

Master Sciences et Techniques CAC Agiq

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

MEMOIRE DE FIN D'ETUDES

Pour l'Obtention du Diplôme de Master Sciences et Techniques

**Validation analytique par l'approche de l'erreur totale d'une
méthode de dosage de bromazépam par HPLC.**

Présenté par:

-EL AICHE Youssef

Encadré par:

- Pr. KHADIJA MOUGHAMIR (FST)

-Pr. SANAE ACHOURE (CHU)

Soutenu Le 13 Juin 2016 devant le jury composé de:

-Pr. K. MOUGHAMIR (FST)

-Pr. S. ACHOURE (CHU)

- Pr. A. BOULAHNA (FST)

- Pr. A. HARRACH (FST)

-Dr. A. ATTARI (CHU)

Stage effectué à : Centre Hospitalier Hassan II (CHU)

Dédicace

A MES PARENTS

A MES FRERES

A MES SOEURES

A MES PROFESSEURES

A MES AMIS





REMERCIEMENT

*Au terme de ce travail
J'ai le plaisir d'exprimer mes profonds remerciements*

A monsieur le directeur du centre hospitalier universitaire Hassan II de Fès de m'avoir accueilli au sein de son établissement.

A madame Sanae ACHOUR, professeur agrégée Toxicologie et chef d'unité de toxicologie du laboratoire central d'analyse médicales CHU Hassan II Fès, qu'elle 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 à mon égard ont contribué au bon déroulement de ce travail de recherche dans son laboratoire.

A l'équipe de travail de service toxicologie du Laboratoire central d'analyses médicales, CHU Hassan II- Fès.

Pr. Ahmad ATTARI

Pr. Imane IKEN.

Pr. Souad KHARBOUCH

Pr. Hasnae HOUMMANI

Mes plus vifs remerciements vont aussi à ma professeur **KHADIJA MOUGHAMIR** pour sa collaboration, et pour sa disponibilité. Sa grande expérience, sa gentillesse et ses grandes qualités scientifiques et humaines qui ont constitué un support permanent à ma réflexion.

Professeur **EL MUSTAPHA EL HADRAMI**, je tiens à vous remercier pour m'avoir accueilli dans votre master. Je suis très reconnaissant pour la confiance que vous m'avez accordée, votre gentillesse, votre disponibilité, et vos encouragements m'ont été indispensables.

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 mes sœurs, qui ont toujours présents et ont été d'un grand secours moral en toutes situations.





Liste des abréviations

HPLC : Chromatographie liquide haut performance

CHU : Centre Universitaire Hospitalier Hasan II

SCE : somme carrée des écarts

CM : carrée moyenne

$CV_{\text{rép}}$: coefficient de variation de répétabilité

CV_{FI} : coefficient de fidélité intermédiaire

K_{IT} : facteur de couverture de l'intervalle de tolérance

ν : degrés de liberté

S_B : Ecart type inter-séries

S_w : Ecart type intra-séries

S_{FI} : Ecart type de fidélité intermédiaire

S_{rep} : Ecart type de répétabilité

R_j : l'importance relative de l'effet de la série

L_i : l'intervalle de tolérance inférieur

L_s : l'intervalle de tolérance supérieur



Contenu

Introduction.....	6
Premier partie : <i>Présentation de LCAM-CHU de Fes</i>	7
I. Présentation du LCAM.....	8
Les différentes méthodes d'analyses médicamenteuses de LCAM sont :	8
Deuxième partie : <i>Etude bibliographique</i>	9
I. Généralité sur les benzodiazépines.....	10
A. Historique	10
B. Classification des BZD en fonction des indications	11
C. Dose toxique de benzodiazépines.....	11
D. Généralité sur bromazépam.....	12
1. Utilisation	12
2. Propriétés	12
3. Récepteurs et effets GABA _A	13
4. Contre-indications.....	14
5. Effets indésirables	14
II. Généralité sur une méthode d'analyse	15
A. Définition	15
B. Cycle de vie d'une méthode analytique	15
III. Validation des méthodes analytiques	17
A. Introduction et définition	17
1. Normes et guidelines de validation	17
B. Approche classique de validation.....	18
1. Critères de validation	18
IV. Validation analytique basée sur le profil d'exactitude et la notion de l'erreur totale.....	23
A. Expérience de la nouvelle stratégie de validation.....	23
B. Analyse de la fonction de réponse et sélection du modèle de régression	26
C. Calculer les concentrations retrouvées par prédiction inverse	27
D. Calcul de justesse et de fidélité.....	28
1. Calcul de la fidélité :	29
2. Calcul de la justesse :.....	29



E.	Profile d'exactitude	30
F.	Calcul de l'intervalle de tolérance	30
G.	Construction graphique et interprétation.....	31
Troisième partie : Partie expérimental.....		34
I.	Méthode et matérielles.....	35
A.	Méthode.....	35
1.	Principe de CLHP.....	35
B.	Matériel et Réactif.....	36
1.	Verrerie.....	36
2.	Matériels divers.....	36
3.	Appareillage.....	36
4.	Réactifs et solution.....	37
C.	Mode opératoire	37
1.	Echantillon analysés	37
2.	Préparation de la gamme d'étalonnage.....	37
3.	Condition chromatographiques	38
4.	Préparation des phases mobile	39
D.	Analyse des résultats.....	39
1.	Optimisation de la méthode analytique.....	39
2.	Validation de la méthode analytique	40
Conclusion		50



Introduction

La validation analytique est fondée sur une analyse statistique, basée sur un certain nombre de critères aboutissant à des méthodes analytiques permettant de donner des résultats fiables. Le champ d'application de la validation analytique s'étend à toute procédure d'analyse utilisée dans le contrôle de la matière première, le développement galénique, le contrôle en cours de fabrication, le contrôle des produits intermédiaires et les essais de stabilité de tous les produits pharmaceutiques.

Dans ce stage nous avons validé la technique de dosage de bromazéпам qui est un médicament anxiolytique appartenant à la classe de benzodiazépines.

Le dosage de cette molécule qui s'inscrit dans le cadre du suivi thérapeutique adapté par laboratoire du Centre Hospitalier Hassan II est réalisé par chromatographie liquide haute performance de détecteur à barre diode.

Cette technique serait employée pour effectuer le SCREENING (détection) des benzodiazépines ainsi que leur dosage dans les prélèvements de nature hospitalière. La mise au point a consisté en la détermination des paramètres instrumentaux pour l'ensemble des molécules en fonction de leurs propriétés physico-chimiques puis en la détermination du meilleur solvant d'extraction afin d'obtenir le meilleur rendement possible.

Dans le présent rapport nous présentons d'abord, le laboratoire d'analyse (Lieu de stage) ensuite une étude bibliographique qui portera sur la méthodologie de validation analytique.

Dans la partie expérimentale, nous avons appliqué l'approche de validation analytique basée sur l'erreur totale, pour pouvoir en fin de dire que la méthode choisie est convenable pour l'analyses médicales.





Premier partie :

Présentation de

LCAM-CHU de Fès





I. Présentation du LCAM

Dans le cadre du projet de fin d'étude en deuxième année master, j'ai effectué un stage de 4 mois dans le laboratoire de toxicologie, du laboratoire central des analyses médicales, au centre hospitalier universitaire (CHU) Hassan II de Fès. Le but de ce projet est la validation de méthode du dosage du bromazépam par HPLC.

Le laboratoire central des analyses médicales est situé au bâtiment J du CHU Hassan II de Fès, conçu comme un pôle d'activité hospitalière comportant plusieurs spécialités d'analyses médicales :

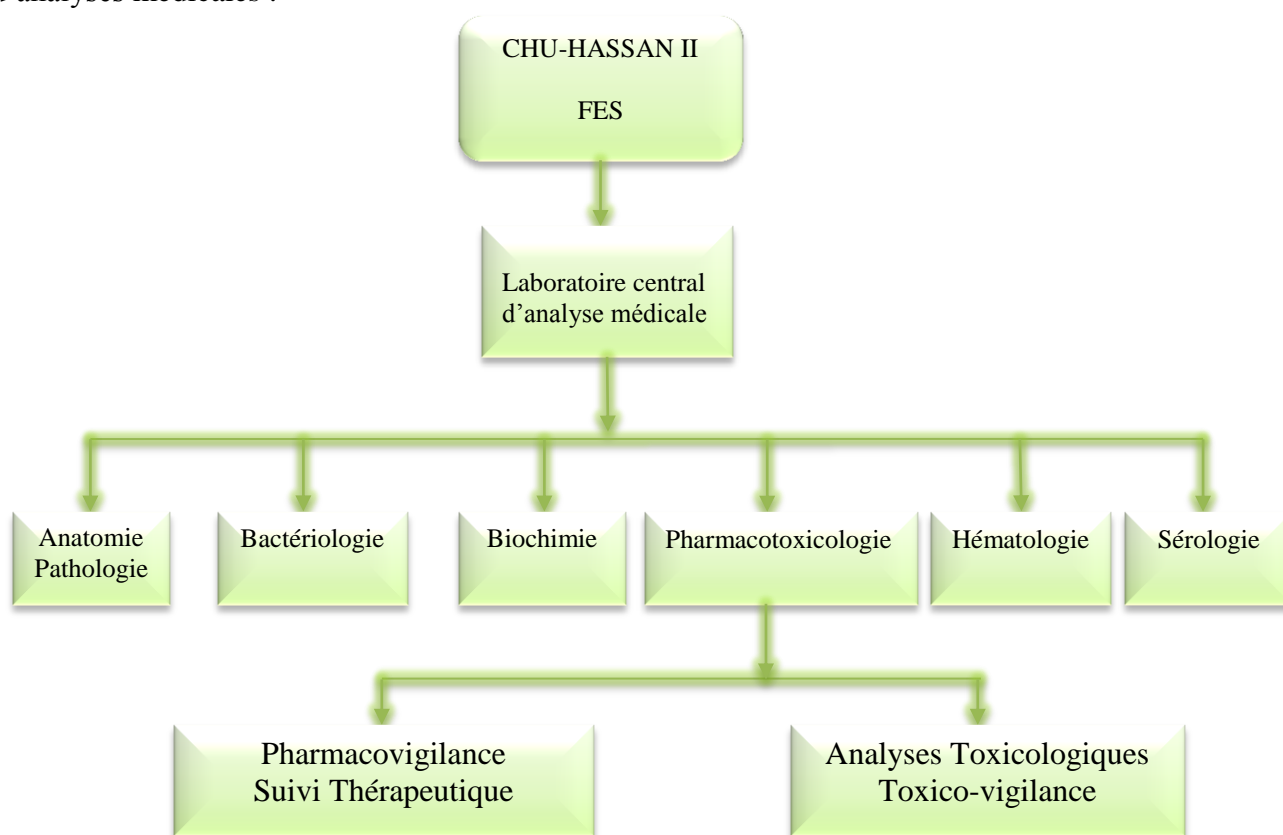


Figure 1 : organigramme de l'unité de laboratoire de CHU- Fès

Les différentes méthodes d'analyses médicamenteuses de LCAM sont :

- Méthodes immuno-chromathographique (CCM et CLHP)
- Méthodes immuno-enzymatique
- Méthode colorimétrique



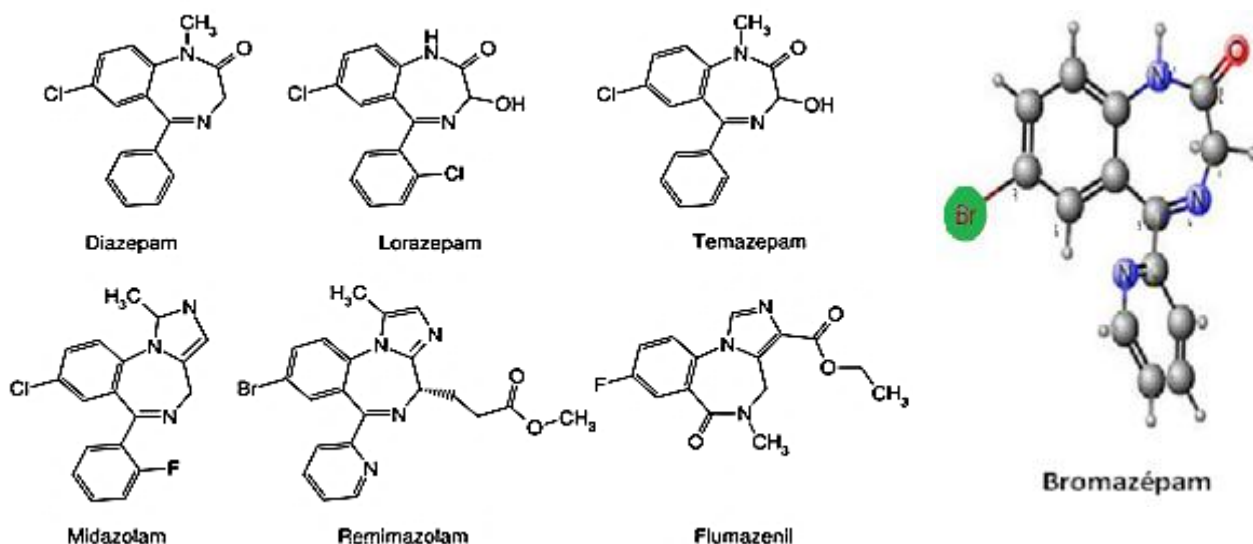
Deuxième partie :

Etude bibliographie



I. Généralité sur les benzodiazépines

Les benzodiazépines constituent une famille de médicaments qui agissent sur le système nerveux central et qui possèdent toutes des propriétés anxiolytiques¹, hypnotiques², myorelaxantes et anticonvulsivants mais à des niveaux différents en fonction de leur structure chimique.



Donc Les BZD sont les médicaments psychotropes les plus souvent prescrits dans le traitement de l'anxiété et des troubles du sommeil. Elles sont efficaces, très bien tolérées et ne présentent que peu d'effets secondaires. Cependant, elles peuvent entraîner d'une part une accoutumance et une dépendance et d'autre part un syndrome associant, à des degrés divers, une altération de l'état de conscience à des troubles du comportement et de la mémoire.

A. Historique

Le BZD découverte par hasard la première BZD, le Chlordiazépoxyde (LIBRIUM®) synthétisée en 1957 par Stern Bach puis utilisation clinique en 1961, suivie en 1964 par le Diazépam (VALIUM®) qui a longtemps été

¹ Les **anxiolytiques** sont des [médicaments](#) utilisés contre l'[anxiété](#)

² **Hypnotiques** Est une classe de médicament ayant la propriété d'induire le sommeil chez des patients qui souffrent de difficultés d'endormissement ou de réveils précoces



Considéré comme le chef de file de la famille, et Oxazépam synthétisé en 1961 par Bell et Midazolam synthétisé en 1976 par Fryer et Walse. Mais le bromazépam découvert par Roche en 1963. Son développement clinique en 1970.

B. Classification des BZD en fonction des indications

fonction des indications des BZD	Classe des BZD
Anxiolytiques	diazépam, Oxazépam, bromazépam, clobazam, alprazolam, chlorazébate...
Hypnotiques	nitrazépam, flunitrazépam, témazepam, loprazolam, triazolam, zopiclone et zolpidem
Antiépileptiques	Clonazépam
Anesthésiques	Midazolam

Tableau 1 : classification des Benzodiazépines

L'affinité relative des principales benzodiazépines utilisées en anesthésie pour le récepteur GABA-A est la suivante : flunitrazépam > lorazépam > midazolam > diazépam.

C. Dose toxique de benzodiazépines

Les doses toxiques théoriques sont différentes d'une molécule à l'autre, et peuvent varier pour une molécule en fonction de l'âge, des antécédents et de la tolérance du sujet : on peut citer par exemple chez l'adulte :

Triazolam (halcion®)	5mg	Flunitrazépamb (rohpnoI®)	10mg
Diazepam (valium®)	500mg	Clonazépam (rivotril®)	10mg
Loprazépam (havlane®)	10mg	Oxazépam (seresta®)	500mg
Bromazépam (lexomil®)	180mg	Lorazépam (temesta®)	100mg
Nitrazépam (mogadon®)	100mg	Clorazébate (tranxéne)	500mg

Tableau 2 : les doses toxique des benzodiazépines



D. Généralité sur bromazépam

C'est un anxiolytique puissant, il est aussi hypnotique, remarqué pour ses puissants effets amnésiants³, myorelaxants⁴, anticonvulsivants et antiépileptiques⁵. C'est la seule benzodiazépine ayant une pyridine en position 5 et un atome de brome en position 7. Seul 2% de bromazépam a été retrouvé dans les urines. Mais affirmer à juste titre que la demi-vie du bromazépam est de 1,25 jour, et délai d'apparition des signes cliniques varie entre 1 à 4h car cela veut dire qu'un usager régulier va accumuler cette molécule dans l'organisme, c'est un agoniste complet des récepteurs GABA_A et il a une forte affinité avec eux.

1. Utilisation

Le bromazépam est généralement utilisé pour prévenir ou combattre les symptômes les plus sévères de l'anxiété, notamment les crises de spasmophilie et les attaques de panique. Il peut éventuellement servir à calmer un patient anxieux avant une intervention chirurgicale. Le bromazépam est aussi indiqué dans le sevrage alcoolique, car il permet de prévenir ou de lutter contre le delirium tremens, un grave trouble associant divers symptômes (dont normalement du délire, de la fièvre et de forts tremblements incontrôlables) se manifestant souvent en cas de sevrage brutal.

2. Propriétés

Le bromazépam agit directement sur le système nerveux central (moëlle épinière et encéphale). Il peut amplifier l'action de GABA, un neurotransmetteur naturel du corps humain ayant pour rôle d'inhiber l'activité cérébrale. Cela a pour conséquence directe d'apaiser le patient (propriété anxiolytique). Le bromazépam a également des propriétés sédatives, myorelaxantes et antispasmodiques⁶.

³ L'**amnésie** est une perte partielle ou totale de la mémoire

⁴ Myorelaxants utilisé pour décontracte les muscles

⁵ Antiépileptique est un médicament utilisé dans la prévention ou l'occurrence de l'épilepsie.

⁶ Lutte contre les spasmes musculaires

3. Récepteurs et effets GABA_A⁷

Sous la dénomination de récepteur GABA_A, on désigne un complexe macromoléculaire qui, en plus des sites de fixation du GABA, comporte des sites de fixation

- ✓ des benzodiazépines,
- ✓ des barbituriques,
- ✓ de certains stéroïdes.

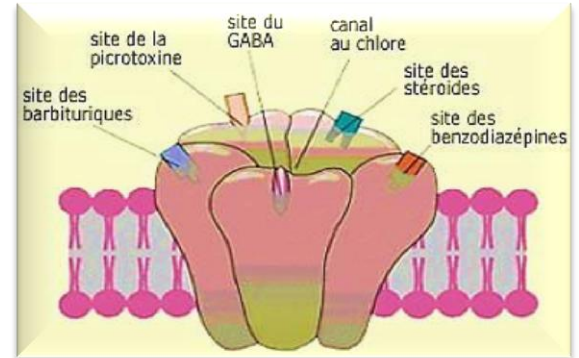
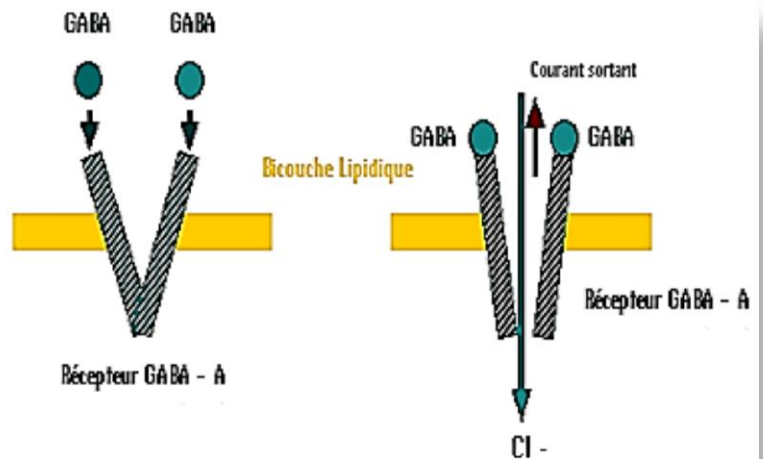


Figure 2 : structure de récepteurs GABA-A

40% des neurones comportent des récepteurs GABA_A.

Il s'agit d'un récepteur-canal, perméable préférentiellement aux ions Cl⁻ et accessoirement aux ions Br⁻. L'ouverture de ce récepteur-canal perméable aux ions Cl⁻ est commandée directement par le GABA qui est le médiateur essentiel. La fixation de deux molécules de GABA entraîne son ouverture, la pénétration des ions Cl⁻ et une hyperpolarisation cellulaire.



Cependant, un excès de GABA désensibilise le récepteur. Il existe des agonistes agissant sur des récepteurs à effet opposé à ceux des benzodiazépines et que l'on désigne par agonistes inverses.

Au niveau du système nerveux :

⁷ Acide gamma amino butyrique



L'influx intracellulaire de chlore entraîne une hyperpolarisation de la membrane qui inhibe l'activité neuronale.

L'augmentation de la fréquence d'ouverture du canal chlorure, laissant entrer des ions Cl^- est à l'origine d'effets inhibiteurs, et sa diminution, à l'origine d'effets opposés.

Une particularité du récepteur GABA_A est d'être modulé allostériquement par d'autres récepteurs qui favorisent ou inhibent l'effet du GABA.

4. Contre-indications

Le bromazépam est contre-indiqué en cas d'antécédents allergiques à cette molécule, d'apnée du sommeil, d'insuffisances respiratoires graves (ex. : broncho-pneumopathie chronique obstructive), d'insuffisances hépatiques sévères (chroniques ou aiguës) et de myasthénie (maladie neuromusculaire auto-immune).

5. Effets indésirables

Le bromazépam peut déclencher divers effets indésirables, dont notamment un phénomène de dépendance et une amnésie antérograde (impossibilité à se remémorer les événements récents), ce trouble est majoré si le patient consomme de l'alcool durant le traitement. Il peut aussi provoquer des hallucinations et, en cas d'effet paradoxal, de nombreux troubles du comportement tels qu'irritabilité, nervosité, comportements inhabituels, euphorie, agressivité.



II. Généralité sur une méthode d'analyse

A. Définition

Une analyse chimique peut être définie comme une suite d'opérations élémentaires, statistiquement indépendantes les unes des autres, qui commencent au moment de la prise d'essai (prélèvement d'un échantillon analytique sur l'échantillon de laboratoire) et aboutissent à l'expression d'un résultat d'analyse qu'il faudra valider pour pouvoir disposer enfin d'une donnée analytique.

Donc une méthode analytique est un moyen visant à exprimer concrètement un besoin bien exprimé, ou encore c'est la réponse matérialisée à un problème donné, comme par exemple dans le service de toxicologie la présence de toxique dans l'échantillon, néfastes pour la santé et dont il faudra déterminer la teneur. Dans le domaine analytique, deux types de méthodes sont mentionnés, les méthodes qualitatives et les méthodes quantitatives. Par rapport à cette dernière, l'objectif d'une méthode analytique peut se résumer en sa capacité à quantifier chacune des quantités inconnues présentes dans un échantillon.

Une méthode analytique est définie de la manière suivante dans le projet de norme FD V 01-0001: « procédure écrite décrivant l'ensemble des moyens et modes opératoires nécessaires pour détecter et/ou doser l'analyte, c'est-à-dire : domaine d'application, principe et/ou réactions, définitions, réactifs, appareillage, modes opératoires, expression des résultats, fidélité, rapport d'essai (selon l'ISO⁸/DIS 78-2)»

B. Cycle de vie d'une méthode analytique

La mise en œuvre d'une méthode de dosage peut se décomposer en quatre grandes phases généralement successives :

- ✓ une phase de Sélection où des objectifs et des conditions opératoires initiales sont définis ;

⁸ Organisation Internationale de Normalisation

- ✓ une phase de Développement, avec ou sans optimisation au moyen de plans d'expériences ;
- ✓ une phase de Validation (Validation Interne/Externe) précédée, selon les cas, d'une phase de prévalidation;
- ✓ une phase d'application en routine (Usage en routine), incluant le plus souvent une validation en routine et parfois une validation partielle ou une revalidation.

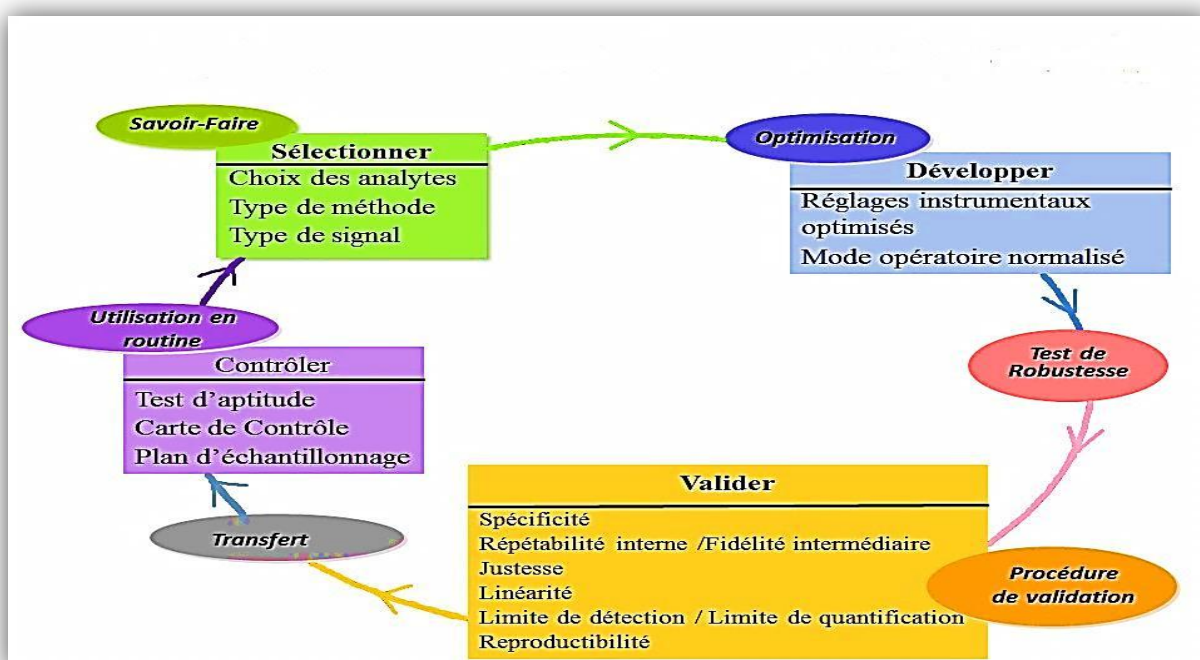


Figure3 : Cycle de vie d'une méthode analytique



III. Validation des méthodes analytique

A. Introduction et définition

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

Il existe deux approches pour validé une méthode analytique, les approches classiques (dites aussi approches des critères) fondées sur les tests d'hypothèses utilisent séparément les deux erreurs, aléatoire et systématique, pour la prise de décision. A côté de ces approches classiques, une approche basée sur le concept de l'erreur totale proposant un outil graphique de prise de décision à la fois pratique et visuel, nommé profil d'exactitude.

Dans les deux approches la validation analytique passe par différentes étapes qui visent : à tester la normalité de la distribution des mesures (dans l'approche classique) et l'estimation de l'erreur de justesse, ou biais systématique, et de l'erreur aléatoire, qu'il faut combiner pour vérifier si la méthode remplit les objectifs qui lui ont été assignés. La construction d'un modèle statistique permet d'évaluer quantitativement ces notions, qui peuvent être visualisées graphiquement, suivant la méthode du profil d'exactitude et de se donner les moyens de contrôler le maintien dans le temps des performances de la chaîne de mesure.

1. Normes et guidelines de validation

Dans la littérature on trouve différents textes réglementaires, on cite deux à titre d'exemple :



Deux guidelines ICH⁹ ont été dédiés à la validation analytique Q₂.

Q₂A: «texte de validation analytique de la procédure: Présente une discussion sur les caractéristiques qui doivent être prises en compte au cours de la validation des méthodes analytiques.

Q₂B: «Méthodologie» : Son but est de fournir des conseils et recommandations sur la manière d'appréhender les différentes caractéristiques de la validation pour chaque méthode analytique. En outre, le document fournit une indication sur les données qui devraient être présentées dans un dossier d'enregistrement.

SFSTP¹⁰ : présentent les recommandations réglementaires communément admises et appliquées dans l'industrie pharmaceutique nationale et une démarche statistique pour la validation d'une procédure analytique.

B. Approche classique de validation

Les approches classiques (dites aussi approches des critères) fondées sur les tests d'hypothèses utilisent séparément les deux erreurs, aléatoire et systématique, pour la prise de décision. Ces approches classiques de validation qui sont largement appliquées se servent d'un nombre colossal de tests statistiques.

1. Critères de validation

Les critères de validation sont ceux couramment utilisés dans les procédures analytiques de séparation et repris dans le document Q₂A de la Conférence Internationale sur l'Harmonisation. Il s'agit représenté dans le schéma suivant :

⁹ International Conférence on Harmonisation

¹⁰ Société Française des Sciences Techniques et Pharmaceutiques

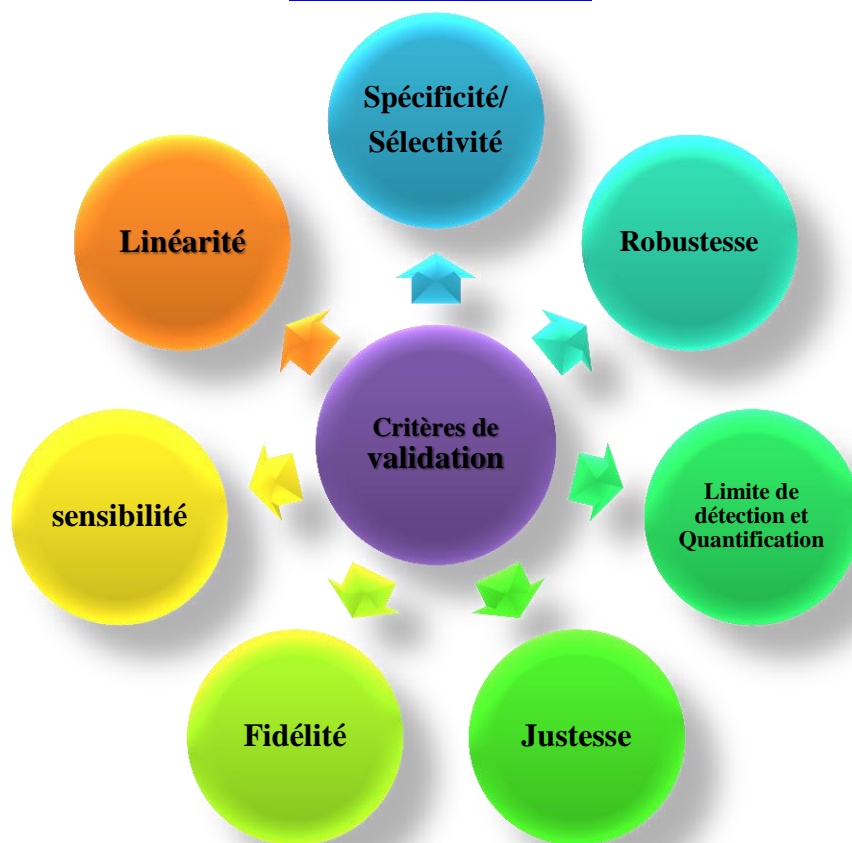


Figure 4 : critères de validation

Le tableau suivant renseigne les différentes caractéristiques à évaluer en fonction du type de procédure analytique à valider. Cette liste doit être considérée comme un guide et une base de référence.

Caractéristiques	Type d'analyse			
	Identification	Analyse des impuretés		Dosage
		Teneur	Limite	
Exactitude	-	+	-	+
Fidélité Répétabilité	-	+	-	+
Fidélité intermédiaire.	-	+	-	+
Spécificité	+	+	+	+
Limite de détection	-	-	+	-
Limite de quantification	-	+	-	-
Linéarité	-	+	-	+
Écart d'utilisation	-	+	-	+

Tableau 3 : Les critères à évaluer en fonction du type de procédure analytique à valider



_caractéristique qui n'est normalement pas évaluée

+ Caractéristique normalement évaluée

a) Spécificité / sélectivité

La spécificité d'une procédure analytique est sa capacité à établir l'existence de la substance à analyser en présence d'autres composants présents. Il s'agit de démontrer que la substance analysée au sein de la matrice est bien l'analyte recherché. La spécificité se fonde sur une absence d'interférences. Elle sera estimée par la méthode des ajouts dosés en calculant le pourcentage de recouvrement.

La sélectivité peut se définir comme l'aptitude d'un élément de la méthode d'analyse (appareil de mesure, milieu de culture, etc...) à discerner un analyte donné dans un mélange complexe.

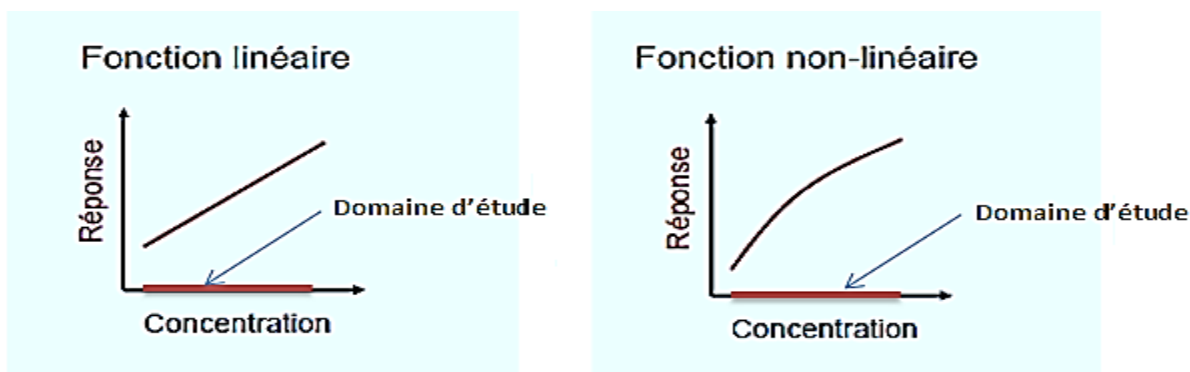
L'examen de la sélectivité s'effectue par l'analyse d'un blanc matrice (plasma, urine,...) en démontrant l'absence de réponse au temps de rétention de l'analyte par comparaison avec une solution pure de l'analyte.

b) Sensibilité

La sensibilité de la méthode qui représente la pente de la droite d'étalonnage ; si la courbe d'étalonnage n'est pas une droite, la sensibilité à une concentration donnée sera définie comme la pente de la tangente à la courbe à cette concentration. Il est clair que plus la sensibilité sera élevée plus il sera facile de distinguer deux échantillons de concentration voisine. Il apparaît également qu'une augmentation de la sensibilité permettra d'obtenir des limites de détection ou de quantification plus basses.

c) Linéarité

La linéarité d'une procédure analytique est sa capacité à l'intérieur de l'intervalle de dosage à fournir des résultats directement proportionnel à la concentration des substances présentes dans l'échantillon.



d) Justesse

La justesse représente l'étroitesse de l'accord entre la valeur moyenne obtenue à partir d'une large série de résultats d'essais et la valeur conventionnellement vraie de l'échantillon (la valeur de référence acceptée). La mesure de la justesse est exprimée en termes de *biais*, celui-ci représentant la différence entre l'espérance mathématique des résultats d'essais – c'est-à-dire la valeur « la plus » probable qu'on peut estimer à partir des résultats obtenus et la valeur de référence acceptée.

e) Fidélité

La fidélité représente l'étroitesse de l'accord entre des résultats d'essais indépendants effectués sur différentes prises d'essais d'un même échantillon homogène.

Fidélité	Echantillon	méthode	Laboratoire	Opérateur	équipements	Jour
Répétabilité	Même	Même	Même	Même	Même	Même
Fidélité intermédiaire	Même	Même	Même	différent	différent	différent
Reproductibilité	Même	Même	Différent	différent	différent	différent

Tableau 4 : les conditions des types de fidélité



f) Exactitude

L'exactitude qui va concerner un résultat seul et représente l'accord entre le résultat d'un mesurage et la valeur vraie du mesurande. Cette notion est la combinaison d'une erreur systématique, liée à la justesse de la méthode, et d'une composante aléatoire, liée à la mesure elle-même et qui dépend donc de la fidélité de la méthode.

g) Limite de détection

La limite de détection (LD) est la plus petite quantité de la substance ciblée qui peut être détectée, mais pas exactement quantifiée dans un échantillon.

h) Limite de quantification

La limite de quantification qu'on définit comme le niveau de mesure auquel la précision de la mesure sera considérée comme satisfaisante pour une détermination quantitative ; en d'autres termes, la limite de quantification est la concentration qui peut être déterminée avec un coefficient de variation appelé aussi déviation standard et une justesse acceptables. C'est en fait la limite à partir de laquelle le résultat sera donné avec une probabilité considérée comme acceptable.

i) Robustesse

La robustesse d'une méthode d'analyse est une mesure de sa capacité à supporter sans conséquence de petites variations apportées délibérément aux paramètres de la méthode; elle donne une idée de la fiabilité de la méthode dans les conditions normales d'utilisation.



IV. Validation analytique basée sur le profil d'exactitude et la notion de l'erreur totale

A. Expérience de la nouvelle stratégie de validation

La nouvelle stratégie de validation (dite aussi approche de l'erreur totale) 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 1. 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.

$$-\lambda < x - \mu < \lambda \Leftrightarrow x - \mu < \lambda \quad 1$$

Les quantités $-\lambda$ et $+\lambda$ représentent ces « distances raisonnables » maximales qu'un client est prêt à accepter. Elles forment ce que nous appelons l'intervalle d'acceptabilité. En outre, cette approche peut également fournir des garanties en calculant la probabilité de produire des résultats situés dans les limites d'acceptabilité $\pm\lambda$. Cette idée de fournir une garantie peut s'écrire sous la forme d'une probabilité supérieure ou égale à une proportion β

$$\Pr[-\lambda < x - \mu < \lambda] \geq \beta \quad 2$$

Avec β la proportion de mesures dans les limites d'acceptation $\pm\lambda$ qui fixées a priori en fonction des contraintes du secteur d'activité. La notion de limite d'acceptation introduit donc un premier critère permettant à l'analyste de prendre des décisions basé 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.

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 5.

Précisons dès à présent que dans le cadre de notre travail nous avons considéré qu'une « estimation » est un moyen par lequel on obtient une valeur qui est l'« estimé ». La formule qui est appliquée pour obtenir cet estimé est quant à elle l'« estimateur ».

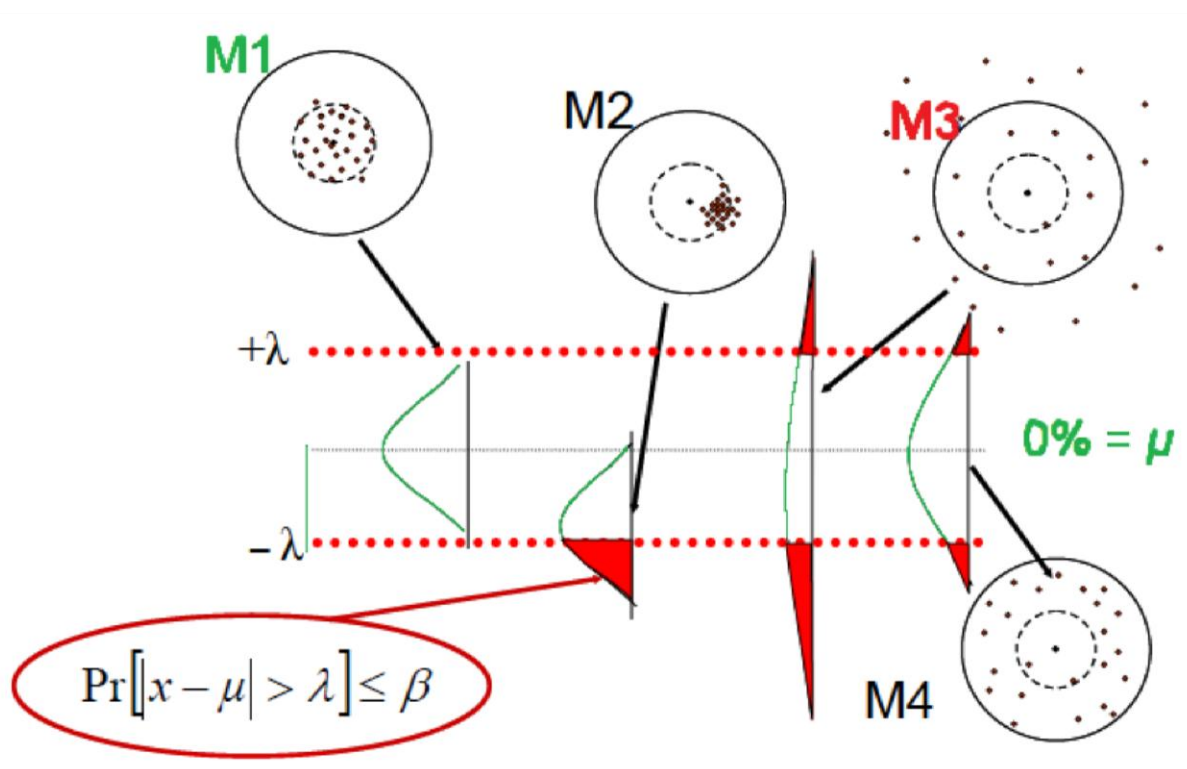


Figure 5 : Profil d'exactitude comme outil de décision pour quatre méthodes M1 (fidèle et juste), M2 (fidèle mais non juste), M3 (non fidèle et non juste) et M4 (non fidèle mais juste)

Ainsi, le profil d'exactitude est un outil de décision basée sur le risque associé à la méthode. La notion de risque est liée à la garantie concernant la future analyse des échantillons inconnus tout en appliquant la méthode



validée. Par conséquent, le profil d'exactitude peut servir à accepter ou rejeter une méthode analytique suivant l'usage attendu. Par ailleurs, le profil peut également être utilisé comme outil de diagnostic. Par exemple, il peut être utilisé pour sélectionner le modèle de régression le plus approprié pour la calibration et pour déterminer les limites de quantification supérieure et inférieure et à sélectionner ainsi que l'intervalle de dosage.

Une troisième notion relative à cette nouvelle stratégie de validation importante dans le cadre de notre travail est sa possibilité d'estimer l'incertitude de mesure sur la base des données de validation. Cette notion sera explicitée ultérieurement dans ce travail.

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

- 1) réalisation des expériences sur deux gammes :
 - ✓ Une gamme de standards d'étalonnage
 - ✓ Une gamme de standards de validation
- 2) Alignement des observations
- 3) sélection des limites d'acceptation considérant l'usage attendu de la méthode,
- 4) choix du modèle adéquat après génération de plusieurs modèles d'étalonnage.
- 5) calcul des concentrations en retour à partir du modèle sélectionné par prédiction inverse.
- 6) calcul de la justesse de chaque niveau de concentration
- 7) calcul des limites de tolérance bilatérales pour les résultats attendus au niveau β à chaque niveau de concentration en considérant le biais et l'écart-type de fidélité intermédiaire
- 6) établissement du profil d'exactitude ou d'incertitude



B. Analyse de la fonction de réponse et sélection du modèle de régression

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 :

$$Y = f(x) \quad (3)$$

Les fonctions f classiquement utilisées sont regroupées au tableau 5 mais cette liste n'est pas limitative. Les paramètres α et β et γ et δ et ψ 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 (AFNOR, 1996)
2. Régression pondérée (Azaïs J.M., Bardet J.M., 2006)
3. Régression non linéaire (Huet S., et al, 2004)

Type	Equation	Paramètres
Droite passant par l'origine	$Y = \beta X$	B
Droite	$Y = \alpha + \beta X$	α et β
Fonction quadratique	$Y = \alpha + \beta X + \gamma X^2$	α et β et γ
Fonction logistique à 4 paramètres	$Y = \alpha + \frac{\delta - \alpha}{1 + \left(\frac{X}{\gamma}\right)^\beta}$	α et β et γ et δ
Fonction logistique à 5 paramètres	$Y = \alpha + \frac{\delta - \alpha}{\left[1 + \left(\frac{X}{\gamma}\right)^\beta\right]^\psi}$	α et β et γ et δ et ψ

Tableau 5 : les fonctions des réponses



La méthode la plus accessible est celle des moindres carrés, car elle est disponible sur les tableurs. La régression pondérée s'applique dans les cas où les variances des réponses ne sont pas homogènes entre niveaux.

Si le type de modèle d'étalonnage a été clairement établi lors du développement de la méthode, on pourra choisir le nombre minimum des coefficients. Cependant, on aura intérêt à prendre mieux adaptés. En effet, 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 .

C. 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, en utilisant la fonction inverse du modèle d'étalonnage, selon le modèle mathématique suivant :

$$\hat{X} = Z = f^{-1}(X) \quad (4)$$

La fonction inverse est appelée équation de prédiction inverse et les valeurs z ainsi obtenues sont appelées concentrations retrouvées. Le tableau 6 fournit ces équations selon la fonction de réponse choisie au tableau 5.

Fonction de réponse	Fonction inverse de calcul de la concentration retrouvée
Droite passant par l'origine	$z = \frac{Y}{a_1}$
Droite	$z = \frac{Y - a_0}{a_1}$
Fonction quadratique	$z = \frac{-a_1 + \sqrt{a_1^2 - 4a_2(a_0 - Y)}}{2a_1}$
Logistique à 4 paramètres	$z = \frac{a_2}{\left(\frac{a_3 - a_0}{Y - a_0} - 1\right)^{\frac{1}{a_2}}}$

Tableau 6 : équations de prédiction inverse selon le type de la fonction de réponse



On utilise les données du plan de validation et les paramètres des modèles d'étalonnage estimés à partir du plan d'étalonnage pour calculer les concentrations retrouvées dans les échantillons de validation. Effectuer ces calculs par série, avec le modèle de la série correspondante. Ce mode de calcul souligne le fait qu'il est indispensable que les essais des plans d'étalonnage et de validation soient synchronisés c'est-à-dire réalisés le même jour et/ou par le même opérateur et/ou par le même laboratoire.

D. Calcul de justesse et de fidélité

Le profil d'exactitude est basé sur une application directe des principes décrits dans les normes de la série ISO 5725 (1, 2, 3, 4 ; 1994)]. On y propose un modèle statistique pour estimer l'exactitude (justesse et fidélité) d'une méthode ou de résultats.

L'estimation de la justesse et de la fidélité de la méthode est réalisée à chaque niveau de concentration à l'aide du module statistique suivant :

$$X_{ijk} = \mu_j + \alpha_{ij} + \varepsilon_{ijk}$$

i : indice de série, $i \rightarrow p$

j : indice de niveau, $j \rightarrow m$

k : indice de répétition, $k \rightarrow n$

X_{ijk} est la $k^{\text{ième}}$ concentration calculée du niveau j de la $i^{\text{ième}}$ série

M_j est la moyenne des concentrations calculées du niveau de concentration j , α_{ij} est au niveau j l'écart entre la moyenne de la $i^{\text{ième}}$ série et la moyenne μ_j . α_{ij} est considéré comme une variable aléatoire ayant une distribution normale de moyenne 0 et de variance $\sigma^2_{B, j}$, ε_{ijk} est l'erreur expérimentale, considérée comme une variable aléatoire ayant une distribution normale de moyenne 0 et de variance $\sigma^2_{w, j} \rightarrow N(0, \sigma^2_{w, j})$



Les variances $\sigma^2_{B, j}$ et $\sigma^2_{w, j}$ représentent les variances inter- séries et intra- séries, respectivement.

1. Calcule da la fidélité :

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

$$\text{On a } CM_b = \frac{SCE_b}{p-1} \quad \text{et} \quad CM_e = CM_w = \frac{SCE_w}{p(n-1)}$$

L'estimation d'ANOVA de chaque niveau

$$S_b^2 = \frac{CM_b - CM_w}{n} \quad \text{Et} \quad S_w^2 = CM_w$$

Si $CM_w < CM_b$

$$\text{On a } S_r^2 = CM_w \quad \text{ET} \quad S_{FI}^2 = S_w^2 + S_b^2$$

$$\text{On calcule donc } CV_r = \left(\frac{S_w}{\bar{X}}\right) * 100 \quad \text{et} \quad CV_{FI} = \left(\frac{S_{FI}}{\bar{X}}\right) * 100$$

Si $CM_w > CM_b$ donc $S_b^2 = 0$ et $S_{FI} = S_T$

2. Calcule da la justesse :

La justesse fournit une indication sur les erreurs systématique de la procédure analytique.

Les trois paramètres :

- Biais $j = Z_j - X_j$
- Biais relatif (biais %) = $\frac{Z_j - X_j}{X_j} \times 100$
- Taux de recouvrement ou de récupération % = $\left(\frac{Z_j}{X_j}\right) \times 100$



E. Profile d'exactitude

À partir de l'écart-type de fidélité intermédiaire ou de reproductibilité, calculé selon les recommandations de la norme ISO 5725-2, on construit un intervalle de tolérance d'espérance β .

L'intervalle de tolérance d'espérance β est différent de l'intervalle de confiance. L'intervalle de confiance caractérise un paramètre statistique. Par exemple l'intervalle de confiance de la moyenne permet d'établir avec un niveau de confiance donné un intervalle autour de la moyenne observée dans lequel la moyenne vraie a de grandes chances de se trouver. Il s'exprime sous la forme Moyenne $\pm k_{IC}$ (écart-type de la moyenne), où k_{IC} est le facteur de couverture de l'intervalle de confiance. L'intervalle de tolérance caractérise, d'un côté, la dispersion des résultats déjà obtenus mais permet aussi de prévoir ceux qui seront obtenus lors de futurs mesurages. Il s'exprime aussi sous la forme Moyenne $\pm k_{IT}$ (écart-type de fidélité) mais où k_{IT} est un autre facteur de couverture, calculé de façon complètement différente de k_{IC} .

F. Calcul de l'intervalle de tolérance

La méthode de calcul proposée par Mee (1984) est celle qui a été choisie pour cette procédure. Elle a aussi été adoptée par une commission de la Société des sciences et techniques pharmaceutiques (SFSTP - 2003, 2006).

Exprimer l'intervalle de tolérance comme un intervalle symétrique autour de la concentration retrouvée moyenne \bar{z} du niveau :

Calculer l'écart-type de l'intervalle de tolérance S_{IT} selon la formule suivant ;

$$S_{IT} = S_{FI} \sqrt{\left(1 + \frac{1}{npB_j^2}\right)} \quad (5) \quad \text{Avec} \quad B_j = \sqrt{\frac{R_j+1}{nR_j+1}} \quad (6)$$

Il servira aussi à l'estimation de l'incertitude de mesure. Il est obtenu grâce aux formules suivantes :



$$\bar{Z} \pm K_{IT} + S_{IT} \quad (7)$$



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

$$K_{IT} = t\left(\nu; \frac{(1+\beta)}{2}\right) \quad (8)$$

$t\left(\nu; \frac{(1+\beta)}{2}\right)$ (9) Est le quantile de la distribution t de Student pour ν degrés de liberté et β la probabilité du contenu de l'intervalle de tolérance. Le nombre de degrés de liberté ν est calculé selon méthode d'approximation et donne :

$$\nu = \frac{(Rj+1)^2}{\frac{(Rj+\frac{1}{n})^2}{p-1} + \frac{1-\frac{1}{n}}{np}} \quad (10)$$

Le rapport $Rj = \frac{S_b^2}{S_w^2}$ entre la variance inter-séries et la variance de répétabilité intervient dans plusieurs formules. Il traduit l'importance relative de l'effet de la série. Par exemple, dans le cas où l'effet jour est l'effet série, si la méthode est très stable d'un jour à l'autre et est capable de fournir des résultats très proches pour un même échantillon, R est proche de 1 et ne jouera qu'un rôle secondaire. Par contre, si ce rapport augmente le nombre de degrés de liberté est diminué et plus le nombre de degrés de liberté est petit, plus le quantile de la distribution t de Student est élevé et élargit l'intervalle de tolérance.

Donc la formule de l'intervalle de tolérance est la suivant :

$$L_{is} = \text{biais \%} \pm t\left(\nu; \frac{(1+\beta)}{2}\right) * \sqrt{\left(1 + \frac{1}{npB_j^2}\right)} \quad (11)$$

G. Construction graphique et interprétation

Le profil d'exactitude peut être construit de différentes façons, en fonction du type de données traité.

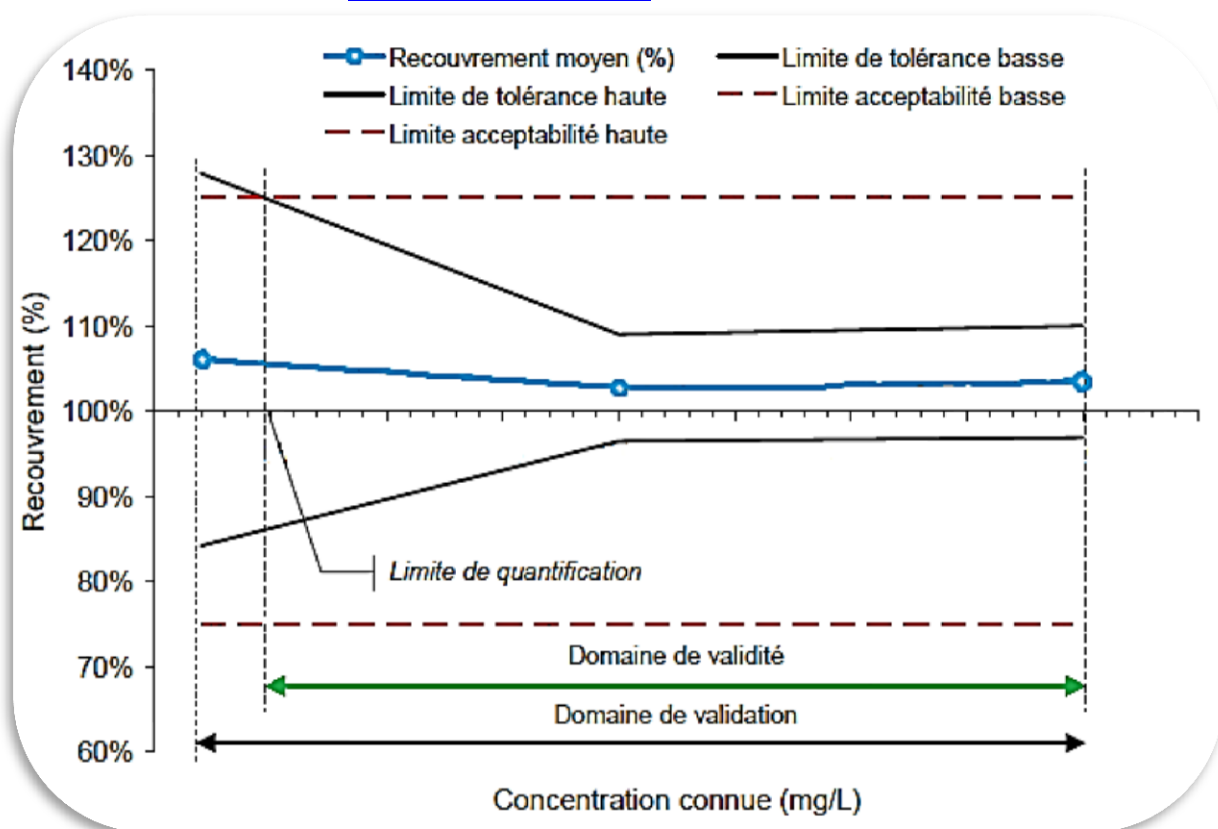


Figure 6 : profil d'exactitude

Les éléments graphiques entrant dans ce profil d'exactitude sont les suivants :

– sur l'axe horizontal, la concentration théorique des niveaux (soit les valeurs de référence assignées aux niveaux) ;

– sur l'axe vertical, simultanément :

- ✚ les limites des intervalles de tolérance d'espérance β calculés sur les concentrations retrouvées et exprimées en pourcentages (sous la forme d'un taux de recouvrement ou d'une exactitude relative) ;
- ✚ les intervalles d'acceptabilité, définis en fonction de l'objectif de la méthode, exprimés de la même façon que les intervalles de tolérance.

Tous les calculs sont effectués séparément pour chaque niveau de concentration k , permettant d'obtenir k écarts-types de fidélité puis k intervalles de tolérance qui une fois réunis servent à construire le profil.



La stratégie d'interprétation de ce graphique est décrite en détail par Max Feinberg (2010 c). Cependant, d'une part, les limites d'acceptabilité, d'autre part, la proportion β qui sert à calculer les intervalles de tolérance dépendent strictement du contexte d'utilisation de la méthode et doivent être adaptés à chaque cas. Sur la figure 6, dans le domaine de validité, délimité par les traits verticaux discontinus.

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



Troisième partie : Partie expérimental



I. Méthode et matérielles

A. Méthode

L'objectif est la validation par l'approche de l'erreur totale d'une méthode de dosage de bromazépam par la technique de séparation chromatographie liquide haut performance (CLHP).

1. Principe de CLHP

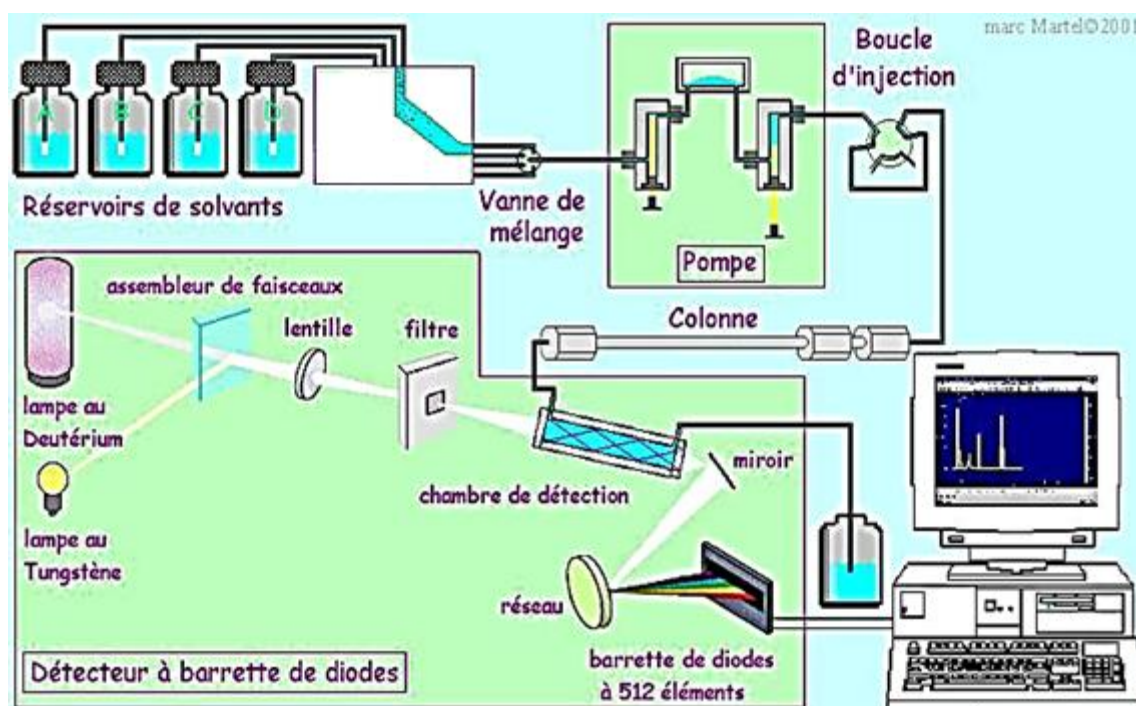


Figure 7 : schéma décrivant le principe de fonctionnement de l'HPLC

L'échantillon à analyser est poussé par un liquide (appelée phase mobile) dans une colonne remplie d'une phase stationnaire de fine granulométrie (les « grains » sont de très petite taille). Le débit d'écoulement de la phase mobile est élevé ce qui entraîne une augmentation de la pression dans le système. Ce débit élevé diminue le temps nécessaire pour séparer les composants le long de la phase stationnaire. La fine granulométrie de la phase stationnaire permet une meilleure séparation des composants. En effet, pour un même volume de phase stationnaire la surface d'échange augmente si les « grains » qui la composent sont de diamètre plus petit. Les pics obtenus sont plus étroits donc la résolution est améliorée (les pics sont bien séparés, on peut donc bien les différencier), le seuil de détection est également plus



bas (des pics étroits et hauts sont plus faciles à isoler du bruit de fond que des pics larges et bas). La combinaison de ces attributs - rapidité et résolution élevées - conduit à l'appellation « haute performance ».

Les solvants utilisés sont des combinaisons miscibles d'eau et de divers liquides organiques (alcools, acétonitrile, dichlorométhane...).

Souvent, la composition de la phase mobile est modifiée au cours de l'analyse, c'est le mode dit « gradient » ou « élution graduée » (en opposition au mode « isocratique », pour lequel la composition de la phase mobile reste la même tout au long de l'analyse). Par exemple, sur une colonne apolaire, en utilisant un mélange eau/méthanol comme phase mobile, les composants les plus hydrophobes sont élués avec une concentration élevée en méthanol alors que les composants plus hydrophiles sont élués préférentiellement avec une concentration faible en méthanol. Selon la nature de la phase stationnaire, on commencera par une concentration élevée en méthanol ou le contraire.

B. Matériel et Réactif

1. Verrerie

- ✓ Tubes en verre borosilicaté de 15 ml à fond rond (SOVIREL)
- ✓ Tubes en verre borosilicaté de 15 ml à fond conique (SOVIREL)
- ✓ Flacons pour injecteur automatique
- ✓ Bêchers en verre

La verrerie est lavée selon la opératoire de nettoyage de la verrerie

2. Matériels divers

- ✓ Micropipettes à volume réglable et volume fixe.

3. Appareillage

L'appareillage est référencé dans le système informatique de gestion des équipements QUALIMS_EQM.

- ✚ Thermostat à sec à bloc métallique avec rampe d'évaporation (TOULEMONDE et cie)
- ✚ Agitateur oscillant Agitelec (TOULEMONDE et Cie)
- ✚ Agitateur vibrant type VORTEX
- ✚ Centrifugeuse JOUAN (Réf. : G 412)
- ✚ pH-mètre de paillasse (précision $\pm 0,01$)
- ✚ Agitateur à retournement
- ✚ Bloc chauffant avec rampe d'évaporation



+ Balance de précision de classe I

+ Système chromatographique :

- 2 pompes SHIMADZU LC 10 A
- Auto-injecteur SHIMADZU SIL-10 ADVP
- Colonne NICLEOSIL C18 (MACHERY-NAGEL ou équivalent) : L=150 mm, d.i¹¹=4,5mm, d.p¹²=5µm.

4. Réactifs et solution

Les réactifs utilisés dans cette méthode sont référencés dans le système informatique de gestion de stocks.

C. Mode opératoire

1. Echantillon analysés

En général, le dosage est effectué dans le sang total, le sérum, les urines ou le liquide gastrique. Il est toutefois possible de rechercher et de doser les benzodiazépines dans d'autres matrices telles que les organes, les poudres, les liquides inconnus. L'analyse nécessite un volume minimal 2 ml pour chaque milieu.

2. Préparation de la gamme d'étalonnage

Les solutions filles sont préparées à partir de dilution de la solution mère de bromazépan de concentration 1g/l dans le méthanol.

Le tableau suivant présent la gamme d'étalonnage complète étudiée lors de la validation analytique.

¹¹ Diamètre intérieur

¹² Diamètre de pore



Dans des types de 15 ml, introduit successivement :

Concentration $\mu\text{g/l}$	Gamme d'étalonnage					
	0	50	100	500	1000	2000
Milieu biologique sans BZD (μl)	2000	1900	1800	1900	1800	1600
solution fille de Bromazépam à 10 mg/l (μl)	-	-	-	100	200	400
solution fille de Bromazépam à 1 mg/l (μl)	-	100	200	-	-	-
S40 : El à 1 mg/l (μl)	50	50	50	50	50	50
Tampon carbonate pH 9,5 (ml)	1	1	1	1	1	1
Diéthyl éther (ml)	8	8	8	8	8	8

- ✓ Agiter par retournement pendant 10 min
- ✓ Centrifuger pendant 5 min à 3000 tr/min environ
- ✓ Transférer la phase étherée dans un tube à fond conique de 10 ml
- ✓ Evaporer à sec sous faible courant d'azote, à 40 °C environ
- ✓ Reprendre le résidu sec par 100 μl de phase de reprise ¹³R54
- ✓ Agiter au vortex
- ✓ Centrifuger pendant 5 min à 3000 tr/min environ
- ✓ Injecter 40 μl du surnageant dans le système CLHP/UVBD

3. Condition chromatographiques

Débit : 1,3 ml/min

Phase mobile : R5/R9 selon le gradient d'élution suivant :

Temps (min)	R5	R9
0	85	15
2	85	15
42	25	75
45	10	90
48	10	90
50	85	15

¹³ Phase de reprise : est un mélange entre les deux phases mobile tampon phosphate et l'eau acétonitrile (70/30) (V/V)

Le chromatogramme est tracé à 220 nm pendant 50 min avec un balayage de 200 à 400 nm pour une bande passante de 1 nm.

4. Préparation des phases mobile

- R5 tampon phosphate de migration 0,025M ajusté à pH 2,6 avec H_3PO_4 .

On mesure 3,4 g de $K_2H_2PO_4$ et on dissout dans 1L d'eau distillée, après ça nous avons faire la filtration de cette solution et ajusté à pH 2,6 avec H_3PO_4 .

- R9 l'eau / acétonitrile

On mesure 100 ml de l'eau HPLC et 900 ml de l'acétonitrile et on mélange les deux volumes.

D. Analyse des résultats

1. Optimisation de la méthode analytique

a) Spectre de l'absorbance de balayage de la longueur d'onde

Pour déterminer le pic de bromazépam il faut nécessaire de faire la projection de spectre de balayage obtenue de chaque pic sur les différents spectres de balayage présents dans la bibliothèque.

Après l'identification de pic de bromazépam nous avons déterminé encours le temps de rétention $T_R=16,5$

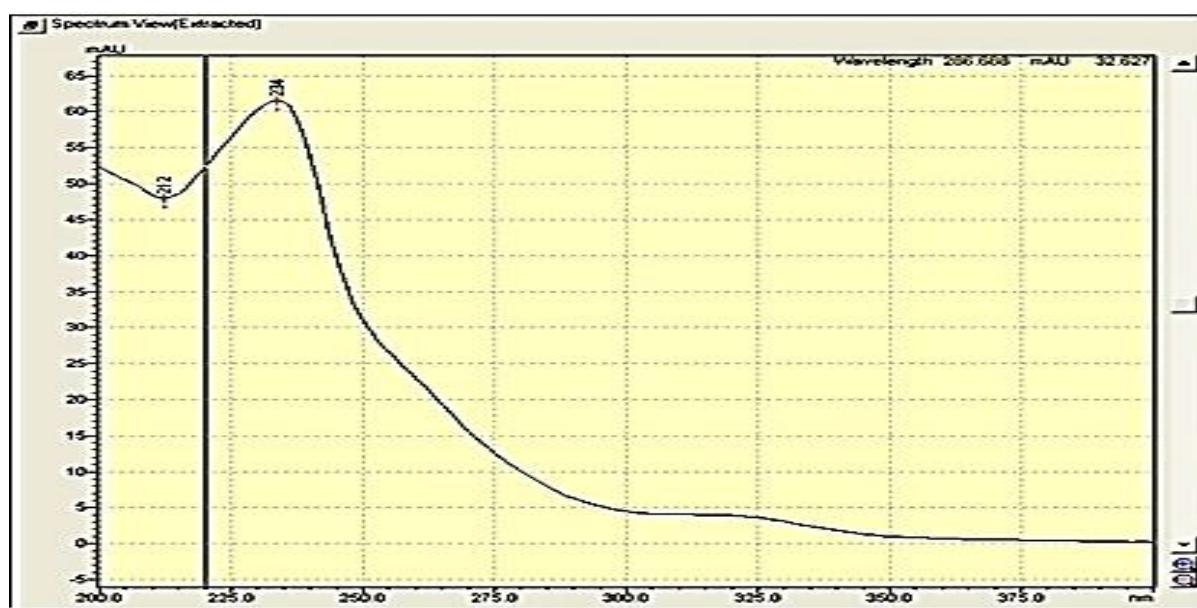


Figure 8 : Spectre de l'absorbance de balayage de longueurs d'ondes

A partir du spectre nous pouvons apercevoir que le pic de la molécule bromazépan apparue aux longueurs d'ondes 200 nm à 400 nm et nous avons choisi la longueur d'onde 220 nm pour mesurer l'absorbance.

b) Chromatogramme de l'impureté

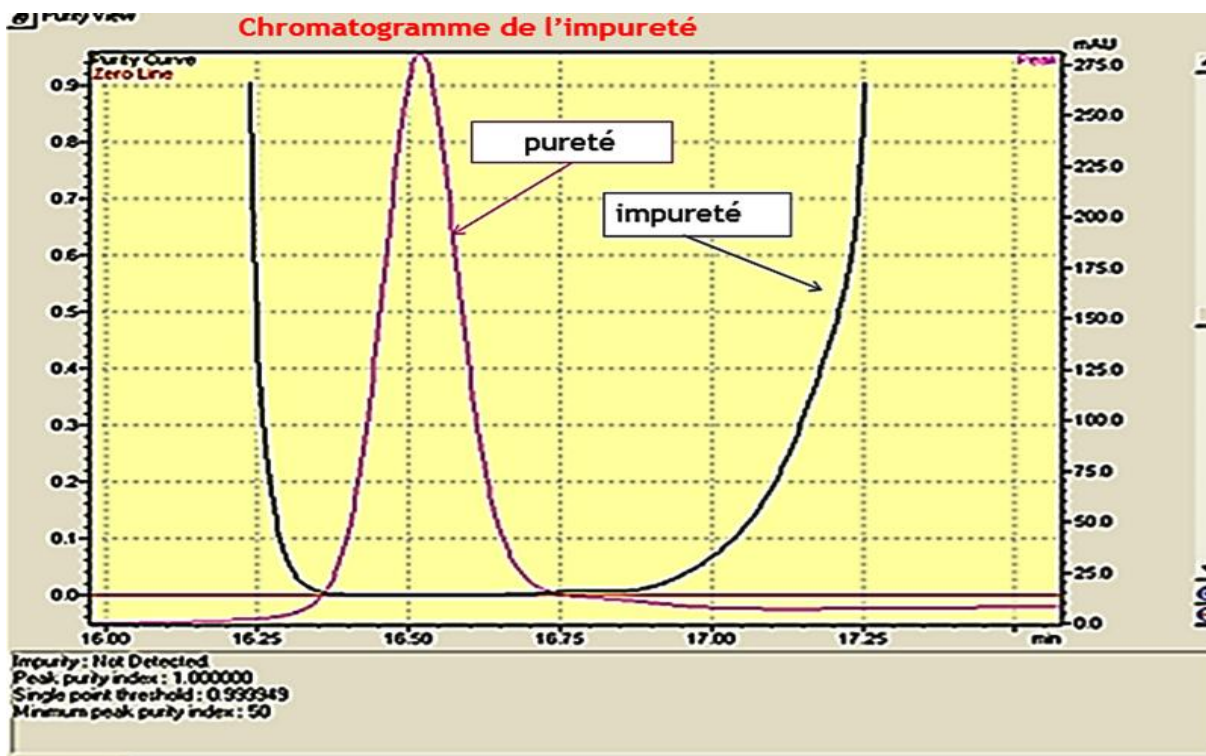


Figure 9 : Chromatogramme de pureté du pic de la bromazépan

Depuis ce chromatogramme on remarque que la courbe d'impureté passe par zéro où temps de rétention de bromazépan : alors que il n'y a pas d'impuretés détecté et l'index de la pureté du pic a une valeur qui tend vers 1 (Index= 0.999999)

Alors qu'on trouve que la Bromazépan est détectée sans aucune impureté.

2. Validation de la méthode analytique

Pour valider la méthode analytique nous avons appliqué les démarches de l'approche de l'erreur total.

a) **Spécificité/Sélectivité**

(1) **Chromatogramme de phase mobile plus l'étalon interne**

Le chromatogramme suivant montre qu'il y a aucun bruit de fond au temps de rétention de la Bromazépam. Car le chromatogramme passe par Zéro après la détection des molécules non-spécifique.

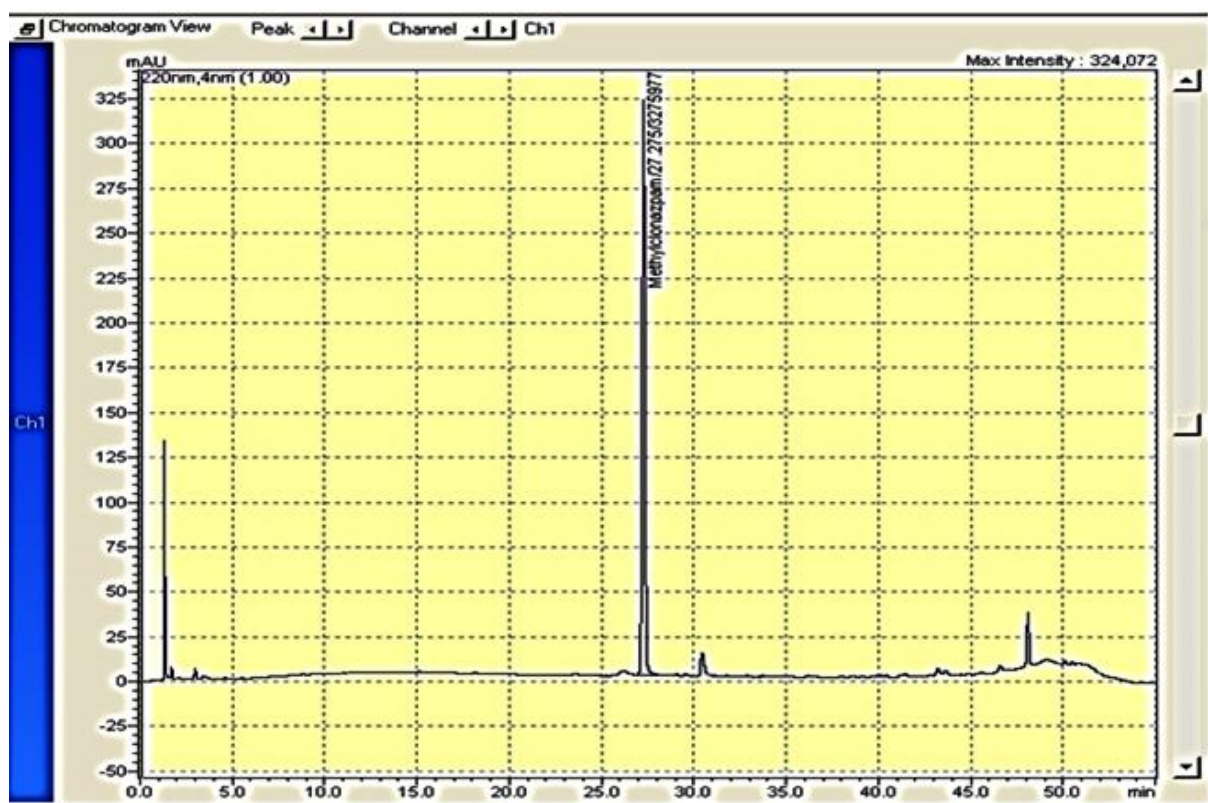


Figure 10 : Chromatogramme du dosage blanc (phase mobile)

- 0 min → 1,5 min : temps mort
- 1,5 min → 4 min : molécules non-spécifique
- 27 min : le témoin (métylclonazépam)

(2) **Chromatogramme du blanc (milieu biologique sans Bromazépam)**

Le chromatogramme du blanc (milieu biologique sans Bromazépam) montré il n'y a aucune molécule détectée au temps de rétention de la Bromazépam. Donc l'aire de pic est seulement de la molécule analysé.



Figure 11 : Chromatogramme du dosage blanc (milieu biologique sans Bromazépam)

(3) Chromatogramme du dosage blanc (milieu biologique avec Bromazépam)

A partir de chromatogramme de dosage de milieu biologique avec Bromazépam nous avons remarqué que la Bromazépam est détectée seulement au temps de rétention **16,5min**.

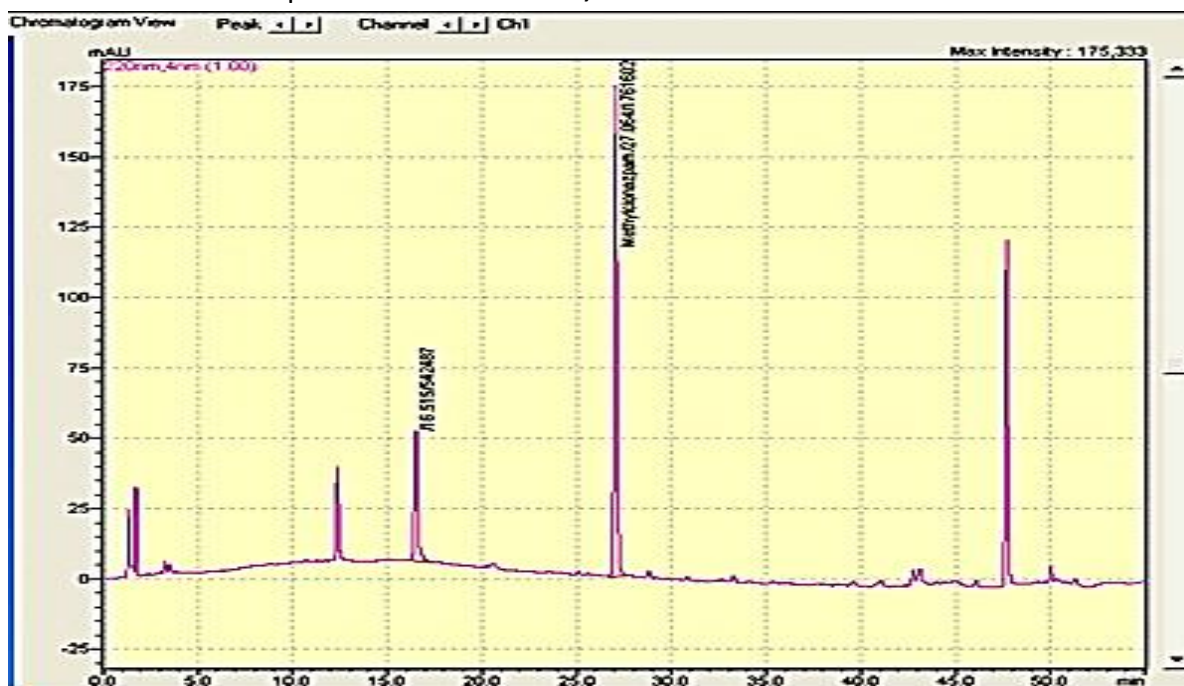


Figure 12 : Chromatogramme du dosage blanc (milieu biologique avec Bromazépam)

Conclusion générale :

A partir des trois chromatogrammes précédente on conclure que la méthode est bien spécifique et sélective pour la détection de Bromazépam.



b) Les résultats des expériences sur deux gammes

Le plan d'étalonnage

Comporte p=3 série (jour) et m=5 niveau et n=3 répétition

niveau	C _i (Ug/l)	Y _{ijk} = Aire		
		jour 1	jour 2	jour 3
1	50	33928	55011	28395
	50	44635	55378	31942
	50	30990	51112	26571
2	100	108911	112749	84778
	100	104880	103209	77212
	100	112353	193942	66876
3	500	238258	638777	326207
	500	604085	602221	999619
	500	545121	597789	228333
4	1000	1442566	1244963	1058761
	1000	1222215	1011866	1031655
	1000	1185695	1178202	1214493
5	2000	2718535	2485275	2079288
	2000	3335602	2251785	2469801
	2000	2877772	2002117	2608770

Tableau 7 : données de gamme d'étalonnage

Plan de validation

Le plan de validation comporte p=3 série (jour) et m=5 niveau et n=3 répétition

niveau	C _i (Ug/l)	Y _{ijk} =Aire		
		jour 1	jour 2	jour 3
1	50	16734	25600	29271
	50	16354	25678	25637
	50	11023	16662	20456
2	100	102956	87922	60166
	100	90000	81027	64573
	100	107806	98342	62067
3	500	225473	621174	217271
	500	512382	627361	976197
	500	931830	650163	170099
4	1000	1021444	1175684	1595029
	1000	1219476	1218274	1127750
	1000	1217072	1324741	1060865
5	2000	2507334	2250514	2291942
	2000	2323873	2653793	2316173
	2000	2928374	2363924	2583529

Tableau 8 : données de gamme de validation



c) Sélection les limites d'acceptation

Dans cette analyse nous avons étudié un médicament dans une matrice biologique donc la limite d'acceptation $\lambda = \pm 15\%$

d) Choix le module d'étalonnage le plus adéquat

Dans cette étape il faut nécessaire de générer différents modèles d'étalonnage et faire l'établissement du profil d'exactitude de chaque module pour choisir le plus adéquat qui réponde sur les besoin et situer dans les limites d'acceptation.

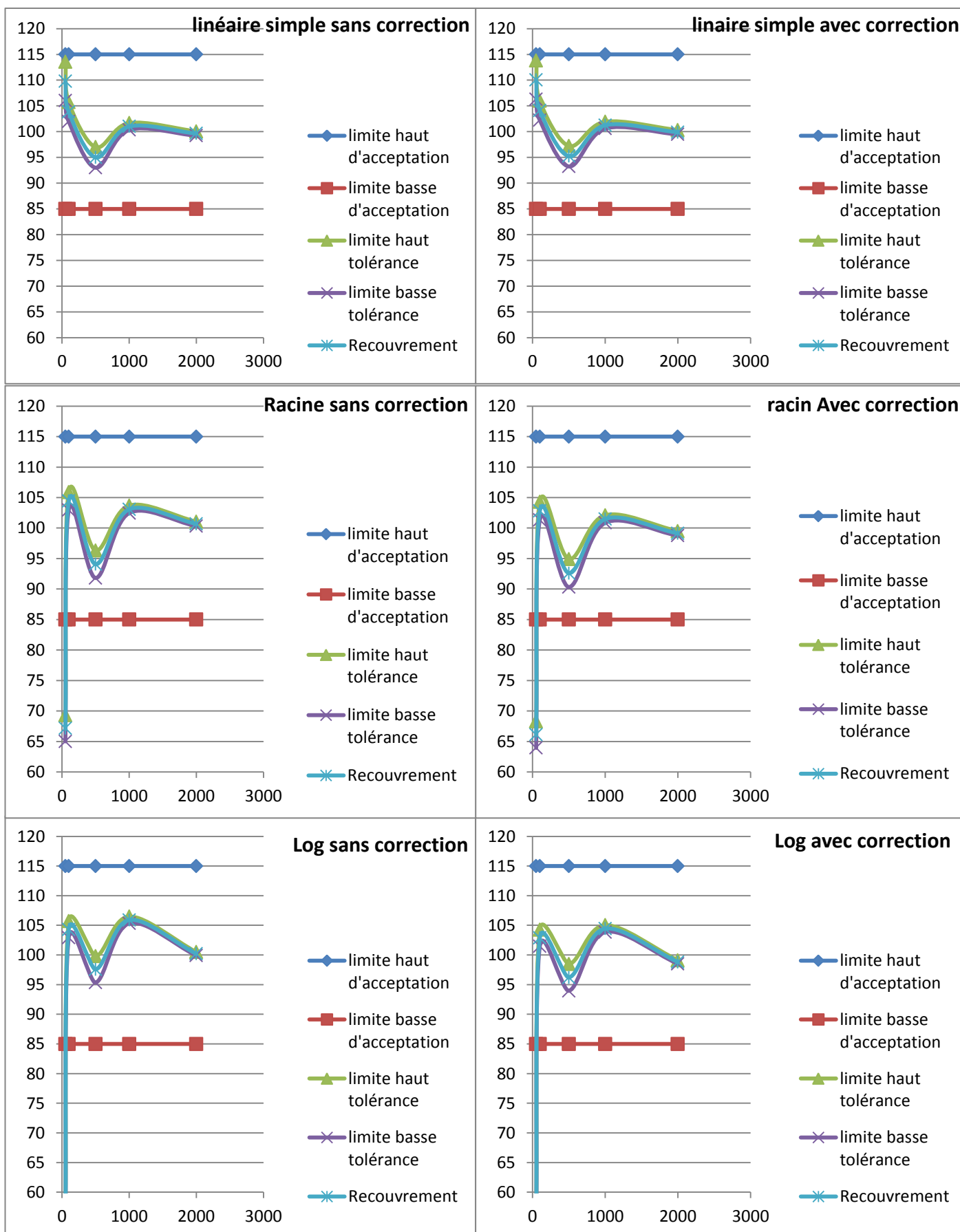
Le tableau suivant regroupe les résultats statistiques de tous les modèles générés :

	Pente	L'ordonnée a l'origine	R ²
simple	1512	-130014	97,30%
	1116	24548	98,40%
	1209	-60308	95,50%
ln	1,15	6,09	97,40%
	0,993	7,11	98,80%
	1,18	5,7	96,80%
racine	40,1	-119	97,30%
	33,2	20,6	99,00%
	36,4	-98	95,50%
pondéré	0,00137	-1E-06	93,80%
	0,000919	0	97,60%
	0,00173	-1E-06	97,50%
passee par Zéro	1421,765	0	98,08%
	1132,658	0	99,21%
	1167,059	0	97,44%

Tableau 9 : données des différentes gammes d'étalonnage

A partir des données de plan de validation et en utilisant les paramètres des différents modèles d'étalonnage pour calculé les concentrations retrouvé par la prédiction inverse. On utilise ces concentrations pour calculer les valeurs de biais relatifs et recouvrement, les coefficients de variation de la répétabilité et de la fidélité intermédiaire des différents niveau de concentration, ces paramètres est nécessaires pour établir le profil d'exactitude.

Les différents profils construits sont donnés dans la figure suivant :



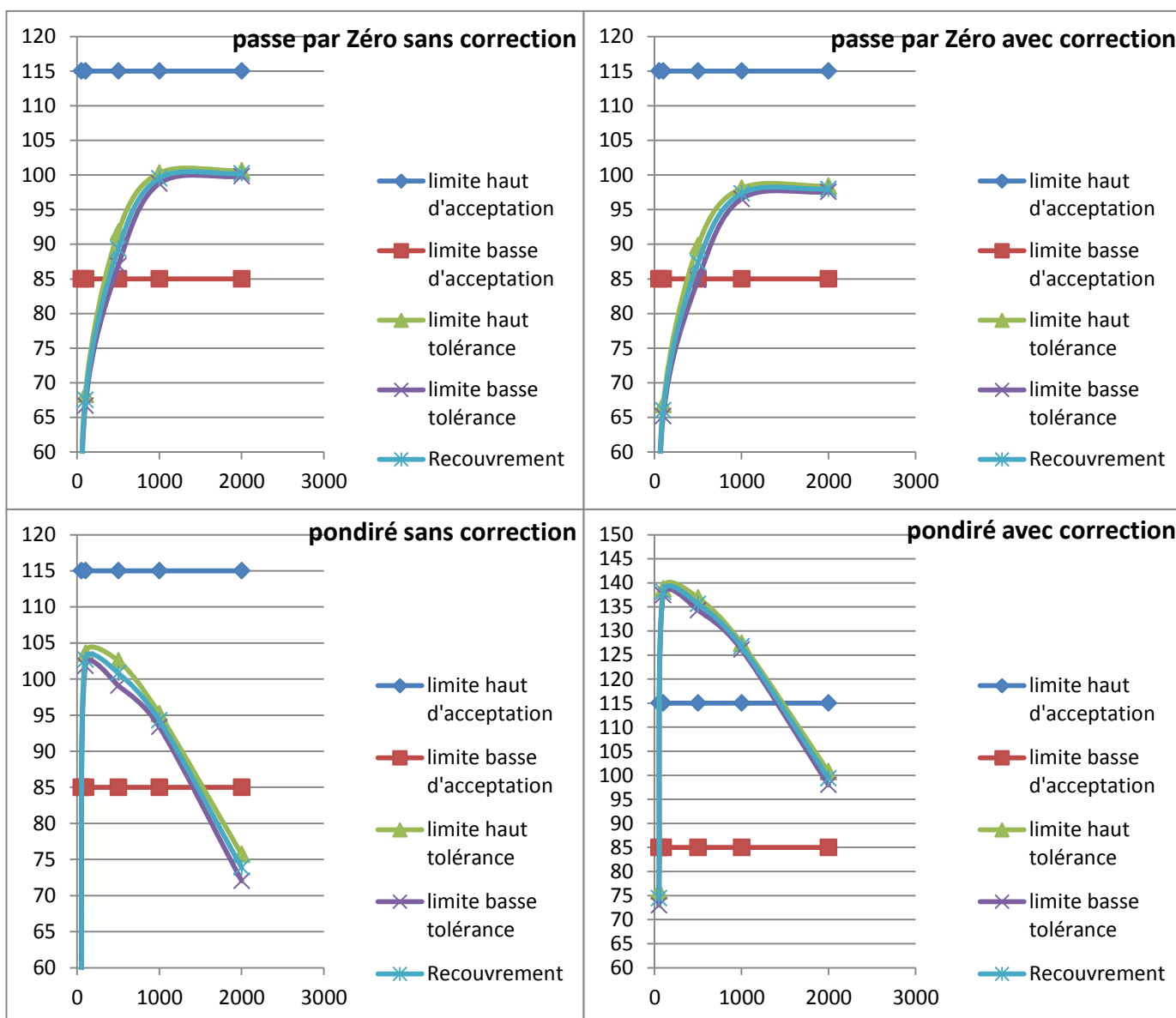


Figure 13 : les profils d'exactitude des différents modules d'étalonnage

Après avoir examiné soigneusement ces profils, nous avons sélectionné les trois modules suivant :

Module linéaire simple

Module logarithmique

Module racine carrée

Le choix est basé sur l'objectif de trouver des recouvrements par niveau, les plus proches possibles du 100% et bails plus proches de zéro, avec un intervalle de tolérance le plus étroit et situé à l'intérieure des limites d'acceptabilité, pour avoir une méthode valide dans l'intervalle de concentration étudiée. Le modèle **linéaire simple** s'avère plus ou moins proche du recouvrement souhaité.

Calcul de facteur de correction

Pour déterminée le facteur de correction on utilise la pente de l'équation entre les concentrations retrouvé et les concentrations théoriques.

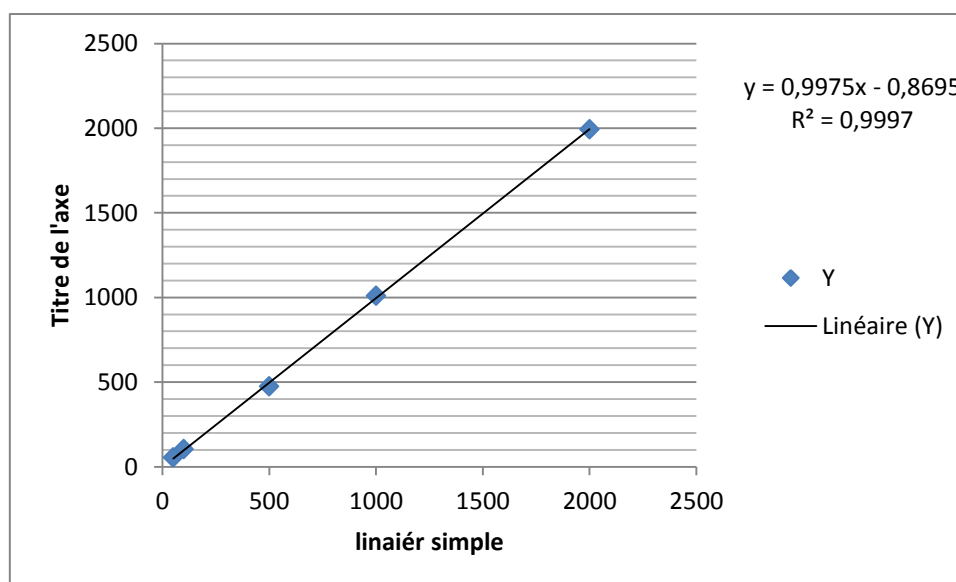


Figure 14 : Droite de régression entre les concentrations introduites et les concentrations retrouvées pour le modèle linéaire simple

Le facteur de correction FC à appliquer est $FC = 1/\text{pente}$

$$FC = \frac{1}{0,9975} = 1,0025$$

Un nouveau calcul du profil d'exactitude est réalisé en tenant compte du facteur de correction. La correction est effectuée sur les concentrations calculées en retour.



e) Calcul de fidélité

Les calculs de fidélité par niveau avant la correction est résumée dans le tableau suivant :

Niveaux de concentration	Concentration introduite ($\mu\text{g/l}$)	Concentration calculée ($\mu\text{g/l}$)	$S_{\text{rép}}$	$CV_{\text{rép}}$ (%)	S_B^2	S_{FI}	CV_{FI} (%)
1	50	54,890	3,627	6,607	2554,652	50,674	92,318
2	100	103,840	5,814	5,599	2223,636	47,513	45,756
3	500	475,011	255,218	53,729	0,000	277,116	58,339
4	1000	1010,043	150,913	14,941	12025,988	186,549	18,469
5	2000	1992,755	177,631	8,914	21701,445	230,769	11,580

Tableau 10 : Critères de fidélité pour les cinq niveaux de concentration avant la correction

Les calculs de fidélité par niveau après la correction est résumé dans le tableau suivant :

Niveaux de concentration	Concentration introduite ($\mu\text{g/l}$)	Concentration calculée ($\mu\text{g/l}$)	$S_{\text{rép}}$	$CV_{\text{rép}}$ (%)	S_B^2	S_{FI}	CV_{FI} (%)
1	50	55,028	3,627	6,590	2554,652	50,674	92,087
2	100	104,100	5,814	5,585	2223,636	47,513	45,641
3	500	476,202	255,218	53,595	0,000	277,116	58,193
4	1000	1012,574	150,913	14,904	12025,988	186,549	18,423
5	2000	1997,749	177,631	8,892	21701,445	230,769	11,551

Tableau 11 : Critères de fidélité pour les cinq niveaux de concentration après la correction

A partir des résultats de fidélité avant et après la correction on observe un faible changement dans les deux facteurs $CV_{\text{rép}}$ et CV_{FI} .

f) Calcul de justesse

La justesse peut être calculée à partir des données du tableau de validation, sous diverses formes, comme un biais moyen absolu ou relatif. Dans notre cas elle est évaluée à l'aide du taux de recouvrement moyen R %, le tableau 12 résume les critères de justesse.

concentration introduit	concentration retrouvé	biais absolu	biais %	Recouvrement%
50	54,89006376	4,890063756	9,78012751	109,7801275
100	103,8400259	3,840025864	3,84002586	103,8400259
500	475,0112197	-24,98878032	-4,99775606	95,00224394
1000	1010,042991	10,04299106	1,00429911	101,0042991
2000	1992,755109	-7,24489116	-0,36224456	99,63775544

Tableau 12 : Critères de justesse pour les cinq niveaux de concentration sans correction

concentration introduit	concentration retrouvé	biais absolu	biais %	Recouvrement%
50	55,02763284	5,02763284	10,0552657	110,055266
100	104,1002766	4,10027656	4,10027656	104,100277
500	476,201724	-23,798276	-4,7596552	95,2403448
1000	1012,574427	12,5744271	1,25744271	101,257443
2000	1997,749483	-2,25051745	-0,11252587	99,8874741

Tableau 13 : Critères de justesse pour les cinq niveaux de concentration avec la correction

A partir des résultats de justesse avant et après la correction on observe un faible changement dans le recouvrement et biais %.

g) Calcule de l'intervalle de tolérance

Le tableau suivant représente les différents résultats des calculs :

limite haut d'acceptation	limite basse d'acceptation	Avec correction		Sans correction	
		limite haut tolérance	limite basse tolérance	limite haut tolérance	limite basse tolérance
115	85	113,8142874	106,296244	113,5485703	106,0116847
115	85	105,9618236	102,2387295	105,7062384	101,9738133
115	85	97,23237638	93,24831322	96,99926808	93,0052198
115	85	101,9187874	100,596098	101,6673013	100,3412969
115	85	100,3096643	99,46528397	100,0610037	99,21450716

h) Profil d'exactitude

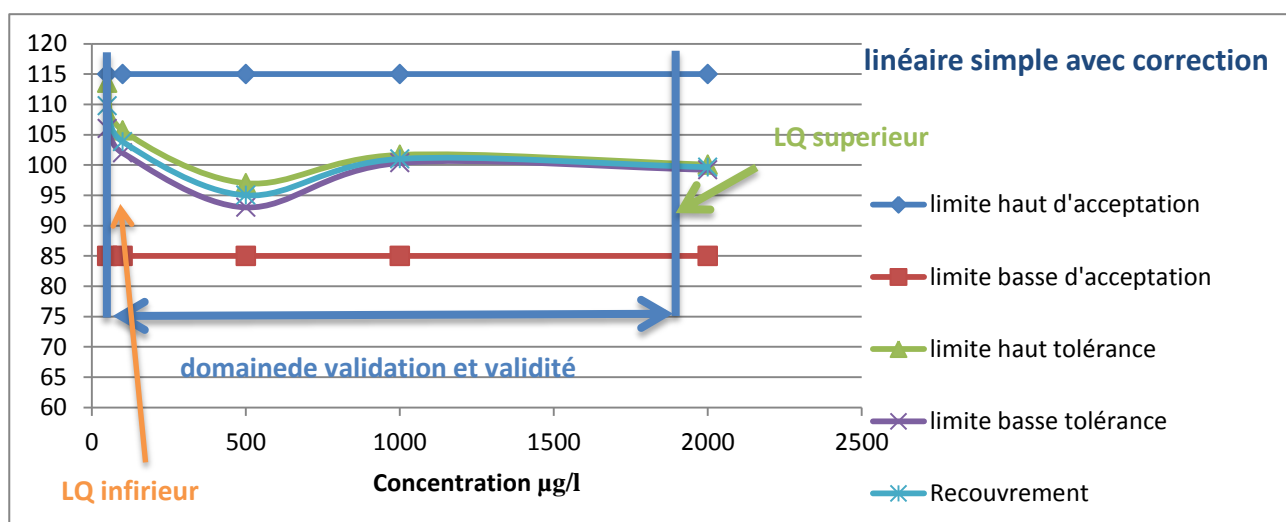


Figure 15 : profil d'exactitude de linéaire simple sans correction

A partir de profil d'exactitude on conclure, le domaine d'étude est valide car les limites de tolérances situé entre les limite d'acceptation et recouvrement très proche à la valeur 100%.



Conclusion

La méthode de validation par l'approche de l'erreur totale d'un dosage de bromazépam par HPLC est mieux adaptée aux enjeux de la validation.

Dans un premiers temps, nous avons évalué l'absence des impuretés dans la longueur d'onde choisie et après cela on démontre que la méthode est bien sélectivité pour la molécule de bromazépam. Puis après la réalisation d'un plan expérimental de validation pour pouvoir estimer le biais, nous avons constaté que le recouvrement moyen est en sous-estimation dans un quelque niveaux et surestimation a l'autre, ce qui nous a poussés à introduire un facteur de correction (1,0025) après génération de plusieurs modèles. Le modèle retenu est le modèle linéaire simple qui donne des résultats très satisfaisants soit avant ou après la correction.

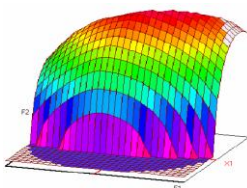
L'établissement des deux intervalles de tolérance basse et haute de profil d'exactitude on utilisant les paramètres statistiques tel que le biais relatif (bais %) et le coefficient de variation de la fidélité intermédiaire (CV_{FI}) pour une attente d'une proportion de 95% des résultats futurs soit comprise entre les limites d'acceptation $\lambda = \pm 15\%$, nous a permis de construire le profil d'exactitude.

Le profil d'exactitude construit à l'issue de ce travail caractérisant la méthode, est valide dans un intervalle de concentration allant de la limite inférieure de quantification, estimée égale à $50\mu\text{g/ml}$ vers la limite supérieure de quantification à $2000\mu\text{g/ml}$.



REFERENCES

1. Choix et validation d'une méthode d'analyse
2. Feinberg M. (2000) La validation des méthodes d'analyse. Le cahier des Techniques de l'Inra, 44, 19-49.
3. Feinberg M. (2010a) Principes et vocabulaire in Validation des méthodes d'analyse quantitative par le profil d'exactitude. Le Cahier des Techniques de l'Inra, numéro spécial, 13-25
4. Hantson Ph, Baud F. Intoxications aiguës médicamenteuses. Encycl Méd Chir (Elsevier, Paris). Toxicologie-Pathologie professionnelle. 16-001-G-10.1995 : 28.
5. https://fr.m.wikipedia.org/wiki/Chromatographie_en_phase_liquide_à_haute_performace
6. <https://www.adneurope.com/index.php?id=241>
7. Jaeger A., Vale A. intoxication aiguës : 1999 Elsevier, Paris, 46-97-108-432.
8. PS-ML-(AMI_)-AL-04
9. Psychopharmacologie essentielle Stahl, Lavoisier, Paris, 2010, p. 765
10. Validation des méthodes d'analyse quantitatives au moyen du profil d'exactitude, Max FEINBERG.Publication : 10/12/2012
11. Validation des procédures analytiques quantitatives Harmonisation des démarches, Commission SFSTP, Ph. Hubert, J.J. Nguyen-Huu, B. Boulanger, E. Chapuzet, P. Chiap, N. Cohen, P.A. Compagnon, W. Dewe, M. Feinberg, M. Lallier, M. Laurentie, N. Mercier, C. Nivet, G. Muzard, L. Valat.
12. Validation des procédures analytiques quantitatives. Harmonisation des démarches Partie I, STP Pharma Pratiques Ph. Hubert, J.J. Nguyen-Huu, B. Boulanger, E. Chapuzet, P. Chiap, N. Cohen, P.A. Compagnon, W. Dewe, M. Feinberg, M. Lallier, M. Laurentie, N. Mercier, G. Muzard, C. Nivet, L. Valat.(2003) 13(3), 101-138



Master ST CAC Agiq

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

Nom et prénom: EL AICHE Youssef

Année Universitaire : 2015/2016

Titre: Validation analytique par l'approche de l'erreur totale d'une méthode de dosage de bromazépam par HPLC

Résumé

La validation analytique par l'approche de l'erreur totale associer les deux éléments fondamentaux de la validation que sont la justesse et la fidélité, cette approche peut également fournir des garanties en calculant la probabilité de produire des résultats situés dans les limites d'acceptabilité $\pm\lambda$. Cette idée de fournir une garantie peut s'écrire sous la forme d'une probabilité supérieure ou égale à une proportion β .

Dans la partie expérimental on applique les démarche de validation par l'approche de erreur totale pour déterminer le domine de concentration de bromazépam qu'est valide par la méthode de dosage par HPLC, car cette approche proposant un outil graphique de prise de décision à la fois pratique et visuel, nommé profil d'exactitude.

Mots clés: 5 mots au maximum

Validation - erreur totale – bromazépam - HPLC