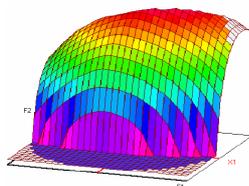


Année Universitaire : 2014-2015



**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 par profil d'exactitude de la
méthode de dosage simultané de métronidazole et de
spiramycine par HPLC**

Présenté par:

MOUHSIN Mouad

Encadré par:

- Pr. A.BOUKLOUZE
- Pr. O.SQALLI

Soutenu Le 23 Juin 2015 devant le jury composé de:

- O. SQALLI
- T. SAFFAJ
- CH. AMEZIANE

Stage effectué à : Faculté de médecine et de pharmacie - RABAT

Remerciements

Au terme de ce travail,

J'ai le plaisir d'exprimer mes profonds remerciements

*A Monsieur **A.BOUKLOUZE**, professeur à la faculté de médecine et de pharmacie de Rabat, qu'il trouve ici l'expression de ma profonde reconnaissance tant pour m'avoir accordé sa confiance que pour m'avoir guidé dans mon travail tout au long de cette période de stage. Ses compétences, ses précieux conseils, sa disponibilité et sa gentillesse.*

*Mes plus vifs remerciements vont aussi à Madame **O.SQALLI**, professeur à la faculté des sciences et techniques pour sa collaboration, et pour sa disponibilité. Sa grande expérience et ses grandes qualités scientifiques et humaines.*

Merci également aux membres de jury d'avoir accepté de juger ce travail.

Il est évident que je ne peux oublier de remercier ma famille, notamment mes parents, mes frères et ma sœur, qui ont toujours répondu présents et ont été d'un grand secours moral en toutes situations

Sommaire

INTRODUCTION	4
Partie théorique	5
I. Généralités sur la méthode analytique	6
1. Définition de la méthode analytique.....	6
2. Choix de la méthode analytique :	6
3. Cycle de vie de la méthode analytique :	7
4. Sélection d'une méthode :	7
5. Développement analytique :	7
6. La validation d'une méthode	9
7. Utilisation en routine	9
II. Généralités sur la validation analytique :	9
1. Définition de la validation d'une méthode d'analyse :	9
2. Objectif de la validation analytique :	9
3. Critères de la validation analytique	9
4. Différentes Approches de la validation analytique :	11
III. Le concept d'incertitude	22
1. Incertitude et erreur	22
2. Composantes de l'incertitude :	23
IV. Rappel sur la chromatographie	24
Partie pratique.....	26
I. Introduction :	27
II. Présentation des deux principes actifs sujet de dosage:	27
1. Métronidazole.....	27
2. Spiramycine.....	27
3. Matériels et réactifs	28
4. Méthodes :	28
III. Validation analytique par profil d'exactitude de la méthode de dosage simultanée de Métronidazole et de Spiramycine par HPLC	29
1. Validation analytique par profil d'exactitude de la méthode de dosage de métronidazole.	29
2. Validation analytique par profil d'exactitude de la méthode de dosage de Spiramycine.....	37
Conclusion générale :	45
Référence bibliographique :	46

INTRODUCTION

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 recherché, 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.

L'objectif d'une méthode analytique quantitative est de quantifier la valeur de l'échantillon avec une exactitude connue et acceptable. Traditionnellement, selon la démarche classique, ceci est accompli en examinant deux critères statistiques inhérents à la performance de la méthode analytique qui sont habituellement mesurés séparément: la justesse et la fidélité de la méthode. Cette approche suppose que si la méthode est bonne, alors les mesures qu'elle fournit seront aussi bonnes, cependant ce n'est pas toujours le cas. En fait, au lieu de mesurer ces critères statistiques séparément, il est possible d'évaluer l'exactitude d'une manière globale selon un nouveau concept basé sur l'erreur totale (erreur systématique + erreur aléatoire), il consiste à construire un outil de décision, appelé profil de l'exactitude. Les résultats collectés sous les conditions de la fidélité intermédiaire permettent de calculer l'intervalle de tolérance où une proportion élevée des résultats futurs sera comprises dans les limites acceptables. Quand ce nouvel intervalle est compris dans les limites d'acceptation $\pm\lambda$, la méthode est déclarée valide et fiable pour quantifier les échantillons d'une manière exacte et fidèle que le laboratoire aura à analyser.

Dans ce contexte, notre travail vise à valider une méthode analytique pour le dosage simultané de deux principes actifs (Métronidazole et Spiramycine) par HPLC et calculer l'incertitude de la méthode.

Le présent travail sera subdivisé en deux parties, la première est consacrée à un aperçu sur la validation analytique; ces critères et ces approches, et à un rappel sur le concept de l'incertitude.

La deuxième partie s'attache, tout d'abord à calculer des critères statistiques pour valider la méthode chromatographique de dosage des deux principes actifs (Métronidazole et Spiramycine) en utilisant le profil d'exactitude, finissant par la présentation du calcul de l'incertitude de notre méthode de dosage.

Partie théorique

I. 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
- 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 (figure1) depuis le moment où elle est choisie jusqu'au moment où on l'abandonne [4].

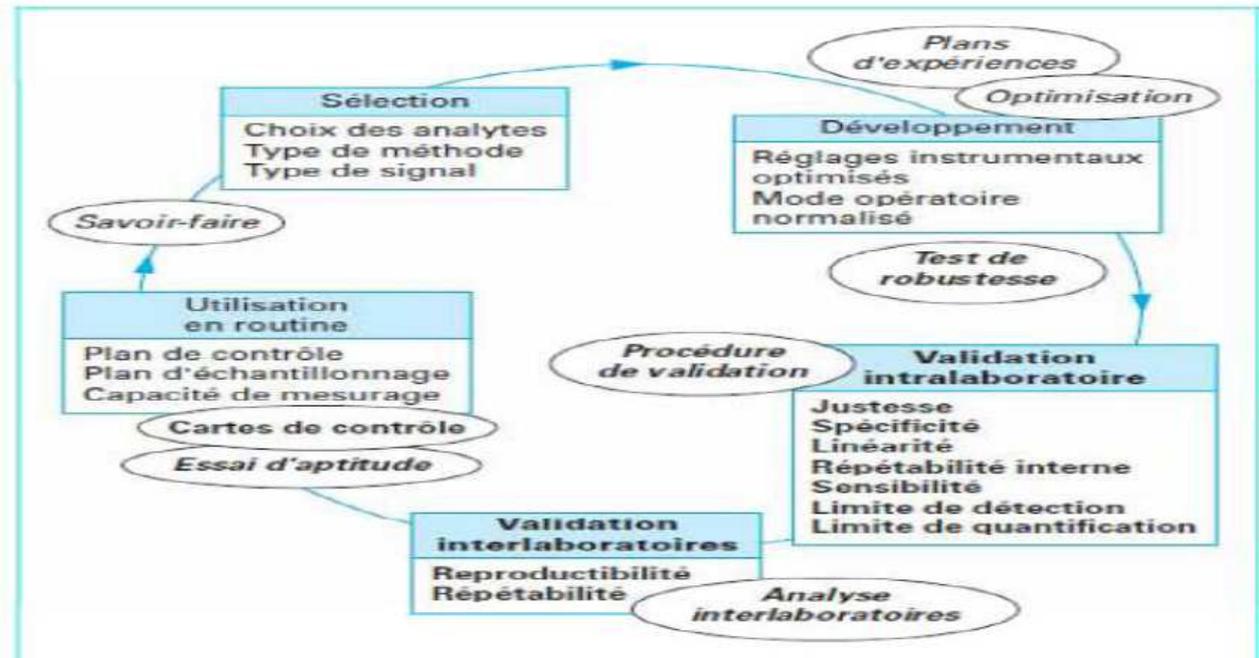


Figure 1 : Cycle de vie d'une méthode analytique [4]

4. 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].

5. 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.

5.1. Méthodologie des plans d'expériences

Les plans d'expériences font partie de la chimiométrie. L'objectif poursuivi est de fournir à l'analyste, moyennant un nombre d'expériences restreint, un maximum d'informations pertinentes 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 tout en utilisant des outils mathématiques combinés aux outils statistiques pour expliquer les phénomènes observés [5].

5.2. 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]

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

5.3. Optimisation

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 [5]. 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.

6. 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].

7. 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].

II. 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 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 même 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. Différentes 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 [9] :

- $\pm 2\%$ 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 = $Xi - \mu$, biais relatif = $\frac{Xi - \mu}{\mu t} * 100$ et le recouvrement = $(Xi/\mu) * 100$

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

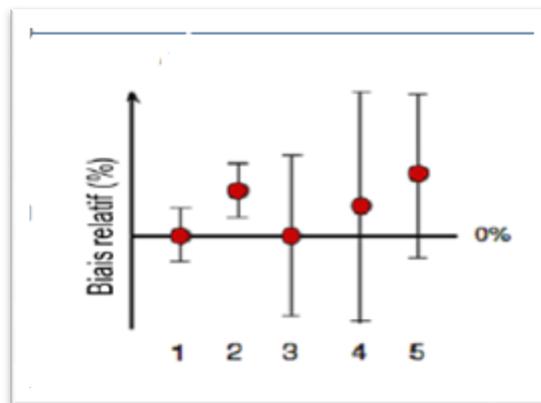


Figure 2: Les règles de décisions de validité des méthodes analytiques pour 5 situations différentes (1 à 5) selon le biais relatif de la méthode [9]

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

A côté de ces approches classiques, nouvelle stratégie de validation permet d'associer les deux éléments fondamentaux de la validation que sont la justesse et la fidélité au résultat final d'une mesure, et par conséquent de tenir compte de l'erreur totale de mesure (erreur systématique + erreur aléatoire). Le principe de cette stratégie de validation peut être traduit par l'équation : qui stipule que la différence entre une mesure (x) et sa vraie valeur (μ) doit être inférieure à la limite d'acceptation (λ) définie a priori.

$$-\lambda < x - \mu < \lambda \Leftrightarrow |x - \mu| < \lambda \quad (2)$$

La notion de limite d'acceptation introduit donc un premier critère permettant à l'analyste de prendre des décisions basées sur l'objectif de la méthode analytique. Communément, la limite d'acceptation est de 1% ou 2 % pour le dosage de principes actifs dans une matière première, de 5 % pour les formes pharmaceutiques et de 15 % pour les analyses dans les matrices biologiques ou environnementales. Pour la détermination des impuretés, une limite d'acceptation minimale de 10 % est communément admise [7].

Le profil d'exactitude est construit à partir des estimés de l'intervalle de tolérance d'espérance β de mesures attendues à chaque niveau de concentration.

Une autre notion importante définie est celle de « bonne procédure analytique » avec un risque connu qui peut se traduire par la relation suivante :

$$\Pr[|x - \mu| > \lambda] \leq \beta \quad (3)$$

avec β la proportion de mesures dans les limites d'acceptation, et λ la grandeur définissant les limites d'acceptation fixées a priori en fonction des contraintes du secteur d'activité. Le risque associé d'une procédure s'évalue par la proportion attendue de mesures en dehors des limites d'acceptation. Le risque associé dépend des estimés du biais et de la précision de la procédure analytique obtenus en phase de validation comme le montre la figure 3.

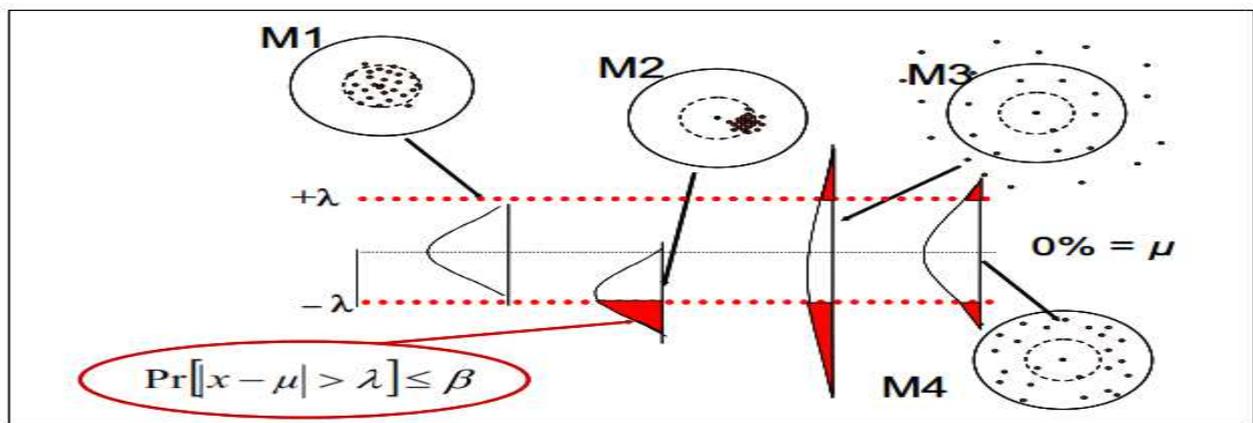


Figure 3 : Profil d'exactitude comme outil de décision pour quatre méthodes M1 (fidèle et juste), M2 (fidèle mais non juste), M3 (non fidèle et non juste) et M4 (non fidèle mais juste)

4.4.1. Mise en œuvre du profil d'exactitude

➤ Définir la quantité mesurée

Il faut faire la distinction entre deux types de méthodes [4]:

– Les méthodes « indirectes ou rationnelles » qui exigent un étalonnage préalable pour calculer la concentration des échantillons inconnus. Pour ces méthodes, on procède en deux étapes : d'abord construire la courbe d'étalonnage en utilisant le même principe physico-chimique que celui qui sert pour les échantillons ; ensuite faire des mesures sur les échantillons inconnus et calculer leurs concentrations à l'aide d'un modèle d'étalonnage ;

– Les méthodes « directes ou empiriques » dont l'analyte est défini par la méthode elle-même. On mesure alors la concentration des échantillons inconnus à l'aide d'une autre méthode de mesure, comme une pesée ou une titrimétrie.

➤ ***Préciser des objectifs de la validation***

- [Choisir le domaine de validation](#)

Définir le domaine de validation de la méthode, sous la forme d'une gamme de concentrations absolues ou relatives. Le choix du domaine d'application peut correspondre à une obligation légale. Par exemple, dans le domaine pharmaceutique, il faut prendre en compte les domaines minimums suivants :

- pour les substances pures ou les spécialités pharmaceutiques, le domaine doit au moins couvrir entre 80 et 120 % de leurs valeurs nominales [4].

- pour une vérification de concentration continue, le domaine doit s'étendre entre 70 et 130 % de la concentration attendue [4].

➤ ***Sélectionner les échantillons de validation***

- [Choisir la ou les matrices](#)

Les essais qui servent à calculer les éléments du profil d'exactitude doivent être réalisés sur des échantillons clairement identifiés, appelés échantillons de validation. Ce sont des matériaux qui doivent être le plus représentatif possible du domaine d'application de la méthode. Ils peuvent ainsi inclure différentes matrices pour les méthodes multi-matrices. Mais surtout on doit être capable de leur attribuer une valeur de référence qui représente la teneur attendue. Penser à choisir des matériaux stables et homogènes en quantité suffisante pour réaliser l'ensemble des essais définis par le plan d'expérience de validation.

- [Établir les valeurs de référence des échantillons de validation](#)

Pour estimer la justesse de la méthode, il faut disposer d'échantillons de validation dont la concentration est connue le plus exactement possible avec une incertitude connue. Cette concentration correspond à la valeur de référence assignée à l'échantillon de validation et doit être fixée indépendamment de la méthode à valider, on la note X. Il existe plusieurs approches possibles pour établir la valeur de référence assignée à un échantillon de validation, parmi lesquelles :

- utiliser des matériaux de référence certifiés (MRC), externes (MRE) ou internes (MRI) ; la traçabilité de ces matériaux décroît en fonction de leur nature ;

- réaliser des ajouts dosés à partir d'une molécule étalon de pureté connue ;

- préparer des échantillons dopés ou synthétiques avec la matrice choisie ;

– utiliser une méthode de référence, appliquée en interne ou en externe par un laboratoire pair.

➤ **Planifier les essais de validation**

• Organiser les essais de validation

Le plan d'expérience de validation sert à estimer, dans les conditions où le mode opératoire sera appliqué en routine, quelles seront les performances en routine de la méthode. Dans ce contexte, un essai consiste à faire un mesurage sur un échantillon de validation, de préférence dont la valeur de référence a été établie avec une incertitude connue.

Pour réaliser ce plan, prévoir :

- I séries de mesures ($1 \leq i \leq I$) ;
- pour chaque série, effectuer J répétitions ($1 \leq j \leq J$) ;
- K niveaux de concentration ($1 \leq k \leq K$) couvrant le domaine d'application de la méthode.

Dans ce contexte, on entend par un niveau une valeur de référence.

Construire un tableau qui rassemblera les données brutes selon le modèle du tableau 1. Les valeurs de référence X_k des échantillons de validation sont exprimées en quantités absolues (mg, g,...) ou relatives (mg/kg, $\mu\text{g}/\text{kg}$, mg/l,...). Pour les méthodes indirectes, la réponse Y est notée dans une unité correspondant à celle de la méthode instrumentale (surface du pic, hauteur de pic, absorbance,...). Pour les méthodes directes, elle est directement exprimée dans la même unité que celle des valeurs de référence.

Tableau 1 : Organisation des mesures du plan de validation

Niveaux	Séries (Jours)	Concentrations des échantillons de validation (valeurs de référence) X	Mesurages (Réponses instrumentales) Y			
			1	2	...	J
1	1	x_{11}	y_{111}	y_{121}	...	y_{1J1}
			
	I		...			
2	1					
	...					
	I					
...				
K	1					
				
	I	x_{IK}				y_{IJK}

•

- Choisir le nombre de séries, de répétitions et de niveaux de validation

Dans le cas d'une validation interne, on peut choisir les exigences minimales suivantes :

- le nombre de séries I égal ou supérieur à 3. Une série peut être représentée par un jour mais aussi par une combinaison de diverses sources d'incertitude, comme plusieurs appareils, plusieurs opérateurs et plusieurs jours.
- le nombre constant de répétitions par série et par niveau J égal ou supérieur à 2.
- le nombre de niveaux de concentration K égal ou supérieur à 3.

➤ **Planifier l'étalonnage (pour les méthodes indirectes)**

- Organiser les essais d'étalonnage

Le plan d'étalonnage a pour objectif de permettre l'estimation des coefficients du modèle de la courbe d'étalonnage. Il n'est obligatoire que pour les méthodes indirectes qui requièrent un étalonnage pour réaliser la quantification. Pour réaliser ce plan, on va choisir les paramètres minimums suivants :

- prévoir I séries ($1 \leq i \leq I$). Ce nombre doit absolument être le même que pour le plan de validation. Par exemple, si le jour se confond avec la série, les mesurages d'étalonnage doivent être effectués les mêmes jours que les mesurages de validation. On calculera ainsi un modèle d'étalonnage pour chaque jour et non pas un modèle global ;

- pour chaque niveau, effectuer J' mesurages répétés ($1 \leq j \leq J'$). Le nombre de répétitions J' peut être différent du nombre J choisi pour le plan de validation ;

- pour chaque série prévoir K' niveaux ($1 \leq k \leq K'$) étalons de concentrations connues, couvrant la gamme d'étalonnage. Le nombre de niveaux K' peut être différent du nombre K choisies pour le plan de validation. Construire le tableau 2 qui résume l'ensemble des essais et mesurages à effectuer. Dans ce tableau les concentrations des étalons sont exprimées en quantités absolues (mg, g,...) ou relatives (mg/kg, µg/kg, mg/l,...). Après réalisation, les réponses sont notées dans les unités de la méthode instrumentale (surface du pic, hauteur de pic, absorbance,...).

Tableau 2 : Organisation des essais du plan d'étalonnage

Niveaux des étalons	Séries (Jours)	Concentrations des échantillons de validation (valeurs de référence) X	Mesurages (Réponses instrumentales) Y			
			1	2	...	J'
1	1	x_{11}	y_{111}	y_{121}	...	$y_{1J'1}$
			
	I		...			
2	1					
	...					
	I					
...				
K'	1					
				
	I	$x_{IK'}$				$y_{IJ'K'}$

➤ **Calculer les concentrations prédites inverses (pour les méthodes indirectes)**

4.4.2. Calculer les modèles d'étalonnage

Pour les méthodes indirectes, il est nécessaire d'exprimer la réponse instrumentale Y en fonction des concentrations x des étalons, à l'aide d'un modèle mathématique de la forme :

$Y = f(x)$ Les fonctions classiquement utilisées sont regroupées au tableau 3 mais cette liste n'est pas limitative. Les paramètres a_1, a_2, \dots sont appelés les paramètres du modèle. Calculer les paramètres du modèle d'étalonnage à partir des données recueillies pour chaque série k , de façon à obtenir k ensembles de valeurs des paramètres. Le même type de modèle doit être utilisé pour l'ensemble des données, quelle que soit la série, mais les valeurs des paramètres peuvent être différentes d'une série à l'autre. Cette approche permet de prendre en compte les variations inter-séries (inter-jours) observées. Le calcul des estimations des coefficients du modèle d'étalonnage peut faire appel aux diverses techniques statistiques classiques détaillées dans la littérature :

1. Régression par la méthode des moindres carrés
2. Régression pondérée
3. Régression non linéaire

Tableau 3 : Principales fonctions de réponse utilisables pour un étalonnage

Type	Équation	Souhaitable pour K'	Minimum pour K'
Droite passant par l'origine	$Y = a_1x$	2	1
Droite	$Y = a_0 + a_1x$	3	2
Fonction quadratique	$Y = a_0 + a_1x + a_2x^2$	4	3
Fonction logistique à 4 paramètres	$Y = a_0 + \frac{a_3 - a_0}{1 + \left(\frac{a_2}{x}\right)^{a_1}}$	5	5

Si le type de modèle d'étalonnage a été clairement établi lors du développement de la méthode, on pourra choisir le nombre minimum pour K' . à partir des données du plan d'étalonnage, il est possible d'estimer plusieurs modèles d'étalonnage puis de construire ainsi plusieurs profils d'exactitude. On pourra alors retenir le modèle qui fournit le profil le plus favorable. Il conviendra alors de modifier le mode opératoire en fonction du modèle choisi, sans pour autant modifier les limites d'acceptabilité λ .

- [Calculer les concentrations retrouvées par prédiction inverse](#)

Pour les méthodes indirectes, les modèles d'étalonnage servent à calculer les concentrations retrouvées, à partir des données au plan de validation (Tableau 1), en utilisant la fonction inverse du modèle d'étalonnage, selon le modèle mathématique suivant :

$$\hat{x} = z = f^{-1}(Y) \quad (4)$$

La fonction inverse est appelée équation de prédiction inverse et les valeurs z ainsi obtenues sont appelées concentrations retrouvées.

➤ **Calculer les critères de validation**

- [Calculer la justesse et la fidélité par niveau](#)

Rassembler avec les critères de justesse, calculés pour un niveau et non plus pour un mesurage individuel, sous la forme d'un tableau, comme le tableau 4. Dans les cas très particuliers où la justesse n'est pas exigée, la valeur de référence moyenne peut être fixée comme étant égale à la concentration retrouvée moyenne. Il est alors inutile de calculer un biais moyen ou un taux de recouvrement moyen.

Tableau 4 : Critères de fidélité et de justesse par niveau

Critères	Symbole	Niveaux		
		1	...	K
Valeur de référence moyenne	$\bar{\bar{x}}_k$			
Concentration retrouvée moyenne	$\bar{\bar{z}}_k$			
Écart-type de répétabilité	s_{kr}			
Écart-type inter-séries	s_{kB}			
Écart-type de fidélité intermédiaire	$s_{kFI} = \sqrt{s_{kr}^2 + s_{kB}^2}$			
Coefficient de variation de la fidélité intermédiaire	$\frac{s_{kFI}}{\bar{\bar{x}}_k} \times 100$			
Biais moyen absolu	$\bar{\bar{z}}_k - \bar{\bar{x}}_k$			
Biais moyen relatif	$\left(\frac{\bar{\bar{z}}_k - \bar{\bar{x}}_k}{\bar{\bar{x}}_k} \right) \times 100$			
Taux de recouvrement moyen	$\frac{\bar{\bar{z}}_k}{\bar{\bar{x}}_k} \times 100$			

- [Calculer les intervalles de tolérance](#)

Le calcul se fait à partir des données du tableau 4, indépendamment pour chaque niveau de concentration k. Pour des raisons de simplification des formules, l'indice k est omis dans les formules suivantes. Exprimer l'intervalle de tolérance comme un intervalle symétrique autour de la concentration retrouvée moyenne $\bar{\bar{z}}$ du niveau :

$$\bar{\bar{z}} \pm k_{tol} \times s_{IT} \quad (5)$$

Calculer l'écart-type de l'intervalle de tolérance s_{IT} selon la formule (5) ; il servira aussi à l'estimation de l'incertitude de mesure. Il est obtenu grâce aux formules suivantes :

$$s_{IT} = s_{FI} \left(\sqrt{1 + \frac{1}{I \times J \times B^2}} \right) \quad (6)$$

$$B = \sqrt{\frac{R+1}{J \times R+1}} \quad (7)$$

$$R = \frac{s_B^2}{s_r^2} \quad (8)$$

La quantité k_{tol} est appelé facteur de couverture de l'intervalle de tolérance et vaut :

$$k_{tol} = t_{v, \frac{1+\beta}{2}} \quad (9)$$

$t_{v, \frac{1+\beta}{2}}$: Le quantile de la distribution t de Student pour v degrés de liberté et β la probabilité du contenu de l'intervalle de tolérance. Le nombre de degrés de liberté v est calculé selon méthode d'approximation et donne :

$$v = \frac{(R+1)^2}{\frac{\left(R + \frac{1}{J}\right)^2}{I-1} + \frac{1 - \frac{1}{J}}{IJ}} \quad (10)$$

Pour chaque niveau k, calculer l'écart-type de l'intervalle de tolérance s_{IT} , le facteur de couverture k_{tol} et les limites basse et haute de l'intervalle de tolérance. La valeur choisie pour β doit être au moins de 80%. L'ensemble des calculs est rassemblé dans un tableau de la forme du tableau 5.

Tableau 5 : résumé des différents éléments qui serviront au profil d'exactitude, incluant les limites des intervalles de tolérance par niveau

Critères	Symbole	Niveaux		
		1	...	K
Valeur de référence moyenne	$\bar{\bar{x}}$			
Limite de tolérance basse	$\bar{\bar{z}} - k_{tol} \times s_{IT}$			
Limite de tolérance haute	$\bar{\bar{z}} + k_{tol} \times s_{IT}$			
Limite de tolérance basse relative	$\left(\frac{\bar{\bar{z}} - k_{tol} \times s_{IT}}{\bar{\bar{x}}}\right) \times 100$			
Limite de tolérance haute relative	$\left(\frac{\bar{\bar{z}} + k_{tol} \times s_{IT}}{\bar{\bar{x}}}\right) \times 100$			
Limite d'acceptabilité basse relative	$(1 - \lambda) \times 100$			
Limite d'acceptabilité haute relative	$(1 + \lambda) \times 100$			

➤ **Construire le profil d'exactitude**

Le profil d'exactitude peut être construit de différentes façons, en fonction du type de données traité. La méthode la plus classique, lorsqu'on a à faire à des concentrations relatives, est celle présentée à la figure 3 où les performances sont exprimées de façon relative, par un taux de recouvrement. Mais si les données sont des comptages exprimés en logarithmes, il vaut mieux exprimer les performances, comme des différences entre 2 logarithmes, ce qui est équivalent à un rapport. Pour construire le profil d'exactitude, sélectionner dans le tableau 5, les lignes suivantes :

– à reporter sur l'axe horizontal

1) Les valeurs de référence moyennes.

– à reporter sur l'axe vertical

2) Les limites de tolérance basses relatives ;

3) Les limites de tolérance hautes relatives ;

4) Les taux de recouvrement moyens ;

5) Les limites d'acceptabilité basses relatives ;

6) Les limites d'acceptabilité 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 3.

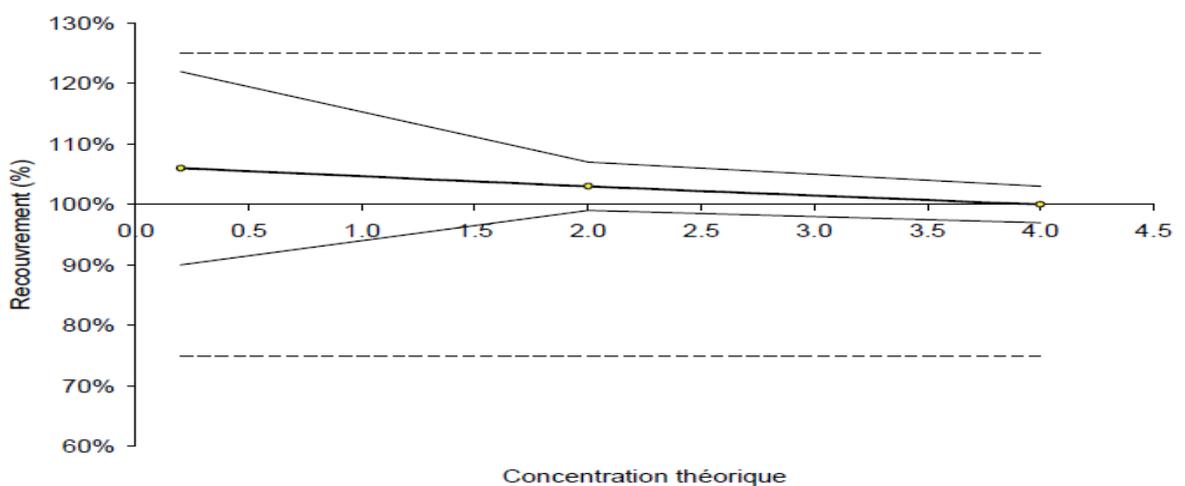


Figure 3 : *profil d'exactitude exprimé par le taux de recouvrement*

III. Le concept d'incertitude

L'incertitude au sens large, d'une mesure est la zone au sein de laquelle se trouve probablement la valeur vraie [5]. Cette zone est définie par une dispersion et se quantifie par un écart type. Elle reflète la qualité d'un mesurage, d'un instrument ou d'une méthode employée. C'est donc un indicateur de qualité.

De nos jours, l'expression de l'incertitude associée aux résultats de mesure devient un paramètre important de performance d'une méthode analytique à considérer à côté des critères de validation. Pour se rendre compte, il suffit de regarder pendant ces cinq dernières années la quantité de directives, normes, recommandations émises et le nombre d'articles publiés en rapport avec l'incertitude.

En fait, lorsqu'une série de résultats de mesures est générée lors de l'application d'une méthode analytique, par exemple lors de la validation d'une méthode de dosage, lors de son étude de robustesse ou lors de son application à large échelle par plusieurs laboratoires, et du fait que ces résultats ne sont jamais identiques, une variabilité de ces résultats est logiquement observée. Celle-ci traduit la dispersion des données dues à ces mesures et est considérée comme une incertitude.

Le terme « mesurande » est défini comme étant une quantité particulière sujette à une mesure. Un mesurande peut être la concentration d'un analyte. Ce terme n'est pas très fréquent dans le domaine analytique. Toutefois, il a été repris dans le vocabulaire international de métrologie et adopté dans le domaine de l'incertitude pour le différencier du terme « analyse chimique » employé pour mesurer d'autres grandeurs telles que la couleur, le pH... Il convient également de le différencier du terme « analyte » préféré en chimie analytique pour définir un élément (ou une substance) recherché ou déterminé dans un échantillon.

1. Incertitude et erreur

L'erreur est définie comme étant la différence entre un résultat individuel et la valeur exacte ou vraie valeur du mesurande. En tant que telle, l'erreur est une valeur unique et la connaissance de cette valeur peut être appliquée pour corriger le résultat. Cependant, en pratique la correction n'est pas faisable car la valeur des erreurs n'est pas exactement connue.

L'incertitude quant à elle, prend la forme d'un intervalle et, si elle est estimée pour une procédure analytique et un type particulier d'échantillon, elle peut s'appliquer à toutes les déterminations décrites de cette façon. La valeur de l'incertitude ne peut parfois pas être utilisée pour corriger le résultat d'une mesure et l'incertitude du résultat d'une mesure ne devrait jamais être interprétée comme représentant l'erreur elle-même, ni l'erreur subsistant après correction.

L'erreur a deux composantes. La première, l'erreur aléatoire, résulte typiquement des variations imprévisibles des grandeurs ayant une influence sur le résultat. Ces effets donnent lieu à des variations dans les observations répétées du mesurande. L'erreur aléatoire d'un résultat analytique ne peut être compensée, mais il est possible de la réduire en augmentant le nombre d'observations. La seconde, une composante systématique appelée aussi biais systématique, est définie comme une composante de l'erreur qui, au cours d'un ensemble d'analyses du même mesurande, reste constante ou varie de façon prévisible. Elle est indépendante du nombre de mesures réalisées et ne peut donc être réduite par l'augmentation du nombre d'analyses dans des conditions de mesure constantes [5]. Le biais est la différence entre une valeur observée et la vraie valeur alors que l'erreur aléatoire est la différence entre la valeur observée et celle attendue.

Le biais peut avoir aussi deux composantes, le biais de la méthode qui est une erreur inhérente à la méthode et le biais du laboratoire qui peut être considéré comme étant le biais introduit spécifiquement par un laboratoire lors de l'application d'une méthode non biaisée.

Finalement, pour le résultat d'une mesure x , l'erreur doit être distinguée de l'incertitude. Les équations suivantes le montrent clairement:

$$x = \tau + e = \tau + \Delta + \delta = \mu + \delta \quad (11)$$

Où τ représente la vraie valeur, e l'erreur associée qui est composée du biais Δ et de l'erreur aléatoire δ , et μ la valeur attendue obtenue suite à une série d'observations infinies,

$$x \pm U_x \quad (12)$$

Où U_x représente l'incertitude élargie du résultat de la mesure x . L'incertitude, représentée ici par l'incertitude élargie, est donc un intervalle.

2. Composantes de l'incertitude :

2.1. Incertitude type :

Dans l'estimation de l'incertitude globale, il peut être nécessaire de considérer chaque source d'incertitude et de la traiter séparément pour obtenir la contribution de cette source. Chacune des contributions à l'incertitude prise séparément est appelée composante de l'incertitude. Lorsqu'elle est exprimée à l'aide d'un écart-type, une composante de l'incertitude est

appelée incertitude type. S'il existe une corrélation entre des composantes, elle doit être prise en compte par la détermination de la covariance.

Pour une distribution donnée, l'écart-type représente la mesure de la dispersion des données autour de la moyenne. .

2.2. Incertitude type composée

Pour le résultat Y d'une mesure, l'incertitude totale appelée incertitude type composée et notée $u_c(y)$, est un écart-type estimé égal à la racine carrée de la variance totale obtenue en combinant toutes les composantes de l'incertitude, évaluée toutefois à l'aide de la loi de propagation de l'incertitude.

2.3. Incertitude élargie :

Pour la plupart des applications en chimie analytique une incertitude élargie U devrait être utilisée. L'incertitude élargie définit un intervalle dans lequel on estime que la valeur du mesurande est située avec un niveau plus élevé de confiance. U est obtenu en multipliant $u_c(y)$, l'incertitude type composée, par un facteur d'élargissement k. Le choix du facteur k dépend du niveau de confiance désiré. Pour un niveau de confiance approximatif de 95 %, k est 2.

IV. Rappel sur la chromatographie

Selon la nature de la phase stationnaire, on peut distinguer les mécanismes suivants :

- ❖ Chromatographie d'adsorption
- ❖ Chromatographie de partage
- ❖ Chromatographie par échange d'ions
- ❖ Chromatographie par exclusion de taille [10].

La chromatographie de partage est la technique de chromatographie liquide, la plus utilisée. Ce mécanisme est surtout utile pour la séparation de molécules très polaires de masses molaires inférieures à 3000 (composés non-ioniques).

Il y a 2 types de chromatographie de partage (tableau 6)

- ✓ Chromatographie de partage sur phase inversée
- ✓ Chromatographie de partage sur phase normale (classique)

Environ 80% des séparations chromatographiques en phases liquides sont effectuées par partage sur des phases inversées.

Tableau 6 : Types de chromatographie de partage

	<u>Phase inversé</u>	<u>Phase normale</u>
<u>Phase stationnaire</u>	Non polaire *silice greffée par une chaîne alkyle ou phényle	Polaire * C ₂ H ₄ CN * C ₃ H ₆ NH ₂ * C ₃ H ₆ N(CH ₃) ₂ * diol
<u>Phase mobile</u>	Polaire - eau - méthanol - acétonitrile - tétrahydrofurane	Non polaire - n-hexane - chloroforme - éther

❖ **Principe de la chromatographie liquide (HPLC)**

La chromatographie en phase liquide est une méthode d'analyse physico-chimique qui sépare les constituants d'un mélange (les solutés) par entraînement au moyen d'une phase mobile (liquide) le long d'une phase stationnaire (solide) grâce à la répartition sélective des solutés entre ces deux phases. Chaque soluté est donc soumis à une force de rétention (exercée par la phase stationnaire) et force de mobilité (due à la phase mobile).(Figure 4)

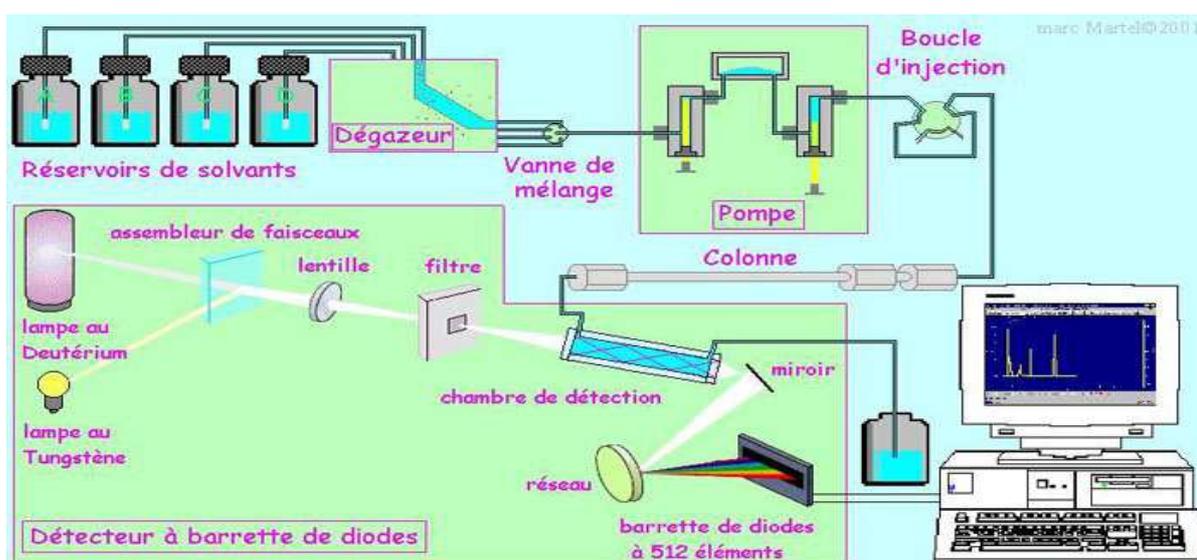


Figure 4 : Système de chromatographie liquide

Partie pratique

3. Matériels et réactifs

- ✓ Etalon de travail : substance chimique de référence.
- ✓ Acétonitrile pour HPLC.
- ✓ Acide orthophosphorique.
- ✓ Sodium hydroxyde.
- ✓ Instrumentation HPLC (**Perkin Elmer**) comprenant :
 - Une pompe quaternaire
 - Un injecteur automatique
 - Un détecteur DAD
 - Un système d'acquisition des données (**logiciel Chromera**)

4. 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.

4.1. Conditions chromatographiques

-phase mobile :

La phase mobile est un mélange de 80% de solution tampon et 20% d'Acétonitrile. La solution tampon est préparée par la méthode suivante : On prélève 6,7 ml d'acide ortho phosphorique (85%), 20ml de soude 2 M et on compléter à 1 litre avec de l'eau distillée. on Ajuste si nécessaire à pH 2,0 avec NaOH 0,1 M ou H₃PO₄ dilué.

- Phase stationnaire :

La phase stationnaire est une colonne type RP8e de longueur 250mm, diamètre 4 mm et granulométrie 10 µm.

- ✓ Température de la colonne : Ambiante.
- ✓ Débit de la phase mobile : 1.2 ml min⁻¹.
- ✓ Longueur d'onde de détection : 232 nm.
- ✓ Volume injecté : 20 µL

III. Validation analytique par profil d'exactitude de la méthode de dosage simultanée de Métronidazole et de Spiramycine par HPLC

1. Validation analytique par profil d'exactitude de la méthode de dosage de métronidazole.

1.1. Choix du domaine d'application

-Intervalle de Concentration : le domaine de validation va de 22.5µg/ml à 33.756µg/ml.

Tableau 7 : le domaine de validation de la méthode de dosage de métronidazole

	niveau	concentration(µg/ml)
niveau1	80%	22,50
niveau2	90%	25,32
niveau3	100%	28,13
niveau4	110%	30,94
niveau5	120%	33,76

1.2. Plan d'expérience d'étalonnage :

Notre méthode de dosage est une méthode indirecte qui nécessite un étalonnage pour réaliser la quantification à l'aide d'un modèle de régression reliant la surface du pic à la concentration introduite. Il faut réaliser un étalonnage pour chaque série et l'utiliser pour quantifier les standards de validation. Le but est de prendre en compte la variabilité de la réponse instrumentale d'une série à l'autre et de vérifier sur plusieurs jours si la méthode est capable de quantifier de façon constante le même échantillon.

Le plan d'étalonnage est formé de I=3 séries (codées jour1, jour2, jour3) avec K' = 5 niveaux de concentration (exprimés en 22.5 ; 25.31 ; 28.13 ; 30.94 ; 33.75 µg/ml) et J' = 2 répétitions par jours. Les concentrations introduites sont exprimées en µg/ml et les réponses en unités arbitraire (surface du pic).

✓ Préparation des standards d'étalonnage :

Une solution mère a été préparée par dissolution d'une quantité exactement pesée de 28.0 mg de métronidazole et 37.0 mg de spiramycine dans 50 ml de mélange de solvant pour avoir une concentration de 0.56 mg/mL de métronidazole et 0.74 mg/ml de spiramycine. Ensuite, des dilutions successives ont été réalisées en vue d'obtenir plusieurs solutions filles aux niveaux de concentration tels que mentionnés dans le tableau 8. Ces solutions ont été utilisées comme standards d'étalonnage. Chaque solution a été analysée deux fois.

Tableau 8: plan d'étalonnage (mesures exprimées en unités arbitraire)

Séries	niveaux	Concentration (µg/ml)	surface du pic	
jour 1	80%	22,50	583124,20	
		22,50	581752,30	
	90%	25,32	692909,20	
		25,32	686179,00	
	100%	28,13	756211,20	
		28,13	769869,80	
	110%	30,94	827570,10	
		30,94	860957,60	
	120%	33,76	924775,40	
		33,76	911521,20	
	jour 2	80%	22,50	597121,50
			22,50	586638,10
90%		25,32	696389,10	
		25,32	691351,60	
100%		28,13	781381,30	
		28,13	770553,80	
110%		30,94	885254,40	
		30,94	871903,60	
120%		33,76	921790,50	
		33,76	922331,20	
jour 3		80%	22,50	592587,30
			22,50	584873,8
	90%	25,32	697742,4	
		25,32	697949,9	
	100%	28,13	771358,9	
		28,13	792334,2	
	110%	30,94	882389,4	
		30,94	906788,3	
	120%	33,76	929602,2	
		33,76	946275,9	

✓ *Modèle d'étalonnage*

Le modèle choisi est une droite du type $Y = a_0 + a_1X$, où a_0 est le blanc, a_1 la pente ou la sensibilité. La méthode de calcul est la méthode de régression aux moindres carrés. Un modèle est

calculé pour chaque jour. Le tableau 9 rassemble les estimations des coefficients du modèle d'étalonnage pour chaque jour.

Grphe 1 : Droites d'étalonnage des essais pour chaque jour

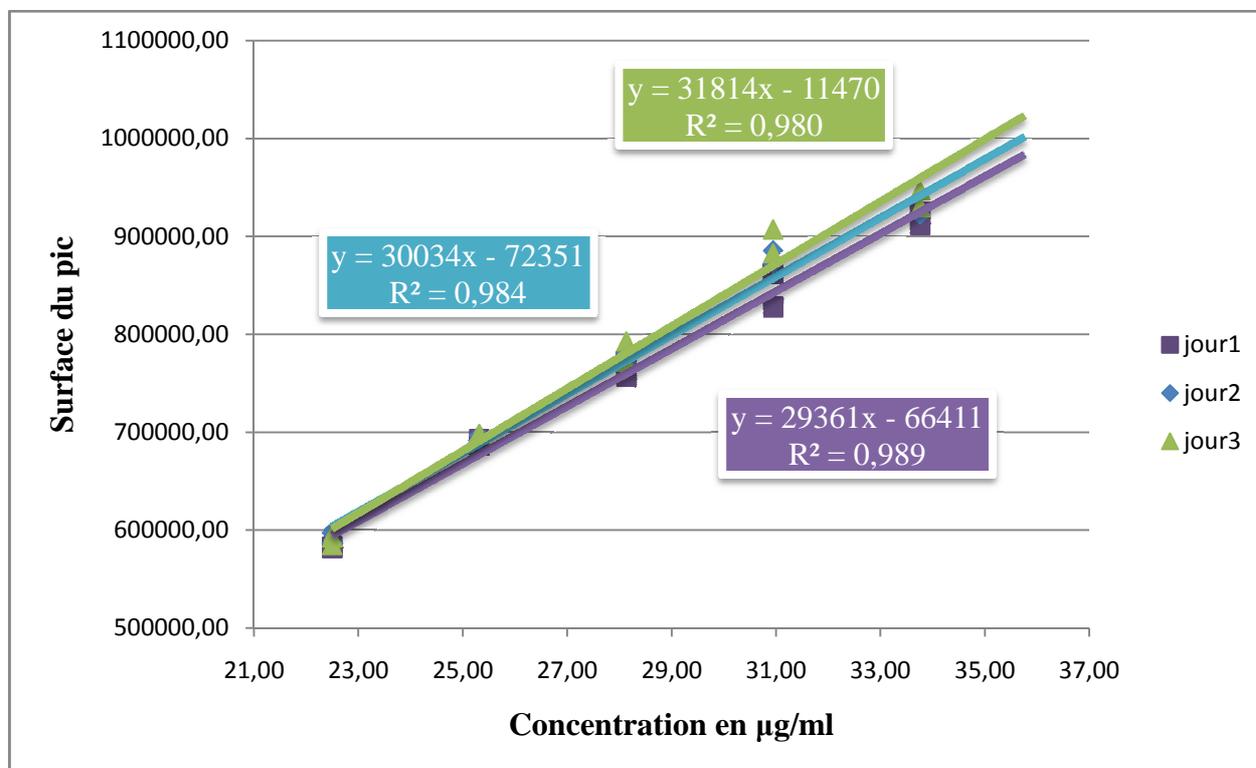


Tableau 9 : Les coefficients des modèles d'étalonnage

	jour1	jour2	jour3
Pente	29360,88	30033,66	31813,82
Blanc	-66411,21	-72351,33	-114707,10

Les variations observées de la sensibilité et du blanc font partie de l'incertitude de la mesure. Elles confirment aussi la nécessité de conduire les essais sous condition de fidélité intermédiaire.

1.3. Plan de validation :

Le plan de validation est formé de I = 3 séries (codées jour1, jour2, jour3) avec K = 5 niveaux de concentration (22.5 ; 25.31 ; 28.13 ; 30.94 ; 33.75 µg/ml) et J = 3 répétitions par jours. Les concentrations introduites sont exprimées en µg/ml et les réponses en unités arbitraire (surface du pic).

✓ *préparation des standards de validation*

Des solutions mères indépendantes ont été préparées de la même façon que pour celles des standards d'étalonnage. Elles ont été successivement diluées en vue d'obtenir des solutions intermédiaires. Les solutions filles dont les concentrations sont indiquées dans le tableau 10 ont été obtenues par dilution de ces solutions intermédiaires dans la matrice.

Trois répétitions ($J = 3$) ont été préparées pour chaque niveau de concentration ($K = 5$). L'ensemble de l'étape de préparation a été répété sur trois séries ($I = 3$).

Tableau 10 : Plan de validation (réponse exprimées en unités arbitraires)

séries	Niveaux	Concentration introduite ($\mu\text{g/ml}$)	Réponse1	Réponse2	Réponse3
jour 1	80%	22,50	581872,9	587384,3	584429
	90%	25,32	673023	686989,9	688018,1
	100%	28,13	750519	761399,6	775489,7
	110%	30,94	826232,4	836267,3	839228,1
	120%	33,76	920286,9	922729,5	920306,5
jour 2	80%	22,50	581324,8	585365,1	590052,9
	90%	25,32	663238,8	686182,8	687750,8
	100%	28,13	757580,5	774199,7	772749,4
	110%	30,94	837647,7	827442,2	835191,5
	120%	33,76	910996,4	931209,9	929605,6
jour 3	80%	22,50	586105,5	584307,7	580677,2
	90%	25,32	686355,3	692225	689922,6
	100%	28,13	775883,4	786211,7	789032,7
	110%	30,94	835384,6	834547	831327,7
	120%	33,76	933951,1	930291,1	931523,7

Le plan de validation sert à calculer la justesse, répétabilité et la fidélité en calculant la concentration prédite de chaque essai en utilisant le modèle d'étalonnage.

1.4. Calcul de la justesse, fidélité et exactitude

Après l'estimation des coefficients des modèles d'étalonnage nous avons calculé les concentrations prédites à partir des données du tableau 10 en prenant soin d'utiliser les modèles obtenus pour chaque série. les résultats sont regroupés dans le tableau 11 :

✓ Exemple de calcul des concentrations prédites :

Par exemple pour calculer la concentration prédite de (réponse 1 du niveau 80% jour1)

-le modèle d'étalonnage du jour 1 est : $Y=29360,88518 X - 66411,21144$

- $Y(\text{surface du pic}) = 581872,9$ (à partir du tableau 10)

-donc $X (\text{concentration prédite}) = 22,08 \mu\text{g/ml}$

Tableau 11: Plan de validation : concentrations retrouvées par étalonnage inverse

séries	Niveaux	Référence ($\mu\text{g/ml}$)	Concentration prédite en $\mu\text{g/ml}$			moyenne
			résultat1	résultat2	résultat3	
jour 1	80%	22,5	22,08	22,27	22,17	22,17
	90%	25,31	25,18	25,66	25,7	25,51
	100%	28,13	27,82	28,19	28,67	28,23
	110%	30,94	30,4	30,74	30,85	30,66
	120%	33,75	33,61	33,69	33,61	33,64
jour 2	80%	22,5	21,76	21,9	22,06	21,91
	90%	25,31	24,49	25,26	25,31	25,02
	100%	28,13	27,63	28,19	28,14	27,99
	110%	30,94	30,3	29,96	30,22	30,16
	120%	33,75	32,74	33,41	33,36	33,17
jour 3	80%	22,5	22,03	21,97	21,86	21,95
	90%	25,31	25,18	25,36	25,29	25,28
	100%	28,13	27,99	28,32	28,41	28,24
	110%	30,94	29,86	29,84	29,74	29,81
	120%	33,75	32,96	32,85	32,89	32,90

✓ *Calcul de la justesse*

La justesse fournit une indication sur les erreurs systématiques de la procédure analytique. Elle est exprimée en termes de biais (en $\mu\text{g/ml}$), de biais relatif (%) ou de recouvrement et a été estimée à l'aide du tableau 11,.

Tableau 12 : calcul de la justesse de la méthode

niveau de concentration	concentration introduite ($\mu\text{g/ml}$)	Moyenne retrouvée ($\mu\text{g/ml}$)	Biais(%)	Recouvrement (%)
80	22,50	22,01	2,18	97,82
90	25,32	25,27	0,19	99,81
100	28,13	28,15	0,08	100,08
110	30,94	30,21	2,22	97,78
120	33,76	33,24	1,54	98,46

Comme le montre le tableau 12, les biais relatifs de la méthode développée ont été trouvés acceptables puisqu'ils sont relativement proches de zéro et que les recouvrements sont compris entre 97,78% et 100,08 %. Cependant, pour le niveau de concentration 100%, nous avons noté un biais relatifs aux alentours de 0.08%.

✓ *Calcul de la fidélité*

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

Tableau 13 : Récapitulatif des critères de fidélité pour les cinq niveaux de concentration

Niveaux	80	90	100	110	120
Moyenne retrouvée	22,01	25,27	28,15	30,21	33,24
Ecart-type de répétabilité	0,11	0,32	0,33	0,23	0,22
Ecart-type de fidélité intermédiaire	0,17	0,36	0,33	0,42	0,41
coefficient de variation de la répétabilité	0,51	1,24	1,17	0,76	0,66
Coefficient de variation de la fidélité intermédiaire	0,77	1,40	1,17	1,37	1,24

Comme montré dans le tableau, les coefficients de variation de répétabilité qui reflètent la fidélité intra-jour pour chaque niveau de concentration ne dépassent pas 1,25 %.

Pour la fidélité intermédiaire qui reflète la fidélité inter-jour, les coefficients de variation ne dépassent pas 1,4 %, ce qui démontre l'excellence de la fidélité de la méthode de HPLC développée.

✓ *Intervalle de tolérance et exactitude :*

L'exactitude se réfère à l'étroitesse d'agrément entre le résultat obtenu et la valeur de référence acceptée notamment par convention ou « la vraie valeur ». L'exactitude tient compte de l'erreur totale liée au résultat, c'est-à-dire des erreurs systématique et aléatoire. L'exactitude de la méthode est représentée à partir du profil d'exactitude tel qu'illustré à la figure 7. Au vu des résultats présentés dans le tableau 14, la méthode HPLC proposée est exacte étant donné qu'à chaque niveau de concentration, les différentes limites de tolérance des résultats restent incluses dans les limites d'acceptation de ± 5 %. le tableau présente un récapitulatif des critères d'exactitude pour les 5 niveaux de concentration. La probabilité β associée à l'intervalle de tolérance est de 80% et les limites d'acceptation sont de ± 5 % comme décidé auparavant.

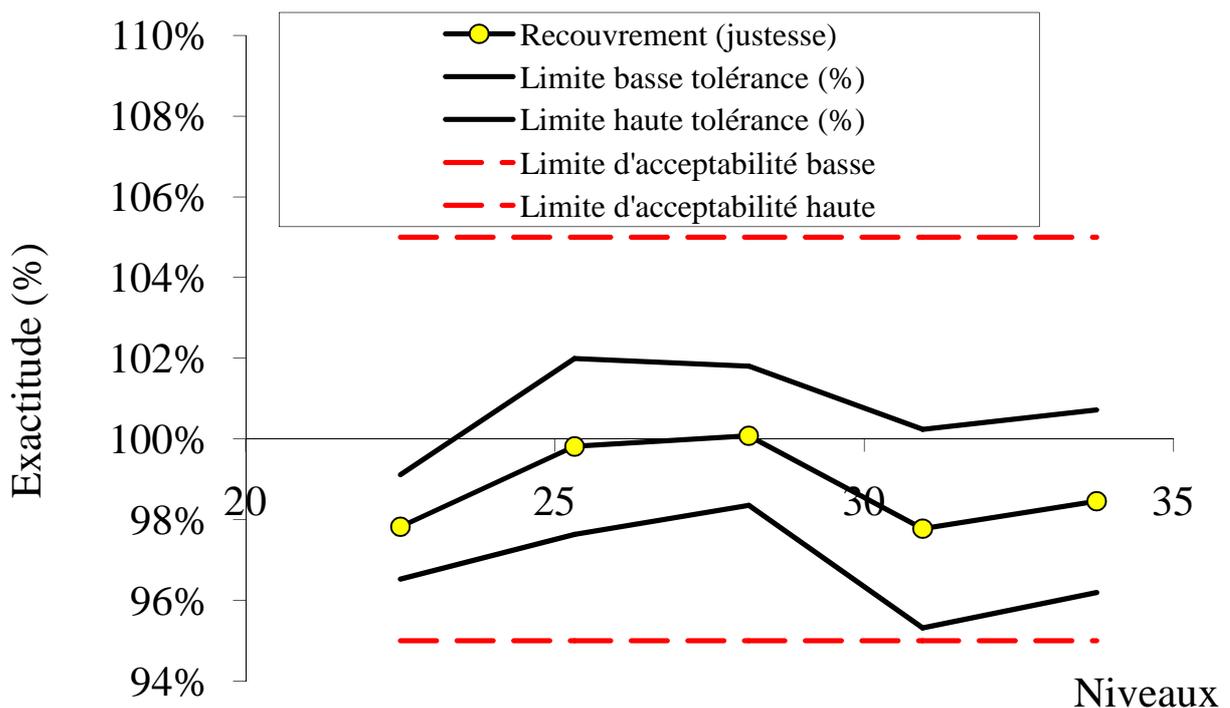
Tableau 14 : Récapitulatif des critères d'exactitude pour les cinq niveaux de concentration

Niveaux	80%	90%	100%	110%	120%
Concentration introduite	22,50	25,32	28,13	30,94	33,76
Moyenne niveau	22,01	25,27	28,15	30,21	33,23
Valeur basse tolérance	21,72	24,72	27,67	29,30	32,47
Valeur haute tolérance	22,31	25,82	28,64	31,12	33,99
Recouvrement (justesse)	97,82%	99,82%	100,08%	97,65%	98,46%
Limite basse tolérance (%)	96,53%	97,64%	98,36%	94,71%	96,20%
Limite haute tolérance (%)	99,12%	101,99%	101,80%	100,60%	100,72%
Limite d'acceptabilité basse	95,00%	95,00%	95,00%	95,00%	95,00%
Limite d'acceptabilité haute	105,00%	105,00%	105,00%	105,00%	105,00%

1.5. Construction de profil d'exactitude

Deux illustrations graphiques sont possibles. La première consiste à utiliser en abscisse la valeur de référence et en ordonnée la moyenne retrouvée les limites des intervalles de tolérance et d'acceptabilité exprimées en valeurs absolue. L'autre mode de représentation consiste à exprimer tous les résultats en valeurs relatives ramenées à la valeur de référence du niveau. Les limites d'acceptabilité sont aussi exprimées de façon relative et se situent entre 95% et 105%.

Figure 7 : Profil d'exactitude représenté à partir des valeurs relatives



Le profil d'exactitude de cette méthode indique que la méthode est validée par rapport aux exigences pour l'ensemble du domaine de validité, de 22,5 à 33,75 µg/ml parce que les limite de tolérance ne dépassent pas les limites d'acceptation. En outre, ce graphique fournit d'autres indications. En particulier, sur la figure 7, il apparaît que la justesse varie avec la concentration. Le taux de recouvrement qui traduit la justesse est d'environ 98 % aux basses concentrations pour être proche de 99 % aux concentrations élevées.

1.6. Estimation de l'incertitude

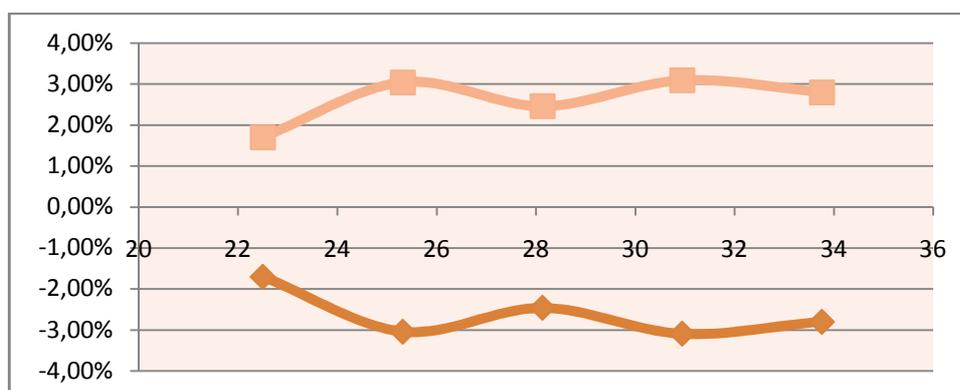
L'incertitude au sens large, d'une mesure est la zone au sein de laquelle se trouve probablement la valeur vraie. Cette zone est définie par une dispersion et se quantifie par un écart type. Elle reflète la qualité d'un mesurage, d'un instrument ou d'une méthode employée. On peut calculer l'incertitude élargie soit directement soit de façon relative en la ramenant à la valeur de référence. Le tableau rassemble ces résultats qui montrent que l'incertitude varie entre 2% et 3% .

Tableau 15 : calcul de l'incertitude type et de l'incertitude élargie pour chaque niveau de concentration

niveau de concentration	concentration introduite (µg/ml)	incertitude type	incertitude élargie(%)
80,00	22,50	0,19	2
90,00	25,32	0,38	3
100,00	28,13	0,35	2
110,00	30,94	0,47	3
120,00	33,76	0,47	3

On peut aussi visualiser l'incertitude en construisant un profil d'incertitude comme celui de la figure 8

Figure 8 : profil d'incertitude illustrant l'incertitude élargie de la méthode en fonction de la concentration.



Comme le montre la figure 8, l'incertitude de la méthode varie en fonction de la concentration mais généralement reste minimale surtout aux alentours des basses concentrations.

2. Validation analytique par profil d'exactitude de la méthode de dosage de Spiramycine

2.1. Choix du domaine d'application

-Intervalle de Concentration : le domaine de validation va de 29.88.5µg/ml à 44.82µg/ml.

Tableau 16 : le domaine de validation de la méthode de dosage de spiramycine

	niveau	concentration(µg/ml)
niveau1	80%	29,88
niveau2	90%	33,62
niveau3	100%	37,35
niveau4	110%	41,09
niveau5	120%	44,82

2.2. Plan d'expérience d'étalonnage :

Le plan d'étalonnage est formé de I=3 séries (codées jour1, jour2, jour3) avec K' = 5 niveaux de concentration (29.88 ; 33.62 ; 37.35 ; 41.09 ; 44.82 µg/ml) et J' = 2 répétitions par jours. Les concentrations introduites sont exprimées en µg/ml et les réponses en unités arbitraire (surface du pic).

✓ Préparation des standards d'étalonnage :

Une solution mère a été préparée par dissolution d'une quantité exactement pesée de 28.0 mg de métronidazole et 37.0 mg de spiramycine dans 50 ml de mélange de solvant pour avoir une concentration de 0.56 mg/mL de métronidazole et 0.74 mg/ml de spiramycine. Ensuite, des dilutions successives ont été réalisées en vue d'obtenir plusieurs solutions filles aux niveaux de concentration tels que mentionnés dans le tableau 17. Ces solutions ont été utilisées comme standards d'étalonnage. Chaque solution a été analysée deux fois. Le nombre des niveaux de concentration est suffisant pour générer différents modèles de régression.

Tableau 17: plan d'étalonnage (mesures exprimées en unités arbitraire)

séries	niveaux	concentration($\mu\text{g/ml}$)	surface du pic	
jour 1	80%	29,88	1001094,2	
		29,88	1010033,3	
	90%	33,61	1165493,1	
		33,61	1160378	
	100%	37,35	1350213,6	
		37,35	1320260,9	
	110%	41,08	1446826	
		41,08	1471644,6	
	120%	44,82	1629354,1	
		44,82	1577074,2	
	jour 2	80%	29,88	1053289
			29,88	1059156,3
90%		33,61	1187675,8	
		33,61	1188420,9	
100%		37,35	1369967,8	
		37,35	1396253,9	
110%		41,08	1505269,6	
		41,08	1516235,7	
120%		44,82	1601193,1	
		44,82	1584133,5	
Jour 3		80%	29,88	1036492,3
			29,88	1049058,9
	90%	33,61	1187639,7	
		33,61	1187141,5	
	100%	37,35	1343791,9	
		37,35	1384526,7	
	110%	41,08	1472953	
		41,08	1500445,9	
	120%	44,82	1606366,4	
		44,82	1629804,6	

✓ *Modèle d'étalonnage*

Le modèle choisi est une droite du type $Y = a_0 + a_1X$, où a_0 est le blanc, a_1 la pente ou la sensibilité. La méthode de calcul est la méthode de régression aux moindres carrés. Un modèle est calculé pour chaque jour. Le tableau 18 rassemble les estimations des coefficients du modèle d'étalonnage pour chaque jour

Grphe 1 : les Droites d'étalonnage des essais de chaque jour

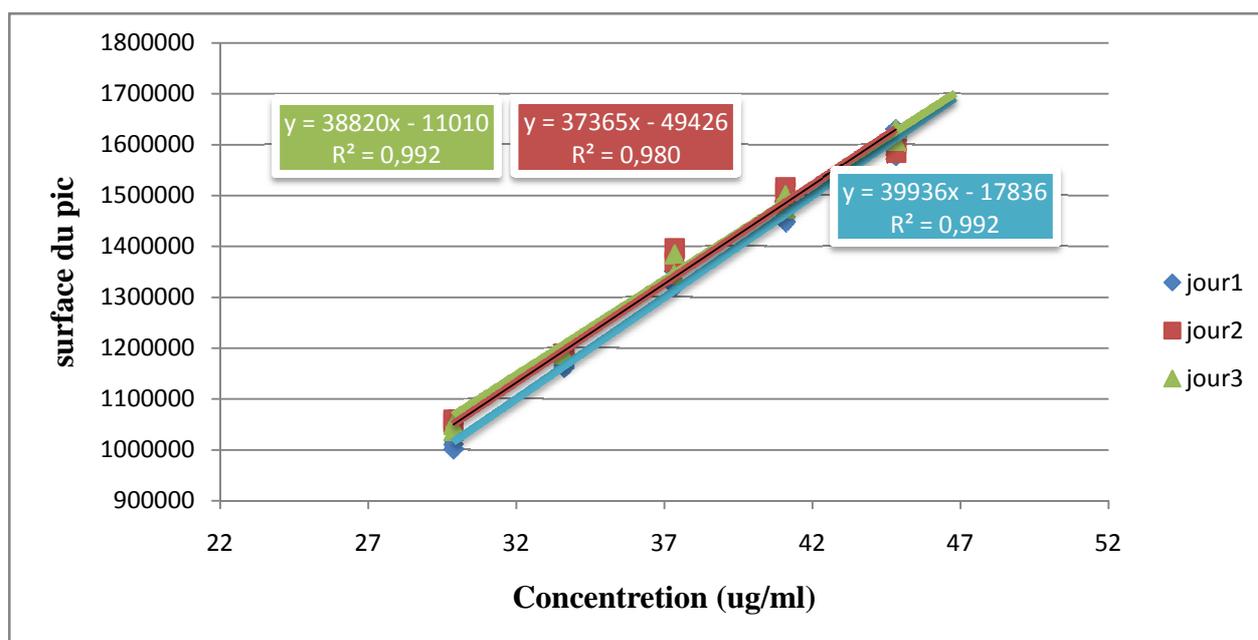


Tableau 18 : les coefficients des modèles d'étalonnage

	jour1	jour2	jour3
penete	39935,76	37365,08	38820,04
blanc	-178363,35	-49426,04	-110106,60

Les variations observées de la sensibilité et du blanc font partie de l'incertitude de la mesure. Elles confirment aussi la nécessité de conduire les essais sous condition de fidélité intermédiaire.

2.3. Plan de validation :

Le plan de validation est formé de I=3 séries (codées jour1, jour2, jour3) avec K = 5 niveaux de concentration (22.5 ; 25.31 ; 28.13 ; 30.94 ; 33.75 µg/ml) et J = 3 répétitions par jours. Les concentrations introduites sont exprimées en µg/ml et les réponses en unités arbitraire (surface du pic).

✓ préparation des standards de validation

Des solutions mères indépendantes ont été préparées de la même façon que pour celles des standards d'étalonnage. Elles ont été successivement diluées en vue d'obtenir des solutions intermédiaires. Les solutions filles dont les concentrations sont indiquées dans le tableau 19 ont été obtenues par dilution de ces solutions intermédiaires dans la matrice.

Trois répétitions (J = 3) ont été préparées pour chaque niveau de concentration (K= 5). L'ensemble de l'étape de préparation a été répété sur trois séries (I = 3).

Tableau 19 : Plan de validation (réponse exprimées en unités arbitraires)

Séries	Niveaux	Concentration introduite (µg/ml)	Réponse1	Réponse2	Réponse3
jour 1	80%	29,88	1061481,20	1049398,40	1011722,20
	90%	33,62	1177455,40	1164654,80	1170023,50
	100%	37,35	1324379,50	1347836,80	1324019,90
	110%	41,09	1490068,80	1476300,20	1505784,30
	120%	44,82	1570520,00	1674868,70	1674591,70
jour 2	80%	29,88	1065055,10	1047752,00	1057752,00
	90%	33,62	1214260,80	1217250,00	1242491,20
	100%	37,35	1297143,80	1340417,10	1336038,00
	110%	41,09	1491883,40	1517790,30	1532209,30
	120%	44,82	1633070,00	1634591,70	1633123,00
jour 3	80%	29,88	1052553,80	1051738,40	1052809,00
	90%	33,62	1175451,10	1172791,80	1181660,30
	100%	37,35	1322801,10	1387927,30	1369576,20
	110%	41,09	1516830,30	1477617,10	1498196,90
	120%	44,82	1576960,30	1621883,50	1650865,40

2.4. Calcul de la justesse, fidélité et exactitude

Après l'estimation des coefficients des modèles d'étalonnage nous avons calculé les concentrations prédites à partir des données du tableau 19 en prenant soin d'utiliser les modèles obtenus pour chaque série. les résultats sont regroupés dans le tableau 20

Tableau 20 : Plan de validation : concentrations retrouvées par étalonnage inverse

séries	Niveaux	Concentration introduite(µg/ml)	Concentration prédite en µg/ml			moyenne
			Résultat1	Résultat2	Résultat3	
jour 1	80%	29,88	31,05	30,74	29,8	30,53
	90%	33,62	33,95	33,63	33,76	33,78
	100%	37,35	37,63	38,22	37,62	37,82
	110%	41,09	41,78	41,43	42,17	41,79
	120%	44,82	43,79	46,41	46,4	45,53
jour 2	80%	29,88	29,83	29,36	29,63	29,61
	90%	33,62	33,82	33,9	34,58	34,10
	100%	37,35	36,04	37,2	37,08	36,77
	110%	41,09	41,25	41,94	42,33	41,84
	120%	44,82	45,03	45,07	45,03	45,04
jour 3	80%	29,88	29,95	29,93	29,96	29,95
	90%	33,62	33,12	33,05	33,28	33,15
	100%	37,35	36,91	38,59	38,12	37,87
	110%	41,09	41,91	40,9	41,43	41,41
	120%	44,82	43,46	44,62	45,36	44,48

✓ *Calcul de la justesse*

La justesse fournit une indication sur les erreurs systématiques de la procédure analytique. Elle est exprimée en termes de biais (en µg/ml) , de biais relatif (%) ou de recouvrement et a été estimée à l'aide du tableau 20.

Tableau 21 : calcul de la justesse de la méthode

niveau de concentration	concentration introduite (µg/ml)	Moyenne retrouvée (µg/ml)	Biais(%)	Recouvrement (%)
80	29,88	30,03	-0,49	100,49
90	33,62	33,68	-0,18	100,18
100	37,35	37,49	-0,37	100,37
110	41,09	41,68	-1,46	101,46
120	44,82	45,02	-0,44	100,44

Comme le montre le tableau 21, les biais relatifs de la méthode développée ont été trouvés acceptables puisqu'ils sont relativement proches de zéro et que les recouvrements sont compris

entre 100,18% et 101,46%. Cependant, pour le niveau de concentration 100%, nous avons noté un biais relatifs aux alentours de -0,37%.

✓ *Calcul de la fidélité*

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

Tableau 22 : Récapitulatif des critères de fidélité pour les cinq niveaux de concentration

Niveaux	80	90	100	110	120
Moyenne retrouvée	30,03	33,68	37,49	41,68	45,02
Ecart-type de répétabilité	0,40	0,27	0,65	0,48	1,03
Ecart-type de fidélité intermédiaire	0,57	0,53	0,82	0,48	1,03
coefficient de variation de la répétabilité	1,32	0,78	1,74	1,15	2,31
Coefficient de variation de la fidélité intermédiaire	1,89	1,57	2,18	1,15	2,31

Comme montré dans le tableau 22, les coefficients de variation de répétabilité qui reflètent la fidélité intra-jour pour chaque niveau de concentration ne dépassent pas 2,31 %.

Pour la fidélité intermédiaire qui reflète la fidélité inter-jour, les coefficients de variation ne dépassent pas 2,31%, ce qui démontre l'excellence de la fidélité de la méthode de HPLC développée.

➤ *Intervalle de tolérance et exactitude :*

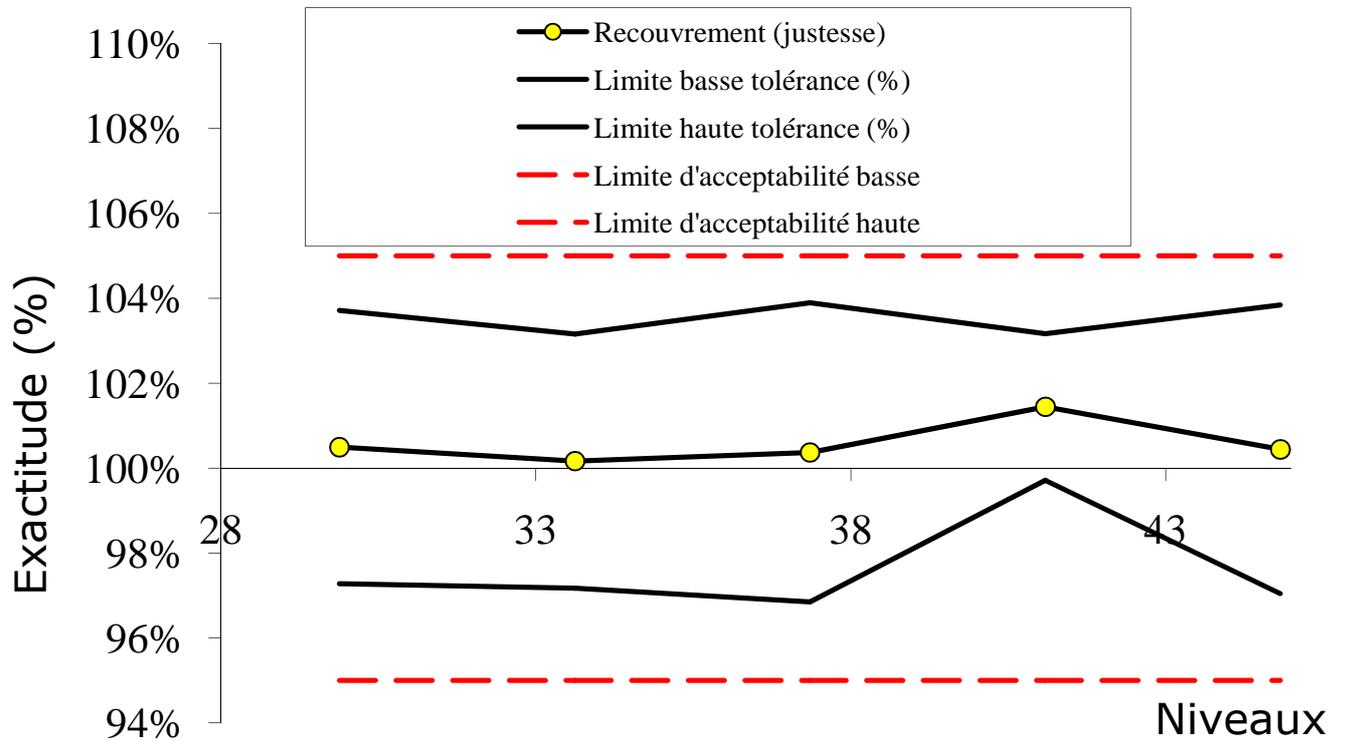
le tableau présente un récapitulatif des critères d'exactitude pour les 5 niveaux de concentration. La probabilité bêta associée à l'intervalle de tolérance est de 80% et les limites d'acceptabilité sont de ± 5 % comme décidé auparavant.

Tableau 23 : Récapitulatif des critères d'exactitude pour les cinq niveaux de concentration

niveaux	80	90	100	110	120
Concentration introduite	29,88	33,62	37,35	41,09	44,82
Moyenne niveau	30,027	33,675	37,488	41,683	45,018
Valeur basse tolérance	29,066	32,669	36,173	40,974	43,494
Valeur haute tolérance	30,989	34,682	38,804	42,392	46,542
Recouvrement (justesse)	100,49%	100,18%	100,37%	101,45%	100,44%
Limite basse tolérance (%)	97,27%	97,18%	96,85%	99,73%	97,04%
Limite haute tolérance (%)	103,71%	103,17%	103,89%	103,18%	103,84%
Limite d'acceptabilité basse	95,00%	95,00%	95,00%	95,00%	95,00%
Limite d'acceptabilité haute	105,00%	105,00%	105,00%	105,00%	105,00%

2.5. Construction de profil d'exactitude

Figure 9 : profil d'exactitude représenté à partir des valeurs relatives



Le profil d'exactitude de cette méthode indique que la méthode est validée par rapport aux exigences pour l'ensemble du domaine de validité, de 29,88 à 44,82 $\mu\text{g/ml}$ parce que les limite de tolérance ne dépasse pas les limites d'acceptation.

2.6. Estimation de l'incertitude

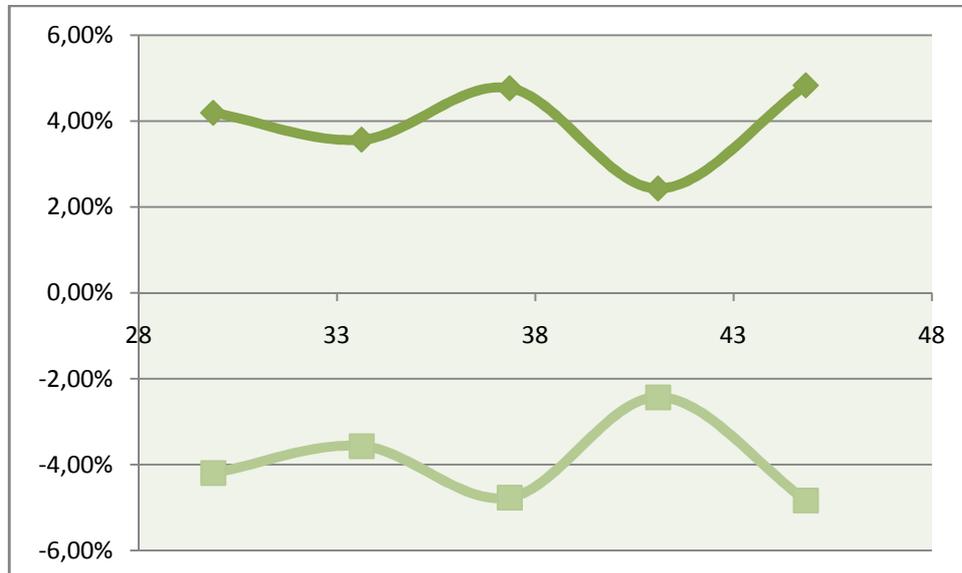
On peut calculer l'incertitude élargie soit directement soit de façon relative en la ramenant à la valeur de référence. Le tableau rassemble ces résultats qui montrent que l'incertitude varie entre 2% et 3% .

Tableau 24 : calcul de l'incertitude type et de l'incertitude élargie pour chaque niveau de concentration

niveau de concentration	concentration introduite (ug/ml)	incertitude type	incertitude élargie
80,00	22,50	0,63	4,19%
90,00	25,32	0,60	3,57%
100,00	28,13	0,89	4,77%
110,00	30,94	0,51	2,43%
120,00	33,76	1,09	4,83%

On peut aussi visualiser l'incertitude en construisant un profil d'incertitude comme celui de la figure 10.

Figure 10 : Profil d'incertitude illustrant l'incertitude élargie de la méthode en fonction de la concentration



Comme le montre la figure 10, l'incertitude de la méthode est variée en fonction de la concentration, on voit qu'elle est minimale pour le niveau de concentration 110% et maximale pour le niveau 120%, mais généralement ne dépasse pas 5%.

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, ce travail nous a permis de mieux comprendre la validation analytique de dosage simultané de deux principes actifs (Métronidazole et spiramycine) dans une forme pharmaceutique par HPLC.

En premier lieu, nous avons effectué un plan d'étalonnage pour générer un modèle d'étalonnage pour chaque série (le jour) permet de relier la réponse analytique (la surface du pic) à la concentration introduite.

En deuxième lieu nous avons réalisé un plan de validation pour pouvoir estimer le biais et la fidélité de la méthode .Cependant nous avons constaté que la méthode est juste pour le dosages des deux principes actifs avec un biais relatif qui ne dépasse pas 2.5% pour les deux principes actifs. Aussi nous avons constaté que la méthode est valide puisque les coefficients de variations de répétabilité et de fidélité intermédiaire sont généralement inférieur à 4%.

En troisième lieu, l'établissement des intervalles de tolérance apparié à des limites d'acceptation nous permet de construire les profils d'exactitudes.

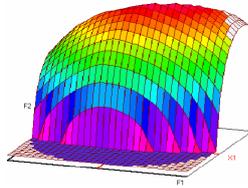
Les profils d'exactitude construit à l'issue de ce travail caractérisant la méthode est valide dans l'intervalle de concentration étudié [22,5 ; 33,75] pour le métronidazole et dans l'intervalle de concentration étudié [29.88 ; 44,82] pour la spiramycine. , avec une proportion $\beta=80\%$ de mesures dans les limites d'acceptations ($\pm 5\%$).

Dans le même contexte, nous avons calculé l'incertitude de la méthode. 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] <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, techniques d'ingénieurs. Numéro spécial 2010c.
- [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.
- [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] <http://www.farm.ucl.ac.be/tpao/tpintegres/HPLC/documents/chapitre4.pdf>
- [11] <https://fr.wikipedia.org/wiki/Spiramycine>
- [12] <https://fr.wikipedia.org/wiki/M%C3%A9tronidazole>.

Année Universitaire : 2014-2015



Master ST CAC Agiq

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

Nom et prénom: MOUHSIN Mouad

Année Universitaire : 2014/2015

Titre: Validation analytique par profil d'exactitude de la méthode de dosage simultané de métronidazole et de spiramycine par HPLC

Résumé

Une méthode de dosage simultané de deux principes actifs (Métronidazole et Spiramycine) par HPLC est sujette de la validation analytique en utilisant une approche récemment développée intitulée Profil d'exactitude qui consiste à associer les deux éléments fondamentaux de la validation tels que la justesse et la fidélité au résultat final d'une mesure, et par conséquent de tenir compte de l'erreur totale de mesure (erreur systématique + erreur aléatoire).

L'introduction de la notion de limite d'acceptation à travers l'estimation de l'intervalle de tolérance d'espérance par niveau de concentration, nous permet de construire un outil de décision basé sur le risque associé à la méthode, fournissant la garantie aux futures analyses des échantillons inconnus.

Mots clés : Validation Analytique, Profil d'exactitude, Erreur totale, Métronidazole, Spiramycine.

