High Performance Liquid Chromatography) de type Perkin Elmer ;
- ✓ Une balance analytique ;
- ✓ Un pH-mètre ;
- ✓ Un Agitateur Vortex ;
- ✓ Un bain ultrason.

II-3 Réactifs :

Les réactifs utilisés sont de type HPLC conformes aux standards de qualité reconnus :

- ✓ Acide Sulfurique 1N ;
- ✓ Acétonitrile (ACN) ;
- ✓ Eau ultra pure.

III-Mise au point de la méthode HPLC :

Il s'agit d'une étape de développement de la méthode sélectionnée, afin d'optimiser les différents paramètres du protocole opératoire pour les adapter à la matrice des échantillons qui seront dosés ainsi qu'aux conditions opératoires de la méthode.



Nous avons effectué plusieurs essais pour trouver les meilleures conditions à savoir la longueur d'onde, la composition de la phase mobile, le volume d'injection et le débit. Donc, nous avons procédé à la sélection de la longueur d'onde à 214 nm, et un débit qui est fixé à 1ml/min. Le volume d'injection est 10µl. Le débit d'élution choisi est de 1ml/min, car il permet d'obtenir un temps de rétention adéquat et une pression correcte au niveau de la pompe.

III-1 les Conditions chromatographique :

Après la mise au point de la méthode on a constaté que les conditions convenable pour obtenir des bonnes résultats sont regroupés dans le tableau 3 :

Tableau 3 : les paramètres optimaux pour la validation

La Longueur d'onde (nm)	214
Le débit (ml/min)	1
Colonne	Nucléosil C18 5 µm, 250mm
Volume d'injection (µl)	10
La phase mobile	50% eau ; 50% Acétonitrile
pH de la phase mobile	2,6 avec H₂SO₄

IV-Validation de la Méthode de Dosage deLévamisole par HPLC :

D'un point de vue pratique, l'approche de validation peut se résumer aux étapes suivantes :

- Réalisation des expériences sur deux Gammes:
 - *Une gamme de Standards d'Etalonnage
 - *Une gamme de Standards de validation
- Alignement des observations (si un niveau de concentration, les quantités introduites ne sont pas identique pour toutes les séries).
- Sélection des limites d'acceptation en fonction des contraintes du secteur d'activité.
- Choix du modèle adéquat après génération de plusieurs modèles d'étalonnage.
- Calcul des concentrations en retour à partie du modèle sélectionné par prédiction inverse.
- Calcul de la justesse à chaque niveau de concentration.
- Calcul de la fidélité à chaque niveau de concentration.
- Calcul des intervalles de tolérance bilatéraux pour chaque niveau de concentration.
- Etablissement du profil d'exactitude.

IV-1 Pré-Validation :

1-Sélectivité :

La Sélectivité de la méthode d'analyse consiste à démontrer que le pic obtenu ne provient que du composé à analyser, sans aucune interférence avec les composés de la matrice (excipients, produits de dégradation, impuretés,...). Pour ce faire, la sélectivité de la méthode a été vérifiée en comparant le chromatogramme contenant que la phase mobile, un chromatogramme du principe actif seul et l'autre deux principes actifs ayant la même activité Anthelminthique (le Lévéamisole et le praziquantel)

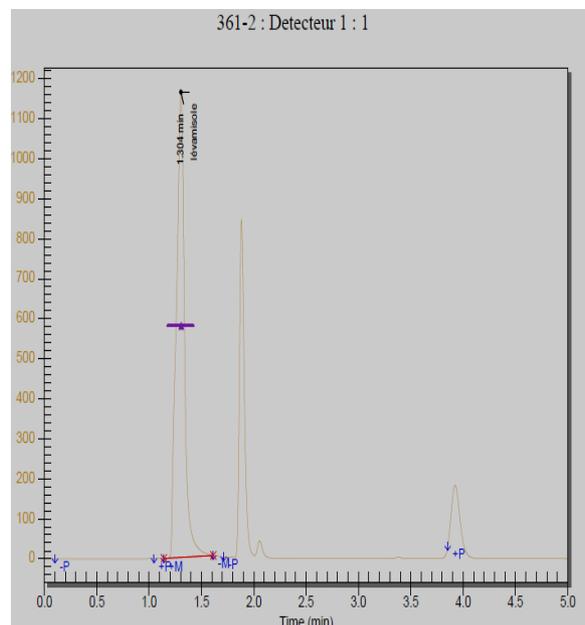
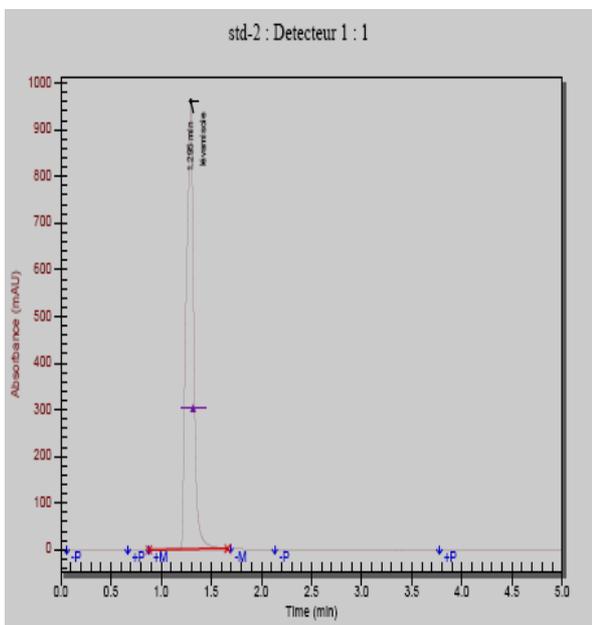


Figure 6: chromatogramme de principe actif seul **Figure 7 : chromatogramme de médicament**
Contenant Lévéamisole

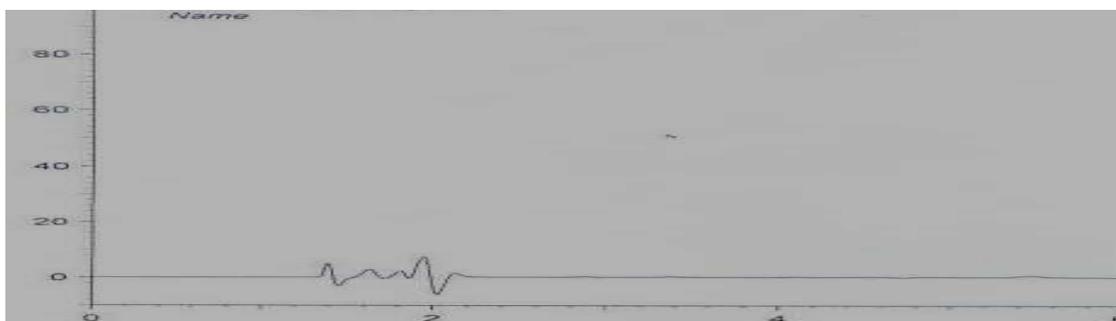


Figure 8: Chromatogramme de la phase mobile



Comme l'illustre la figure 7, aucun pic n'a été observé au temps de rétention du pic de lévamisole donc notre méthode est sélective

2- Etude de la Précision de l'Appareil :

Avant d'entamer la phase de validation de la méthode HPLC, nous avons procédé à la vérification de la précision du système HPLC.

A partir de l'injection de 7 solutions de standard, nous avons obtenu les résultats suivants :

Tableau 4 : différentes injection de Standard pour la précision de l'appareil

Standard n°	Air	Temp de rétention	Facteur de capacité	Nombre de plateaux théoriques	Facteur D'asymétrie
1	6507299 ,1	1,296	4,182	980	1,481
2	6422243,9	1,296	4,185	971	1,515
3	6405067,4	1,293	4,171	971	1,535
4	6384251 ,6	1,300	4,201	975	1,509
5	6372151,4	1,295	4,181	973	1,516
6	6380781,4	1,295	4,182	972	1,525
7	6390528,1	1,298	4,190	973	1,492
Moyenne	6408903,3	1,296	4,185	974	1,510
Ecart-type	46478,161	0,0022	0,009	3,154	0,018
CV%	0.725	0.180	0,223	0,324	1,225

D'après les résultats du tableau, on constate que le coefficient de variation(%) de tous les paramètres est inférieur à 2% et par conséquent l'appareil est précis.

Après la conformité des critères de pré-validation, on peut donc poursuivre les autres étapes de validation de l'approche totale tel que décrit précédemment.



IV-2 Validation Analytique:

1. Préparation de la Gamme de Standard d'étalonnage:

A partir des étalons secondaire, on a réalisé 3 séries de 4 niveaux de concentration, préparés indépendamment avec 3 répétitions pour chaque niveau de concentration, à raison d'une série par jour, les niveaux de concentration sont de : 50, 100, 150, et 200 µg/ml.

Les résultats d'analyse de la gamme d'étalonnage sont présentés dans le tableau 5 :

Tableau5 : tableau des données de standards d'étalonnage PA:

Niveau	Concentration (µg/ml)	Aires		
		Série 1	Série 2	Série 3
1	51	2212173,9	2175480,7	2083528,1
	51,6	2241881	2178069,8	2068937,5
	50,8	2120985,5	2196799,2	2100172,6
2	102	4496089,9	4361226,8	4466002,1
	103,2	4483594,2	4389930,3	4436513,5
	101,6	4368692,7	4043689,7	4340948,4
3	153	6744670,4	6685903,1	6759471,2
	154,8	6585228,5	6460421,8	6575406,8
	152,4	6441108,2	6342491,6	6382660,2
4	204	9101392,3	8650970,7	8759259,7
	206,4	8845745,8	8724075,8	8826643,5
	203,2	8979286,1	8337394,2	8498299

2. Préparation de la gamme de standard de validation (Ajouts dosés) :

Puisqu'on ne dispose pas des matières qui composent le médicament, on a utilisé la méthode des ajouts dosés sur 2 échantillons de doses différentes (2 CQ).

Le plan de validation est formé de p= 3 séries (jours) avec m= 5 niveaux de concentration et n= 4 répétitions par jour et par niveau.



Les deux échantillons (CQ) ayant deux concentrations différentes sont préparés comme suit :

- 1) Préparation de la solution mère (SM₁) : 1 ml de l'échantillon dissous dans 50 ml de l'eau ultra-pure.
- 2) Préparation de la solution fille par de la méthode des ajouts dosés.

Le tableau 6 montre le mode opératoire de cette préparation :

Tableau 6 : préparation de la gamme de validation par la méthode des ajouts dosés

n° de fiole (10ml)	1	2	3	4	5
Standard (SM)	0 ml	0,5 ml	1 ml	1,5 ml	2 ml
CQ1 (SM)	1 ml	1 ml	1 ml	1 ml	1 ml
CQ2 (SM)	2 ml	2 ml	2 ml	2 ml	2 ml



Les résultats d'analyse pour le CQ1 et CQ 2 sont regroupés dans le deux tableaux ci-dessous (7 et 8)

Tableau 7: Tableau des données de standards de validation PA+FR de CQ1:

Niveau	Concentration ($\mu\text{g/ml}$)	Aires		
		Série1	Série 2	Série 3
1	0	4372464,3	4321630,4	4306658,2
	0	4336480,7	4269508,7	4237959,9
	0	4335162,4	4260969,9	4227701
	0	4348035,8	4284036,3	4257439,7
2	51,5	6558444,7	6617579,8	6604227,3
	51,5	6558250,1	6569209,9	6662003,3
	51,5	6518682,9	6545208,9	6606977,5
	51,5	6545125,9	6577332,9	6624402,7
3	103	8910218,8	8848370,5	8837561,2
	103	8808484,5	8784603,5	8814731,8
	103	8797769,2	8738303,9	8809287,8
	103	8838824,2	8790426	8820526,9
4	154,5	11029486,2	11041280,4	10751896,5
	154,5	11097355,4	10894185,3	10537258
	154,5	11011502,8	10843851,8	10494910,7
	154,5	11073514,5	10926439,2	10594688,4
5	206	13332845,6	12810155,2	12729296,6
	206	13063644,6	12647485,4	12669839,1
	206	13043415,5	12632620,7	12627095,8
	206	13120830,3	12680713,7	12663331,9



Tableau 8: Tableau des données de standards de validation PA+FR de CQ 2 :

Niveau	Concentration ($\mu\text{g/ml}$)	Aires		
		Série1	Série 2	Série 3
1	0	4574569,18	4573016,6	4502378,1
	0	4501963,43	4452507,6	4433667,5
	0	4493066,83	4426515,9	4426619,2
	0	4435625,49	4453907,7	4456269,6
2	51,5	6596165,3	6388678,7	6523220,3
	51,5	6586353,1	6440551,9	6515368,7
	51,5	6697995,3	6489029,9	6621192,5
	51,5	6598869,5	6478923,5	6615896,2
3	103	8898573,6	8569130,6	8887364,6
	103	8919857,7	8664220,9	8821161,1
	103	8747285,8	8598320,7	8774464,3
	103	86486890	8598008,3	8786550,7
4	154,5	11401847,9	11083687,7	11259780,2
	154,5	11124420,4	10913124,1	102048654
	154,5	11205124,7	10559920,9	10984021,4
	154,5	11283514,5	11094118,8	11323685,9
5	206	13349803,3	13067617,3	13160416,3
	206	13385440,6	12944154,1	13126084,2
	206	13289900,3	12955426,8	13138522,2
	206	13600830,3	12959456,3	13119465,2

3. fonctions de réponse :

A la recherche du modèle le plus adéquat, à savoir celui qui nous permettra d'obtenir une garantie de résultats futures incluses dans les limites d'acceptation, nous avons généré plusieurs modèles reliant la surface et la concentration. Le tableau ci-dessous regroupe les résultats statistiques de tous les modèles générés :



Tableau 9 : les résultats statistiques au près de chaque modèle généré

Modèle Générés	Séries	intercepte	Pente	R ²
Linéaire Simple	1	-69457,348	43972,840	0,997
	2	29280,083	41848,170	0,997
	3	-56526,482	43009,231	0,998
Linéaire Quadratique	1	74459,387	11,005	0,998
	2	26612,454	1,5487	0,996
	3	-309907,120	13,3286	0,997
LogY=f (Log X)	1	10,618	1,0122	0,998
	2	10,698	0,9896	0,997
	3	10,504	1,0313	0,998
$\sqrt{Y}=f(\sqrt{X})$	1	-27,499	210,751	0,998
	2	16,816	203,668	0,997
	3	-46,587	210,309	0,998

Cependant d'après l'examen des profils construit, nous avons sélectionnée le modèle linéaire qui répond à nos attentes. Ce modèle à été sélectionné parce qu'on souhaite de retrouver des recouvrements par les niveaux le plus proche possible du 100% avec un intervalle de tolérance le plus étroit, pour avoir une méthode validé dans un domaine large.

4.Prédiction inverse

Les concentrations prédites ou concentrations retrouvées des standards de validation sont calculées en utilisant la fonction inverse du modèled'étalonnage ($Y=aX+b$)

Ces concentrations retrouvées permettent de calculer le biais, la justesse, la fidélité de chaque mesurage, et également de vérifier la linéarité de la méthode.

Les tableaux 10 et 11 représentent les concentrations retrouvées pour les deux échantillons :



Tableau10 : les concentrations retrouvées par la prédiction inverse(CQ1)

Niveau	Concentration ($\mu\text{g/ml}$)	Concentration retrouvée ($\mu\text{g/ml}$)		
		Série 1	Série 2	Série 3
1	51,5	49,712	54,863	53,420
	51,5	50,526	54,953	56,361
	51,5	49,656	54,584	55,320
	51,5	49,964	54,800	55,033
2	103	103,194	108,170	105,347
	103	101,700	107,892	106,413
	103	101,485	106,990	106,525
	103	102,126	107,684	106,095
3	154,5	151,390	160,572	149,857
	154,5	153,751	158,302	146,464
	154,5	151,830	157,303	145,717
	154,5	152,946	158,726	147,346
4	206	203,770	202,841	195,833
	206	198,467	200,199	196,048
	206	198,037	200,048	195,292
	206	199,505	200,646	195,443

Tableau 11 : les concentrations retrouvées par la prédiction inverse(CQ2)

Niveau	Concentration ($\mu\text{g/ml}$)	Concentration retrouvée ($\mu\text{g/ml}$)		
		Série 1	Série 2	Série 3
1	51,5	45,973	43,387	46,986
	51,5	47,402	47,506	48,401
	51,5	50,143	49,285	49,842
	51,5	49,195	48,390	50,213
2	103	98,333	95,490	101,954
	103	100,470	100,642	102,012
	103	96,746	99,689	101,090
	103	92,114	99,027	100,682
3	154,5	155,261	155,578	157,115
	154,5	150,603	154,382	156,253
	154,5	152,640	146,563	152,464
	154,5	155,730	158,673	159,673
4	206	199,560	202,986	201,306
	206	202,021	202,915	202,105
	206	200,051	203,806	202,558



	206	208,430	203,247	201,426
--	-----	---------	---------	---------

5. Etude de la fidélité et la justesse pour chaque échantillon :

La fidélité de la méthode est évaluée sur chaque série de validation, en utilisant les données obtenues pour les trois répétitions des niveaux de concentrations 50% ; 100% ; 150% ; 200%.

Les recouvrements entre les concentrations introduites et les concentrations retrouvées sont calculés pour les trois séries, puis une analyse statistique est effectuée sur ces résultats.

5.1 Les résultats de validation de CQ 1 :

1. La justesse :

Les résultats de la justesse sont représentés dans le tableau 12 :

Tableau 12 : Etude statistique de la justesse par niveau de concentration (CQ1)

Concentration (%)	Concentration retrouvée (%)	Recouvrement %	Biais Relatif %
50%	53,3	103,43	3,43
100%	105,3	102,24	2,24
150%	152,85	98,93	-1,07
200%	190,85	96,53	-3,47

La justesse à chaque niveau de concentration est satisfaisante, compte tenu du fait que les biais relatifs sont inférieurs à 5% pour les quatre niveaux.



2. La Fidélité :

Tableau 13:
de la fidélité par
concentration

concentration	Répétabilité (CV _r %)	Fidélité intermédiaire (CV _{FI} %)
50%	1,40	5,5
100%	0,60	2,80
150%	0,94	3.81
200%	0,9	1,66

Etude statistique
niveau de
(CQ1)

Les résultats de l'analyse statistique montrent que la méthode est fidèle pour chaque niveau de concentration, puisque coefficients de variation de répétabilité sont inférieurs à 5% et des coefficients de variation de fidélité intermédiaire ne dépasse pas 5% sauf le niveau 1 qui dépasse légèrement 5%.

3. Intervalle de tolérance et profil d'exactitude

Les limites inférieure et supérieure de l'intervalle de tolérance sont calculées pour les niveaux de concentration 50%, 100%, 150%, et 200% avec une probabilité β de 90%.

Tableau 14 : Construction de profil d'exactitude (CQ1)

concentration	Biais relatif(%)	Ecart-type de l'intervalle de tolérance S _{IT} (%)	Facteur de couverture k _{IT}	Intervalle de Tolérance basse (%)	Intervalle de Tolérance haute (%)
50%	3,43	3,36	3,22	85,11	121,75
100%	2,24	3,47	3,26	93,00	111,47
150%	-1,07	6,7	3,22	86,75	111,11
200%	-1,47	3,55	2,6	92,54	100,52

4. Construction de profil d'exactitude :

Pour construire le profil d'exactitude il faut que :

- Reporter sur l'axe horizontal, les valeurs de référence moyennes.
- Reporter sur l'axe vertical, les limites de tolérance basses relatives; les limites de tolérance hautes relatives, Les taux de recouvrement moyens; les limites d'acceptabilité basses relatives; les limites D'acceptabilités hautes relatives.
- Reporter ces données sur un graphique en utilisant les valeurs de référence moyennes pour dessiner l'axe des abscisses, comme l'illustre la figure 8

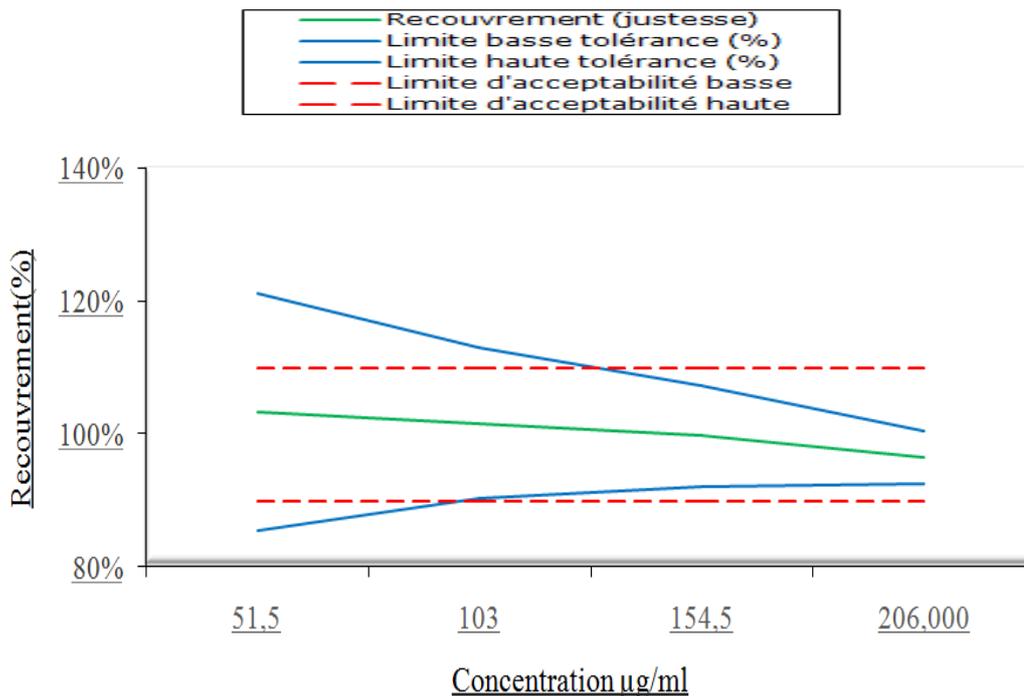


Figure 9 : Profil d'exactitude de CQ1



5. Calcul de l'incertitude

Le tableau 15 résume les valeurs de l'incertitude estimées à chaque niveau de concentration. D'après ce tableau on voit que la valeur maximale de l'incertitude ne dépasse pas la limite d'acceptation $\pm 10\%$.

Tableau 15 : Estimation des différentes incertitudes relatives pour chaque niveau de concentration, à travers l'utilisation du modèle de régression linéaire (CQ1)

Niveau	Concentration ($\mu\text{g/ml}$)	β -HTI ($\mu\text{g/ml}$)	β -BTI ($\mu\text{g/ml}$)	t-student	Incertitude-type ($\mu\text{g/ml}$)	Incertitude-élargie ($\mu\text{g/ml}$)	Incertitude-élargie relative(%)
1	51,5	62,70	43,83	2,80	3,36	6,72	12,64
2	103	114,81	95,78	2,84	3,34	6,68	6,36
3	154,5	171,6	134,03	2,80	3,70	7,4	8,76
4	206	207,06	190,62	2,30	3,55	7,1	3,52

A partir des résultats du tableau 15, les valeurs de l'incertitude à chaque niveau de concentration, on voit que la valeur maximale (12,64%) dépasse les limites d'acceptation $\pm 10\%$, par contre les niveaux 2, 3, et 4 ayant des valeurs qui ne dépassent pas 10%.



5.2 Les résultats de validation de CQ 2 :

1. La justesse :

Tableau 16 : Etude statistique de la justesse par niveau de concentration (CQ 2) :

Concentration (%)	Concentration retrouvée (%)	Recouvrement (%)	Biais relatif %
50%	48,26	93,71	-6,29
100%	99,02	96,14	-3,83
150%	154,5	100,05	0,05
200%	202,53	98,32	-1,68

La justesse par niveau de concentration est satisfaisante, compte tenu du fait que les biais relatifs sont inférieurs à $\pm 5\%$ pour les quatre niveaux sauf le niveau 1, et que le recouvrement moyenne contiennent des valeurs très proche de la valeur cible 100% sauf le niveau 1.

2. La fidélité:

Tableau 17: Etude statistique de la fidélité par niveau de concentration (CQ 2)

Concentration (%)	Répétabilité (CV%)	fidélité intermédiaire (CV _{F1} %)
50%	3,35	3,35
100%	2,47	3,11



150%	2,39	2,39
200%	2,82	2,82

Les coefficients de variation de répétabilité (qui reflète la fidélité intra-série) ainsi que les coefficients de variation de la fidélité intermédiaire (qui reflète la fidélité inter-série) pour chaque niveau de concentration ne dépassent pas 5%. Donc, des résultats sont, en effet, acceptables.

3. Intervalle de tolérance et profil d'exactitude

Tableau 18 : Construction de profil d'exactitude (CQ 2)

Concentration (%)	Biais relatif (%)	Ecart-type de l'intervalle de tolérance S_{IT} (%)	Facteur de couverture k_{IT}	Intervalle de tolérance basse (%)	Intervalle de tolérance haute (%)
50%	-6,29	1,68	1,87	87,8	99,60
100%	-3,86	3,37	2,10	89,76	102,51
150%	0,05	3,85	1,87	95,55	104,55
200%	-1,68	2,5	1,87	96,4	100,5

4. Construction du profil d'exactitude

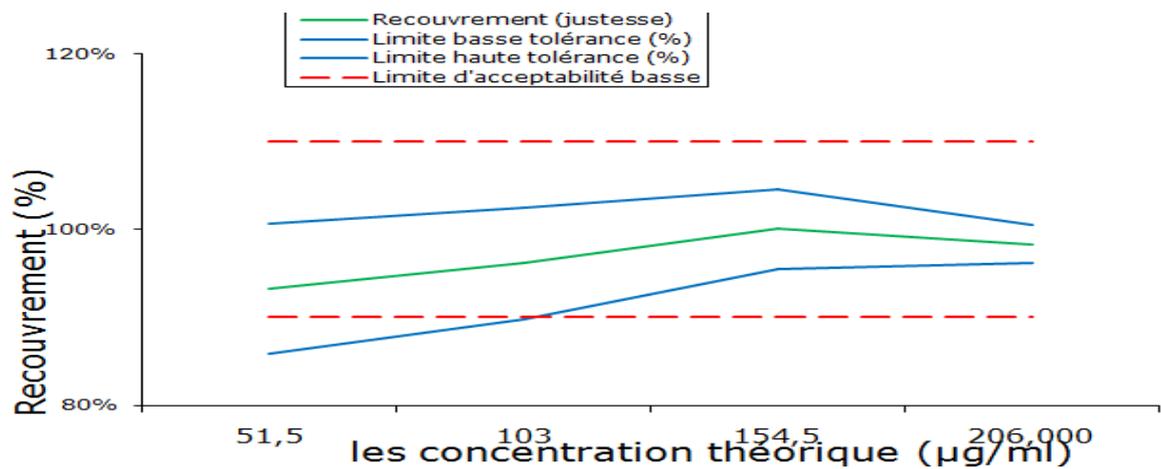


Figure10 : Profil d'exactitude de CQ2

5. Calcul de l'incertitude

Tableau 19: Estimation des différentes incertitudes relatives pour chaque niveau de concentration, à travers l'utilisation du modèle de régression linéaire (CQ 2)

Niveau	Concentration (µg/ml)	β-HTI (µg/ml)	β-BTI (µg/ml)	t-student	Incertitude-type (µg/ml)	Incertitude-élargie (µg/ml)	Incertitude élargie relative(%)
1	51,5	52,143	44,18	1,80	2,21	4,42	9,18
2	103	104,1	93,42	1,89	3,08	9,16	6,20
3	154,5	201,22	119,72	1,80	3,86	10,72	5
4	206	207,022	198,04	1,80	2,49	4,98	2,46

A partir du tableau 19, toutes les valeurs maximales sont incluses dans la limite d'acceptation $\pm 10\%$



Application de dosage d'un médicaments vétérinaire en routine

Pour faire un dosage d'un principe actif par les méthodes de routine, il faut calculer la teneur en principe actif dans un échantillon .Pour plus de détail on prend le cas de deux médicament ayant des concentrations différents qui comportent comme principe actif le lévamisole :

Tableau 20 : concentration du PA dans deux médicaments différents

Médicament1	Médicament2
5g/100ml	2,5 g /100ml

En suivant cette relation :

$$T(\%) = \frac{Ae}{As} * \frac{Ps}{Pe} * T * F$$

Avec :

- Ae : Air de l'échantillon
- As : Air du Standard
- Ps : Prise d'essai du standard
- Pe : Prise d'essai de l'échantillon
- F : Facteur de dilution
- T : Titre du standard

Tableau 21 : Surfaces mesurées pour les deux médicaments CQ1 et CQ2

	Essai	Essai 2	Essai 3	Moyenne	CV(%)
CQ 1	4372464,3	4335162,4	4365988,5	4357871,73	0,45



CQ 2	4558468,18	4498361,43	4502569,2	4519799,6	0,74
------	------------	------------	-----------	-----------	------

	Ae	As	Pe	Ps	T	F
CQ 1	4357871,73	4439911,43	1	10,3	99,9	5
CQ 2	4519799,6	4404109,47	1	10,5		2,5

Le Facteur de dilution : Dillution de l'échantillon/ Dillution de standard

Les résultats de la teneur de chaque CQ sont :

$$\underline{\underline{T(CQ1) = 0,5g/100ml}}$$

$$\underline{\underline{T(CQ 2) = 0.26 g/100ml}}$$

Conclusion

L'objectif de ce travail qui a été effectué à la Division de la pharmacie et des intrants vétérinaire est de mettre au point une méthode chromatographique qui permet le dosage delévamisole qui fait partie de la famille des Anthelminthiques.

Dans la première partie, nous avons déterminée les paramètres optimaux permettant l'analyse du Lévamisole par une méthode chromatographique HPLC avec une colonne Nucléosil C18 5µm, une phase mobile constituée d'un mélange binaire acétonitrile-eau), ajuster à un pH 2,6 (50:50 ; v/v), et un débit 1mL/ min.

Nous avons, par ailleurs, validé la méthode de dosage du lévamisole. Ainsi, nous avons pu montrer que la méthode de dosage adoptée est sélective, exacte, fidèle, juste et linéaire. Cette méthode validée est appliquée pour le dosage de lévamisole dans la forme pharmaceutique avec un excellent taux de recouvrement.

Par ailleurs, l'incertitude de mesure, calculée à partir des résultats de validation, a montré que les résultats sont très satisfaisants pour les deux échantillons sauf pour le premier niveau qui n'est pas inclus dans les limites d'acceptation.

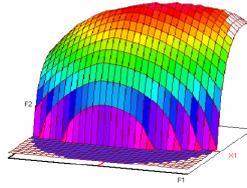


Référence

- (1) Organisation Mondial de la santé animal OIE/ Bernard Vallat
- (2) <http://www.onssa.gov.ma/fr/index.php>
- (3) Santé médecine.net/juillet 2014
- (4) Comité mixte FAO/OMS d'experts des additifs alimentaires – JECFA/ Manuel de procédure du codex : la commission du codex alimentarius <http://www.fao.org/fao-who-codexalimentarius/standards/vetdrugs/glossary/fr/> Consulté le 09-03-2016
- (5) Propriétés anthelminthiques du sainfoin (*Onobrychisviciifoliae*) : Analyse des facteurs de variations et du rôle des composés phénoliques impliqués/ Foteini MANOLARAKI le 21 Janvier 2011
- (6) Santé médecine.net/juillet 2014
- (7) Propriétés anthelminthiques du sainfoin (*Onobrychisviciifoliae*) : Analyse des facteurs de variations et du rôle des composés phénoliques impliqués/ Foteini MANOLARAKI le 21 Janvier 2011
- (8) http://www.agrimaroc.net/btt_168.pdf
- (9) La réglementation des médicaments dans l'union européenne
- (10) Propriétés anthelminthiques du sainfoin (*Onobrychisviciifoliae*) : Analyse des facteurs de variations et du rôle des composés phénoliques impliqués/ Foteini MANOLARAKI le 21 Janvier 2011
- (11) Pierre-André Dubé, B. Pharm., M. Sc., pharmacien/ Direction de la santé environnementale et de la toxicologie, Institut national de santé publique du Québec



-
- (12) développement de méthodes physico-chimiques pour le contrôle de la médication par l'harpagophytum et l'eleutherococcus, principes actifs utilisés en phytothérapie équine/ cyril colas le 19 décembre 2006
- (13) Cour de Validation analytique, Master CAC 2016 B. IHSSANE & T. SAFFAJ



Master ST CAC Ageq

Mémoire de fin d'études pour l'obtention du Diplôme de Master Sciences et Techniques

Nom et prénom: ILHAM AANOUIZ

Année Universitaire : 2015/2016

Titre: **La validation de la méthode de quantification de lévamisole par HPLC dans les formes médicamenteuse vétérinaire**

Résumé

On s'intéresse dans le présent travail à la validation par l'approche du profil d'exactitude d'une méthode de dosage d'un Anthelminthique, leLévamisol par Chromatographie Liquide Haute Performance à phase inversé couplée à un détecteur UV. Dans la première partie, nous avons déterminée les paramètres optimaux permettant une analyse adéquate du Lévamisole par HPLC/perkin Elmer avec une colonne de type Nucléosil C18 5 μ m, une phase mobile constituée d'un mélangeacétonitrile-eau à pH 2.6 (50:50v/v), à un débit de 1mL/min. Nous avons par ailleurs validé la méthode de dosage du lévamisole Ainsi, nous avons pu montrer que la méthode de dosage adoptée est spécifique, exacte, et linéaire entre 103 μ g mL⁻¹ et 206 μ g /mL. Cette méthode validée est appliquée pour le dosage d'une forme pharmaceutique le lévamisoleavec un excellent taux de recouvrement.

Mots clés: 5 mots au maximum

Validation analytique ; profil d'exactitude ; approche totale ; HPLC ; Lévamisole