

Master Sciences et Techniques CAC Agiq
Chimiométrie et Analyse Chimique : Application à la gestion industrielle
de la qualité

MEMOIRE DE FIN D'ETUDES

Pour l'Obtention du Diplôme de Master Sciences et Techniques

Validation analytique et Calcul d'incertitude selon l'approche GUM
d'une méthode chromatographique de dosage de Métopimazine
dans une forme pharmaceutique

Présenté par:

Hasnaa HAIDARA

Encadré par:

Mr M. ELGUEZZAR (COOPER PHARMA)

Pr B. IHSSANE (FST Fès)

Soutenu le 19 Juin 2013 devant le jury composé de:

Pr B. IHSSANE

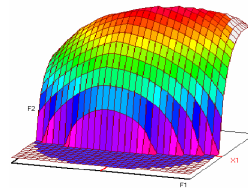
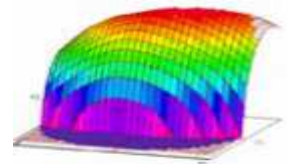
Pr E. M. EL HADRAMI

Pr F. KHALIL

Mr M. ELGUEZZAR

Stage effectué à :





Master ST CAC Agiq

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

Nom et prénom: HAIDARA Hasnaa

Année Universitaire : 2012/2013

Titre: *Validation analytique et Calcul d'incertitude selon l'approche GUM d'une méthode chromatographique de dosage de Métopimazine dans une forme pharmaceutique.*

Résumé

La validation est l'étape ultime du développement d'une méthode analytique capable de fournir des résultats qui soient valablement interprétés et donc utilisés à bon escient. Afin que ces résultats soient fiables, il est préférable que leur incertitude soit connue. A cet effet, une méthode chromatographique de dosage de la **Métopimazine** dans une forme pharmaceutique a été sujette de la validation analytique en respectant les normes et les contextes réglementaires. Dans ce même contexte, nous avons calculé l'incertitude de la dite méthode associée à la teneur en Métopimazine et ceci en appliquant l'approche de GUM.

L'étude statistique a permis de montrer que la méthode du dosage de Métopimazine est validée dans l'intervalle de concentration étudié [0,12 ; 0,28] et la valeur de l'incertitude calculée se trouve incluse dans la limite d'acceptation $\pm 5\%$. Ce qui révèle que la méthode analytique peut être utilisée comme méthode de routine au sein de laboratoire COOPER-PHARMA.

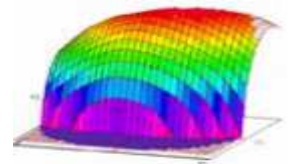
Mots clés: validation analytique, calcul d'incertitude, HPLC, Métopimazine, Approche de GUM.

Sommaire

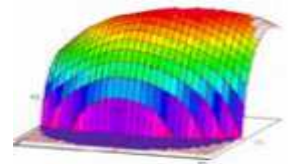
Introduction.....

..1

1^{ere} partie : partie bibliographique



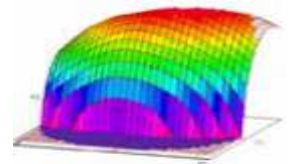
I. Présentation	de	laboratoire	Cooper-
Pharma			2
II. Généralité	sur	la	méthode
analytique			3
1. Définition	de	la	méthode
analytique.....			3
2. Choix	de	la	méthode
analytique.....			3
3. Cycle	de	de	la
de vie de la			méthode
analytique.....			4
III. Généralités	sur	la	validation
analytique			6
1.			
Définition.....			6
2.	Objectif	de	la
validation			analytique.....
analytique.....			6
3.	Critères	de	la
validation			analytique
analytique.....			6
4.	Différents	Approches	de
la			validation
analytique.....			7
4.1.			Approche
descriptive.....			7
4.			2.
Approche de différence.....			8
4.3.			
Approche d'équivalence.....			9
4.4.		Approche de	profil
d'exactitude.....			9
IV. Incertitude			de
mesure			11



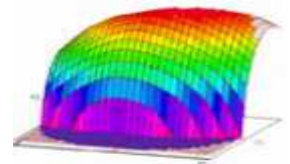
1. Concept d'incertitude.....	11
2. Différentes approches de mesure de l'incertitude.....	11
2.1. Approche de GUM (Bottom-up).....	11
2.2. Approche Inter-laboratoire (Top-Down).....	11
2.3. Approche basée sur les données de la validation.....	12
3. Démarche de la méthode de GUM.....	12
3.1. Composantes de l'incertitude.....	12
3.2. Spécification du mesurande.....	14
3.3. Identification des sources d'incertitude.....	14
3.4. Quantification de l'incertitude.....	15
3.5. Incertitude-type.....	15
3.6. Incertitude composée.....	15
3.7. Incertitude élargie.....	15

2^{eme} partie : Partie expérimentale

I. Protocole de validation analytique de la méthode du dosage de Métopimazine



dans	une	solution
injectable.....		17
1. Présentation de Principe Actif	de	17
dosage.....		17
2. Matériels.....		17
3. Méthodes.....		18
4. méthode de Validation du dosage de la Métopimazine dans une solution injectable		19
5. Bilan de la validation analytique de la méthode du dosage de Métopimazine.....		21
6. Conclusion.....		30
II. Calcul de l'incertitude de la méthode de dosage du Métopimazine.....		31
1. Spécification		31
mesurande.....		31
2. Identification et analyse des sources de l'incertitude.....		32
3. Quantification des composantes de l'incertitude.....		36
4. Calcul de l'incertitude composée.....		38
5. Calcul de l'incertitude élargie et présentation du résultat.....		40
Conclusion générale.....		41



Références

bibliographiques	42
Annexe :Chromatogrammes de Dosage de la Métopimazine dans une solution injectable.	
1. Fidélité	
.....	44
2. Linéarité et Justesse (PAS)	
.....	45
3. Linéarité et Justesse (FPR).....	46

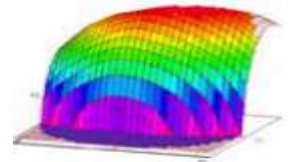
Introduction :

L'industrie pharmaceutique marocaine est connue par son efficacité et sa performance dans l'économie nationale, l'industrie du médicament compte quelques 38 laboratoires pharmaceutiques avec 4.6 milliards de dirhams de chiffre d'affaire en 2003 (équivalent à 1 milliard 'euros). Le Maroc avec l'Afrique du sud sont les deux seuls pays à avoir une industrie pharmaceutique au point et d'un certain niveau.

Le contexte industriel actuel impose à de nombreuses entreprises de démontrer que l'ensemble des procédés et des méthodes utilisées dans l'évaluation d'un produit manufacturé conduisent effectivement au résultat recherchés; l'industrie pharmaceutique n'échappe pas à cette règle et les laboratoires sont tenus de prouver que les méthodes d'analyse employées sont parfaitement valides et fiables.

A cet égard, la validation des procédures analytiques quantitatives est largement réponde dans ce domaine d'activité où des mesures sont réalisées. Le champ d'application de la validation analytique s'étend à toute procédure d'analyse utilisée dans le contrôle de la matière première, le contrôle en cours de fabrication, le contrôle des produits intermédiaires et finis et les essais de stabilité de tous les produits pharmaceutiques. Son exigence est avant tout une pratique réglementaire.

Dans ce contexte, ce stage réalisé au sein de laboratoire COOPER-PHARMA vise à valider une méthode analytique pour le dosage de la Métopimazine dans une solution injectable et à calculer l'incertitude de la dite méthode par la proche de GUM.



Le présent travail sera subdivisé en deux parties, la première est consacrée à une présentation générale du laboratoire pharmaceutique COOPER-PHARMA, puis à un aperçu sur la validation analytique; ces critères et ces approches. Finalement un rappel sur le concept de l'incertitude et les approches utilisées pour sa mesure est donné.

La deuxième partie s'attache, tout d'abord à vérifier les critères pour valider la méthode chromatographique de dosage du principe actif « METOPIMAZINE » dans une solution injectable en utilisant une approche classique de la validation, finissant par la présentation du calcul de l'incertitude de la méthode de dosage du Métopimazine selon la méthode de GUM.

I. Présentation de laboratoire COOPER-PHARMA:

1. Historique de COOPER-PHARMA:

Cooper-Pharma, au départ filiale de Cooper Melun France, a été créée en **1933** sous le nom de Cooper Maroc pour vocation initiale la distribution au Maroc de médicaments importés de différents laboratoires internationaux. Par la suite, ces partenaires ont demandé à Cooper-Pharma de fabriquer des spécialités pharmaceutiques pour leur compte.

Dès les années **1960**, Cooper Pharma est devenu fabricant et distributeur de médicaments et a acquis une expertise dans la production pharmaceutique aux côtés des leaders mondiaux du secteur.

En **1980**, il y'a eu création d'une nouvelle unité de fabrication à Tit Mellil.

Dès le début des années **1990**, le savoir faire et les capacités de production de Cooper-Pharma lui ont permis de démarrer les exportations vers les pays voisins, à savoir l'Algérie et la Libye.

En **1999** ils ont obtenus la certification ISO 9002 du site de production et une activité qui s'étendra, dès les années **2000**, à l'Europe et à l'Afrique de l'ouest.

En **2010** : Cooper Maroc devient Cooper Pharma.

2. Présentation des services de production :

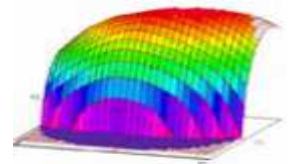
Le site industriel à Tit Mellil s'étend sur une surface de 20000 m² dont 12500 m² couverts extensibles avec une maîtrise totale du traitement de l'air et de l'eau en conformité avec les BPF européennes, 1500 m² pour le département qualité 3000 m² pour la production et 5000 m² pour les magasins.

Secteur I :

Forme solide : poudre, comprimés simples et pelliculés et gélules.

Forme pâteux : pommades, crème et suppositoires.

Secteur II :



Forme liquide : solution, sirops, suspensions et ampoules buvables.

Forme injectables : ampoule une pointe, solutions phases aqueuses et huileuses.

Laboratoire de contrôle :

Laboratoire physico-chimique.

Laboratoire de microbiologie.

II. Généralités sur La méthode analytique

1. Définition de la méthode analytique

La méthode d'analyse consiste à décrire chacune de ses étapes, indissociables les unes des autres, en précisant pour chacune d'elles les opérations élémentaires qu'il faut réaliser. [1]

La description de méthode soumise doit comprendre les points suivants :

- La définition de l'analyte
- L'appareillage
- Les réactifs (y compris la pureté ainsi que tous les détails sur la pureté des étalons).
- La procédure analytique y compris le traitement des échantillons, la purification...
- La procédure pour le calcul des résultats à partir des données brutes [2].

2. Choix de la méthode analytique :

Le choix d'une méthode d'analyse constitue en tant que tel un Problème analytique qu'il va falloir résoudre en empruntant la démarche de l'analyste, ce qui veut dire bien poser le problème au départ et le traduire en termes d'analyse(s) qu'il faudra réaliser. [1]

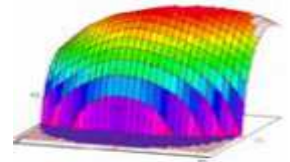
 *Le choix d'une méthode analytique dépend des critères suivants:*

Prise en compte de l'échantillon à analyser

- Nature de l'échantillon (liquide, solide...).
- Homogène, hétérogène.
- Quantité d'échantillons disponible (analyse destructive ou non).
- Eventualité d'effets matrice du à l'échantillon (et à la technique choisie).

Prise en compte des molécules recherchées et de la qualité du résultat attendu

- Notion de limite de détection (espèce cible majoritaire ou minoritaire)
- Niveau de présence (traces en mg, ...)



- Précision et exactitude du résultat
- **Prise en compte de la notion du cout de la méthode**
- Analyse ponctuel ou systématique
- Temps d'analyse (délais à respecter)
- Cout (temps personnel, consommables, appareillages) [3]

3. Cycle de vie de la méthode analytique :

Afin de comprendre le rôle et la place de la validation dans la vie d'une méthode d'analyse, il est intéressant de décrire son cycle de vie depuis le moment où elle est choisie jusqu'au moment où on l'abandonne. [4]

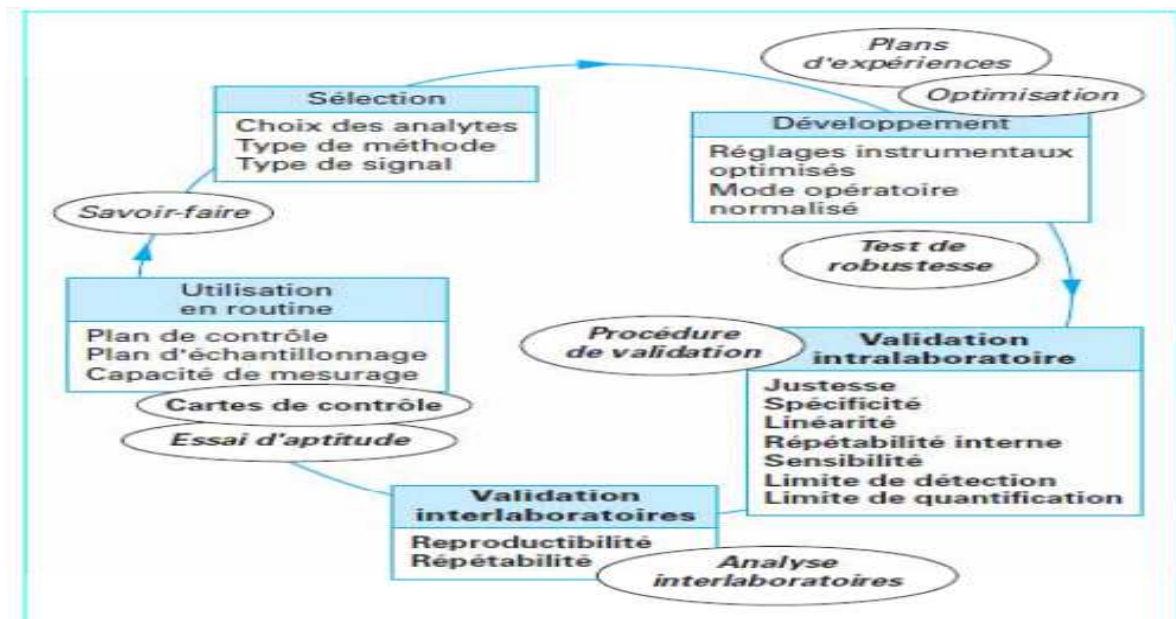
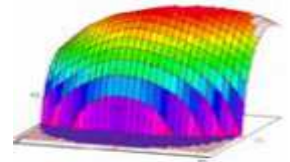


Figure 1 : Cycle de vie d'une méthode analytique [4]

4.1. Sélection d'une méthode :

L'étape de la sélection est critique pour un analyste. En effet, étant le point de départ d'une méthode, c'est d'elle que dépendent les autres étapes et plus particulièrement les décisions qui seront prises. De ce fait, elle nécessite de bien cerner la problématique en vue de définir clairement les objectifs pour proposer des solutions appropriées, matérialisées en termes de conditions opératoires, et pour éviter la perte de temps, de réactifs et d'argent, d'où la nécessité



d'une bonne expertise de l'analyste qui devra s'appuyer sur un maximum d'*a priori*, d'informations pertinentes . [5]

3.2. Développement analytique :

La réalisation de cette phase peut se faire au moyen ou non d'un plan d'expériences selon la problématique définie lors de l'étape de la sélection.

3.2.1. Méthodologie des plans d'expériences :

Les plans d'expériences font partie de la chimométrie. L'objectif poursuivi est de fournir à l'analyste, moyennant un nombre d'expériences restreint, un maximum d'informations pertinente pouvant expliquer certains effets, informations susceptibles de ne pas être obtenues par la méthodologie classique univariée.

Puisque dans la méthodologie des plans d'expériences, tous les facteurs sont étudiés simultanément, la stratégie consiste à réaliser les expériences de manière programmée et raisonnée en faisant varier les niveaux de tous les facteurs à la fois toute en utilisant des outils mathématiques combinés aux outils statistiques pour expliquer les phénomènes observés.[5]

3.2.2. Modélisation :

Sans une modélisation, les plans d'expériences n'ont aucune valeur informative ni exploitable. La modélisation permet d'exprimer la relation entre, d'une part, la réponse (Y) qui le plus souvent, est un paramètre de performance de la méthode analytique et, d'autre part, les facteurs à étudier ($X_1, X_2, X_3 \dots X_p$). Le choix du modèle (premier ou second degré) dépendra des objectifs poursuivis, du nombre de facteurs considérés ainsi que du nombre de niveaux à tester par facteurs.

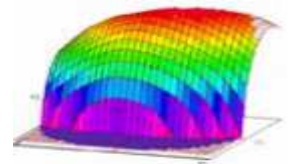
L'équation ci-dessous est un exemple de modèle appliqué sur la base d'une régression linéaire multiple pour p facteurs: [5]

$$Y = \beta_0 + \sum_{i=1}^p \beta_1 X_1 + \sum_{j=1}^p \sum_{k=1}^p \beta_{jk} X_j X_k + \varepsilon \quad ; \quad \varepsilon : \text{étant l'erreur résiduelle.}$$

3.2.3. Optimisation : [5]

L'une des applications des plans d'expériences correspond au criblage dans un domaine expérimental fixé, de tous les facteurs potentiellement influents, y compris ceux qui ne semblent ne jouer qu'un rôle mineur. Les plans expérimentaux appropriés dans ce cas sont des plans factoriels complets ou fractionnaires à deux niveaux. Les facteurs ayant une influence réellement significative étant identifiés, leur optimisation peut ensuite être envisagée. Elle consiste en la sélection parmi la multiplicité de solutions potentielles, de la meilleure solution par rapport à des critères bien définis.

3.3 La validation d'une méthode :



Dans la pratique courante, après l'étape d'optimisation, il devient de plus en plus évident et essentiel de démontrer au moyen de la validation analytique qu'une méthode optimisée correspond à l'usage attendu tout en fournissant, par ailleurs, des résultats fiables et exacts.[5]

3.4 Utilisation en routine :

Enfin, lors de l'utilisation en routine de la méthode, il faudra mettre en œuvre des outils de contrôle de la qualité. On sait qu'un grand principe méthodologique du contrôle de qualité est la MSP. Il conduit à l'établissement de cartes de contrôle et concerne la fidélité. Mais, il existe aussi une autre technique pour maîtriser la justesse qui consiste, pour le laboratoire, à participer à un test d'aptitude aussi appelé essai d'aptitude ou test de compétence. Cette méthode sera évoquée à propos des différentes analyses inter-laboratoires. [4]

III. Généralités sur la validation analytique :

1. Définition de la validation d'une méthode d'analyse :

Selon la norme ISO/IEC 17025 : La validation se définit comme la « confirmation par l'examen et l'apport de preuves objectives du fait que les prescriptions particulières en vue de l'utilisation prévue déterminée sont remplies ». [4]

2. Objectif de la validation analytique :

L'objectif de la validation est de :

- donner des garanties quant à l'aptitude de la méthode analytique à quantifier le plus exactement possible chacune des quantités inconnues que le laboratoire aura à quantifier à l'avenir. [5]
- s'assurer qu'une méthode analytique donnée donnera des résultats suffisamment fiables et reproductibles, compte tenu du but de l'analyse. Il faut donc définir correctement à la fois les conditions dans lesquelles la méthode sera utilisée et le but dans lequel elle sera employée. [6]

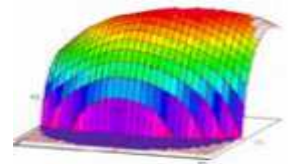
3. Critères de la validation analytique :

Les critères de validation sont ceux couramment utilisés dans les procédures analytiques. Il s'agit de la sélectivité, de la justesse, de la Fidélité (répétabilité et fidélité intermédiaire) et de la linéarité. [5]

3.1 Sélectivité :

Cette caractéristique est étudiée en premier lieu. En effet, elle permet de vérifier que le signal mesuré correspond bien à l'analyte recherché.

A cet égard, la sélectivité d'une méthode désigne dans quelle mesure cette méthode permet de doser un (des analyte(s) particulier(s) dans un mélange complexe sans qu'il y ait d'interférence avec les autres composants présents dans le mélange. [7]



3.2 Linéarité :

La linéarité d'une méthode d'analyse est sa capacité de donner des résultats qui sont directement (à l'intérieur de certaines limites) proportionnels à la concentration de la substance analysée dans un échantillon. [7]

3.3 Justesse :

La justesse 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. La justesse doit être vérifiée dans le domaine d'utilisation de la méthode d'analyse. [7]

3.4 Fidélité :

La fidélité d'une méthode correspond au degré d'accord entre les résultats des mesures obtenues par l'analyse individuelle de plusieurs prélèvements d'un même échantillon homogène, prélevés dans des conditions prescrites. La fidélité peut s'évaluer à trois niveaux :

- { Répétabilité
- { Fidélité intermédiaire
- { Reproductibilité

La fidélité est généralement exprimée par la variance, l'écart-type ou le coefficient de variation d'un ensemble de mesures.[7]

- Répétabilité :

La répétabilité est une expression de la fidélité de l'analyse lorsque celle-ci est reprise dans les mêmes conditions de réalisations, après un court intervalle de temps. La répétabilité est aussi désignée fidélité intra- analyse. [7]

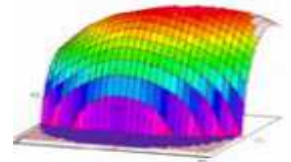
Condition de répétabilité : condition de mesurage dans un ensemble de conditions qui comprennent la même procédure de mesure, le mêmes opérateur, le même lieu, ainsi que les mesurages répétés sur le même objet ou des objets similaires pendant une courte période de temps. [7]

- Fidélité intermédiaire :

La fidélité intermédiaire correspond aux variations survenant dans un même laboratoire : analyses effectuées pendant des jours différents, par des personnes différentes, au moyen d'appareils différents, etc. [7]

- Reproductibilité :

La reproductibilité correspond à la concordance entre laboratoires.



condition de reproductibilité : condition de mesurage dans un ensemble de conditions qui comprennent des lieux, des opérateurs et des systèmes de mesure différents, ainsi que des mesurage répétés sur le même objet ou des objets similaires.[8]

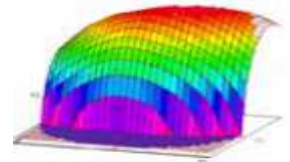
4. Différents Approches de la validation analytique :

Quatre approches statistiques conventionnelles existent pour évaluer les critères de la validation:

4.1 Approche descriptive :

L'approche descriptive utilise seulement des estimations des paramètres statistiques :
Le biais et la fidélité intermédiaire.

Les valeurs estimées de chaque critère sont calculées à chaque niveau de concentration des standards de validation et sont comparées aux limites d'acceptation fixées à priori.



Les limites d'acceptation rencontrées dans l'industrie pharmaceutique pour des méthodes de dosages de principes actifs dans des produits finis sont:

- ❖ $\pm 2 \%$ pour le biais relatif
- ❖ 3% pour le CV_{FI}

Cela signifie que si le biais estimé est inclus dans l'intervalle de $[-2 \%, +2 \%]$, la justesse de la méthode pour le niveau de concentration étudié est acceptée.

Pour le critère de fidélité, si le CV_{FI} est plus petit que 3% , la fidélité de la méthode pour le niveau de concentration étudié est acceptée. [9]

4.2 Approche de différence :

L'approche de différence est basée sur le test d'hypothèse. Ce test est composé de deux hypothèses à savoir l'hypothèse nulle H_0 et l'hypothèse alternative H_1 .

Le critère de justesse (ou le biais de la méthode) est évalué en utilisant un test bilatéral de student dont les hypothèses nulles et alternatives sont données ci-dessous. Ceci peut être vérifié en comparant l'intervalle de confiance à 95% du biais global estimé à la valeur 0% de biais relatif.

Hypothèse nulle :

H_0 : biais = 0 ou biais relatif = 0% ou recouvrement = 100%

Hypothèse alternative :

H_1 : biais $\neq 0$ ou biais relatif $\neq 0 \%$ ou recouvrement $\neq 100 \%$

Avec : $biais = X_i - \mu_t$, $biais\ relatif = \left(\frac{X_i - \mu_t}{\mu_t}\right) * 100$ et le recouvrement = $\left(\frac{X_i}{\mu_t}\right) * 100$

Si cet intervalle contient 0% de biais, la justesse de méthode est acceptée. Sinon, elle devrait être rejetée comme illustré dans la Figure n°2. [9]

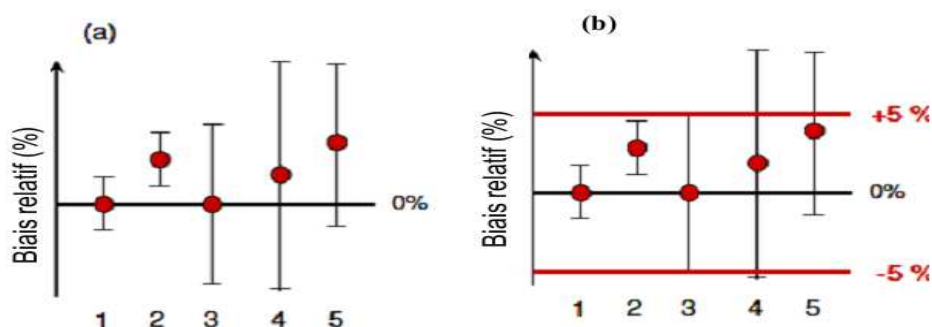
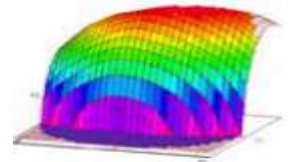


Figure 2: Les règles de décisions de validité des méthodes analytiques pour 5 situations Différentes (1 à 5) selon le biais relatif de la méthode ; (a) l'approche de différence du biais relatif, (b) l'approche d'équivalence du biais relatif avec les limites de décision fixées à $\pm 5\%$.



4.3 Approche d'équivalence :

L'approche d'équivalence diffère des précédentes par le fait qu'au lieu de vérifier si le biais relatif estimé ou le CV_{FI} estimé est inclus dans les limites d'acceptation, elle vérifie si la vraie valeur de ces paramètres est incluse dans leurs limites d'acceptation respectives, cela pour chaque niveau de concentration des standards de validation étudiés comme le montre la Figure n°2 .

Cela consiste à comparer des intervalles de confiance des paramètres étudiés aux limites d'acceptations.

Pour le critère de justesse, l'intervalle de confiance à 95 % du biais relatif est calculé pour chaque niveau de concentration et comparé par exemple aux limites d'acceptation de $\pm 2\%$.

L'hypothèse statistique de ce test est maintenant :

$$H_{01} : \text{Biais relatif} \leq \Delta \quad \text{vs} \quad H_{11} : \text{biais relatif} > \Delta$$

$$H_{02} : \text{Biais relatif} \geq \Delta \quad \text{vs} \quad H_{12} : \text{biais relatif} < \Delta$$

Où $\Delta(\%)$ est la limite de décision, à savoir la différence maximale tolérée pour le biais relatif de la méthode (par exemple 2%).

Comme illustré par les deux lignes horizontales représentant les limites de décision de $\pm 5\%$ au niveau de la Figure n°2, la règle de décision a changé. Avec cette nouvelle règle, les procédures 4 et 5 sont rejetées, alors que la procédure 2 est maintenant considérée comme valide.

Pour le critère de Fidélité, c'est la limite supérieure de l'intervalle de confiance à 95% du CV_{FI} qui est comparé par exemple, à la limite de 3% et qui doit être plus petite que cette valeur maximale. [9]

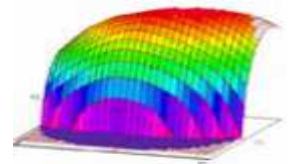
4.4 Approche de l'erreur totale ou du profil d'exactitude :

A côté de ces approches classiques, une approche originale, basée sur le profil d'exactitude en utilisant les intervalles de tolérance statistique et l'erreur totale de mesure comme outil de décision unique a été proposée. Face à la disponibilité de ces différentes approches, il est du devoir de l'analyste de choisir l'approche la plus appropriée.

Toutefois, cette dernière approche, basée sur la construction du profil d'exactitude, est une règle de décision, à la fois pratique et visuelle. Elle repose sur l'intégration des limites de tolérances dans des limites d'acceptation ($\pm\lambda$).

Le profil d'exactitude, construit à partir des intervalles de tolérance permet donc, comme illustré dans la Figure n° 3, de décider de la capacité ou non d'une procédure à fournir des résultats dans les limites d'acceptation. La zone en grisé montre l'intervalle de dosage dans lequel la procédure est capable de quantifier avec une exactitude connue et un risque fixé par l'analyste.

C'est ainsi que dans ces conditions, si l'analyste est prêt à assumer par exemple un risque de 5%, il pourra au terme de la validation de sa procédure garantir que 95 fois sur 100 les futures



mesures fournies par celle-ci seront comprises dans les limites d'acceptation fixées en fonction des contraintes de son secteur d'activité (ex: 1% ou 2% sur les matières premières, 5% sur les spécialités pharmaceutiques, 15% en bioanalyse, environnement, etc).

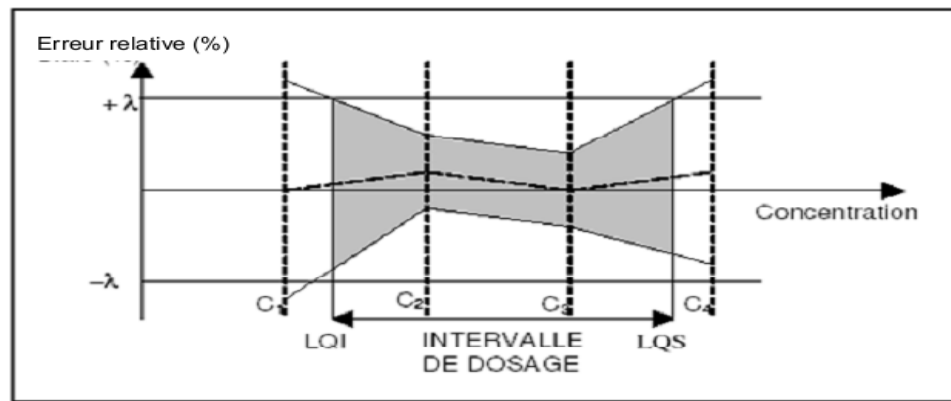
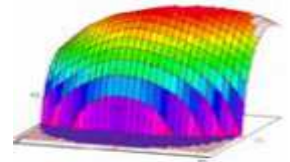


Figure 3: Illustration du profil d'exactitude comme outil de décision.

Comme les vraies valeurs de biais et de fidélité de la procédure sont inconnues, le profil d'exactitude par niveau de concentration (C_1, C_2, \dots) s'obtient en calculant l'intervalle de tolérance qui permet d'évaluer la probabilité d'obtenir des résultats futurs dans des limites d'acceptation et ce, à partir des estimations disponibles du biais et de la fidélité de la procédure après la phase de validation au niveau de concentration en question. A noter que les estimations du biais et de la variance sont des éléments essentiels pour calculer les intervalles de tolérance, mais la décision n'est pas faite sur la base de ces estimations de biais et de variance. [9]



VI. Incertitude de mesure :

1. Concept d'incertitude :

Le but d'une mesure analytique est d'attribuer une valeur au mesurande, le mesurande dans le vocabulaire de métrologie étant la grandeur que l'on cherche à mesurer.

Les aléas de tout processus de mesure nous conduisent à « estimer » les mesurandes et à leur attribuer la valeur en laquelle nous avons le plus confiance. [10]

Si l'on admet cela, alors la définition du terme incertitude sera « *un Paramètre qui caractérise la dispersion des valeurs qui pourrait raisonnablement être attribuées à la grandeur mesurée.* [11]

2. Les différentes approches de mesure de l'incertitude :

Le laboratoire d'analyse face à la question de la validation des méthodes et à l'estimation de l'incertitude des résultats se trouve face à deux situations possibles : soit l'approche intra-laboratoire avec une démarche analytique qui lui permet d'évaluer l'incertitude du résultat de mesure en combinant toutes les sources d'incertitude, soit une approche collective inter-laboratoire, si la méthode de mesure est aussi pratiquée par d'autres collègues

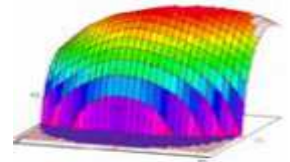
2.1. Approche de GUM (Bottom-up)

L'approche de GUM consiste à l'identification et la quantification des sources importantes d'incertitude. On rappelle que la procédure décrite dans la norme ISO dénommée « Guide pour l'expression de l'incertitude (GUM) » comporte 4 étapes principales :

- Identification des facteurs d'influence qui ont une action sur le résultat de l'analyse et prise en compte de ces facteurs pour la construction de modèle mathématique.
- Evaluation de l'incertitude des différentes grandeurs d'entrée du modèle à l'aide de méthodes de type A et de méthodes de type B.
- Application de la loi de propagation de l'incertitude pour évaluer l'incertitude sur le résultat en fonction de l'incertitude de différentes grandeurs d'entrée du modèle.
- Evaluation d'une incertitude élargie. [12]

2.2 Approche Inter-laboratoires (Top-Down) :

Dans les approches collectives, on utilise les résultats d'essais inter-laboratoires. En fait il existe plusieurs types d'essais inter-laboratoires : les essais qui contribuent à l'évaluation d'un laboratoire (essais d'aptitude), et les essais qui servent à déterminer les performances d'une méthode selon la norme ISO 5725. [13]



L'approche inter-laboratoire se subdivise aussi en deux approches :

- *Approche « performance de la méthode »*

Il s'agit d'utiliser les valeurs de fidélité (répétabilité / reproductibilité) d'une méthode publiées à l'issue d'une comparaison inter-laboratoire, où tous les laboratoires mettent en œuvre la même méthode.

Elle est utilisée dans le cas où des méthodes sont normalisées et qu'elle contient des résultats d'une comparaison inter-laboratoire. Dans ce cas-là, le laboratoire déterminera l'incertitude de sa méthode en comparant ses résultats à ceux publiés dans la norme.

- *Approche « essais d'aptitude »*

Cette approche consiste à utiliser les résultats d'inter-comparaisons pour déterminer la performance d'un laboratoire.

Ce dernier doit réaliser une mesure avec un échantillon de référence.

Un organisme se charge de toute la logistique pour que la comparaison inter-laboratoire se déroule dans les mêmes conditions pour les différents laboratoires. [14]

2.3 Approche basée sur les données de la validation :

En considérant la nouvelle stratégie de la validation basée sur le profil d'exactitude, les données issues de la validation peuvent servir pour l'estimation de l'incertitude de mesure. L'incertitude dérivée à partir de la variance utilisée pour construire les limites de l'intervalle de tolérance est calculée comme suit :

$$\sigma_{Tot}^2 = \left[\sqrt{1 + \frac{1}{pnB^2}} \hat{\sigma}_M \right]^2 \quad \text{avec } B = \sqrt{\frac{A+1}{nA+1}}, \quad A = \frac{\hat{\sigma}_B^2}{\hat{\sigma}_W^2}.$$

Le terme $\hat{\sigma}_M^2$ est la variance totale estimée ou la fidélité intermédiaire, $\hat{\sigma}_B^2$ la variance inter-série et $\hat{\sigma}_W^2$ la variance intra-série, n le nombre de répétitions et p le nombre de séries. *Feinberg et coll* ont démontré que σ_{tot}^2 est égal à l'incertitude des mesures. [5]

3. Démarche de la méthode de GUM :

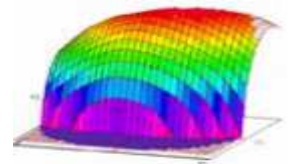
3.1 Composantes de l'incertitude :

- **L'incertitude de type A :**

On suppose dans ce cas que la grandeur X est estimée à partir d'une série statistique.

On notera (x_1, x_2, \dots, x_n) un n -échantillon de la grandeur X , où X_i représente la valeur de la variable aléatoire associée à la $i^{\text{ème}}$ mesure de la grandeur X .

Le nombre $S^2(X) = \frac{1}{n-1} \times (\sum (x_i - \bar{x})^2)$ est la « meilleure » estimation de la variance de X notée $\sigma^2(X)$.



L'écart-type expérimental de la moyenne $s_{\bar{x}}$ est utilisé comme estimation de l'incertitude de la moyenne X , noté incertitude-type. [15]

• **L'incertitude de type B :**

Lorsque l'estimation d'une grandeur X ne peut être obtenue à partir des observations répétées, la Variance estimée $u^2(x)$ ou l'incertitude-type $u(x)$ sont évaluées par un jugement fondé sur des lois de probabilité supposées a priori.

Des exemples de lois utilisées dans les calculs d'incertitude ainsi que les incertitudes-types correspondantes sont présentés si dessous :

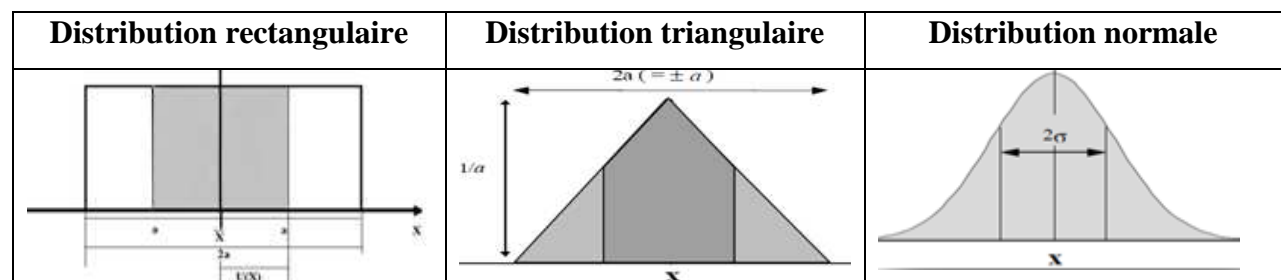


Figure 4 : Différentes types de fonctions de distribution

-La Distribution rectangulaire est utilisée quand :

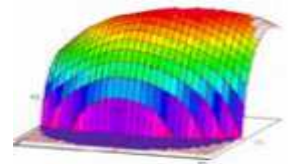
- Un certificat ou autre spécification donne des limites sans spécifier le niveau de confiance (par exemple 25 ml \pm 0.05ml).
- Une estimation est faite sous la forme d'un intervalle maximum ($\pm a$) sans connaître la forme de la distribution. L'incertitude dans ce cas est égal à : $u(X) = \frac{a}{\sqrt{3}}$

-la Distribution triangulaire est Utilisée quand :

- Les informations disponibles sur x sont moins limitées que pour une distribution rectangulaire. Des valeurs proches de X sont plus probables que celle situées près des bornes.
- Une estimation est établie sous la forme d'un intervalle maximum ($\pm a$) décrit à l'aide d'une distribution symétrique.

L'incertitude dans ce cas est égal à : $u(X) = \frac{a}{\sqrt{6}}$ [15]

La Distribution normale :



A utiliser quand	Incertitude
une estimation est faite à partir des observations répétées d'un processus variant de manière aléatoire	$u(X) = S$
une incertitude est donnée sous la forme d'un écart-type S, d'un écart type relatif S/x ou d'un écart type % CV sans spécifier la distribution.	$u(X) = S$ $u(X) = x \cdot \left(\frac{S}{\bar{x}}\right)$ $u(X) = \left(\frac{CV\%}{100}\right) \cdot x$
une incertitude est donnée sous la forme d'un intervalle de confiance à 95% ou autre ($\pm c$) sans spécification sur la distribution.	$u(X) = \frac{c}{2}$ (pour IC à 95%) $u(X) = \frac{c}{3}$ (pour IC à 99.7%)

Tableau 1 : différentes cas de la distribution normale

3.2 Spécification du Mesurande :

Dans le contexte de l'estimation de l'incertitude la « *spécification du mesurande* » exige d'établir clairement et sans ambiguïté ce qui va être mesuré et de donner une expression quantitative reliant la valeur du mesurande aux paramètres dont il dépend.

Dans les mesures analytiques, il est particulièrement important de distinguer les mesures qui vont produire des résultats indépendants de la méthode utilisée.

Des résultats qui dépendent de la méthode sont souvent observés lorsque les mesures sont effectuées par des méthodes conventionnelles. [7]

3.3 Identification des sources d'incertitude :

A cette étape le but principal est d'avoir une vision parfaitement claire de toutes les sources qui doivent être pris en compte.

Afin de constituer la liste requise des sources d'incertitude il est habituellement pratique de calculer le mesurande à partir des valeurs intermédiaires en établissant le modèle de calcul. Dans ce modèle, tous les paramètres peuvent avoir une incertitude associée à leur valeur. De plus il peut exister d'autres paramètres qui n'apparaissent pas explicitement dans l'expression utilisée pour calculer la valeur du mesurande mais qui cependant affectent les résultats de la mesure.

Le diagramme des causes et des effets est une façon très pratique de dresser la liste des sources d'incertitude, de montrer leur parenté et d'établir leur influence sur l'incertitude du résultat. Il permet également d'éviter de compter deux fois les mêmes sources.

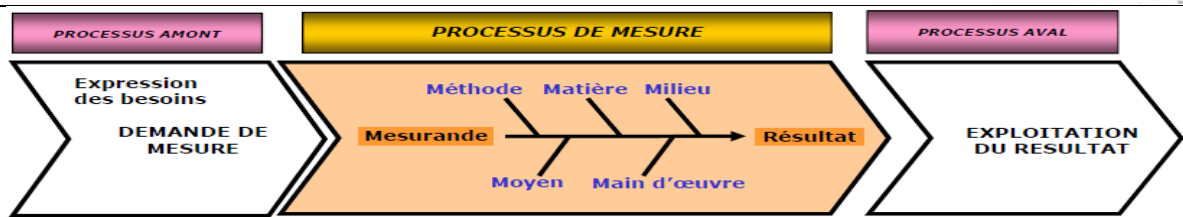
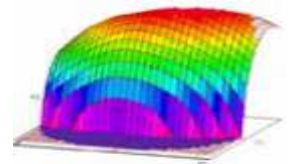


Figure 5: Diagramme d'Ishikawa présentant les sources d'incertitude

Une fois la liste des sources d'incertitude constituée, leurs effets sur le résultat peuvent en principe être représentés à l'aide d'un modèle formel de mesure dans lequel chaque effet est associé à un paramètre ou variable dans une équation. L'équation forme alors un modèle complet du processus de mesure qui incorpore tous les facteurs individuels qui affectent la mesure. [7]

3.4 Quantification de l'incertitude :

Une fois les sources d'incertitudes identifiées, l'étape suivante consiste à quantifier l'incertitude générée par ces sources .on y parvient en :

- Evaluant l'incertitude générée par chaque source individuelle et en suite en les combinant.
- En déterminant directement la contribution combinée à l'incertitude du résultat à partir de quelques-unes ou de toutes les sources en utilisant les données issues des performances de la méthode. [7]

3.5 Incertitude type :

-Avant d'être composées, toutes les contributions à l'incertitudes doivent être exprimées sous forme d'incertitude types. C'est-à-dire sous forme écarts types .

-Lorsque la composante de l'incertitude a été évaluée expérimentalement à partir de la dispersion de mesures répétées, elle peut être exprimée facilement sous forme d'un écart type.

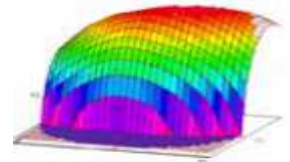
Pour ce qui concerne la contribution à l'incertitude de mesures uniques. L'incertitude type est simplement

l'écart-type observé ;pour les résultats soumis au calcul de la moyenne on utilise l'écart type de la moyenne. [7]

3.6 Incertitude composée :

Après avoir estimé les composantes individuelles ou groupées de l'incertitude et les avoir exprimées sous forme d'incertitudes. Dans l'étape suivante, il faut calculer l'incertitude type composée .

-Soit $M = f(x_1, x_2, \dots, x_i)$, la relation générale entre l'incertitude type composée $u_c(M)$ de la grandeur M et l'incertitude des paramètres indépendants x_1, x_2, \dots, x_i dont elle dépend sera égale à :



$$u_c(M) = \sqrt{\sum \left(\frac{\partial M}{\partial x_i} \right)^2 \times u^2(x_i)} \quad [7]$$

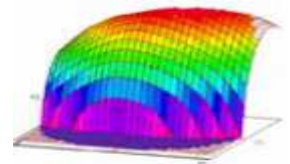
3.7 Incertitude élargie :

Le stade final consiste à multiplier l'incertitude type composée par le facteur d'élargissement k choisi de manière à obtenir une incertitude élargie :

$$U = k \cdot u$$

dans la plus part des cas, il est recommandé de fixer la valeur de k à 2 (pour un niveau de confiance à 95%). Cependant cette valeur de k peut être insuffisante lorsque l'incertitude composée est fondée sur des observations statistiques dont le nombre des degrés de liberté est assez faible le choix de k dépend alors du nombre effectif de degrés de liberté.

Lorsque l'incertitude type composée est dominée par une contribution unique avec des degrés de liberté inférieurs à 6, il est recommandé que k soit fixé à un niveau égal à la valeur bilatérale d'un test t de Student pour le nombre de degrés de liberté associés à cette contribution et pour le niveau de confiance requis (95%). [7]



I. Protocole de validation analytique de la méthode du dosage de Métopimazine dans une solution injectable

1. Présentation de Principe Actif sujet de dosage:

Le principe actif de la solution injectable est le *Métopimazine* (MPZ) qui est un dérivé des phénothiazines utilisé dans la prévention des nausées durant les traitements en chimiothérapie. Elle possède des propriétés pharmacologiques antiémétiques et neuroleptiques.

La Métopimazine est une poudre cristalline jaune pâle, se colore à la lumière vive, inodore, pratiquement insoluble dans l'eau, peu soluble dans le chloroforme, très peu soluble dans l'alcool, dans le méthanol et dans l'acétone pratiquement insoluble dans l'éther. Son point de fusion est de 186 °C à 190 °C. [18]

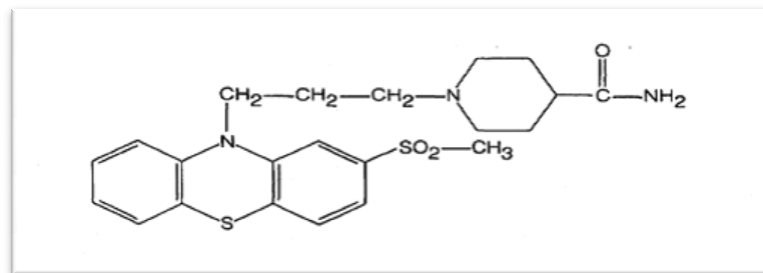


Figure 6 : représentation en perspective de Cram de Métopimazine « C₂₂H₂₇ N₃ O₃ S₂ »

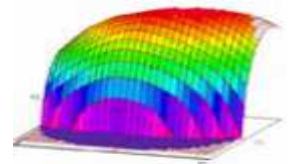
La formule chimique : 1-[3-[2-(Methylsulfonyl) phenothiazin-10-yl] propyl] piperidine-4 carboxamide.

2. Matériels

2.1. Réactifs et solvants

Tous les solvants et réactifs utilisés dans l'analyse chromatographique sont de grade chromatographique :

- Eau ultra pure Milli-Q (bidistillée) ;
- Métopimazine, substance de référence ;
- Acétonitrile (ACN) ;
- Potassium dihydrogèno phosphate ;
- Di-potassium hydrogèno phosphate ; [16]



2.2 Appareillage :

Les analyses par HPLC ont été réalisées sur un chromatographe liquide de marque *DIONEX*, appareil entièrement automatisé et muni des éléments suivants :

- Une pompe UltiMate 3000,
- Un injecteur automatique couplé à un passeur d'échantillons à plateau de 200 places,
- Un compartiment pour thermostatisation de la colonne,
- Un détecteur à barrette de diodes,

L'ensemble du système chromatographique est piloté par un ordinateur muni d'un logiciel Chromeleon version 6.8.

La qualification de l'appareil HPLC est réalisée tous les six mois et après chaque intervention technique sur l'appareil. [16]

3. Méthodes :

Dans cette partie, on s'intéresse à la préparation des solutions, de la phase mobile ainsi que les méthodes utilisées pour mener à bien cette étude.

3.1 Conditions chromatographiques :

- Phase mobile :

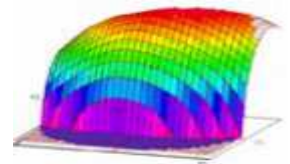
La phase mobile est un mélange dégazé de 65% de solution tampon et 35% d'Acétonitrile. La solution tampon est préparée par la méthode suivante :

Dans une fiole jaugée de 1 litre, on pèse 2.72 g de potassium dihydrogèphosphate et 3.48 g de di potassium hydrogèphosphate. On fait dissoudre dans l'eau purifiée puis on le complète à 1000ml par le même solvant. [16]

- Phase stationnaire :

La phase stationnaire est une Colonne de 15 cm de longueur et de 3.9 mm de diamètre interne remplie d'une suspension de gel de silice octylsilyle pour chromatographie R C8 (5µm).

- *Température de la colonne* : Ambiante.
- *Débit de la phase mobile* : 1 ml min⁻¹.
- *Longueur d'onde de détection* : 240 nm.
- *Volume injecté* : 10 µl. [16]



3.2 Préparation des solutions :

Toutes les solutions préparées sont filtrées sur filtre rapide de 0,45µm.

❖ La solution à examiner (Forme Reconstituée) :

Dans un tube à essai, on fait vider 5 ampoules de la solution injectable (Soluté), on introduit 2 ml de cette solution dans une fiole de 100 ml et on complète au trait de jauge avec la phase mobile.

❖ La Solution du Placebo :

Dans une fiole jaugée de 100 ml, on introduit 2 ml de placebo, et on complète au trait de jauge avec la phase mobile.

❖ La solution Témoin (Sa) :

Dans une fiole jaugée de 100 ml, on introduit une quantité exactement pesée de 100 mg de la Métopimazine (substance de référence), on ajoute 70 ml de la phase mobile, on sonifie pendant 5 min. on complète au trait de jauge avec la phase mobile. Puis on fait diluer 1 ml de cette solution à 5ml et on complète au volume avec la phase mobile. [16]

3.3 Conformité du système :

L'essai de conformité du système est un test effectué afin de s'assurer que la méthode analytique satisfait aux critères d'acceptation fixés lors de la validation de la méthode. Cet essai est réalisé avant de mettre en route la méthode analytique et il est répété régulièrement, autant que nécessaire, pendant toute la procédure analytique pour vérifier que la performance du système est satisfaisante au cours de l'analyse. [19]

On injecte 6 fois 10µl de la solution témoin.

Critères d'acceptation : [16]

1-Temps de rétention approximatif de la Métopimazine : voisin de 4 min

2 – Facteur de symétrie $\leq 1,2$

3 - Nombre de plateaux ≥ 2500

4 - Le CV des aires des 6 injections de la solution de référence doit être inférieur à 2.0%.

5- Le CV des temps rétention des 6 injections de la solution de référence doit être inférieur à 1.0%.

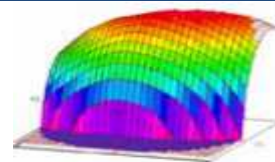
4. Méthode de validation du dosage de la Métopimazine dans une solution injectable

a- Sélectivité :

Il consiste à effectuer des essais sur le blanc, le placebo et la forme reconstitué et montrer qu'ils n'interfèrent pas avec une solution de standard de Métopimazine dans les mêmes conditions expérimentales. [17]

Critère d'acceptation :

Absence des pics interférant au temps de rétention correspondant au Métopimazine.



b-Linéarité et Justesse :

A partir de la solution témoin et la solution de Placebo dopée de Métopimazine, on prépare 3 séries de 5 concentrations séparées à raison d'une série par jour selon les tableaux ci-dessous :

⌘ Principe Actif Seul (PAS) :

Niveau de concentration %	Volume de la solution (Sa) (ml)	Volume de dilution (ml)	Concentration (mg/ml)
60	3	25	0,12
80	4	25	0,16
100	5	25	0,20
120	6	25	0,24
140	7	25	0,28

Tableau 2: Préparation des essais de Linéarité et de justesse (PAS).

⌘ Forme Reconstituée(FR) :

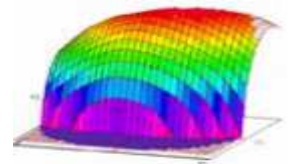
Niveau de concentration en %	Volume du placebo injectable (ml)	V de la solution (Sa) (ml)	Volume de dilution (ml)	Concentration (mg/ml)
60	0,5	3	25	0,12
80	0,5	4	25	0,16
100	0,5	5	25	0,20
120	0,5	6	25	0,24
140	0,5	7	25	0,28

Tableau 3: Préparation des essais de Linéarité et de justesse (FR).

Critères d'acceptation :

Etude statistique	Critères d'acceptation
	Métopimazine seule/ Métopimazine dans la Forme reconstituée
Coefficient de détermination	$R^2 \geq 0,999$
Test d'existence des pentes significatives (Test de Fischer)	$F > 4,67$
Test de comparaison des ordonnées avec 0 (Test de Student)	$t < 2,16$
Test d'homogénéité des variances (Test de Cochran)	$C < 0,68$
Test de comparaison des ordonnées à l'origine (Test de Student)	$t < 2,056$
Test de comparaison des pentes des droites d'ajustement (Test de Student)	$t < 2,056$

Tableau 4 : Critères d'acceptation de la linéarité



c-Fidélité de dosage du PA:

On Effectue au minimum 3 séries de 6 pesées de la concentration théorique (100%) sur la forme pharmaceutique reconstituée et ce à raison d'une série par jour. [17]

Niveau de Concentration (%)	Volume de la Solution (Sa) (ml)	Volume du Placebo (ml)	Volume (ml)	Concentration en (mg/ml)
100	5	0,5	25	0,20

Tableau 5 : Préparation des essais de Fidélité.

Critères d'acceptation

- Les variances des différents groupes (test de Cochran) doivent être homogènes au risque de 5%:

$$(C_{\text{calculé}} \leq C_{\text{théorique}})$$

$C_{\text{théorique}}$ correspond à $C(0,05 ; 3 ; 5) = 0,7071$

-Les coefficients de variation de répétabilité et de fidélité intermédiaire doivent être $\leq 2.0\%$.

5. Bilan de la validation analytique de la méthode du dosage de Métopimazine

Avant de présenter les résultats de validation on calcule d'abord la précision de système.

• Conformité de système :

La vérification de la conformité de système est effectuée au débit de chaque analyse, les résultats de la dernière vérification sont mentionnés dans le tableau ci-dessous:

temps de rétention de Métopimazine		L'aire de pic de Métopimazine		Nombre des plateaux théoriques	Coefficient de symétrie
\bar{x}_{tr}	cv(%)	s_p	cv(%)		
3,808	0,1	0,015	0,1	6801	1,57

Tableau 6 : Résultats de la vérification de la conformité de système lors de l'utilisation de la méthode chromatographique

Les CV des aires des pics et des temps de rétention de la Métopimazine des 6 injections sont respectivement de 0,1.

La précision du système de la méthode de dosage de la Métopimazine par HPLC est donc vérifiée

a- Sélectivité :

Avant d'effectuer l'ensemble des critères, on a procédé à la vérification de l'absence de toute interférence au niveau de l'absorbance due aux excipients utilisés comme matrice et la solution du blanc-réactifs.

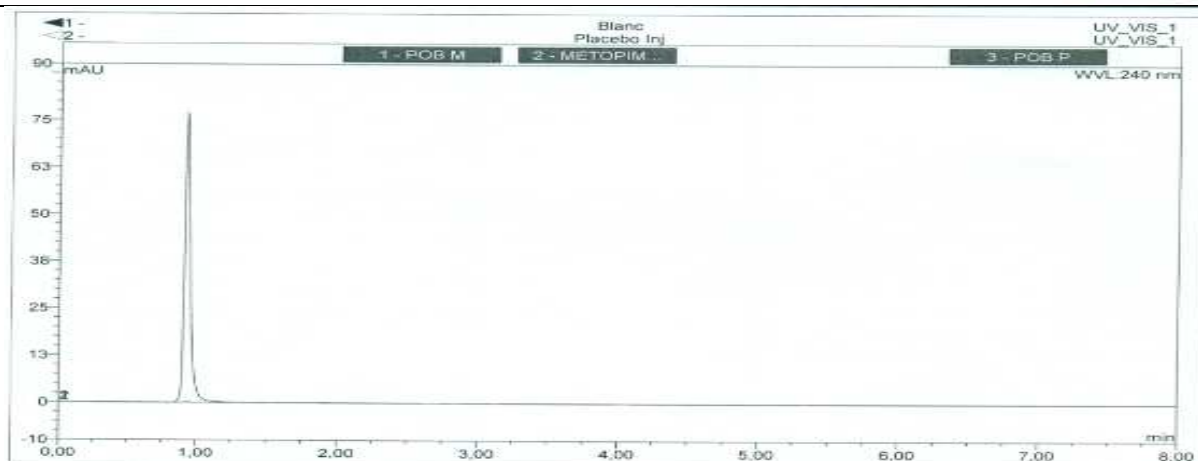
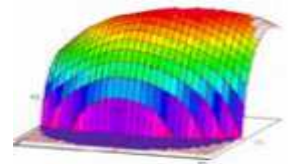


Figure 7 : Chromatogrammes superposés du blanc et placebo

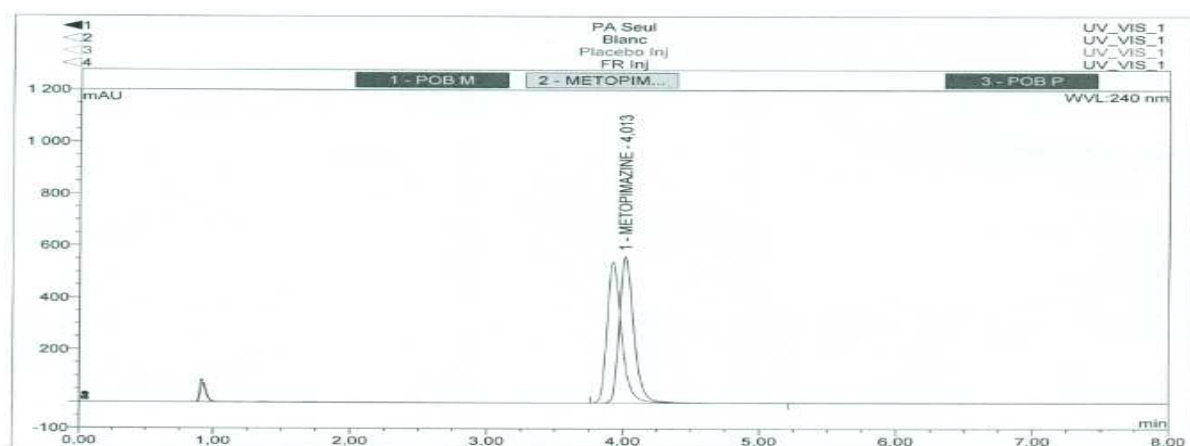


Figure 8 : Chromatogrammes superposés du blanc, placebo, PAS et FPR

D'après les chromatogrammes des essais de sélectivité, il n'y a aucune interférence entre le pic du principe actif seul, les pics du placebo, les pics de FPR et le pic de la phase mobile au temps de rétention correspondant au Métopimazine, Alors on peut considérer notre méthode comme une méthode sélective.

b- Linéarité :

La démarche de l'analyse statistique est donc de démontrer statistiquement que la méthode est linéaire dans l'intervalle de concentration choisi pour le principe actif seul, et pour la forme pharmaceutique reconstituée, puis de démontrer que les deux droites ne sont pas statistiquement différentes.

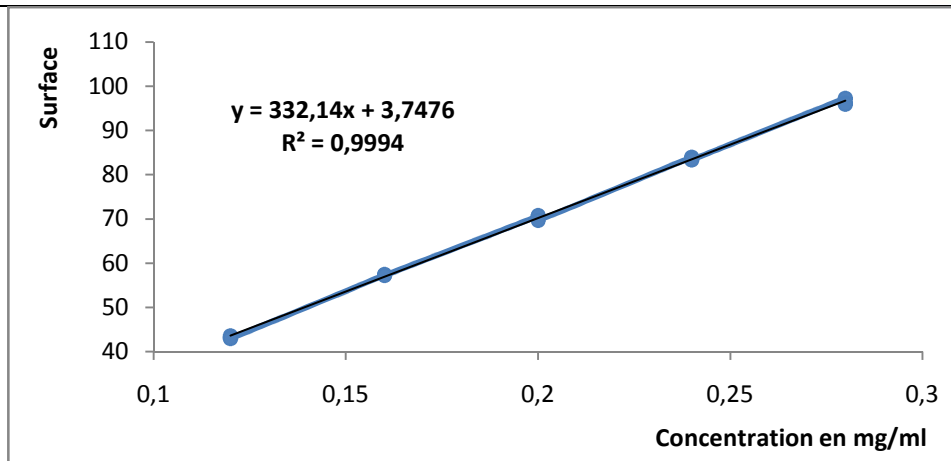
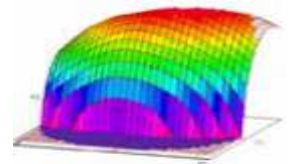


Figure 9 : Droite d'étalonnage (PAS)

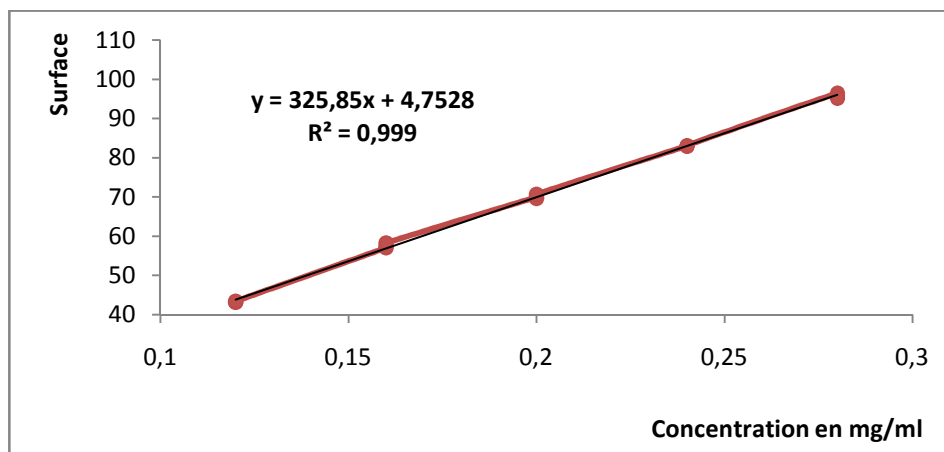


Figure 10 : Droite d'étalonnage (PA dans FR)

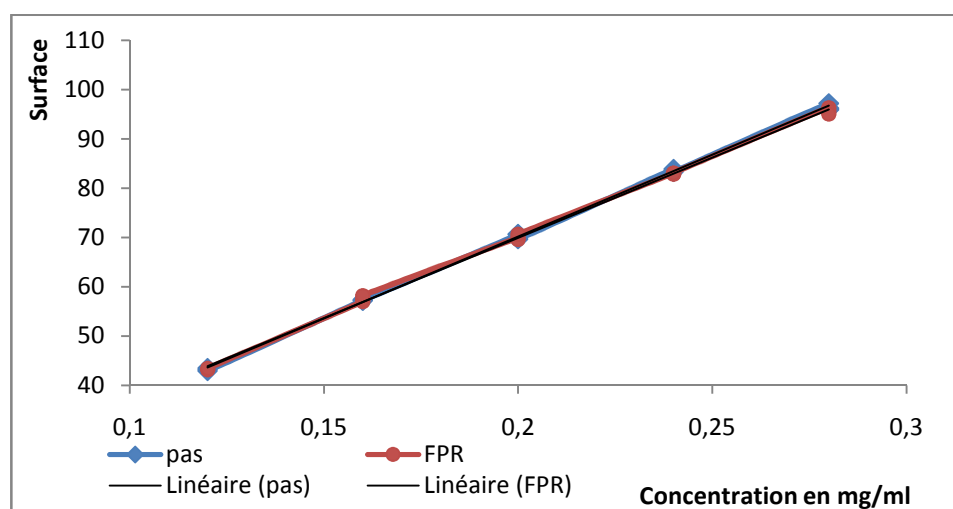
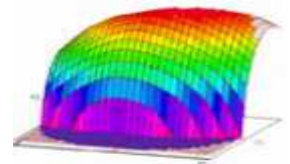


Figure11: superposition des deux droites d'étalonnage (PAS) et (FR)

Calculs statistiques élémentaires :



	PAS	FR
La pente	332,14	325,85
L'ordonnée à l'origine	3,75	4,75
Ecart type de la pente	2,29	2,84
Ecart type de l'ordonnée à l'origine	0,48	0,59
Coefficient de détermination R ²	0,999	0,999
Ecart type résiduelle Sr	0,50	0,62

Tableau 7 : paramètres des deux droites (D1) et (D2)

- Tests de comparaisons :

Ces tests consistent à démontrer que les pentes et les ordonnées à l'origine des droites (D1) et (D2) sont statistiquement identiques.

-Comparaison des droites D1 et D2 :

-Comparaison des pentes a₁ et a₂ :

Afin d'effectuer une comparaison des pentes, on calcule la valeur de student selon la formule suivante :

$$t = \frac{|a_1 - a_2|}{\sqrt{S_{a_1}^2 + S_{a_2}^2}}$$

Test de student	t calculé	t (95%,26)
	1,73	2,06

Tableau 8 : comparaison des pentes de (D1) et (D2)

Puisque $t_{\text{calculé}} < t_{\text{théorique}}$, on conclut que les pentes ne sont pas significativement différentes au risque de 5%. Donc il **n'ya pas d'effet de matrice** dans la méthode de dosage de Métopimazine.

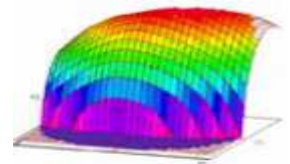
-Comparaison des ordonnées à l'origine b₁ et b₂ :

Afin d'effectuer une comparaison des ordonnées à l'origine, on calcule le coefficient de student selon la formule suivante :

$$t = \frac{|b_1 - b_2|}{\sqrt{S_{b_1}^2 + S_{b_2}^2}}$$

Test de student	t calculé	t (95%,26)
	1,33	2,06

Tableau 9 : comparaison des ordonnées à l'origine de (D1) et (D2)



Puisque $t_{obs} < t_{théorique}$, on conclut que les ordonnées à l'origine ne sont pas significativement différentes au risque de 5%. Alors **qu'il n'ya pas d'effet systématique** dans la méthode de dosage de Métopimazine.

-Comparaison des ordonnées à l'origine (b1) et (b2) avec zéro :

Afin d'effectuer une comparaison des ordonnées à l'origine avec zéro, on calcule les valeurs de student selon les deux formules suivantes :

$$t_1 = b_1/s_{b_1} ; t_2 = b_2/s_{b_2}$$

		S_b	$t_{calculé}$	$t(5\%,13)$
Test student	PAS	0,476	7,87	2,16
	PFR	0,590	8,05	2,16

Tableau 10 : Comparaison des ordonnées à l'origine (b1) et (b2) avec zéro

Dans les deux cas, on observe que $t_{calculé} > t_{théorique}$. Alors, les ordonnées à l'origine de la droite étudiée (D_1) et (D_2) sont significativement différents de zéro au seuil de probabilité 5%. Par conséquent, la calibration sera effectuée par une gamme de 3 point au minimum.

-Tests statistiques :

-Test d'homogénéité des variances:

	S_{max}	$\sum S_i^2$	$C_{calculé}$	$C(5\%,3,5)$
PAS	0,482	0,968	0,497	0,684
PFR	0,439	1,148	0,382	0,684

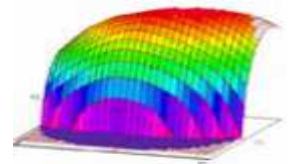
Tableau11 : test de Cochran pour PAS et FR.

Le tableau de Cochran présenté ci-dessus montre que $C_{calculé} < C_{théorique}(5\%,3,5)$ donc l'ensemble des variances du PAS et PFR sont homogènes au seuil de 5%.

-Test de l'existence d'une pente significative par test F de Fisher (ANOVA):

	Source de variation	SCE	ddl	CM	F	Probabilité observée
PA	résiduelle	3,28	13	0,25	21019,60	0,0000
	régression (linéaire)	5295,37	1	5295,37		
	totale	5298,64	14	378,47		
FR	résiduelle	5,03	13	0,39	13176,70	0,0000
	régression (linéaire)	5096,49	1	5096,49		
	totale	5101,52	14	364,39		

Tableau12 : Vérification de l'existence d'une pente significative du Métopimazine par test de Fisher



Comme la valeur de la probabilité observée est de l'ordre de zéro, donc inférieur à 5%. Alors, nous pouvons conclure l'existence d'une pente significative pour la droite (D₁) et (D₂).

-L'allure des résidus :

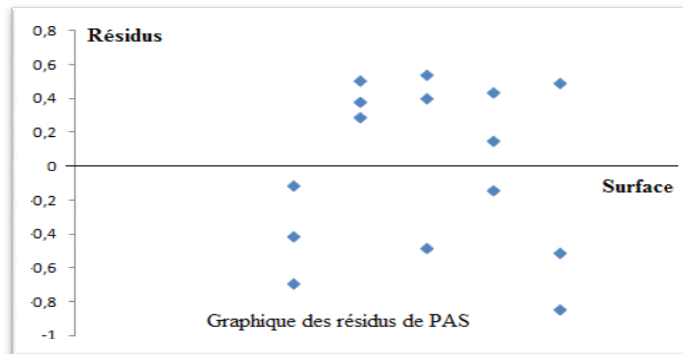


Figure 12: graphique des résidus de PAS

Puisque la distribution des résidus est aléatoire, le modèle linéaire simple sera adopté comme un modèle de calibration.

c- Justesse :

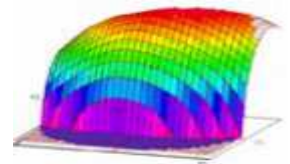
Le tableau ci-dessous présente les valeurs de la concentration introduite, les concentrations retrouvées ainsi les recouvrements pour chaque niveau de concentration considéré. Le recouvrement est calculé par la formule suivante :

$$R = \frac{\text{Quantité retrouvée}}{\text{Quantité introduite}}$$

niveau	Q introduite	Q retrouvée	R%
1	0,12	0,119	99,37
	0,12	0,119	98,75
	0,12	0,117	97,3
2	0,16	0,161	100,68
	0,16	0,162	101,37
	0,16	0,163	101,89
3	0,20	0,200	100,05
	0,20	0,200	99,79
	0,20	0,202	100,81
4	0,24	0,240	99,81
	0,24	0,240	100,09
	0,24	0,241	100,28
5	0,28	0,280	100,01
	0,28	0,279	99,82
	0,28	0,278	99,26

Tableau13: données brutes pour étude de la justesse pour Métopimazine

-Test d'homogénéité des moyennes:



Ce test est effectué en vue de vérifier l'homogénéité des moyennes des recouvrements pour chaque niveau de concentration

Source de variation	SCE	ddl	CM	F	Probabilité observée
Entre groupe	12,55	4	3,14	7,892	0.004
A l'intérieur des groupes	3,98	10	0,4		
totale	16,52	14			

Tableau14 : Etude d'homogénéité des moyennes des moyennes de recouvrement de Métopimazine

Comme la valeur de la probabilité observée 0.4% est inférieure à 5%, l'hypothèse d'homogénéité des moyennes est rejetée au risque de 5% de se tromper.

L'absence d'homogénéité est causée par l'existence d'un point aberrant. Pour cette raison, il s'est avéré nécessaire de détecter ce point à l'aide d'un tracé de la boîte à moustache présentée ci-dessous :

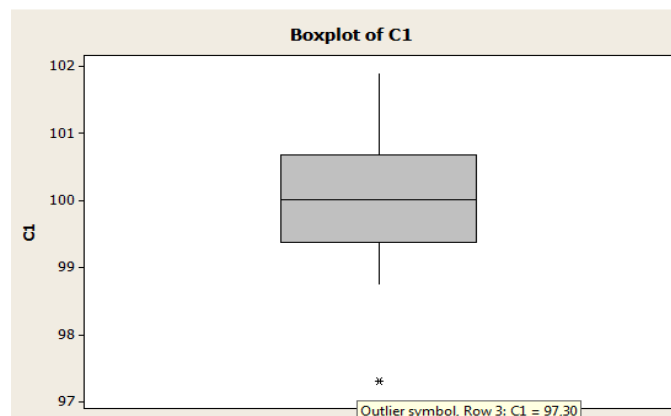


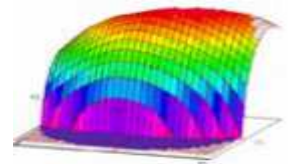
Figure 13 : Boîte à moustaches des valeurs de recouvrements (R%)

D'après le tracé de la figure n° 12, il apparaît évident que l'absence de l'homogénéité de la distribution des valeurs de recouvrement est causée par la valeur 97.3 % qui se situe au niveau de la concentration 60%.

Pour cette raison, l'estimation de l'intervalle de confiance se fait en deux parties.

-Estimation du recouvrement moyen et de son intervalle de confiance pour Métopimazine :

N	R%	S _R	t (5%,11)	IRM	
				min	max
12	100,32	0,74	2,201	99,85	100,79
N	R%	s _R	t (5%,2)	IRM	
				min	max
3	98,48	1,06	4,303		



				95,83	101,12
--	--	--	--	-------	--------

Tableau 15 : Estimation du recouvrement moyen et de son intervalle de confiance de Métopimazine

Puisque la valeur 100% est incluse dans les deux intervalles de recouvrement calculés, donc la méthode peut être considérée comme **juste**.

d- Fidélité :

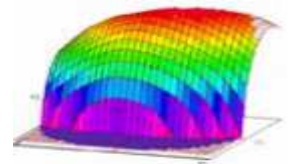
La répétabilité (fidélité intra-jour) et la fidélité intermédiaire (Fidélité inter-jour) sont observées à une concentration de 0,2 mg/ml (niveau 100%).

Le tableau suivant résume l'ensemble des résultats d'essais de la fidélité.

Séries	Concentration introduite	Concentration retrouvée	R %
1	0,2	0,202	100,88
	0,2	0,202	101,03
	0,2	0,198	98,90
	0,2	0,198	99,14
	0,2	0,198	98,89
	0,2	0,202	101,15
2	0,2	0,199	99,53
	0,2	0,200	100,10
	0,2	0,198	99,20
	0,2	0,200	100,11
	0,2	0,202	101,09
	0,2	0,202	100,75
3	0,2	0,202	100,80
	0,2	0,202	100,94
	0,2	0,202	101,03
	0,2	0,202	101,14
	0,2	0,202	101,00
	0,2	0,202	100,95

Tableau16 : Données utilisés pour évaluer la fidélité de la méthode analyse de Métopimazine.

-Vérification de l'homogénéité des moyennes des niveaux (test de GRUBBS)



Ce test permet de rechercher les moyennes et les valeurs suspectes afin de s'assurer de leur homogénéité au seuil de probabilité de 5%.

Test de Grubbs	Test des moyennes		$G_{1\text{calculé}}$	$G(5\%,3)$
	MAX [$y_{i\text{ moy}}$]	100,98	0.72	1,15
	MIN [$y_{i\text{ moy}}$]	100,00	0.43	
	Test des valeurs suspectes Série incriminée : 3		$G_{2\text{calculé}}$	$G(5\%, 6)$
	MAX [y_j]	101,14	1,44	1,89
	MIN [y_j]	100,8	1,58	

Tableau17 : Moyens aberrants des données de fidélité pour Métopimazine par test de GRUBBS

Les valeurs G_1 trouvées sont inférieures à la valeur lue sur la table GRUBBS, alors les moyennes testées sont considérées comme correctes au seuil de probabilité de 5%.

Les valeurs G_2 trouvées sont inférieures à la valeur sur la table de GRUBBS avec un risque de 5% ; alors les résultats de deux séries incriminées sont homogènes.

Après avoir montré :

- l'absence des moyennes aberrantes.
- homogénéité des variances.

On calcul des coefficients de variation de répétabilité et de fidélité intermédiaire.

-Estimation de la répétabilité et la Fidélité intermédiaire :

-Répétabilité :

répétabilité	Sr	t (95%, 15)	Seuil de répétabilité (r)	CV _r
	0,0015	2,131	0,0047	0,77

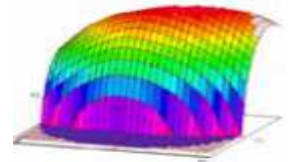
Tableau 18 : Calcul du coefficient de répétabilité pour Métopimazine

On remarque que le coefficient de variation de répétabilité est de l'ordre de 0,77% qui est inférieur à 2%, ce qui montre que la méthode est répétable.

-Fidélité intermédiaire :

Fidélité intermédiaire	\bar{n}	S_d	S_L	S_{FI}	CV _{FI}
	6	0,003	0,0008	0,0018	
	t (95%,15)		Seuil de fidélité intermédiaire		
	2,131		0,0053		

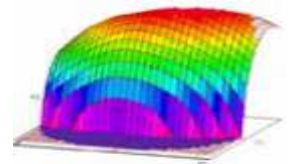
Tableau19 : Calcul du coefficient de fidélité intermédiaire pour Métopimazine



Nous observons bien que le coefficient de variation de fidélité intermédiaire est égal à 0.88 il est inférieur à 2%, ce qui montre aussi que la méthode est fidèle.

6- Conclusion :

Les résultats d'évaluation des critères de validation trouvés montrent que la dite méthode est linéaire, juste et fidèle dans l'intervalle de concentration [0,12 ; 0,28] mg/ml.



II. Calcul de l'incertitude de la teneur en Métopimazine selon la méthode de GUM :

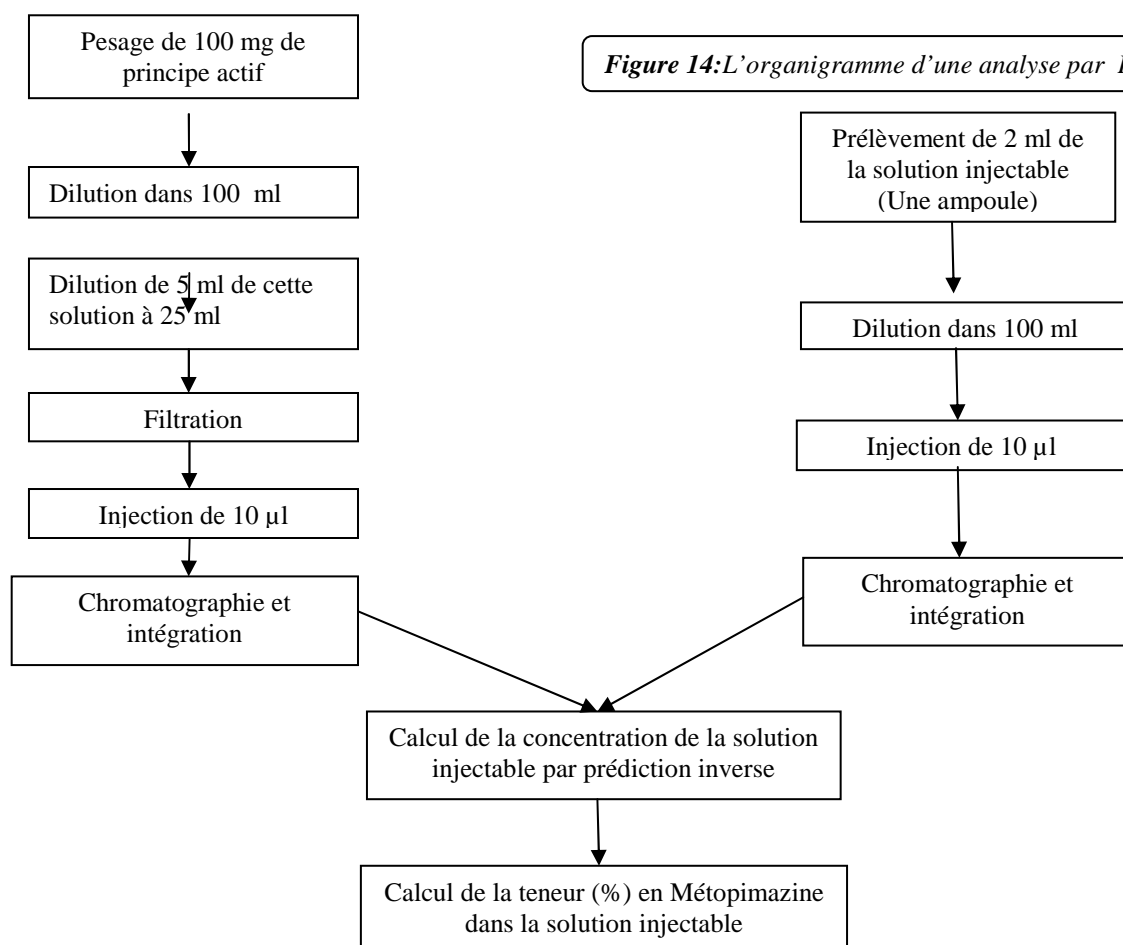
Afin que les résultats fournis soient valablement interprétés et donc utilisés à bon escient, il faut qu'ils soient fiables c'est-à-dire que leur incertitude soit connue. De plus. En absence de l'incertitude de mesure, la déclaration d'un résultat analytique ne peut être considérée complète. C'est pourquoi, la norme ISO 17025 impose depuis 2001 aux laboratoires d'essai et notamment à tous les prestataires de services dans le domaine de la santé humaine d'appliquer des procédures pour l'estimation de l'incertitude de mesure pour leurs résultats d'essais et de mesure et le cas échéant, de rapporter cette incertitude. [5]

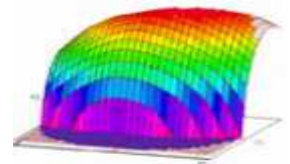
1. Spécification du Mesurande :

L'objectif de la première étape est de décrire la procédure de mesure. Cette description consiste à établir une liste des étapes de la mesure et à donner une formulation mathématique du mesurande et des paramètres dont il dépend.

Procédure :

Le calcul de la teneur (%) en Métopimazine passe par les étapes suivantes :





Le mesurande est la teneur de Métopimazine exprimée en (%) dans une ampoule de la solution injectable, il dépend de la masse du principe actif, de sa pureté, de la réponse analytique, ainsi que la surface de la solution à examiner et le volume de dilution de ces deux solutions :

$$T(\%) = \left(\frac{A'_e}{A'_t}\right) \times \left(\frac{P_t}{P_e}\right) \times \left(\frac{fd_t}{fd_e}\right) \times \left(\frac{P}{100}\right) \times \left(\frac{V_m}{Dose}\right) \times 100$$

A'_e : Aire du pic de Métopimazine dans la solution à examiner corrigé par l'ordonnée à l'origine $Ae - a_0$.

A'_t : Aire du pic de la Métopimazine dans la solution témoin corrigé par l'ordonnée à l'origine $At - a_0$.

P_t : Prise témoin en mg.

P_e : Prise d'essai en ml.

fd_t : Facteur de dilution de témoin en ml^{-1} .

fd_e : Facteur de dilution de la solution à examiner en ml^{-1}

P : Pureté de la Métopimazine de référence en %.

a_0 : L'ordonnée à l'origine de l'équation de la courbe d'étalonnage.

$\frac{V_m}{Dose}$: Rapport entre le volume moyenne de la solution injectable et la quantité en Métopimazine qui lui correspond. Ce rapport vaut 1ml/10 mg.

Avec : $fd_t = \frac{1}{Vt_1} * \frac{Vp}{Vt_2}$; $fd_e = \frac{1}{V_e}$

Alors : $T(\%) = \left(\frac{A'_e}{A'_t}\right) \times \left(\frac{P_t}{Vt_1}\right) \times \left(\frac{Vp}{Vt_2}\right) \times \left(\frac{V_e}{P_e}\right) \times \left(\frac{P}{100}\right) \times \left(\frac{V_m}{Dose}\right) \times 100$

Vt_1 : Volume de dilution de la solution mère de témoin.

Vp : Volume prélevé de la solution mère de témoin.

Vt_2 : Volume de dilution de volume prélevé de la solution mère.

V_e : Volume de la solution à examiner.

2. Identification et analyses des sources de l'incertitude :

L'objectif de cette seconde étape est de dresser la liste de toutes les sources d'incertitudes pour chacun des paramètres qui affectent la valeur du mesurande.

A ce stade, l'objectif serait donc d'établir **un diagramme d'Ishikawa** reprenant toutes les sources possibles d'incertitude.

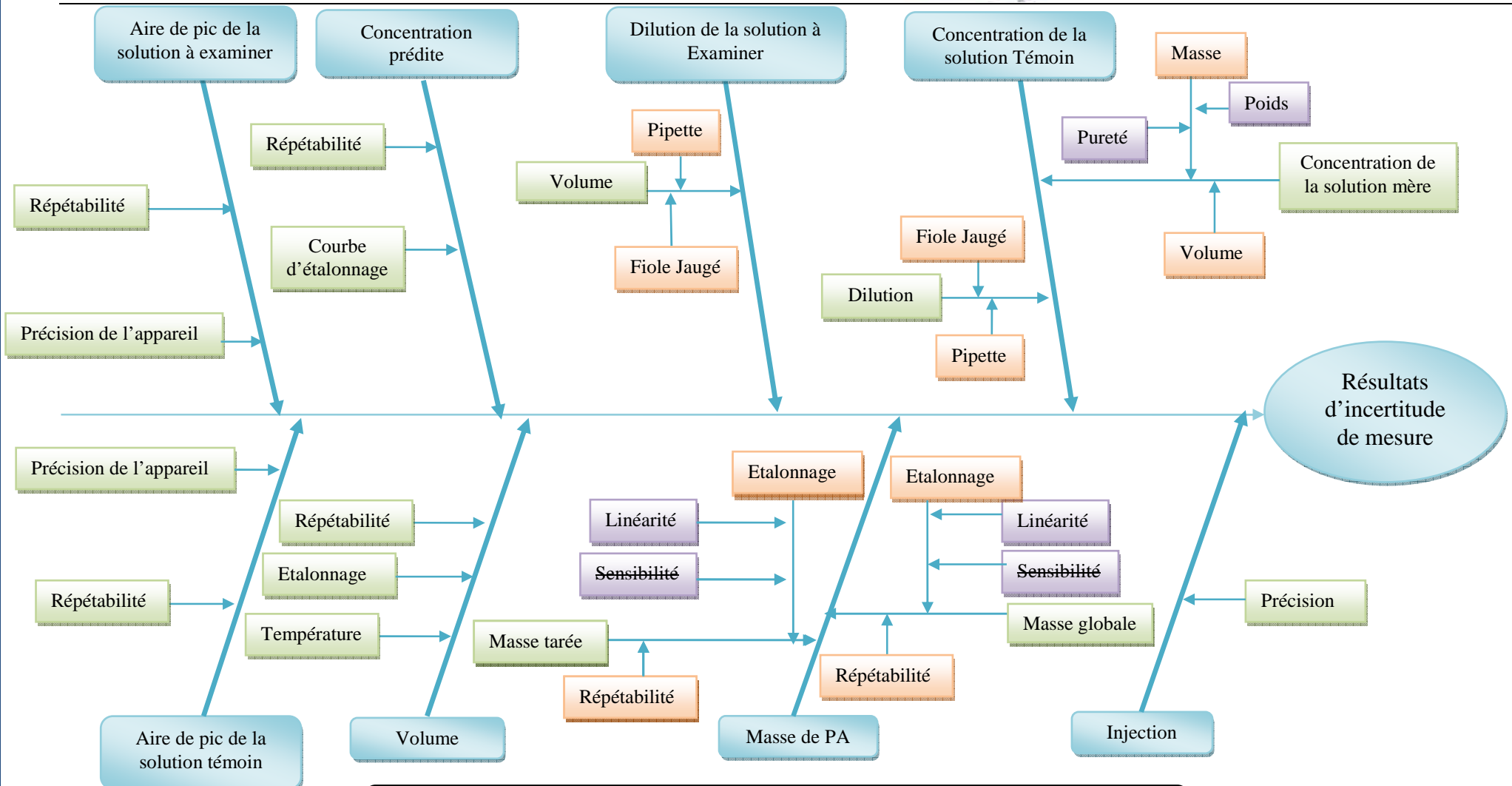
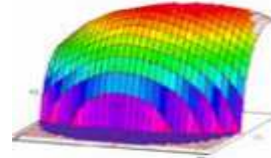


Figure15 : Diagramme d'Ishikawa présentant les causes et les effets y compris les sources d'incertitude pour la procédure d'analyse en HPLC

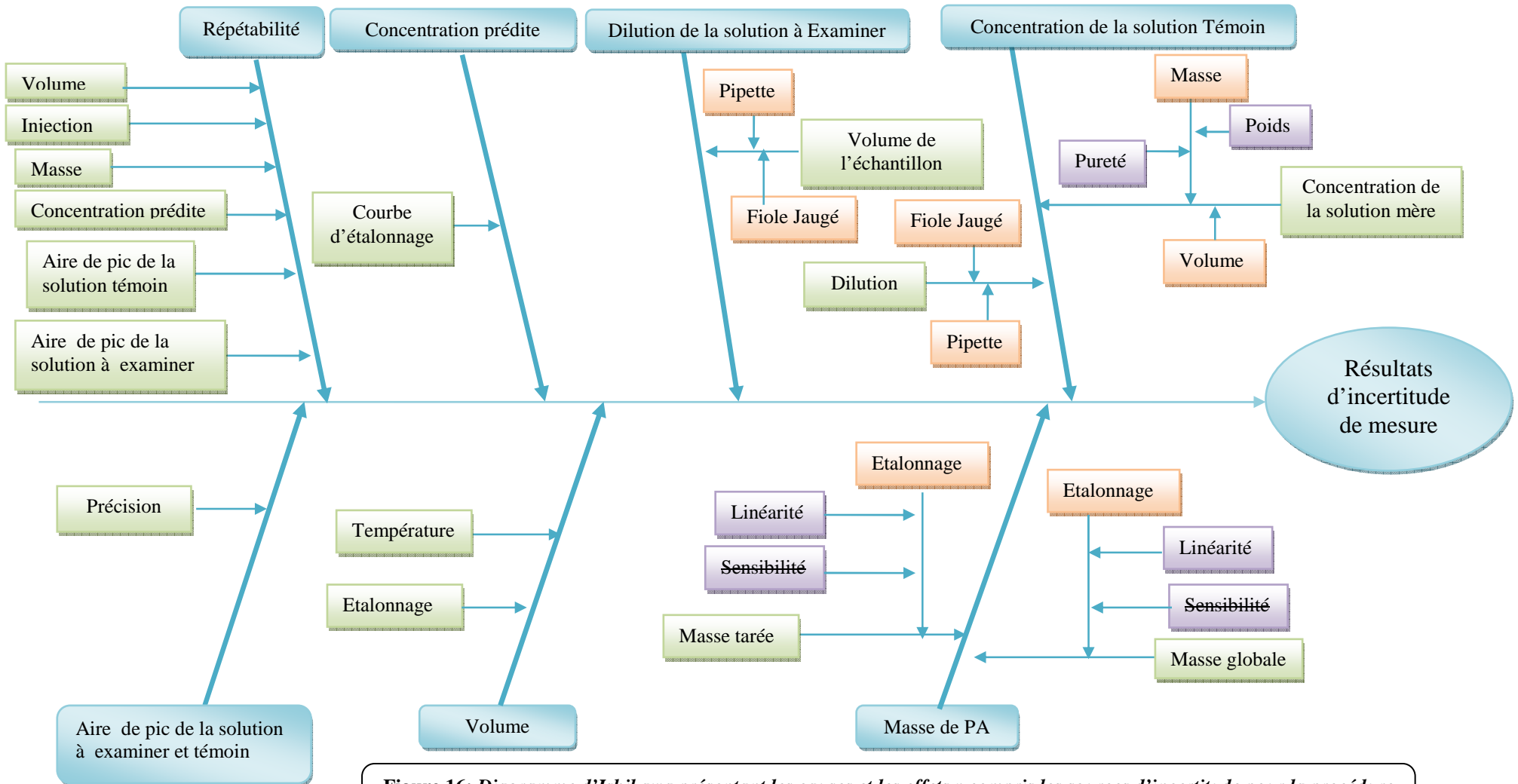
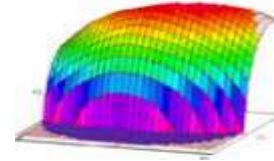
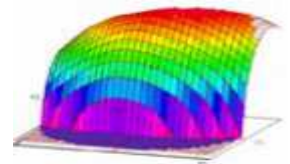


Figure 16: Diagramme d'Ishikawa présentant les causes et les effets y compris les sources d'incertitude pour la procédure d'analyse en HPLC (Répétabilité combinées)



NB : Si la pesée est effectuée à la même échelle et sur un faible intervalle de poids alors la contribution de la sensibilité peut être négligée.

- **Pureté :**

La pureté de principe actif est notée dans le dossier interne de l'analyse de la matière première (Métopimazine) comme étant égale à $99.99 \pm 0.01 \%$.

La pureté est par conséquent égale à 0.9999 ± 0.0001 .

- **Masse m :**

La seconde étape de la préparation suppose de peser le principe actif afin de préparer la solution témoin.

La masse utile de principe actif est déterminée par une pesée tarée, donnant $m = 100 \text{ mg}$.

La documentation du fabricant identifie trois sources d'incertitude pour la pesée tarée : la répétabilité ; la lecture (résolution numérique) de l'échelle de la balance et la contribution due à l'incertitude sur la fonction d'étalonnage de l'échelle cette fonction d'étalonnage a deux sources potentielles d'incertitude, identifiées comme étant la sensibilité de la balance et sa linéarité.

- **Volume V :**

Le volume de la solution contenue dans la pipette et la fiole volumétrique est soumis à trois sources majeures d'incertitude :

-l'incertitude sur le volume interne certifié de la fiole et de la pipette.

-variation dans le remplissage de la fiole et la pipette jusqu'à la marque.

-la température de la fiole et la pipette et de la solution sont différentes de la température à laquelle le volume de la fiole et de la pipette ont été étalonnés.

- **Aire des pics de la solution d'essai et témoin :**

Aire du pic (A_i) corrigé par l'ordonnée à l'origine peut être exprimée selon la formule suivante :

$$A'_i = A_i - a_0$$

Puisque a_0 est une constante, alors l'incertitude d'aire du pic (A_i) corrigé par l'ordonnée à

l'origine est égale à

$$u(A'_i) = \sqrt{u(A_i)^2}$$

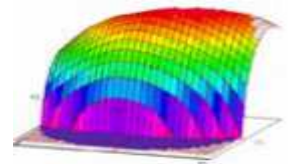
$u(A_i) = s_p$; s_p : C'est l'écart-type de la moyenne de la précision de système calculé en répétant six fois l'injection de PA

Donc :

$$u(A'_i) = s_p$$

- **Concentration prédite :**

Avant de calculer le taux en Métopimazine, la concentration de ce dernier est prédite en exploitant l'équation de la courbe d'étalonnage : $A_t = a_0 + a_1 \cdot c_x$



$$C_x = \frac{(A_t - a_0)}{a_1} \quad ; \quad u(C_x) = s = \frac{S_{res}}{a_1} \times \sqrt{\frac{1}{p} + \frac{1}{n} + \frac{(C_x - \bar{C})^2}{SCE_x}}$$

Ou :

a_1 : Pente de la courbe d'étalonnage

p : Nombre de mesure pour déterminer C_x

n : Nombre de mesure nécessaire à l'étalonnage

C_x : Concentration prédite

\bar{C} : Valeur moyenne de la concentration de différents étalons pour étalonnage

a_0 : Ordonnée à l'origine de la courbe d'étalonnage

SCE_x : Somme de carrés des écarts de la variable concentration.

3. Quantification des composantes de l'incertitude :

Dans l'étape 3, il faut quantifier l'incertitude de chaque source identifiée dans l'étape 2 et ensuite la convertir en une incertitude type.

-Pureté :

La pureté de Métopimazine est donnée sur le dossier d'analyse de la matière première de la Métopimazine comme étant égale à 0.9999 ± 0.0001 . Dans la mesure où on ne dispose pas d'informations supplémentaires sur la valeur de l'incertitude, on suppose que la distribution est rectangulaire. Pour obtenir l'incertitude type u_p , il faut diviser la valeur de 0.0001 par $\sqrt{3}$.

$$u_p = \frac{0.0001}{\sqrt{3}} = 0.000058$$

-Masse :

L'incertitude associée à la masse de principe actif est estimée, à l'aide des données tirées du certificat d'étalonnage comme étant égale à 0.02 mg cette estimation prend en compte les trois contributions identifiées précédemment.

-La concentration prédite :

L'analyse de la solution injectable par la méthode sujette de la validation est effectuée six fois.

La concentration moyenne C_x prédite en utilisant la courbe d'étalonnage est $C_x = 0,2000$

L'incertitude de cette concentration $u(C_x)$ est calculée par la formule suivante :

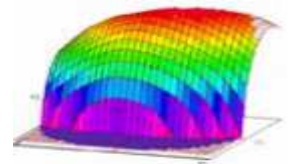
$$u(C_x) = \frac{0.502}{332.145} \times \sqrt{\frac{1}{6} + \frac{1}{15} + \frac{(0.2005 - 0.2)^2}{0.048}}$$

$$u(c_x) = 0.0007 \text{ mg/ml}$$

-Volume :

Le volume a trois influences majeures : étalonnage, répétabilité et effets de la température.

- **Etalonnage :**



Le fabricant indique :

- pour la fiole un volume $100 \text{ ml} \pm 0,1 \text{ ml}$ mesuré à une température de 20°C .
- pour la fiole un volume $25 \text{ ml} \pm 0,04 \text{ ml}$ mesuré à une température de 20°C .
- pour la pipette jaugée un volume $5 \text{ ml} \pm 0,015 \text{ ml}$ mesuré à une température de 20°C .
- pour la pipette jaugée un volume $2 \text{ ml} \pm 0,01 \text{ ml}$ mesuré à une température de 20°C .

La valeur de l'incertitude est donnée sans information sur le niveau de confiance ni sur la distribution, aussi une supposition s'avère nécessaire. Ici, on calcule l'incertitude des pipettes et des fioles en supposant que la distribution est rectangulaire :

$$u(V_{100}) = \left(\frac{0,1}{\sqrt{3}}\right) = 0,057 \text{ ml} \quad ; \quad u(V_{25}) = \left(\frac{0,04}{\sqrt{3}}\right) = 0,023 \text{ ml} ;$$

$$u(V_5) = \left(\frac{0,015}{\sqrt{3}}\right) = 0,009 \text{ ml} \quad ; \quad u(V_2) = \left(\frac{0,01}{\sqrt{3}}\right) = 0,006 \text{ ml}$$

- **La répétabilité :**

Toutes les expériences comprennent toujours au moins la répétabilité du volume et la répétabilité de l'opération de pesée. Par conséquent, il est raisonnable de combiner toutes les contributions pour l'ensemble de l'expérience et d'utiliser les valeurs tirées de la validation de la méthode pour quantifier sa dimension.

- **Température :**

D'après le fabricant, la fiole et la pipette ont été étalonnées à une température de 20°C , alors que la température du laboratoire varie entre les limites de $\pm 4^\circ\text{C}$. L'incertitude résultant de cet effet peut être calculée à partir de l'estimation de l'intervalle des températures et du coefficient de dilatation du volume. La dilatation du volume du liquide est nettement plus importante que celle de la fiole et la pipette. Aussi faut-il seulement considérer la première. Le coefficient de dilatation d'un volume d'eau est de $2,1 \times 10^{-4} \text{ }^\circ\text{C}^{-1}$ ce qui conduit à une variation du volume. Les formules suivantes présentent l'incertitude due à la variation de la température de la fiole de 100ml, fiole de 25ml, pipette de 5ml et de pipette de 2ml respectivement :

$$(100 \times 4 \times 2,1 \times 10^{-4}) = 0,084 \text{ ml}$$

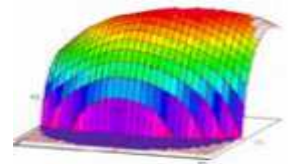
$$(25 \times 4 \times 2,1 \times 10^{-4}) = 0,021 \text{ ml}$$

$$(5 \times 4 \times 2,1 \times 10^{-4}) = 0,0042 \text{ ml}$$

$$(2 \times 4 \times 2,1 \times 10^{-4}) = 0,0017 \text{ ml}$$

On calcule l'incertitude-type en supposant que la distribution pour la variation de température est rectangulaire c'est-à-dire :

$$\frac{0,084}{\sqrt{3}} = 0,048 \quad ; \quad \frac{0,021}{\sqrt{3}} = 0,012 \quad ; \quad \frac{0,0042}{\sqrt{3}} = 0,0024 \quad ; \quad \frac{0,0017}{\sqrt{3}} = 0,0009$$



Les trois contributions sont combinées pour donner l'incertitude type $u(V)$ de volume V de chaque instrument de mesure

$$u(Vt1) = \sqrt{0.057^2 + 0.048^2} = 0.0745 \text{ ml}$$

$$u(Vt2) = \sqrt{0.023^2 + 0.012^2} = 0.0259 \text{ ml}$$

$$u(Vp) = \sqrt{0.009^2 + 0.0024^2} = 0.0093 \text{ ml}$$

$$u(Pe) = \sqrt{0.006^2 + 0.0009^2} = 0.0061 \text{ ml}$$

$$u(Ve) = \sqrt{0.057^2 + 0.048^2} = 0.0745 \text{ ml}$$

-Aire des pics de la solution d'essai et témoin

D'après les résultats de vérification de la conformité de système de l'appareil HPLC, l'écart-type de la moyenne de la variation des aires est : $s_p = 0.015$

L'incertitude de l'effet de la précision de l'appareil est :

$$u(A_e) = u(A_t) = s_p = 0,015$$

Symbole	Description	Valeur X	Incertitude type $u(X)$	Incertitude type relative $u(X)/X$
δ_r	Répétabilité	1	0,0015	0,0015
C_0	Concentration prédite par étalonnage	0,2000	0,0007	0,0035
A_e	Aire du pic de Métopimazine dans la solution à examiner.	66,19	0,015	0,000227
A_t	Aire du pic de la Métopimazine dans la solution témoin.	66,58	0,015	0,000225
P_t	Prise témoin en mg	100	0,02	0,0002
$Vt1$	volume de la solution mère de témoin en ml	100	0,0745	0,0007
$Vt2$	volume de dilution de volume prélevé de la solution mère en ml	25	0,0259	0,0010
Vp	volume prélevé de la solution mère de témoin en ml	5	0,0093	0,0018
Ve	volume de la solution à examiner en ml	100	0,0745	0,0007
Pe	Prise d'essai en ml	2	0,0061	0,0030
P	Pureté de la Métopimazine en %.	0,9999	0,000058	0,00006

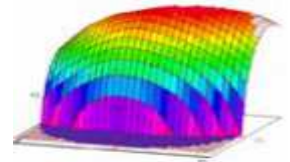
Tableau 20: tableau récapitulatif des valeurs et d'incertitudes de chaque composante de la formule de la teneur

4. Calcul de l'incertitude composé :

Après avoir calculer l'incertitude type associé à chaque composante de la formule de la teneur(%) en passe au calcul de l'incertitude type composé .

T% est donnée par :

$$T(\%) = \left(\frac{A'_e}{A'_t}\right) \times \left(\frac{P_t}{Vt_1}\right) \times \left(\frac{V_p}{Vt_2}\right) \times \left(\frac{V_e}{P_e}\right) \times \left(\frac{P}{100}\right) \times \left(\frac{V_m}{Dose}\right) \times 100$$



l'estimation de la répétabilité est traitée comme un effet relatif ; l'équation complète de modèle est par conséquent :

$$T(\%) = \left(\frac{A'_e}{A'_t}\right) \times \left(\frac{P_t}{Vt_1}\right) \times \left(\frac{V_p}{Vt_2}\right) \times \left(\frac{V_e}{P_e}\right) \times \left(\frac{P}{100}\right) \times \left(\frac{V_m}{Dose}\right) \times \delta_r \times 100$$

A l'aide des valeurs regroupées dans le tableau n° 20 la valeur de la teneur en % égal à :

$$T(\%) = 99.41\%$$

Les incertitudes associées à chaque composante sont composées selon :

$$\frac{u(T)}{T} = \sqrt{\left(\frac{u(A'e)}{A'e}\right)^2 + \left(\frac{u(A't)}{A't}\right)^2 + \left(\frac{u(Pt)}{Pt}\right)^2 + \left(\frac{u(Vt1)}{Vt1}\right)^2 + \left(\frac{u(Vp)}{Vp}\right)^2 + \left(\frac{u(Vt2)}{Vt2}\right)^2 + \left(\frac{u(Ve)}{Ve}\right)^2 + \left(\frac{u(Pe)}{Pe}\right)^2 + \left(\frac{u(P)}{P}\right)^2 + \left(\frac{u(c_x)}{c_x}\right)^2 + \left(\frac{u(\delta_{rep})}{\delta_{rep}}\right)^2}$$

$$u(T) = T \sqrt{\left(\frac{u(A'e)}{A'e}\right)^2 + \left(\frac{u(A't)}{A't}\right)^2 + \left(\frac{u(Pt)}{Pt}\right)^2 + \left(\frac{u(Vt1)}{Vt1}\right)^2 + \left(\frac{u(Vp)}{Vp}\right)^2 + \left(\frac{u(Vt2)}{Vt2}\right)^2 + \left(\frac{u(Ve)}{Ve}\right)^2 + \left(\frac{u(Pe)}{Pe}\right)^2 + \left(\frac{u(P)}{P}\right)^2 + \left(\frac{u(c_x)}{c_x}\right)^2 + \left(\frac{u(\delta_{rep})}{\delta_{rep}}\right)^2}$$

A l'aide des valeurs regroupées dans le tableau n° 20 la valeur de la teneur (%) en Métopimazine égale à :

$$u(T) = 0.55\%$$

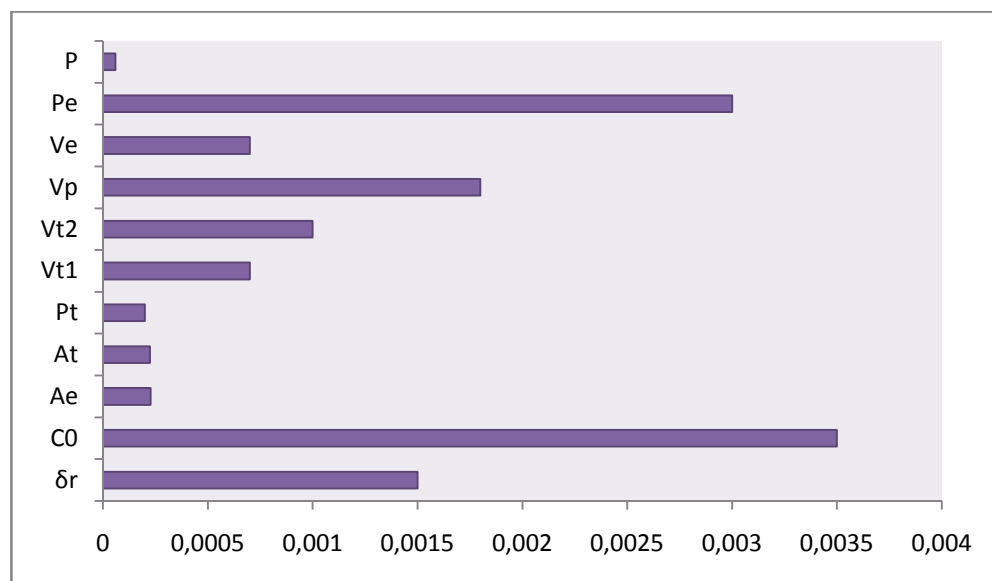
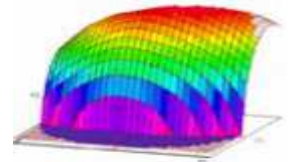


Figure 17 : contributions à l'incertitude dans le dosage de la Métopimazine

D'après la figure n°17, il apparaît claire que la contribution de l'effet de l'étalonnage pour calculer la concentration prédite et l'effet de la prise d'essai est importante dans le calcul de l'incertitude globale.

5. Calcul de l'incertitude élargie et présentation du résultat :

L'incertitude élargie $U(T)$ est calculée en multipliant l'incertitude type composée par un facteur d'élargissement égale à 2 qui correspond à un niveau de confiance $\pm 95\%$, alors :

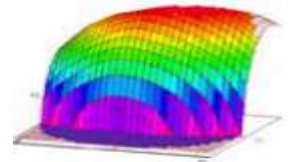


$$U(T) = 2 \times u_T \quad \text{D'où} \quad U(T) = 1,10\%$$

Alors, la valeur de l'incertitude calculée se trouve incluse dans la limite d'acceptation $\pm 5\%$ spécifique pour les produits pharmaceutiques.

Finalement, le résultat en (%) de dosage de la métopimazine dans une solution injectable par la méthode chromatographique est:

$$T(\%) = (99,41 \pm 1,10) \%$$

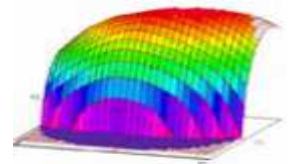


Conclusion générale :

La validation des méthodes d'analyse de dosage de substances médicamenteuses est, en effet, plus ou moins explicitement imposée dans les différentes pharmacopées, elle figure parmi les mesures universellement reconnues, comme faisant nécessairement partie d'un système exhaustif d'assurance qualité. A cet effet, une méthode chromatographique de dosage de la *Métopimazine* dans une forme pharmaceutique a été sujette de la validation analytique en respectant les normes et les contextes réglementaires à savoir ICH et le guideline SFSTP 1992.

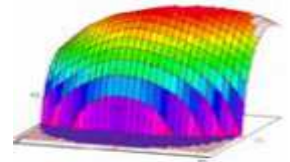
Les résultats de la validation obtenus montrent que les différents critères de validation ont été évalués en appliquant le modèle de régression linéaire simple. Par conséquent la dite méthode est trouvée juste, linéaire et fidèle dans l'intervalle de concentration étudié [0,12 ; 0,28].

Dans le même contexte, nous avons calculé l'incertitude de la dite méthode associée à la teneur en Métopimazine et ceci en appliquant l'approche de GUM. La valeur de l'incertitude calculée se trouve incluse dans la limite d'acceptation $\pm 5\%$. Ce qui nous permet de déclarer que cette méthode peut être utilisée dans le contrôle de qualité de routine.

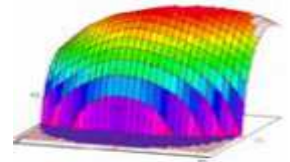


Référence bibliographique :

- [1] : Christian Ducauze, Arlette Baillet-Guffroy et Thanh X. Bui, choix et validation d'une méthode d'analyse, p.1 ,6 (www.agroparistech.fr).
- [2] : ce document est une traduction de courtoisie d'un document guide réalisé au niveau communautaire. Cette traduction a été réalisée par le Ministère de l'écologie, de l'énergie, du développement durable et de la mer (MEEDDM) et l'Agence française de sécurité sanitaire de l'environnement et du travail (AFSSET), dans le cadre de la mise en œuvre de la réglementation sur les produits biocides. Le document original est disponible sur le site de la Commission européenne : <http://ec.europa.eu/environment/biocides/> / <http://ecb.jrc.it/biocides/>.
- [3] : cours de chimie analytique, Nathalie TAPIE, Année 2011/2012, n.tapie@epoc.u-bordeaux1.fr.
- [4] : Max FEINBERG, Validation interne des méthodes d'analyse, p 224, techniques d'ingénieurs.
- [5] : Thèse " Evaluation des différentes approches pour l'estimation de l'incertitude des mesures analytiques" ROLAND MARINI DJANG'EING'A Année académique : 2005-2006, université de Liège, Faculté de médecine –Unité de recherche de chimie bio-analytique service de chimie analytique p : 2-4, 16,40-41, 91,165.
- [6] : Assurance de la qualité de produits pharmaceutiques (1998; 278 pages), Comité OMS d'experts des Spécifications relatives aux préparations pharmaceutiques. Trente-deuxième Rapport. Genève, Organisation mondiale de la Santé, 1992 (OMS, Série de Rapports techniques, N° 823).
- [7] : Guide CITAC/EURACHEM, Guide pour la qualité en chimie analytique, édition 2002
[http:// www.lne.fr](http://www.lne.fr).
- [8] : Métrologie et chimométrie –validation intra-laboratoire des méthodes d'analyse ICH ; VIM2008.
- [9] : Thèse "Etude Critique des Différentes Approches de Validation des Méthodes Analytiques "Abderrahim BOUABIDI, mai 2013 université de Liège – Faculté de Médecine et l'Université Hassan II Mohammedia – Faculté des sciences Ben M'sik.
- [10] : Michèle DESENFANT, Marc PRIEL, Cédric RIVIER, Evaluation des incertitudes des résultats d'analyse, P 105 www.techniques-ingenieur.fr.
- [11] : Guide pour l'expression de l'Incertitude de Mesure (GUM), Une norme pour la détermination des incertitudes de mesures : NF ENV 13005.
- [12] : Michèle DESENFANT, Marc PRIEL, Cédric RIVIER, de la validation des méthodes d'analyse à l'évaluation de l'incertitude des résultats de mesure.
- [13] : NF ISO 5725 Application de la statistique –Exactitude (fidélité, justesse) des résultats et méthodes de mesure.



- [14] : SANCHEZ Erick - Responsable Assurance Qualité du CTCB Justesse, fidélité - Essais inter-laboratoires (ISO 5725 et FD ISO/TS 21748 ; NF ISO 17043 et NF ISO 13528).
- [15] : Ministère de l'éducation nationale, de la jeunesse et de la vie associative (DGESCO-IGEN) Mathématiques – – Physique-chimie – Mesure et incertitudes <http://eduscol.education.fr/prog>.
- [16] : Technique d'analyse du produit fini document interne de COOPER PHARMA (Tech LABOPF 0148 EDITION 03).
- [17] : Bouklouze1 .A, Digua2. K, Démarche statistique de la validation analytique dans le domaine pharmaceutique (méthodologie et exemple pratique). (SFSTP et ICH(Q2B))
- [18] : Pharmacopée française 1983.
- [19] : Organisation mondiale de la Santé « OMS », Série de Rapports techniques, N° 957, 2010, Annexe 1 Règles OMS de bonnes pratiques applicables par les laboratoires de contrôle qualité pharmaceutique.

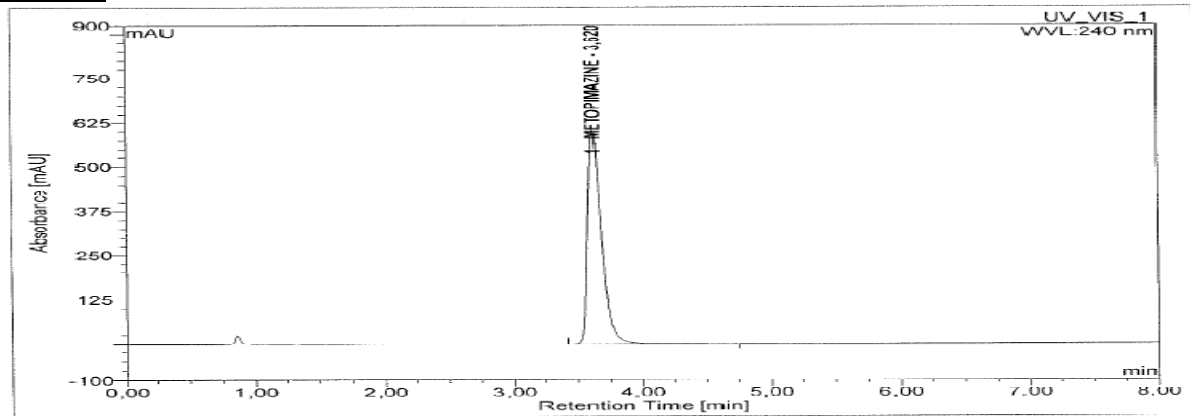


Annexe :

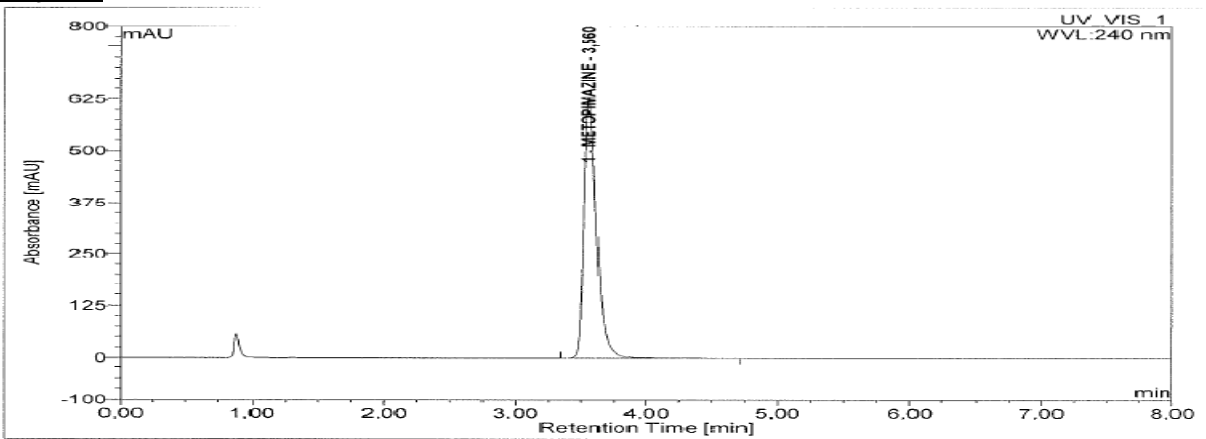
Chromatogrammes de Dosage de la Métopimazine dans une solution injectable

Fidélité :

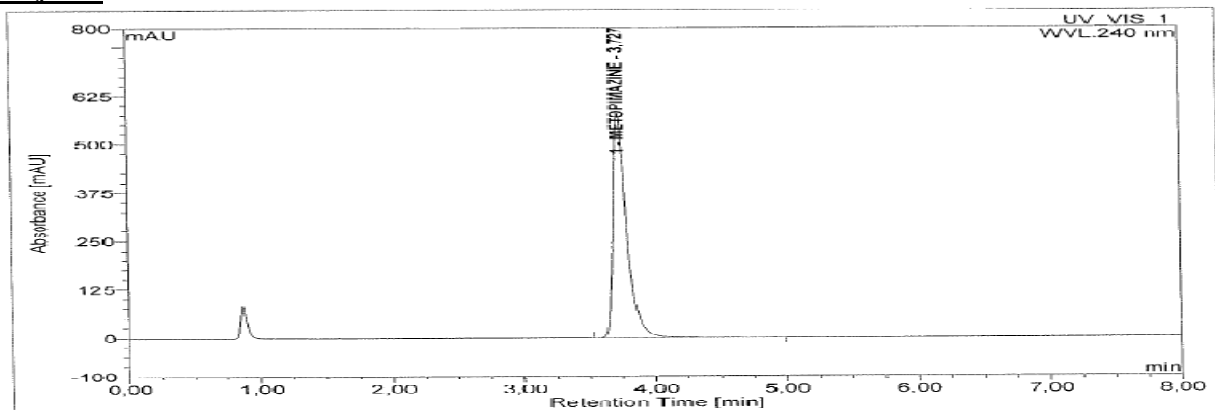
1^{ere} jour :



2^{eme} jour :

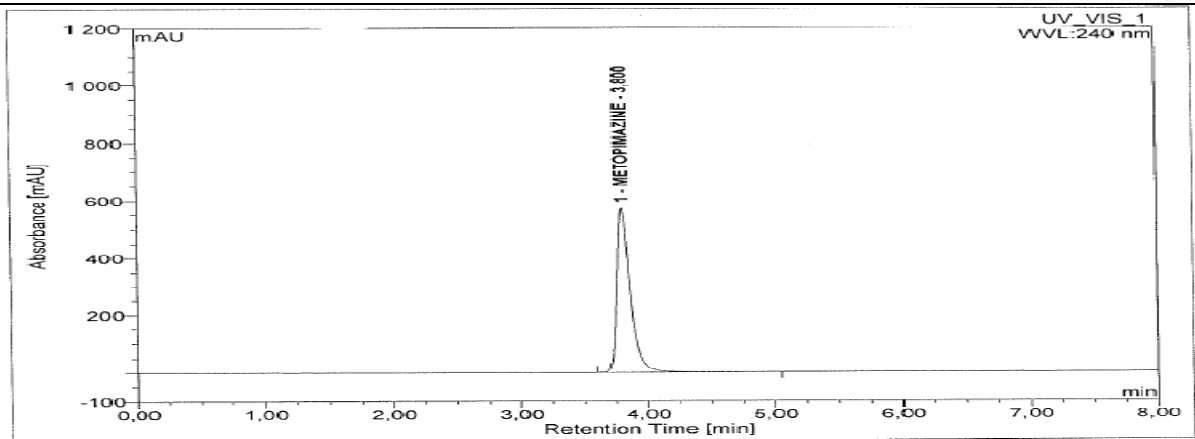
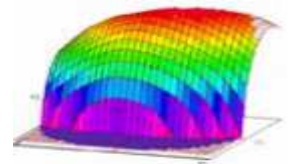


3^{eme} jour :

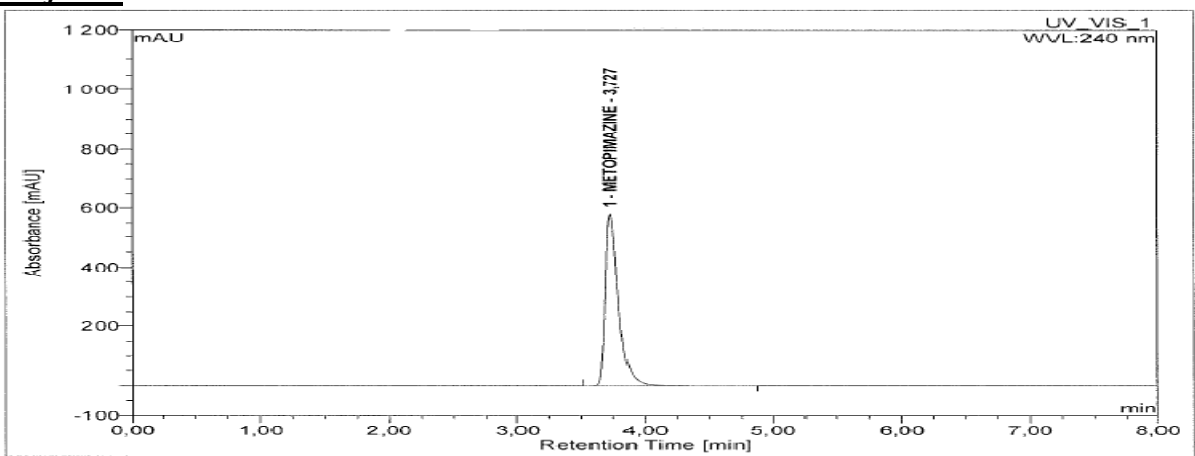


Linéarité et Justesse : (PAS)

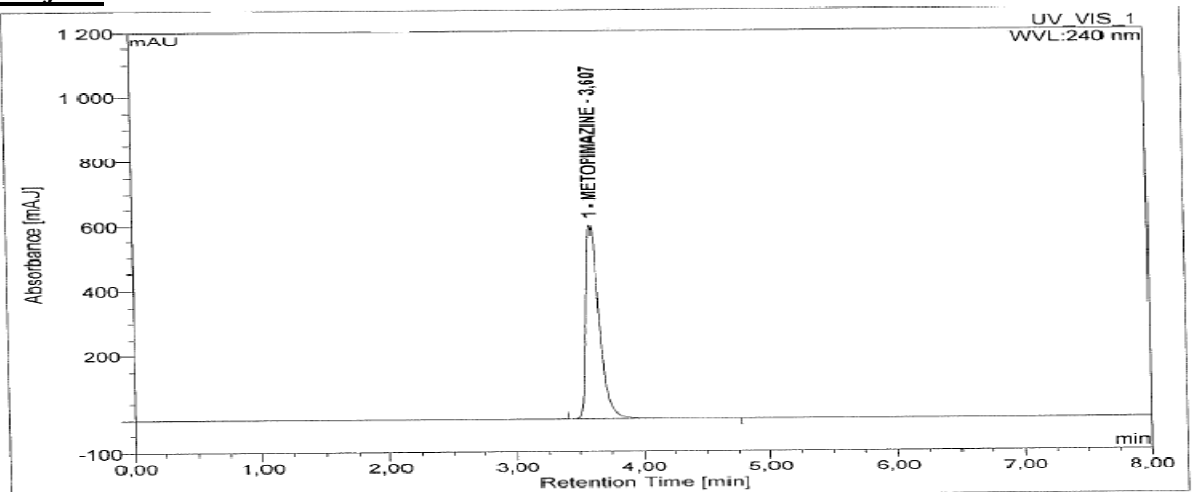
1^{ere} jour :



2^{eme} jour :

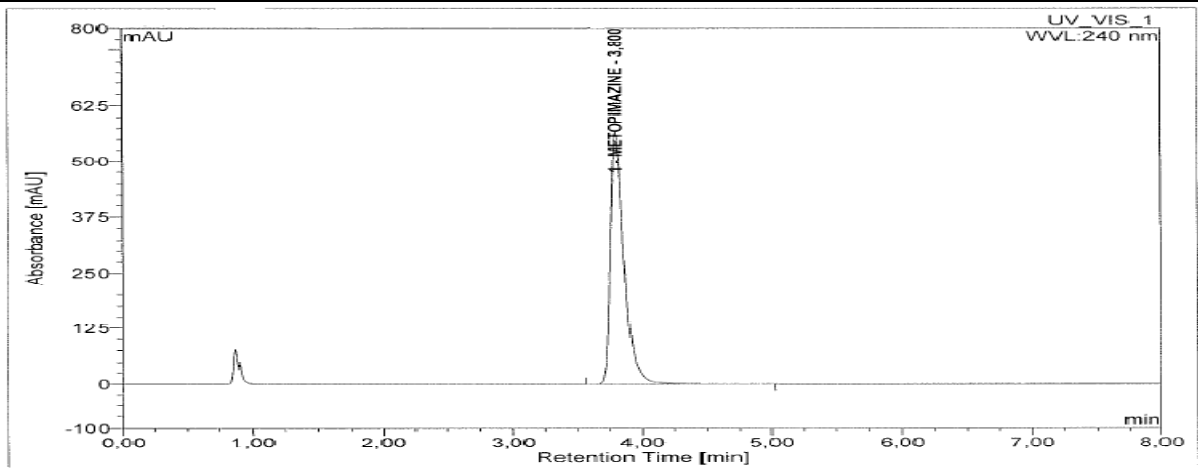
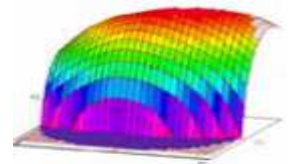


3^{eme} jour

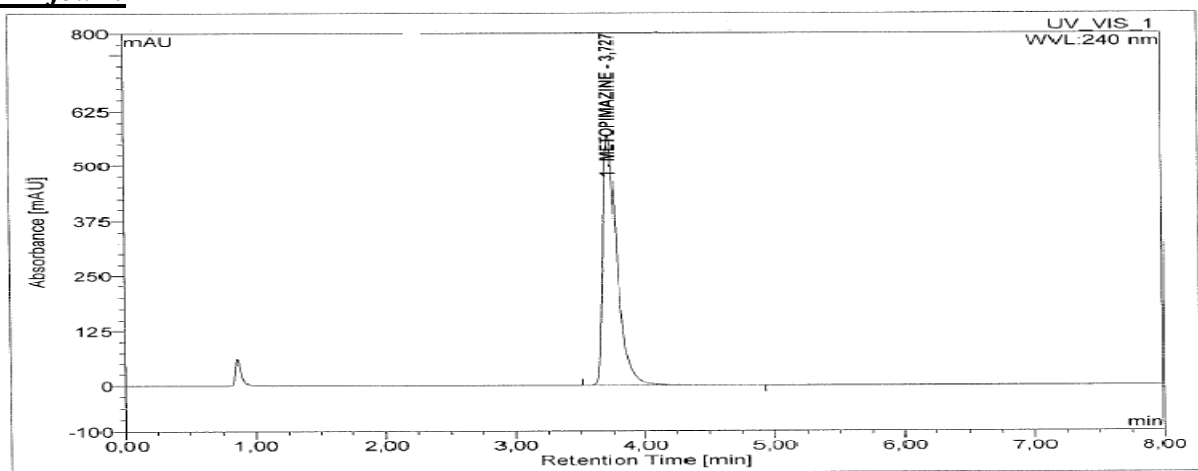


Linéarité et justesse : (FPR)

1^{ere} jour :



2^{eme} jour :



3^{eme} jour :

