



République Algérienne Démocratique et Populaire

-----oOo-----

وزارة التعليم العالي والبحث العلمي

Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique

-----oOo-----



Université Mouloud MAMMERI
Faculté de Médecine
Département de Pharmacie
TIZI-OUZOU

جامعة مولود معمري
كلية الطب
قسم الصيدلة
تيزي وزو

MÉMOIRE DE FIN D'ÉTUDES EN VUE DE L'OBTENTION D'UN
DIPLÔME DE DOCTEUR EN PHARMACIE

Présenté et soutenu publiquement

Le : 25 juillet 2022

MISE AU POINT ET VALIDATION D'UNE METHODE DE DOSAGE DU
MICONAZOLE DANS LE GEL A 2% PAR LA CHROMATOGRAPHIE LIQUIDE
A HAUTE PERFORMANCE (HPLC)

Réalisé par :

M^r BENOUELLA Mohammed Amine

M^{elle} KACI Dihia

Encadrés par :

Pr MAMOU Marzouk

M^{elle} KACI Sarah

M^{elle} MAHMOUDI Maya

Co-encadrés par :

Dr. CHEKROUN Tassadit

Membres du jury :

Dr ABDERRAHIM W.

Dr BELAICHE A.

Dr. BEN SI SAID H.

Pr. MAMOU M.

Dr CHEKROUN T.

MAHU-Faculté de médecine UMMTO

MAHU-Faculté de médecine UMMTO

MAHU -Faculté de médecine UMMTO

MCAHU -Faculté de médecine UMMTO

Résidente

Examinatrice

Examinatrice

Président de jury

Promoteur

Co-promotrice

Année universitaire : 2021/2022

REMERCIEMENT

Au terme de ce travail qui marque la fin de notre cycle universitaire à la faculté de Médecine de l'UMMTO, qui est le fruit de plusieurs sacrifices, qu'il nous soit permis d'exprimer notre gratitude dans un premier temps, à l'Eternel notre Dieu pour la grâce, la santé, la paix, l'intelligence, la sagesse, la force qu'il ne cesse de nous combler pour réussir à réaliser cette œuvre humaine.

Nous tenons à remercier notre promoteur le Professeur M. MAMOU, maître de conférences en chimie analytique, chef de département de Pharmacie de l'UMMTO, d'avoir accepté de nous encadrer dans la conception et l'élaboration de ce travail, et aussi pour le dévouement manifesté malgré toutes ses nombreuses occupations. Nous avons eu l'honneur et la chance de bénéficier de ses connaissances et compétences, de ses précieux conseils et de son suivi tout au long de notre parcours académique.

Nos sincères remerciements s'adressent ainsi à notre co-promotrice Dr T. CHEKROUN résidente en chimie analytique au niveau du CHU Tizi – Ouzou /UMMTO, qui, en dépit de ses diverses occupations, a dû se sacrifier et accepter de nous diriger tout au long de l'élaboration de ce travail, pour le partage de son savoir et son enthousiasme, pour les efforts qu'elle a déployée afin de nous faciliter le travail, ainsi que pour sa disponibilité consacrée pour l'accomplissement et la concrétisation de ce mémoire.

Nous ne manquons pas l'occasion de remercier chaleureusement le Laboratoire Pharmaceutique BIOPHARM, de nous avoir fourni la matière première. Veuillez trouver ici l'expression de notre gratitude et de notre reconnaissance.

Nous remercions également les membres du jury pour leur présence, pour leur lecture attentive de ce mémoire, ainsi que pour les remarques qu'ils nous adresseront lors de cette soutenance afin d'améliorer notre travail.

Enfin, que tous ceux qui, de loin ou de près, ont participé à la réalisation de ce travail trouvent ici l'expression de notre sincère gratitude.

Dédicace

Ma vie extérieure et intérieure dépend du travail de mes contemporains et de celui de mes ancêtres, je dois m'efforcer de leurs fournir la même proportion de ce que j'ai reçu et que je reçois encore... (ALBERTEINSTEIN)

Je dédie ce modeste travail :

A la mémoire de mon très cher grand père parti si tôt, j'aurais tant aimé que Tu sois présent
J'espère que tu vas apprécier cet humble travail comme preuve de reconnaissance et d'affection. Que dieu le tout puissant puisse t'accueillir dans son vaste paradis.

A ma bougie de vie qui se brule pour éclaircir mon chemin, qui ne m'a rien refusé pour que je réussisse, mon cher père **IDIR**, pour qui l'honneur d'être son fils me suffit

A celle qui a veillé pour que j'arrive là où je suis, celle qui m'a encouragé aimer sans cesse durant toute ma vie et elle m'a donné l'espoir de poursuivre ce chemin jusqu'au bout

Ma maman **FARIDA**

A mon seul et unique frère **Youcef** que j'aime beaucoup Puisse dieu, te tout haut, te procurer santé, bonheur et réussite.

A mon autre moitié, ta présence est le plus beau des cadeaux, ton soutien indéfectible fait que ce travail soit témoin de mon affection.

A mes chers quadrinômes **Sarah, Dihia et Maya** avec qui on a traversé toutes les difficultés avec persévérance et bonne humeur.

A ma chère famille, mes amis et toutes personnes connaissant mon humble personne ; ce modeste travail est témoin de ma gratitude et mon affection.

A toutes les personnes qui me sont chères ; sans citer de noms car elles sont innombrables, je vous souhaite tout le bonheur du monde.

Benoufella Mohammed Amine

Dédicace

C'est avec grand bonheur et une vive émotion que je dédie cet humble travail

À ma très chère maman **Nadia**,

À mon très cher père **Said**,

Dont le soutien, l'optimisme et la confiance qu'ils me témoignent m'ont portée tout au long de mes études, Je ne les remercierai jamais assez pour tout ce qu'ils m'ont apporté, je leur adresse ma plus grande gratitude et tout mon amour. Merci de n'avoir jamais douté de moi.

Tout ce que j'espère, c'est que vous soyez fiers de moi aujourd'hui.

Puisse Dieu le tout puissant vous donner santé, bonheur et longue vie.

À mes chers frères que j'aime tant, **Youmel**, **Belkacem**, **kousseila** et **Rouad**,

Merci pour vos encouragements incessants, pour votre humour contagieux, merci d'avoir été toujours là pour moi. Je vous souhaite le bonheur et la réussite dans tout ce que vous entreprenez.

Aux deux familles ; **KACI** et **AOUDIA**, à tous mes oncles et tantes, À tous mes cousins et cousines.

À ma très chère grand-mère **Zahra**, je te dédie ce travail en reconnaissance de l'amour que tu m'offre quotidiennement.

À la mémoire de mon frère **Kousseila**, et mes grands-parents **Amarouche** et **Belkacem**, qui ne sont plus, j'aurais tant aimé que vous soyez présents. Que dieu bénisse vos âmes et les accueille dans son vaste paradis

À mes **amies** et à toutes belles connaissances avec qui j'ai partagé des moments inoubliables. Je vous souhaite tout le bonheur du monde.

À mes chers quadrinômes, **Sarah**, **Maya** et **Amine**, avec lesquels j'ai partagé ce projet, ensemble nous avons pu mener ce travail à terme.

À tous ceux qui me sont chers.

Enfin, une mention spéciale à mes petits cousins, **YASSER** et **NAZIM**.

Kaci Dihia

Dédicace

Je dédie ce modeste travail :

A ma très chère maman **Lila**,

A mon très cher père **Rachid**,

Aucune dédicace ne saurait exprimer mon respect, mon amour éternel et ma
Considération pour les sacrifices que vous avez consenti pour mon instruction et mon bien
être.

Je vous remercie pour tout le soutien et l'amour que vous me portez depuis mon enfance.

Puisse Dieu, le très Haut, vous accorder santé, bonté, longue vie Inshallah et que la
réussite soit toujours à ma portée pour que je puisse vous combler de bonheur.

À mon cher frère **Mehdi**, et mes chères sœurs **Lynda et Lysa**. Qui n'ont
jamais cessé de me soutenir et m'encourager, vous étiez une source d'énergie pour moi.

A mes beaux-frères **Ali et Smail**,

Sur lesquels je compte toujours, et pour lesquels je souhaite une vie prospère.

Une dédicace particulière à mes adorables neveux **Aksel, Yanni et Léa**, qui aiguayent et
embellissent ma vie depuis leur naissance. Je vous aime très fort.

A mes grands-parents paternels, qui ne sont plus, que dieu bénisse vos âmes et les accueille
dans son vaste paradis.

A mes grands-parents maternels, qui m'ont accompagné par leurs prières, puisse Dieu leur
prêter longue vie.

A mes chers quadrinômes **Amine, Dihia et Maya** avec qui on a traversé toutes les difficultés
avec persévérance et bonne humeur.

Une mention spéciale à une personne très chère à mon cœur qui se reconnaîtra, qui m'a
encouragé, soutenu, et aidé à surmonter les obstacles rencontrés, ce travail témoigne mon
estime et mon affection.

A mes fidèles amis qui ont toujours su me remonter le moral et être présents quand il le fallait.

Kaci Sarah

Dédicace

Je dédie ce modeste travail :

A ma très chère maman **Nacira**,

A mon très cher papa **Rezki**,

Qui m'ont apporté de l'aide et m'ont toujours poussé vers l'avant, pour tous leurs sacrifices et inquiétudes, je leur serai toujours reconnaissante.

Aucune dédicace ne saurait exprimer l'amour, la gratitude et le respect que j'ai toujours eu pour vous. Ce modeste travail est le fruit de tous les sacrifices que vous avez déployés pour mon éducation et ma formation. Je vous aime et j'implore Dieu le tout-puissant pour qu'il vous accorde une bonne santé, une longue vie heureuse et que la réussite soit toujours à ma portée pour vous combler de bonheur.

A mes très chères sœurs **Katia**, **Célia**, **Sandra** et **Mélina**, je vous remercie pour votre soutien et votre amour.

A mes très chers frères **Azwaw** et **Amayas**, je vous remercie pour vos encouragements et votre amour.

Aucune dédicace ne peut exprimer mon amour et ma gratitude de vous avoir comme frères et sœurs. Que dieu vous bénisse et vous garde en bonne santé.

A mon aimable beau-frère **Razik** sur lequel je compte toujours, et pour lequel je souhaite une vie prospère.

Une dédicace spéciale à mes adorables neveux **Alice** et **Cayden** qui illuminent ma vie depuis leur naissance, je vous aime inconditionnellement.

A mon cher grand-père maternel, qui m'a accompagné par ses prières, sa douceur, puisse Dieu lui prêter longue vie et beaucoup de santé et de bonheur dans les deux vies.

A la mémoire de mes grands-parents paternels et ma grand-mère maternelle.

J'aurais tant aimé que vous soyez présents. Que Dieu ait vos âmes dans sa sainte miséricorde.

Aux deux familles **MAHMOUDI** et **DEBIANE**.

A toutes les personnes chères à mes yeux, à mes chères cousines **Nawal** et **Sabrina**, à mes chères amies **Sarah**, **Dihia**, **Ines**, **Célia** et **Manal**, pour leur soutien, amour et bienveillance.

A mes chers quadrinômes, ensembles nous avons pu mettre ce travail à terme.

Mahmoudi Maya

Table des matières

Liste des figures	ix
Liste des tableaux	x
Liste des abréviations et des acronymes	xiii
Introduction	2
OBJECTIFS.....	5
Partie Bibliographique	6
Chapitre I	7
Le Miconazole.....	7
1. Définition	8
2. Propriétés physicochimiques.....	9
2.1. Aspect organoleptique	9
2.2. Solubilité	9
3. Propriétés pharmacologiques.....	9
3.1. Propriétés pharmacocinétiques	9
3.1.1. Absorption.....	9
3.1.2. Distribution	9
3.1.3. Métabolisme	9
3.1.4. Elimination.....	9
3.2. Propriétés pharmacodynamiques.....	10
4. Effets indésirables	10
5. Toxicité.....	11
6. Contre-indications et situations à risque ou déconseillées.....	11

7. Interactions médicamenteuses	11
Chapitre II	12
La validation des méthodes analytiques.....	12
1. Définitions	13
2. Buts.....	13
3. Procédures analytiques à valider	14
4. Aspect réglementaire et normatif	14
4.1. Documents ISO 17025	14
4.2. Document ISO 5725.....	14
4.3. Documents ICH.....	14
4.4. Documents de la FDA (guidance for industry).....	15
4.5. Guides de validation analytique : rapports des commissions de la SFSTP	15
5. Critères de validation analytique.....	15
5.1. Spécificité/Sélectivité :	16
5.2. Fonction de réponse :	16
5.3. Exactitude.....	16
5.4. Linéarité	17
5.5. Fidélité	17
5.6. Justesse	17
5.7. Sensibilité.....	18
5.8. Limite de détection (LD)	18
5.9. Limite de quantification	18
5.10. Robustesse	19
6. Les différentes approches de la validation analytique.....	19
6.1. L'approche classique	19

6.2. Validation de la méthode de dosage par quantification des incertitudes	20
6.3. Validation de la méthode de dosage par profil d'exactitude comme outil de décision	20
7. Etapes de la validation	20
8. Etude statistique de la validation	22
8.1. Spécificité.....	24
8.1.1. Approche empirique.....	24
8.1.2. Approche statistique :	25
8.2. Fonction de réponse.....	26
8.2.1. Protocole.....	26
8.2.2. Etude Statistique.....	26
8.3. Alignement des observations	27
8.3.1. Protocole.....	27
8.3.2. Etude statistique	27
8.4. Prédiction inverse	28
8.4.1. Protocole.....	28
8.4.2. Etude statistique	28
8.5. Justesse	29
8.5.1. Protocole.....	29
8.5.2. Etude statistique	29
8.6. Fidélité	30
8.6.1. Protocole.....	30
8.6.2. Etude statistique	30
8.7. Linéarité	31
Chapitre III.....	32
Profil d'exactitude	32

1. Définition	33
1.1. Erreur totale et profil d'erreur totale.....	34
2. L'intervalle de tolérance.....	35
2.1. Définition de l'intervalle de tolérance.....	35
2.2. Relation entre l'intervalle de tolérance et l'erreur totale	36
3. Etablissement du profil d'exactitude.....	37
4. Interprétation du profil d'exactitude	37
5. Choix de la fonction de réponse	38
PARTIE EXPERIMENTALE	39
1. Matériel et méthodes.....	40
1.1. Matériel.....	40
1.1.1. Matières premières.....	40
1.1.2. Réactifs	40
1.1.3. Appareillage et équipements	42
1.1.4. Verreries et Autres	44
1.2. Méthodes.....	46
1.2.1. Méthodologie de la validation analytique	46
1.2.2. Préparation des solutions	46
1.3. Conditions Chromatographiques	49
1.4. Préparation de la Feuille de Calcul	49
Résultats	50
1. Résultats :	50
1.1. Données brutes :.....	50
Approche empirique	52
Approche statistique	53

2.1.	Fonction de réponse :	57
2.2.	Alignement des observations :	59
2.3.	Prédictions inverses :	62
2.4.	Justesse :	62
2.5.	Fidélité	63
2.6.	Exactitude	64
2.7.	Erreur totale et intervalle de tolérance	65
3.	La fonction $y = ax$	66
3.1.	Fonctions de réponses	66
3.2.	Alignement des observations	68
3.3.	Prédictions inverses	69
3.4.	Justesse	70
3.5.	Fidélité	71
3.6.	Exactitude	72
3.7.	Erreur totale et intervalle de tolérance	73
4.	La fonction $\sqrt{y} = a\sqrt{x}+b$	74
4.1.	Fonction de réponse	74
4.3.	Prédictions inverses :	76
4.6.	Exactitude	79
4.7.	Erreur totale et intervalle de tolérance	80
5.	La fonction $\ln y = a \ln(x) + b$	81
5.1.	Fonction de réponse	81
5.2.	Alignement des observations :	82
5.3.	Prédictions inverses :	85
5.5.	Fidélité	88

5.6. Exactitude.....	89
5.7. Erreur totale et intervalle de tolérance.....	90
6. Profils d'exactitude	91
7. Linéarité :	93
Discussion.....	97
1. Spécificité.....	97
a. Approche empirique :	97
b. Approche statistique :	97
2. Le choix de la fonction de réponse.....	98
3. Critères de performance de la fonction de réponse choisie.....	98
3.1. Justesse	98
3.2. Fidélité	99
4. Critères de décision sur la validité de la méthode.....	99
4.1. Erreur totale :	99
4.2. Profil d'exactitude :	99
4.3. Limite de quantification	99
4.4. Linéarité	100
5. Synthèse des résultats	101
Conclusion.....	102
Bibliographie.....	106
.....	109
.....	109
Annexes	109
Annexe I :	110
MONOGRAPHIE DU MICONAZOLE	110

1. Définition	111
2. Caractéristiques	111
3. Identification	111
4. Tests.....	112
5. Essai.....	113
6. Stockage	113
7. Impuretés	113
Annexe II.....	117
CHROMATOGRAPHIE.....	117
1. Introduction.....	118
2. Principe	118
3. Appareillage :	119
3.1. Réservoir de la phase mobile (éluant).....	120
3.2. Pompe	120
3.3. Injecteur	120
3.4. Colonne.....	120
3.5. Détecteurs	121
3.6. Intégrateur	121
4. Application de la chromatographie liquide haute performance à l'analyse.....	122
4.1. Analyse des chromatogrammes.....	122
4.2. Analyse qualitative	124
4.3. Notion d'efficacité ou performances d'une colonne	124
4.4. Qualité de la séparation :	125
4.5. Notion de pression :	126
.....	127

.....	127
Annexe III	127
CHROMATOGRAMMES	127
Annexe IV	126
TABLE DE STUDENT	126
Résumé	144
Abstract	144

Liste des figures

Figure 1. Formule développée du Miconazole	8
Figure 2 : Etapes de validation.....	22
Figure 3. Logigramme permettant de sélectionner un protocole de validation	24
Figure 4. Illustration du profil d'exactitude comme outil de décision	33
Figure 5. Représentation schématique de l'exactitude	35
Figure 6. Image représentant les réactifs utilisés	42
Figure 7. Appareil Chromatographie Liquide Haute Performance SCHIMADZU (LC 20)	43
Figure 8. Etuve.....	43
Figure 9. Balance analytique	44
Figure 10. pH mètre	44
Figure 11. La verrerie utilisée	45
Figure 12. Chromatogramme du diluant non chargé	52
Figure 13. Chromatogramme du solvant HCl non chargé.....	52
Figure 14. Chromatogramme du SE 100%	53
Figure 15. Chromatogramme du SV 100%	53
Figure 16. Courbe de spécificité obtenue avec la fonction $ax+b$	56
Figure 7. Courbes d'étalonnage obtenues avec la fonction $y=ax+b$	58
Figure 18. Courbes d'étalonnage obtenues avec la fonction $y=ax$	67
Figure 9. Courbes d'étalonnage obtenues avec la fonction $\sqrt{y} = a\sqrt{x}+b$	75
Figure 20. Courbes d'étalonnage obtenues avec la fonction $\text{Ln}y = a\text{Ln}(x)+b$	82
Figure 21. Les différents profils d'exactitude obtenus.....	92
Figure 22. Courbe de linéarité obtenue avec la fonction $y = ax + b$	94
Figure 23. Principe de l'HPLC.....	119
Figure 24. Schéma des principaux modules d'une chaîne HPLC	119
Figure 25. Colonnes d'appareil d'HPLC	121
Figure 26. Chromatogramme.....	123

Liste des tableaux

Tableau I. Le choix du nombre de standards d'étalonnage et de validation en fonction du protocole choisi	23
Tableau II. Exemples de fonction de réponse	26
Tableau III. Règles d'alignement pour différentes fonctions de réponse	28
Tableau IV. Calculs des prédictions inverses pour différentes fonctions de réponses.....	28
Tableau V. Calcul des prédictions inverses pour la droite ayant subi une transformation logarithmique ou racine carrée	29
Tableau VI. Propriétés physicochimiques et précautions d'emploi des Réactifs	40
Tableau VII. Appareil Chromatographie Liquide Haute Performance SCHIMADZU (LC 20).....	42
Tableau VIII. Les Autres Appareils utilisés	43
Tableau IX. La verrerie utilisée	45
Tableau X. Tableau présentant les masses théoriques des niveaux de concentration des principes actifs pesées	47
Tableau XI. Tableau présentant le protocole de la préparation des solutions des standards d'étalonnage	47
Tableau XII. Tableau présentant le protocole de la préparation des solutions des standards de validation	48
Tableau XIII. Colonne et conditions Chromatographique	49
Tableau XIV. Données brutes des standards d'étalonnage	50
Tableau XV. Données brutes des standards de validation	51
Tableau XVI. Résultats obtenus de l'étude de la spécificité et de l'effet matrice : standards d'étalonnage (sans matrice) du Miconazole	54
Tableau XVII. Résultats obtenus de l'étude de la spécificité et de l'effet matrice : standards d'étalonnage (sans matrice) du Miconazole	55
Tableau XVIII. Comparaison des deux pentes et des deux ordonnées à l'origine des droites de régression des SE et SV du Miconazole.....	56
Tableau XIX. Résultats obtenus avec fonction $y = ax+b$	57
Tableau XX. Alignement des réponses observées avec les 3 séries des SV en utilisant la fonction $y = ax+b$	60

Tableau XXI. Prédiction inverses obtenues avec les SV des 3 séries en utilisant la fonction $y = ax+b$	62
Tableau XXII. Justesse calculée pour chaque niveau de concentration des standards de validation en utilisant la fonction $y = ax+b$	62
Tableau XXIII. Calcul des écarts types, des CV de répétabilité et de fidélité intermédiaire en utilisant la fonction $y = ax+b$	63
Tableau XXIV. Résultats du calcul de l'exactitude relative pour le Miconazole en utilisant la fonction $y = ax+b$	64
Tableau XXV. Calcul de l'erreur totale pour chaque niveau de concentration des standards de validation du Miconazole en utilisant la fonction $y = ax+b$	65
Tableau XXVI. Intervalle de Tolérance du Miconazole en utilisant la fonction $y = ax+b$	65
Tableau XXVII. Résultats obtenus pour la fonction $y = ax$	66
Tableau XXVIII. Alignement des réponses observées avec les 3 séries des SV en utilisant la fonction $y = ax$	67
Tableau XXIX. Prédiction inverses obtenues avec les SV des 3 séries en utilisant la fonction $y = ax$	69
Tableau XXX. Justesse calculée pour chaque niveau de concentration des standards de validation pour le Miconazole en utilisant la fonction $y = ax$	70
Tableau XXXI. Fidélité calculée pour chaque niveau de concentration des standards de validation pour le Miconazole en utilisant la fonction $y = ax$	71
Tableau XXXII. Résultats du calcul de l'exactitude relative pour le Miconazole en utilisant la fonction $y = ax$	72
Tableau XXXIII. Calcul de l'erreur totale pour chaque niveau de concentration des standards de validation du Miconazole en utilisant la fonction $y = ax$	73
Tableau XXXIV. Intervalle de Tolérance du Miconazole en utilisant la fonction $y = ax$	73
Tableau XXXV. Résultats obtenus pour la fonction $\sqrt{y} = a\sqrt{x}+b$	74
Tableau XXXVI. Alignement des réponses observées avec les 3 séries des SV en utilisant la fonction $\sqrt{y} = a\sqrt{x}+b$	75
Tableau XXXVII .Prédiction inverses obtenues avec les SV des 3 séries en utilisant la fonction $\sqrt{y} = a\sqrt{x}+b$	76
Tableau XXXVIII. Justesse calculée pour chaque niveau de concentration des standards de validation pour le Miconazole en utilisant la fonction $\sqrt{y} = a\sqrt{x}+b$	77
Tableau XXXIX. Calcul des écarts types, des CV de répétabilité et de fidélité	

intermédiaire en utilisant la fonction $\sqrt{y} = a\sqrt{x}+b$	78
Tableau XL. Résultats du calcul de l'exactitude relative pour le Miconazole en utilisant la fonction $\sqrt{y} = a\sqrt{x}+b$	79
Tableau XLI. Calcul de l'erreur totale pour chaque niveau de concentration des standards de validation du Miconazole en utilisant la fonction $\sqrt{y} = a\sqrt{x}+b$	80
Tableau XLII. Intervalle de Tolérance du Miconazole en utilisant la fonction $\sqrt{y} = a\sqrt{x}+b$	80
Tableau XLIII. Résultats obtenus pour la fonction $\text{Lny} = a\text{Ln}(x)+b$	81
Tableau XLIV. Alignement des réponses observées avec les 3 séries des SV en utilisant Courbes d'étalonnage obtenues avec la fonction $\text{Lny} = a\text{Ln}(x)+b$	83
Tableau XLV. Prédiction inverses obtenues avec les SV des 3 séries en utilisant la fonction $\text{Lny} = a\text{Ln}(x)+b$	85
Tableau XLVI. Justesse calculée pour chaque niveau de concentration des standards de validation pour le Miconazole en utilisant la fonction $\text{Lny} = a\text{Ln}(x)+b$	87
Tableau XLVII. Calcul des écarts types, des CV de répétabilité et de fidélité intermédiaire en utilisant la fonction $\text{Lny} = a\text{Ln}(x)+b$	88
Tableau XLVIII. Résultats du calcul de l'exactitude relative pour le Miconazole en utilisant la fonction $\text{Lny} = a\text{Ln}(x)+b$	89
Tableau XLIX. Calcul de l'erreur totale pour chaque niveau de concentration des standards de validation du Miconazole en utilisant la fonction $\text{Lny} = a\text{Ln}(x)+b$	90
Tableau L. Intervalle de Tolérance du Miconazole en utilisant la fonction $\text{Lny} = a\text{Ln}(x)+b$	90
Tableau LI. Masses prédites en fonction des masses introduites	93
Tableau LII. Paramètre de l'équation de de régression de linéarité	94
Tableau LIII. Résultats du traitement statistique de la linéarité	95
Tableau LIV. Signification des résultats des deux pentes et des deux ordonnées à l'origines entre elles	97

Liste des abréviations et des acronymes

AFNOR : Association Française de Normalisation

AMM : Autorisation de Mise sur le Marché

AQ : Assurance Qualité

ARN : Acide Ribonucléique

DDL : Degré De Liberté

DL : Dose Létale

FDA : Food and Drug Administration

HPLC : High Performance Liquid Chromatography

ICH: International Conference on Harmonization

ICH Q2: International Council for Harmonization Validation of Analytical Procedures

ICH Q9: International Council for Harmonization Quality Risk Management

ICHQ10: International Council for Harmonization Pharmaceutical Quality System

ISO: International Organization for Standardization

LCR: Liquide Céphalo-rachidien

LD: Limite de Détection

LQ: Limite de Quantification

MCZ: Miconazole

Mr: Masse molaire

PE: Prise d'essai

SE: Standard d'Etalonnage

SFSTP: Société Française des sciences et Techniques Pharmaceutiques

STP: Suivi Thérapeutique Pharmacologique

SV: Standard de Validation

A thick black L-shaped line forms a frame around the word 'Introduction'. It starts with a horizontal segment on the left, then turns 90 degrees down to a vertical segment, and finally turns 90 degrees right to a horizontal segment at the bottom right.

Introduction

Introduction

Le miconazole est un antifongique Imidazolé à large spectre. Il est largement utilisé pour traiter les infections à levures des muqueuses, y compris les infections orales et vaginales; bien que le miconazole intraveineux ne soit plus disponible, une grande variété d'ovules gynécologiques, de crèmes, de gels et de produits à base de comprimés est disponible [1].

Actuellement, le concept de l'assurance qualité devient de plus en plus une nécessité inévitable dans le domaine de l'industrie pharmaceutique pour garantir l'efficacité et surtout la sécurité d'un médicament pendant toute sa durée de validité [2].

Chaque laboratoire doit prouver et assurer que les méthodes d'analyses employées pour le contrôle des médicaments sont parfaitement valides, fiables et qu'elles répondent bien aux objectifs indiqués [3].

Toute nouvelle méthode d'analyse doit faire l'objet d'une validation analytique avant sa mise en routine qui repose sur un ensemble de mesures expérimentales, et de tests statistiques permettant de prouver qu'une procédure est assez exacte et fiable [3].

L'apparition de nouvelles tendances et de nouveaux concepts scientifiques proposent de revoir les bases de la validation analytique pour une démarche harmonisée, notamment l'utilisation du profil d'exactitude comme outil de décision qui est une approche nouvelle, standardisée dans la norme Afnor NF V03-110. Son avantage est de proposer une interprétation graphique simple et visuelle [4].

L'objectif de cette démarche est de réduire le temps et le coût de l'analyse afin d'aider les spécialistes en industrie pharmaceutique [4].

Généralement les méthodes d'analyses ont pour objectif d'effectuer le contrôle qualité du principe actif ainsi que son dosage pour les formes pharmaceutiques. La mise au point a consisté en la détermination des paramètres de validation analytique telle décrite dans la nouvelle approche proposée par SFSTP afin de pouvoir juger la validité de la méthode [4].

Après l'introduction, ce manuscrit s'articule autour de deux grandes parties suivies d'une

conclusion. La première partie correspond à la synthèse bibliographique, elle est subdivisée en trois chapitres :

Dans **le chapitre I**, Nous traiterons les principales propriétés physico-chimiques, et pharmacologiques du Miconazole.

Le chapitre II, est dédié à la validation analytique dans ses aspects réglementaires et statistiques.

Le chapitre III, concernera l'approche adoptée au cours de la validation de la méthode d'analyse.

La seconde, est consacrée à la partie pratique de notre travail qui comprend la validation d'une méthode de dosage du Miconazole dans le gel à 2% par Chromatographie Liquide à Haute Performance (HPLC). Après avoir développé le matériel et les méthodes utilisés dans le présent travail, nous présenterons et nous discuterons les résultats obtenus et nous conclurons quant à la validité ou pas de la méthode analytique objet de l'étude.

Le présent travail a été réalisé au niveau du Laboratoire de Chimie Analytique du Département de Pharmacie de la Faculté de Médecine, Université Mouloud MAMMERI de Tizi-Ouzou.



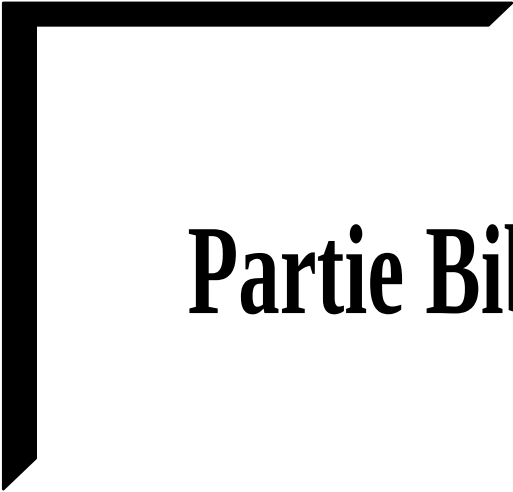
OBJECTIFS

OBJECTIFS

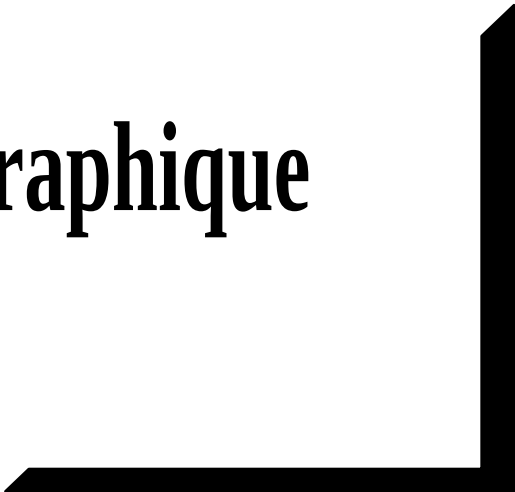
L'objectif de notre travail est de valider une technique analytique de dosage du Miconazole dans le gel à 2% par Chromatographie Liquide à Haute Performance (HPLC), en utilisant le profil d'exactitude comme outil de décision, décrit dans le guide de validation élaboré par une commission de la Société Française des Sciences Techniques et Pharmaceutiques (SFSTP) publié dans la revue STP Pharma Pratique en janvier 2006.

Outre cet objectif principal, les objectifs secondaires assignés à ce travail sont :

- Préparation des solutions en vue d'une analyse par HPLC (diluants, phases mobiles, solutions standards et échantillons).
- Utilisation des équipements analytiques notamment une chaîne HPLC en vue de contrôle qualité des médicaments et l'exploitation des résultats.
- Etablir un protocole de validation, et ce en fonction des caractéristiques du principe actif utilisé.
- Maîtrise des différents outils statistiques utilisés en validation des méthodes analytiques.



Partie Bibliographique



A thick black L-shaped line forms a frame around the text. It starts with a horizontal segment on the left, then turns 90 degrees down to a vertical segment, then turns 90 degrees right to a horizontal segment, and finally turns 90 degrees up to a vertical segment on the right.

Chapitre I

Le Miconazole

1. Définition

Le miconazole, 1-[2- (2,4-dichlorophenyl) 2 [(2,4dichlorophenyl) methoxy] ethyl]imidazole [5], est un dérivé synthétique β -substitué du 1 phénéthyl imidazole [6], antifongique à large spectre, qui présente une activité contre un large éventail de Dermatophytes, de levures et d'actinomycètes, ainsi que certaines bactéries à Gram positif et anaérobies [5].

Il est indiqué pour le traitement local de la candidose oropharyngée chez les patients adultes et pour le traitement d'appoint de la dermatite fessière compliquée par la candidose chez les nourissons. Il est disponible à la fois sous forme de suppositoire et de crème pour le traitement des infections vaginales à levures et le soulagement des démangeaisons et irritations vulvaires associées. Il est aussi efficace pour traiter le pied d'athlète, l'eczéma marginé de Hebra, les mycoses, le pityriasis et la candidose cutanée.

En raison de son absorption orale faible et de sa clairance rapide, le MCZ est utilisé principalement pour le traitement topique des infections superficielles localisées iatrogènes.

Formule développée :

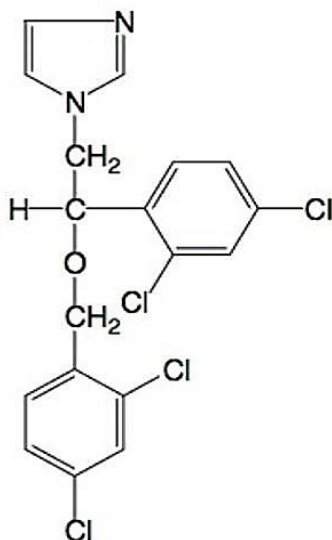


Figure 1. Formule développée du Miconazole

Formule brute : C₁₈H₁₄Cl₄N₂O

Masse molaire : 416,1 g/mol

Numéro CAS : 22832-87-7

Solubilité : 10 g·l⁻¹ eau à 20 °C

Point d'ébullition : 555,1 °C

Pka : 6.77

Classe pharmaceutique : Antifongique.

2. Propriétés physicochimiques

2.1. Aspect organoleptique

Poudre blanche, inodore et cristalline [7] .

2.2. Solubilité

Très peu soluble dans l'eau et peu soluble dans la plupart des solvants organiques courants et dans les acides inorganiques dilués [8].

3. Propriétés pharmacologiques

3.1. Propriétés pharmacocinétiques

3.1.1. Absorption

Le miconazole a été évalué en tant qu'agent topique, oral et intraveineux. Son absorption est légèrement meilleure que celle du clotrimazole, mais reste insuffisante pour être utilisée comme agent systémique, notamment en raison de sa demi-vie relativement courte d'environ 8-9 heures. Le miconazole a également été administré par voie intraveineuse et intrathécale. Il est fortement lié aux protéines et ne diffuse pas bien dans le LCR ; cependant, il pénètre facilement dans les fluides synovial et vitreux [9].

3.1.2. Distribution

Le miconazole a une demi-vie terminale de 24 heures. Les données disponibles indiquent que plus de 90 % du miconazole est lié aux protéines plasmatiques. La pénétration dans le liquide céphalo-rachidien et les expectorations est faible, mais le miconazole se diffuse bien dans les articulations infectées. Les études sur les animaux indiquent que le médicament traverse le placenta mais on ignore si le nitrate de miconazole est excrété dans le lait maternel [10].

3.1.3. Métabolisme

Le miconazole est métabolisé de façon très importante au niveau du foie en subissant une O-désalkylation et une N-désalkylation oxydative, et ne donne lieu à aucun métabolite actif. Le miconazole a un effet de premier passage important [1].

3.1.4. Elimination

Le miconazole est excrété à la fois par l'urine et les fèces ; moins de 1 % du miconazole inchangé est retrouvé dans l'urine [1].

3.2. Propriétés pharmacodynamiques

Le miconazole est un antifongique azolé qui fonctionne principalement par l'inhibition d'une déméthylase spécifique au sein du complexe CYP450 [1].

Le nitrate de miconazole est un dérivé imidazolé doué d'une activité antifongique et antibactérienne.

Différent de celui des antibiotiques, le mécanisme d'action se situe à plusieurs niveaux : membranaire (augmentation de la perméabilité), cytoplasmique (inhibition des processus oxydatifs au niveau des mitochondries), nucléaire (inhibition de la synthèse de l'ARN).

Le nitrate de miconazole est actif sur :

- *Corynebacterium minutissimum* (érythrasma),
- Actinomycètes.

Le miconazole présente une activité antifongique en inhibant la biosynthèse de l'ergostérol dans la membrane cellulaire de l'organisme pathogène. A faible concentration, il interagit avec le cytochrome P450 fongique, ce qui entraîne une inhibition de la 14-alpha-déméthylation, une étape de la biosynthèse de l'ergostérol. La déplétion en ergostérol et l'accumulation concomitante en lanostérol conduisent à des altérations d'un certain nombre de fonctions membranaires. Le miconazole présente un effet fongistatique par l'inhibition de la synthèse de stérol membranaire et un effet fongicide par altération de la fonction de barrière de la membrane fongique [6].

L'activité antifongique a été démontrée *in vitro* et s'exerce sur les agents responsables de mycoses cutanéomuqueuses :

- Dermatophytes (trichophyton, epidermophyton, microsporum) ;
- Candida et autres levures ;
- *Malassezia furfur* (agent du *Pityriasis capitis* et du *Pityriasis versicolor*) ;
- Moisissures et autres champignons.

L'activité antibactérienne a été démontrée *in vitro* vis-à-vis des bactéries Gram + [6].

4. Effets indésirables

L'application topique du miconazole est bien tolérée, avec de rares effets indésirables comprenant irritation, brûlure, macération, et une dermatite allergique aux sites d'application [6].

5. Toxicité

Aucun cas de surdosage en miconazole n'a été signalé. Les patients victimes d'un surdosage présentent un risque accru d'effets indésirables graves tels que céphalées, irritation cutanée, diarrhée, nausées, vomissements, douleurs abdominales et dysgueusie. Des mesures symptomatiques et de soutien sont recommandées. Le miconazole a une DL50 orale de 500 mg/kg chez les rats [FDS] [5].

6. Contre-indications et situations à risque ou déconseillées

Le miconazole est contre-indiqué chez les personnes connues pour leur hypersensibilité à ce produit et en cas d'insuffisance hépatique [7].

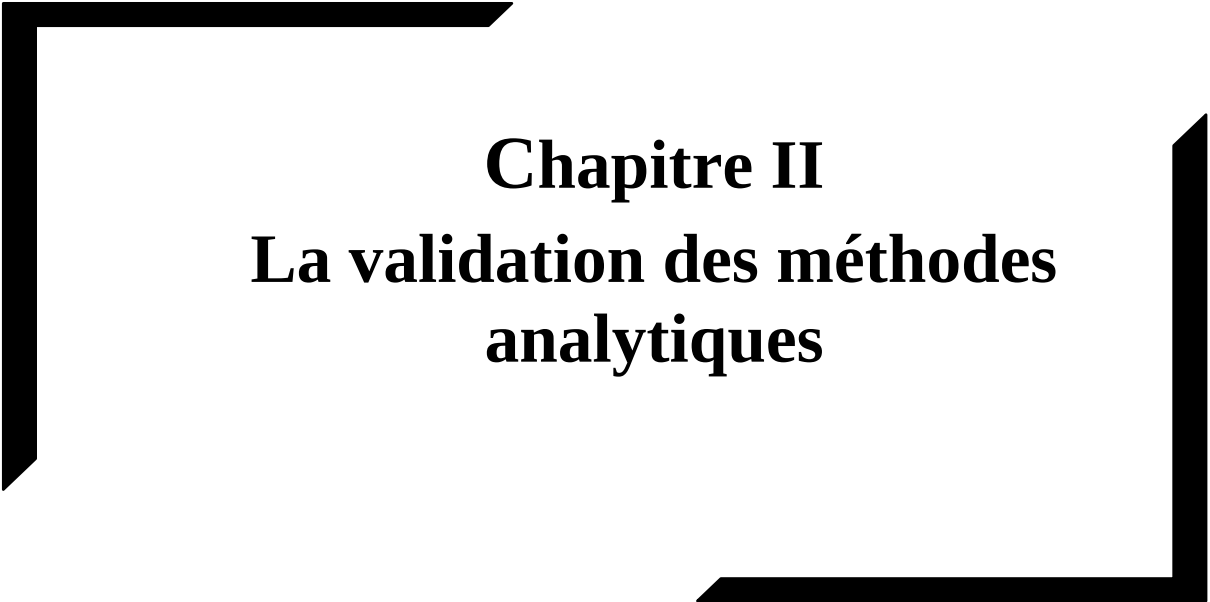
7. Interactions médicamenteuses

Phénytoïne : Le miconazole peut diminuer le métabolisme de la phénytoïne, augmentant ainsi les taux sanguins et le risque de réactions indésirables à l'anticonvulsivant [7].

Agents hypoglycémiants : Le miconazole peut potentialiser l'effet des médicaments hypoglycémiants [7].

Terfenadine / Astémizole : L'utilisation concomitante de cet antihistaminique avec le miconazole doit être évitée car le miconazole inhibe son métabolisme [7].

Anticoagulants : L'utilisation du miconazole augmente l'effet des anticoagulants, probablement en réduisant leur métabolisme [7].

A thick black L-shaped frame surrounds the text. It consists of a vertical line on the left and a horizontal line at the bottom, meeting at a right angle. The lines have a slight diagonal cut at the corners.

Chapitre II

La validation des méthodes analytiques

La validation des méthodes analytiques constitue une des étapes cruciales et indispensables à l'obtention de médicaments de qualité, efficaces et sûrs. En effet, il s'agit d'un des principaux outils de l'assurance qualité permettant de construire la qualité du produit et d'en conserver les caractéristiques depuis la conception jusqu'à la fin de la commercialisation.

De la notion essentielle de la qualité découle la nécessité de validation qui permet de réduire fortement le risque d'apparition de non-conformité et de maîtriser la non-qualité [11].

1. Définitions

- Selon la norme ISO17025 : La validation est « La confirmation par examen et apport de preuves objectives du fait que les exigences particulières en vue d'une utilisation prévue déterminée sont remplies » [12].
- Selon la FDA : « Valider une méthode consiste à démontrer, avec un degré de confiance élevée et sous une forme documentée que la méthode permet d'obtenir un résultat analytique qui atteint les spécifications à l'avance » [13].
- Selon l'ICH Q2A : « L'objectif d'une procédure analytique est de démontrer qu'elle est appropriée à l'usage auquel elle est destinée » [14].
- Selon la pharmacopée américaine : « Processus par lequel il est établi, par des études au laboratoire, que les caractéristiques de performance d'une méthode satisfont aux exigences pour ses applications analytiques prévues » [15].

2. Buts

L'objectif de la validation est de donner aux laboratoires ainsi qu'aux autorités compétentes les garanties que chaque mesure qui sera réalisée ultérieurement en routine, une fois la procédure validée, sera suffisamment proche de la « vraie valeur » inconnue de l'échantillon ou du moins comprise dans une limite acceptable, en fonction de la finalité de la procédure. Dans ces conditions, l'exactitude, la fidélité, la linéarité, etc., ne sont plus que des « Statistiques » ou « éléments de calcul » permettant de chiffrer ces garanties. En effet, on attend d'une procédure de dosage qu'elle soit capable de quantifier, et non pas tellement qu'elle soit fidèle, même si cette fidélité, convenons-en, constitue un gage de réussite. C'est dans ce contexte que l'analyse statistique des résultats de validation trouve sa vraie dimension [16].

3. Procédures analytiques à valider

Le laboratoire doit valider

- Les méthodes non normalisées ;
- Les méthodes conçues/développées par le laboratoire ;
- Les méthodes normalisées employées en dehors de leur domaine d'application prévu ;
- Les amplifications ou modifications de méthodes normalisées ;
- Et aussi une méthode alternative par rapport à une méthode de référence.

Les procédures analytiques de la Pharmacopée Européenne et de la Pharmacopée Américaine doivent être considérées comme validées [4].

En ce qui concerne la revalidation :

L'ICH Q2(R1) préconise une revalidation dans les cas suivants :

- Modification de la voie de synthèse de la substance pharmaceutique.
- Modification de la composition du produit fini.
- Modification de la procédure analytique.
- Modification des conditions opératoires.
- Déplacement des automates [4].

4. Aspect réglementaire et normatif

Les principaux référentiels qui décrivent les procédures de validation analytique sont les suivants [16] :

4.1. Documents ISO 17025

« Exigences générales concernant la compétence des laboratoires d'étalonnages et d'essais ».

C'est une norme internationale élaborée dans le but de l'évaluation de la conformité, ainsi que l'organisation en continu de la qualité des laboratoires.

4.2. Document ISO 5725

« Exactitude (justesse et fidélité) » des résultats et méthodes de mesure. Elle exprime le profil comme outil de décision.

4.3. Documents ICH

Deux guidelines ICH (International Conference on Harmonization) sont dédiés à la validation analytique : Q2 : « validation analytique ».

- ICHQ2B

Validation of analytical methods «Methodology» 1997:

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.

- ICHQ2R1

Validation of analytical methods « Text and methodology » 2005:

C'est une révision de l'ICHQ 2A et ICHQ 2B, dans le but de regrouper les textes de la terminologie et les définitions avec la méthodologie.

4.4. Documents de la FDA (guidance for industry)

- Validation of Bioanalytical Method (2001);
- FDA 2015;
- Guidelines for the Validation of Chemical Methods for the FDA FVM Program, 3rd Edition (FDA, 2019)

4.5. Guides de validation analytique : rapports des commissions de la SFSTP

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

✓ SFSTP « Guide de validation, rapport d'une commission SFSTP »

❖ Méthodologie (1992) ;

❖ Exemples d'application (1992).

✓ SFSTP « dosage dans les milieux biologiques par des méthodes chromatographiques »(1997)

✓ SFSTP « validation des procédures analytiques : harmonisation des démarches »

❖ Partie I : généralités (2003) ;

❖ Partie II : statistiques (2006) ;

❖ Partie III : exemples d'application (2006).

5. Critères de validation analytique

Les principaux critères de validation qui sont largement reconnus et couramment utilisés dans les laboratoires d'analyse présentent des confusions et des divergences concernant les terminologies, les protocoles expérimentaux et les critères d'acceptation. Une étude comparative des trois principaux guides de validation se présente comme suit ;

5.1. Spécificité/Sélectivité :

- **Selon ICH :** (La spécificité) La propriété qui fait qu'une méthode d'analyse rende compte sans ambiguïté de la substance analysée en présence d'autres composés présents [15].
- **Selon US FDA :** La Sélectivité : La propriété d'une méthode d'analyse de différencier et de quantifier la substance à analyser en présence d'autres composants dans l'échantillon [17].
- **Selon ISO 17025 :** La spécificité d'une procédure analytique est sa capacité à établir de manière univoque l'existence de la substance à analyser en présence d'autres composés [12].

5.2. Fonction de réponse :

- **Selon ICH :** Capacité de donner des résultats qui sont directement (à l'intérieur de certaines limites) proportionnels à la concentration (quantité) de la substance analysée dans un échantillon (On parle de linéarité) [15].
- **Selon US FDA :** NA
- **Selon ISO 17025 :** La fonction de réponse d'une procédure d'analyse traduit, à l'intérieur de l'intervalle de dosage, la relation existante entre la réponse (signal) et la concentration (quantité) en substance à examiner dans l'échantillon [12].

-

5.3. Exactitude

- **Selon ICH :** L'exactitude d'une procédure analytique exprime l'étroitesse de l'accord entre la valeur qui est acceptée en tant que valeur vraie conventionnelle ou valeur de référence acceptée et la valeur trouvée [15].
- **Selon US FDA :** (Confondu avec la justesse) l'exactitude exprime le degré d'accord de la moyenne des résultats obtenus par la méthode et la vraie valeur (concentration) de l'analyte [17].
- **Selon ISO 17025 :** L'exactitude exprime l'étroitesse de l'accord entre le résultat d'essai et la valeur de référence acceptée, aussi appelée « valeur conventionnellement vraie ».

L'étroitesse de l'accord ainsi observée est la résultante de la somme des erreurs systématique et aléatoire, en d'autres termes l'erreur totale liée au résultat. Par conséquent, l'exactitude est l'expression de la somme de la justesse et de la fidélité [12].

5.4. Linéarité

- **Selon ICH :** Capacité de donner des résultats qui sont directement (à l'intérieur de certaines limites) proportionnels à la concentration (quantité) de la substance analysée dans un échantillon [15].
- **Selon US FDA :** NA
- **Selon ISO 17025 :** La linéarité d'une procédure d'analyse est sa capacité à l'intérieur d'un certain intervalle de dosage d'obtenir des résultats directement proportionnels à la quantité (exemple : concentration) en analyte dans l'échantillon [12].

5.5. Fidélité

- **Selon ICH :** Correspond au degré d'accord (degré de dispersion) entre les résultats des mesures obtenues par l'analyse individuelle de plusieurs prélèvements à partir d'un même échantillon homogène, prélevés dans des conditions prescrites [15].
- **Selon US FDA :** Décrit le degré d'accord des mesures individuelles de l'analyte quand la méthode est appliquée avec répétabilité sur plusieurs prélèvements d'un même échantillon homogène de la matrice biologique [17].
- **Selon ISO 17025 :** La fidélité exprime l'étroitesse de l'accord (degré de dispersion, coefficient de variation) entre une série de mesures provenant de multiples prises d'un même échantillon homogène (résultats d'essais indépendants) dans des conditions prescrites. La fidélité fournit une indication sur les erreurs liées au hasard. La fidélité peut être évaluée à trois niveaux : la répétabilité, la fidélité intermédiaire (intra -laboratoire) et la reproductibilité (inter -laboratoire) [12].

5.6. Justesse

- **Selon ICH :** 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. (L'exactitude est aussi désignée par la justesse) [15].
- **Selon US FDA :** (exactitude) décrit le degré de concordance entre la moyenne des résultats

obtenus par la méthode et la valeur de référence (concentration) [17].

- **Selon ISO 17025 :**(biais) exprime l'étroitesse de l'accord entre la valeur moyenne obtenue à partir d'une série de résultats d'essais et une valeur qui est acceptée soit comme une valeur conventionnellement vraie, soit comme une valeur de référence acceptée. La mesure de la justesse est généralement exprimée en termes de recouvrement et de biais absolu ou relatif (erreur systématique).

5.7. Sensibilité

- **Selon ICH :** NA
- **Selon US FDA :** La FDA définit la sensibilité à partir de (The LLOQ) la limite de quantification inférieure et qui doit être déterminée pendant le développement de la méthode [17].
- **Selon ISO 17025 :** La sensibilité à une concentration donnée correspond au rapport de la valeur de la variable mesurée à la valeur correspondante de la concentration de l'élément dosé [12].

5.8. Limite de détection (LD)

- **Selon ICH :** La plus faible quantité de la substance analysée que la méthode permet de détecter, sans nécessairement fournir la valeur exacte [15].
- **Selon US FDA :** La plus faible concentration d'un analyte que la méthode bio analytique peut différencier, d'une façon fiable, du bruit de fond [17].
- **Selon ISO 17025 :** est la plus petite quantité de l'analyte dans un échantillon pouvant être détectée, mais non quantifiée comme une valeur exacte dans les conditions expérimentales décrites de la procédure [12].

5.9. Limite de quantification

- **Selon ICH :** La plus faible quantité de la substance analysée que la méthode permet de doser avec un degré acceptable de précision et d'exactitude [15].
- **Selon US FDA :** Limite de quantification inférieure & supérieure (LQI & LQS) : la plus faible/grande quantité de la substance analysée que la méthode permet de doser avec un degré acceptable de précision et d'exactitude [17].
- **Selon ISO 17025 :** est la plus petite quantité de l'analyte dans un échantillon pouvant être dosée dans les conditions expérimentales décrites avec une exactitude définie [12].

5.10. Robustesse

- **Selon ICH** : La robustesse d'une procédure analytique est une mesure de sa capacité à donner des résultats fiables des paramètres de la méthode et sa capacité à ne pas être affectée par les faibles variations [15].
- **Selon US FDA** : NA
- **Selon ISO 17025** : Mesure de la capacité d'une méthode d'analyse à ne pas être affectée par des variations faibles mais délibérées des paramètres de la méthode d'analyse. Elle fournit une indication sur la fiabilité de la méthode d'analyse dans les conditions normales d'utilisation [12].

6. Les différentes approches de la validation analytique

❖ Validation de méthode par ses critères de performance

L'approche classique consiste à valider la méthode de dosage selon des critères de performance définis à l'avance. La méthode est déclarée valide si elle a par exemple, une bonne sensibilité, une bonne spécificité, etc...

❖ Validations de méthodes alternatives (quantification des incertitudes, profil d'exactitude, capacité)

Ce sont des approches globales qui se basent sur des critères décisionnels objectifs, comme par exemple, l'estimation de limites dans lesquelles se trouve le résultat par rapport à la vraie valeur, ou bien, les limites dans lesquelles se trouve la vraie valeur par rapport au résultat. La confrontation de ces limites aux limites imposées en routine, permettent de valider ou de rejeter la méthode de dosage [18].

6.1. L'approche classique

L'approche classique consiste à définir des critères qui vont servir à valider le dosage, estimer ces critères et confronter ces estimations aux limites fixées ou imposées. Ce type de validation est la plus communément utilisée.

Cependant dans la littérature on trouve bon nombre de façon de valider une méthode de dosage par ses critères de performance. Deux critères reviennent systématiquement, ce sont la fidélité et la justesse. La fidélité se mesure soit par un écart type, soit par un coefficient de variation. Plus l'un ou plus l'autre est élevé et moins la méthode de dosage est fidèle. La justesse se mesure par le biais. Plus le biais est élevé et moins la méthode de dosage est juste.

La représentation graphique de l'approche classique descriptive à une concentration définie, peut être estimée comme une distribution des résultats d'un dosage répété à l'infini, dans des conditions définies, à une concentration d'analyte définie et fixe.

En réalité, lorsqu'une méthode de dosage est validée, l'écart type et le biais sont estimés : leurs vraies valeurs ne sont pas connues. Dans l'approche descriptive, une bonne méthode de validation de dosage est une méthode qui permet l'estimation la plus fine, entre autres, de la justesse et de l'exactitude aux concentrations dosées [18].

6.2. Validation de la méthode de dosage par quantification des incertitudes

La validation de méthodes de dosage par quantification des incertitudes, consiste à identifier l'ensemble des sources d'incertitude d'une méthode de dosage, de mesurer ou d'estimer chacune de ces incertitudes, à des concentrations choisies, puis de calculer une incertitude totale aux concentrations étudiées. Pour une méthode de dosage employée dans un laboratoire donné, l'incertitude sert à rendre un résultat en donnant une fourchette d'incertitude au tour des concentrations rendues. Le résultat d'un dosage est rendu avec plus ou moins une valeur d'incertitude. L'incertitude d'un dosage ne peut être étudiée qu'à concentration fixée.

La méthode par l'incertitude a l'avantage de donner comme résultat une incertitude pouvant être comparée à une limite d'acceptation du dosage comme seuil décisionnel. Ce seuil décisionnel sert de limite pour la validation ou non de la méthode de dosage. Cependant, la création de protocole de validation est compliquée, et un protocole de validation doit être mis en place à chaque validation pour chaque méthode de dosage, avec un risque d'erreur possible à chaque fois. De plus, le calcul final de l'incertitude étendue, est un peu empirique [18].

6.3. Validation de la méthode de dosage par profil d'exactitude comme outil de décision

La validation de méthodes de dosage par profil d'exactitude, est une méthode basée sur l'estimation d'un intervalle, dans lequel se situe le résultat d'un dosage, et de vérifier qu'il ne sorte pas des limites fixées. L'intervalle n'est pas centré sur la vraie valeur comme dans la méthode de quantification des incertitudes mais centré sur la moyenne des résultats.

Autrement dit la méthode de validation de dosage par profil d'exactitude comme outil de décision, permet de valider une méthode de dosage en se basant sur les limites d'acceptation de la méthode de dosage [18].

7. Etapes de la validation

Les 10 étapes pour valider une méthode avec le profil d'exactitude sont les suivantes :

- Disposer du mode opératoire et définir le mesurande ;
- Définir le domaine de validation (gamme de concentrations) et l'objectif attendu de la
- Méthode sous la forme d'un intervalle d'acceptabilité ;
- Sélectionner des échantillons de validation dont les valeurs de référence sont connues;
- Choisir un plan d'expérience de validation ;
- Pour les méthodes indirectes, choisir du plan d'expérience d'étalonnage ;
- Collecter les données ;
- Pour les méthodes indirectes, calculer les concentrations retrouvées par étalonnage inverse ;
- Calculer les critères de validation à partir des concentrations retrouvées : principalement les écarts-types de fidélité de fidélité intermédiaire et des biais de justesse ;
- Calculer les intervalles de tolérance et construire le profil d'exactitude ;
- Interpréter les résultats et décider si la méthode est valide ou non [19].

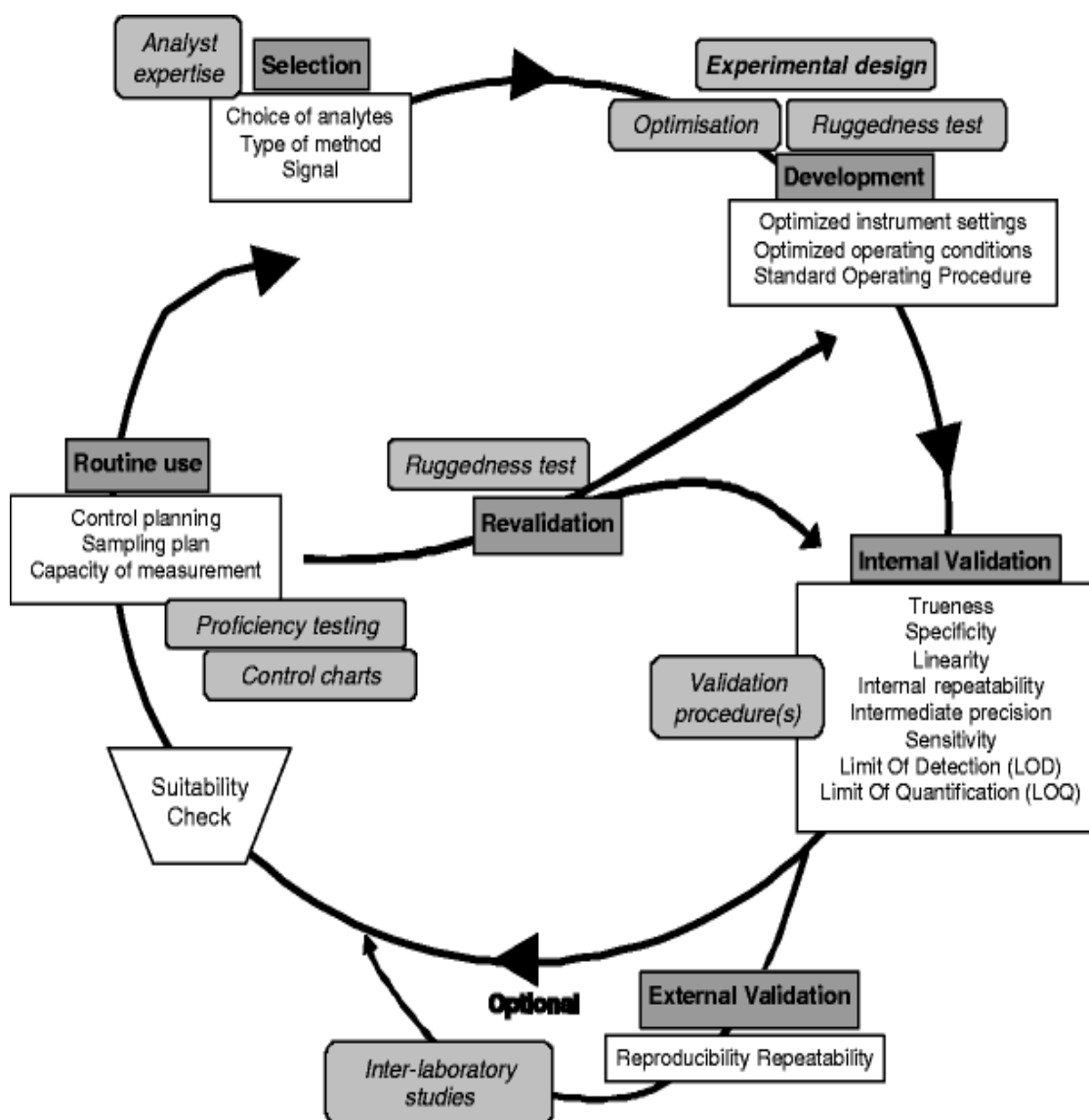


Figure 2 : Etapes de validation

8. Etude statistique de la validation

La validation de techniques analytiques repose sur l'étude et la validation de plusieurs critères qui sont : spécificité, linéarité, exactitude, fidélité, limite de quantification et de détection. Cette méthodologie est basée sur les critères décrits dans le guide élaboré par la SFSTP. Ce dernier repose sur l'utilisation du profil d'exactitude, qui intègre de façon statistiquement correcte dans un seul graphique l'ensemble des éléments essentiels de la validation. Le protocole de validation qui sera sélectionné selon le guide de la SFSTP 2006 déterminera le nombre des standards d'étalonnage (SE) et des standards de validation (SV) sur lequel les essais seront effectués. Cette démarche permet de simplifier l'approche de la

validation d'une procédure analytique tout en contrôlant le risque associé à son utilisation [20] [21].

Tableau I. Le choix du nombre de standards d'étalonnage et de validation en fonction du protocole choisi [21]

Standards	Niv. de conc.	Protocole				
		V1	V2	V3	V4	V5
SE. Etalonnage sans la matrice	Bas		2		2	
	Médian	2	2 (2)	2	2 (2)	
	Haut	2 (1)	2	2 (1)	2	
SE. Etalonnage avec la matrice	Bas				2	2
	Médian			2	2 (2)	2 (2)
	Haut Addit.			2 (1)	2	2
SV. Validation avec la matrice	Bas	3	3	3	3	3
	Médian	3	3	3	3	3
	Haut	3	3	3	3	3
Nbre minimum séries Nbre total essais (min.)		3 33	3 45	3 39	3 63	3 45

1 : Sélection d'un niveau de concentration supérieure à la concentration cible pour l'étalonnage (exemple : 120% de la concentration cible).

2 : Suppression possible du niveau de concentration médian pour l'étalonnage sur la base du modèle de régression retenu pour exprimer la fonction de

Réponse (exemple : modèle plus simple comme le modèle mathématique des moindres carrés). Dans ce cas, le nombre total est de 39 essais pour les protocoles V2 (sans matrice) et V5 (avec la matrice). Le nombre d'essais est de 51 pour le protocole V4.

3 : Addition d'un niveau de concentration supplémentaire pour une fonction de réponse nécessitant un modèle plus complexe (exemple : fonction logistique à quatre paramètres).

En ce qui concerne la préparation des standards d'étalonnage (SE) et standards de validation (SV), celle-ci dépend du protocole de validation choisi. Le logigramme de la figure 05 suivante, présente la démarche proposée dans le guide SFSTP 2003 pour sélectionner un protocole expérimental de validation en fonction des contraintes ou des spécificités liées à la procédure de dosage sous épreuve.

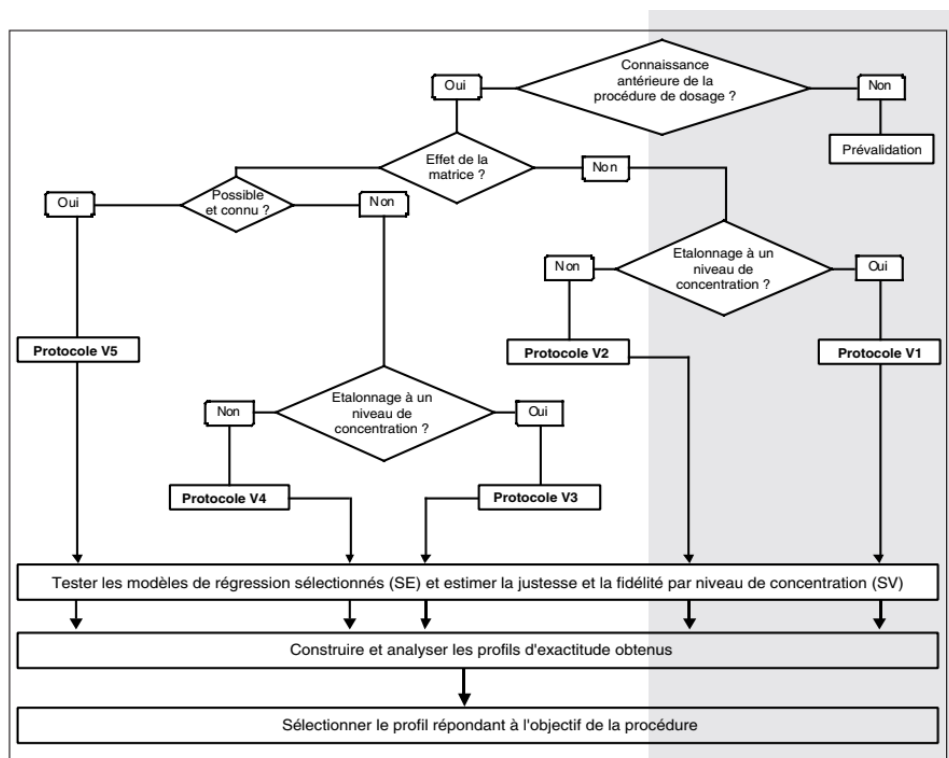


Figure 3. Logigramme permettant de sélectionner un protocole de validation [21]

8.1. Spécificité

L'étude statistique de la spécificité peut être réalisée avec deux approches, la première est empirique, la seconde est statistique.

8.1.1. Approche empirique

Dans cette approche, on s'assure que le signal n'est pas modifié par l'ajout volontaire de produits de structure chimique proche. Cas de produit fini : on s'assure que l'ensemble des substances autres que la substance à doser ne donne aucun signal comparable à celui de la substance à doser. L'étude de la spécificité nécessite la préparation et l'analyse des solutions suivantes :

- Une solution placebo ;
- Une solution standard à 100% (par rapport à la concentration théorique) ;
- Une solution échantillon à 100% (par rapport à la concentration théorique).
- Le signal donné à partir de la solution placebo doit être normalement nul.
- Les signaux obtenus des deux solutions standards 100% et échantillon 100% doivent être similaires en termes de temps de rétention [22].

8.1.2. Approche statistique :

Dans cette approche, on effectue une comparaison de la droite obtenue avec les standards de validation (présence de la matrice) avec celle obtenue à partir des standards d'étalonnage. La comparaison des droites est basée sur le test t de Student selon une stratégie statistique qui permet la recherche d'effet matrice et/ou de l'erreur systématique en vérifiant la spécificité de la méthode pour le dosage du principe actif seul et aussi pour la forme reconstituée [20].

Test t de Student :

Si les pentes sur standard et sur la forme reconstituée sont comparables, leur différence ne doit pas être différente de zéro.

Ceci revient donc à comparer une valeur observée ($a_1 - a_2$) à une valeur théorique (zéro) connaissant l'erreur totale (l'écart type) faite sur a_1 et a_2 respectivement (σ_{a1} et σ_{a2}) permettra d'appliquer le test t de Student comme suit :

$$T_{\text{calculé}} = \frac{|a_1 - a_2|}{\sqrt{\sigma_{a1}^2 + \sigma_{a2}^2}}$$

Le $t_{\text{calculé}}$ est comparé à la valeur t° (α ; $\eta_1 + \eta_2 - 4$) lue sur la table de Student.

Si $t_{\text{calculé}} < t^\circ$: les pentes sont comparables donc absence d'effet matrice, la méthode est spécifique.

Avec :

- $-a_1$ et a_2 : pentes respectives des droites de régression D1 (obtenue à partir de la gamme standard) et D2 (obtenue à partir de la gamme placebo chargé) ;
- $-\sigma_{a1}^2$ et σ_{a2}^2 : variances respectives des pentes a_1 et a_2 ;
- $-\alpha$: risque d'erreur accepté (5%) ;
- $-\eta_1$ et η_2 : nombre d'échantillon réalisé pour la forme standard et la forme placebo chargé ;
- $-\eta_1 + \eta_2 - 4$: degré de liberté (ddl).

Après la vérification de la spécificité de la méthode d'analyse on effectue une opération sur deux ensembles d'échantillons :

π **Standards d'étalonnage (SE)** : peuvent être réalisés sans la matrice (si on démontre l'absence de l'effet matrice) ou avec la matrice, utilisés pour évaluer les différentes fonctions de réponse $y = f(x)$ afin d'effectuer les prédictions inverses.

π **Standards de validation (SV)** : doivent toujours être réalisés avec la matrice, utilisés dans le but de déterminer l'erreur totale à chaque niveau de concentration, calculer l'intervalle

de tolérance et tracer le profil d'exactitude et déterminer les limites inférieure et supérieure de quantification (intervalle de dosage) [22].

8.2. Fonction de réponse

8.2.1. Protocole

Après avoir rassemblé les résultats des expériences opérées sur les standards d'étalonnage (SE), on établit la relation entre la réponse (signal ou instrumentale) Y et la quantité (concentration) de l'analyte X [20].

8.2.2. Etude Statistique

La relation entre la réponse (signal ou instrumentale) Y et la quantité (concentration) X est caractérisée à l'aide d'une fonction f qui doit être strictement monotone (strictement croissante ou décroissante) sur l'intervalle de dosage envisagé :

$$Y = f(X) + \varepsilon$$

ε : l'erreur associée à la fonction de réponse

f : appelée communément erreur résiduelle.

Il faut ajuster la fonction de réponse, c'est-à-dire évaluer les paramètres du modèle, de façon à ce que l'erreur résiduelle soit minimisée.

Différentes fonctions de réponse peuvent être envisagées lors de la validation de la méthode. Comme énuméré au tableau ci-dessous quelques exemples de fonctions de réponses. Le choix dépend du type de méthode (méthode physicochimique, bio-analytique, immuno-dosage) [20].

Tableau II. Exemples de fonction de réponse [18]

Type	Equation	Paramètre	Linéaire
Droite passant par l'origine	$Y = \beta X$	β	Oui
Droite	$Y = \alpha + \beta X$	β, α	Oui
Fonction quadratique	$Y = \alpha + \beta X + \gamma X^2$	β, α, γ	Oui
Fonction logistique à 4 paramètres	$Y = \alpha + \frac{\delta - \alpha}{1 + \left(\frac{x}{\gamma}\right)^B}$	$\beta, \alpha, \gamma, \sigma$	Non

Fonction logistique à 5 paramètres	$Y = \alpha + \frac{\delta - \alpha}{\left[1 + \left(\frac{x}{\gamma}\right)^\psi\right]}$	$\beta, \alpha, \gamma, \sigma, \Psi$	Non
---	--	---------------------------------------	-----

La plupart des méthodes physicochimiques auront recours à une fonction linéaire (une droite passant par l'origine ou non). Pour les méthodes bio-analytiques, la fonction quadratique pourra être envisagée dans certains cas. Dans le cas d'un immuno--dosage, le choix se portera sur les fonctions logistiques à 4 ou 5 paramètres [20].

8.3. Alignement des observations

8.3.1. Protocole

Pour un niveau de concentration, les quantités introduites ne sont pas équivalentes pour toutes les séries (raison de pesée). Dès lors qu'un calcul de variance doit être effectué (évaluation de la répétabilité et de la fidélité intermédiaire), il est indispensable de procéder à un alignement sur concentration moyenne. Cela consiste à transformer les réponses observées afin de les positionner sur cette concentration moyenne [20].

8.3.2. Etude statistique

L'alignement s'effectue par interpolation en ajoutant à la réponse observée la différence entre la valeur de la fonction de réponse considérée à la concentration moyenne et la valeur de cette fonction à la concentration introduite.

En validation, l'alignement s'applique aux réponses obtenues avec les échantillons de validation en utilisant les équations ou fonctions de réponses obtenues avec des standards d'étalonnage qui peuvent être réalisés sans la matrice (en l'absence d'effet matrice prouvée) ou avec la matrice, utilisés pour l'évaluation des différentes fonctions $y=f(x)$ afin d'effectuer les prédictions inverses.

L'alignement des répétitions n_{ij} du niveau de concentration j de la série i se traduit par la relation [20]:

$$Y_{ijk, c} = Y_{ijk} + f(\bar{X}_{ij}) - f(X_{ijk})$$

Tableau III. Règles d'alignement pour différentes fonctions de réponse [18]

Fonction de réponse	Règles d'alignement
Droite passant par l'origine	$y_{ijk,c} = y_{ijk} + \hat{\beta}_i(\bar{x}_{ij} - x_{ijk})$
Fonction quadratique	$y_{ijk,c} = y_{ijk} + \hat{\beta}_i(\bar{x}_{ij} - x_{ijk}) + \hat{\gamma}_i(\bar{x}_{ij} - x_{ijk})$
Fonction logistique	$y_{ijk} = y_{ijk} + (\hat{\delta}_i - \hat{\alpha}_i) \frac{1}{1 + \left(\frac{\hat{\gamma}_i}{\bar{x}_{ij}}\right)^{\hat{\beta}_i}} - \frac{1}{1 + \left(\frac{\hat{\gamma}_i}{x_{ijk}}\right)^{\hat{\beta}_i}}$

8.4. Prédiction inverse

8.4.1. Protocole

Les prédictions inverses sont une forme de fonction inverse de la courbe d'étalonnage qui nous permet de déterminer les concentrations calculées à partir des résultats de la validation [20].

8.4.2. Etude statistique

La formule employée est définie comme suit :

$$x_{calc} = f^{-1}(y)$$

Avant d'appliquer cette formule il faut d'abord assurer l'alignement de toutes les concentrations.

Le tableau 4 ci-dessous établit les prédictions selon l'alignement des fonctions de réponses utilisées [20].

Tableau IV. Calculs des prédictions inverses pour différentes fonctions de réponses [4] [19]

Type de fonction de la réponse	Equation
Droite passant par 0	$x_{ijk,calc} = \frac{y_{ijk}}{\hat{\beta}_i}$
Droite (ne passant pas par 0)	$x_{ijk,calc} = \frac{y_{ijk} - \hat{\alpha}_i}{\hat{\beta}_i}$
Fonction quadratique	$x_{ijk,calc} = \frac{-\hat{\beta}_i + \sqrt{\hat{\beta}_i^2 - 4\hat{\gamma}_i(\hat{\alpha}_i - y_{ijk})}}{\hat{\beta}_i}$

Fonction logistique à 4 paramètres	$x_{ijk,calc} = \hat{\gamma}_i \left(\frac{\hat{\delta}_i - \hat{\alpha}_i}{y_{ijk} - \hat{\alpha}_i} - 1 \right)^{\frac{1}{\hat{\beta}_i}}$
Fonction logistique à 5 paramètres	$x_{ijk,calc} = \hat{\gamma}_i \left[\left(\frac{\hat{\delta}_i - \hat{\alpha}_i}{y_{ijk} - \hat{\alpha}_i} - 1 \right)^{\frac{1}{\hat{\beta}_i}} \bar{\psi}_i \right]^{\frac{1}{\hat{\beta}_i}}$

- Si les observations ont été alignées, il faut remplacer les y_{ijk} par $y_{ijk,c}$ dans le tableau précédent.
- Si une transformation a été utilisée, il faut effectuer la transformation inverse après ce calculen retour.
- Par exemple, après une transformation logarithmique ou racine carrée de la droite les concentrations calculées se font de la manière suivante [20]

Tableau V. Calcul des prédictions inverses pour la droite ayant subi une transformation logarithmique ou racine carrée [20]

Fonction de réponse	Concentration calculée(logarithme)	Concentration calculée (racine carrée)
Droite	$X_{ijk, calc} = e^{\frac{\ln(y_{ijk}) - \hat{\alpha}_i}{\hat{\beta}_i}}$	$X_{ijk, calc} = \left(\frac{\sqrt{y_{ijk} - \hat{\alpha}_i}}{\hat{\beta}_i} \right)^2$

8.5. Justesse

8.5.1. Protocole

L'évaluation de la justesse se fait à partir des concentrations calculées provenant des standards de validation en phase de validation, qui doivent toujours être réalisés avec la matrice [23] .

8.5.2. Etude statistique

La justesse (ou le biais) de la méthode au niveau de concentration est obtenue en calculant la différence entre la moyenne arithmétique des concentrations introduites et la moyenne des concentrations calculées.

Le biais peut s'exprimer en termes absolu, relatif ou de recouvrement par rapport aux quantités introduites, comme suit [20] :

$$Biais_j = \mu_j - x_j$$

$$\text{Biais}_j (\%) = (\hat{\mu}_j - x_j) / x_j$$

$$\text{Recouvrement}_j (\%) = \hat{\mu}_j / x_j \times 100$$

$\hat{\mu}_j$: Moyenne des concentrations prédites

x_j : Moyenne des concentrations introduites

8.6. Fidélité

8.6.1. Protocole

L'évaluation de la fidélité se fait à partir des concentrations calculées des standards de validation qui doivent toujours être réalisés avec la matrice [23].

8.6.2. Etude statistique

L'erreur expérimentale est considérée indépendante de la série. C'est une variable aléatoire ayant une distribution normale de moyenne 0 et de variance $\sigma^2_{w.j}$.

L'estimation de la variance intra-série donne une estimation de la variance de répétabilité tandis que la somme des estimations des variances intra et inter-série donne une estimation de la variance de fidélité intermédiaire [20] :

$$\text{Répétabilité} : \sigma^2_{Rej} = \sigma^2_{wJ}$$

$$\text{Fidélité intermédiaire} : \sigma^2_{IPJ} = \sigma^2_{wJ} + \sigma^2_{BJ}$$

$\sigma^2_{w.j}$: variance intra-série.

$\sigma^2_{B.j}$: variance inter-série.

A chacun des niveaux j des niveaux de concentration est pris en considération, une estimation statistique est réalisée selon le modèle ci-dessous :

$$X_{ijk} = \mu_j + a_{ij} + s_{ijk}$$

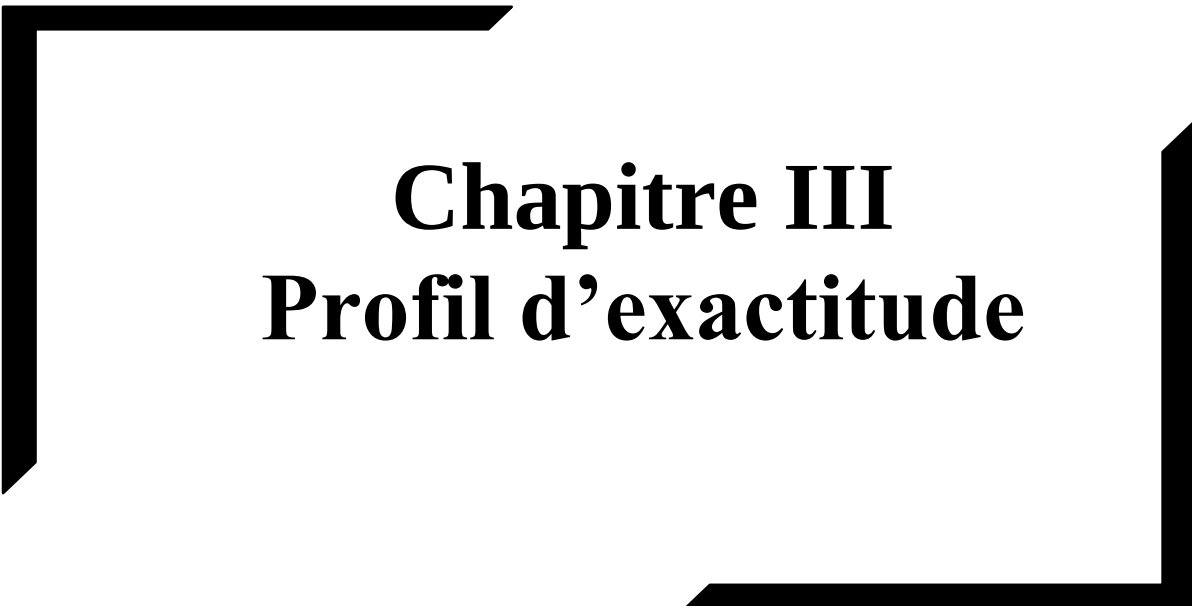
- X_{ijk} : la $k^{\text{ième}}$ concentration calculée du niveau j de la $i^{\text{ième}}$ concentration.
- μ_j : la moyenne des concentrations calculées du niveau de concentration j .
- a_{ij} : l'écart entre la moyenne de la $i^{\text{ième}}$ série et la moyenne μ_j . Au niveau j , a_{ij} est considéré comme une variable aléatoire ayant une distribution normale de moyenne 0 et de variance σ^2_{Bj} .
- s_{ijk} : l'erreur expérimentale [20].

8.7. Linéarité

La linéarité d'une procédure d'analyse est sa capacité à l'intérieur d'un certain intervalle de dosage d'obtenir des résultats directement proportionnels à la quantité (ex : concentration) en analyte dans l'échantillon. Rappelons que l'exigence de linéarité s'applique aux Résultats (concentration calculée= f (concentrations introduites)), pas aux réponses (signal= f (concentrations introduites)). C'est un prérequis à l'estimation de la justesse [20].

Le critère de linéarité se réfère à la relation entre la quantité introduite et la quantité calculée(résultat) d'analyse à partir de la courbe d'étalonnage tandis que la fonction de réponse se réfère à la relation entre la réponse instrumentale et la concentration [24].

A l'inverse, l'existence d'une relation linéaire entre la concentration estimée et la concentration introduit en implique pas que la méthode soit juste.

A thick black L-shaped frame surrounds the text. It starts with a horizontal line on the left, then a vertical line on the right, and a horizontal line at the bottom, forming an open square shape.

Chapitre III

Profil d'exactitude

A côté des approches classiques, une approche originale, basée sur le profil d'exactitude en utilisant les intervalles de tolérance statistique et l'erreur totale de mesure comme outil de décision unique a été proposé. Face à la disponibilité de ces différentes approches, il est du devoir de l'analyste de choisir l'approche la plus appropriée [25].

La méthode de validation utilisant le profil d'exactitude comme outil de décision a été développée par une commission de la SFSTP (SFSTP 2003 et 2006), pour pallier aux faiblesses des guides de validation précédents.

Cette commission est repartie des objectifs fondamentaux de la validation analytique pour proposer un outil de décision permettant de prévoir avec quelle garantie une proportion donnée des résultats futurs seront compris dans les limites d'acceptabilité. Ceci permet de mieux intégrer les besoins de l'utilisateur final de la méthode analytique aux objectifs de la validation.

1. Définition

Le profil d'exactitude, ou approche de l'erreur totale est une règle de décision, à la fois pratique et visuelle. Elle repose sur l'intégration du profil d'exactitude dans des limites d'acceptation ($\pm\lambda$). Le profil d'exactitude permet donc, comme illustré dans la Figure 04, de décider de la capacité ou non d'une procédure à fournir des résultats dans les limites d'acceptation. La zone en gris montre l'intervalle de dosage dans lequel la procédure est capable de quantifier avec une exactitude connue et un risque fixé par l'analyste. C'est ainsi que dans ces conditions, si l'analyste est prêt à assumer par exemple un risque de 5%, il pourra au terme de la validation de sa procédure garantir que 95 fois sur 100 les futures mesures fournies par celle-ci seront comprises dans les limites d'acceptation fixées en fonction des contraintes de son secteur d'activité [25].

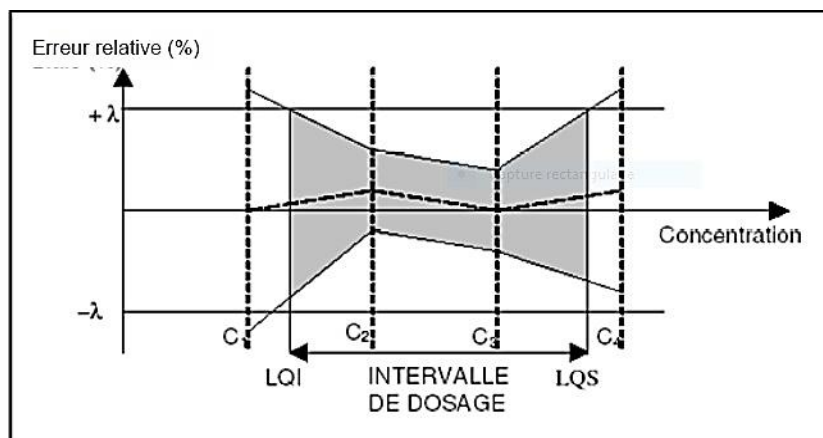


Figure 4. Illustration du profil d'exactitude comme outil de décision [25]

LQI : limite de quantification inférieure ; LQS : limite de quantification supérieure

Comme les vraies valeurs de biais et de fidélité de la procédure sont inconnues, le profil d'exactitude par niveau de concentration (C1, C2, ...) s'obtient en calculant l'intervalle de tolérance qui permet d'évaluer la probabilité d'obtenir des résultats futurs dans des limites d'acceptation et ce, à partir des estimations disponibles du biais et de la fidélité de la procédure après la phase de validation au niveau de concentration en question. A noter que les estimations du biais et de la variance sont des éléments essentiels pour calculer les intervalles de tolérance, mais la décision n'est pas faite sur la base de ces estimations de biais et de variance. Le profil d'exactitude, représenté dans la Figure 04, s'obtient en reliant les limites de tolérance basses et hautes estimées pour chaque niveau de concentration. Si, sur une partie de l'intervalle de dosage sous épreuve, les limites de tolérance devaient sortir des limites d'acceptation, comme dans l'exemple de la Figure 04 pour les niveaux de concentration C1 et C4, de nouvelles limites de quantification, et par là-même un nouvel intervalle de dosage seraient définis.

L'utilisation du profil d'exactitude, comme seul outil de décision, permet non seulement de réconcilier les objectifs de la procédure avec ceux de la validation mais aussi de visualiser rapidement la capacité de la procédure à répondre de façon fiable à son objectif analytique Calcul de l'exactitude [25].

L'exactitude d'un résultat exprime l'étroitesse de l'accord entre le résultat d'essai et la valeur de référence acceptée, elle est donnée pour chaque mesure :

$$\text{Exactitude} = X - \mu$$

Avec

X : le résultat d'essai

μ : la valeur de référence acceptée

-Pour chaque modèle et chaque observation, l'exactitude relative est calculée comme suit :

$$\text{Exactitude (\%)} = (x - \mu) \frac{100}{\mu}$$

Le calcul de l'erreur maximale relative pour chaque modèle sur l'ensemble des séries permet de choisir la fonction de réponse qui donne les résultats les plus exacts [26].

1.1. Erreur totale et profil d'erreur totale

Chaque mesure obtenue est le reflet de la vraie valeur, du biais de la méthode et de sa fidélité, ce qui s'exprime comme suit :

$$X = \mu + |\text{Biais}|_{\text{procédure}} + \text{Fidélité Intermédiaire}_{\text{procédure}}$$

$$X - \mu = |\text{Biais}|_{\text{procédure}} + \text{Fidélité Intermédiaire}_{\text{procédure}}$$

$$X - \mu = \text{Erreur Totale}_{\text{procédure}}$$

L'Erreur Totale d'une procédure analytique évalue son aptitude à produire des résultats exacts. Donc l'estimation de l'erreur totale d'une procédure est fondamentale pour juger de la validité d'une méthode. Cette erreur totale, comme indiqué ci-dessus, est la somme de la justesse (biais) et de la fidélité [26].

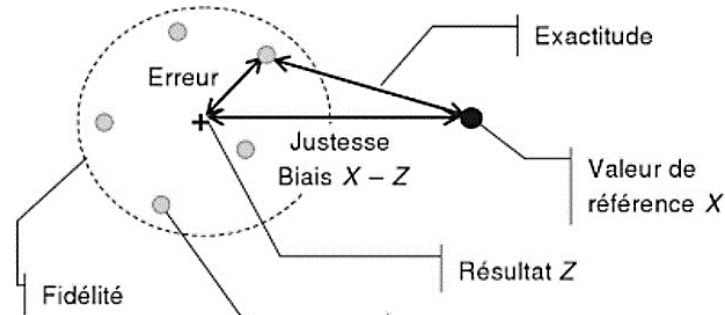


Figure 5. Représentation schématique de l'exactitude [27]

2. L'intervalle de tolérance

2.1. Définition de l'intervalle de tolérance

L'intervalle de tolérance, également appelé **intervalle de prédiction**, permet de prédire où va se trouver en moyenne une proportion connue des mesures. En termes simples, l'intervalle de tolérance caractérise le comportement de l'ensemble des mesures. Il est donc très intéressant dans l'optique d'un contrôle de procédé, il est cependant moins souvent évoqué, sans doute parce qu'il est un peu plus délicat à définir [25] [26].

Ce qui est important en validation, ce n'est pas la validité des résultats obtenus avec l'Erreur Totale, mais plutôt la garantie ou une représentation de ce que la même procédure analytique pourra donner comme résultats dans le futur, C'est le rôle de l'intervalle de Tolérance.

L'estimation des paramètres de justesse et de fidélité u_j , $\sigma^{\wedge}B,j$, $\sigma^{\wedge}r,j$ pour chaque niveau de concentration j est une étape intermédiaire, elle a pour but de permettre d'estimer la proportion attendue d'observation dans les limites d'acceptation prédéfinie $[-\lambda, +\lambda]$.

L'intervalle de tolérance est calculé pour chaque niveau de concentration envisagé avec les standards de validation. Il représente le pourcentage des résultats dont la différence entre la valeur déterminée X et la valeur vraie V est inférieure, en valeur absolue à λ [26].

Pratiquement, l'intervalle de tolérance se calcule comme suit en valeur absolue [28]:

$$E\hat{\mu}_M \sigma_M \{P_X [\hat{\mu}_M - k\hat{\sigma}_M < x < \hat{\mu}_M + k\hat{\sigma}_M [\hat{\mu}_M , \hat{\sigma}_M] \}$$

$$\hat{\sigma}^2_{ELJ} = \hat{\sigma}^2_{WJ} + \hat{\sigma}^2_{BJ}$$

$$R_j = \frac{\hat{\sigma}^2_{B,j}}{\hat{\sigma}^2_{W,j}}$$

$$Bj = \sqrt{\frac{R+1}{nRj+1}}$$

$$v = \frac{(R+1)^2}{\left(R + \frac{1}{n}\right)^2 + \frac{1 - \frac{1}{n}}{pn}}$$

$$Q_t \left(v; \frac{1+\beta}{2} \right)$$

Avec :

- **n** : nombre de répétitions ;
- **p** : nombre de séries ;
- **v** : degré de liberté ;
- **B** : (β-expectation tolérance intervalle) ;
- **Q_t** : quantile β de la distribution t de Student à degrés de liberté.

Le même intervalle en échelle relative devient :

$$\left[\text{biais}(\%)_j - Q_t \left(v; \frac{1+\beta}{2} \right) \sqrt{1 + \frac{1}{pnB_j^2}} CV_{F,I,j} ; \text{biais}(\%)_j + Q_t \left(v; \frac{1+\beta}{2} \right) \sqrt{1 + \frac{1}{pnB_j^2}} CV_{F,I,j} \right]$$

Deux termes sont contenus dans l'intervalle de tolérance : l'un étant la justesse et l'autre étant, à un facteur près, le coefficient de variation de fidélité intermédiaire. C'est la raison pour laquelle cet intervalle peut ainsi être considéré comme une expression de l'exactitude des résultats. Mais l'intervalle de tolérance intègre une dimension supplémentaire, celle de chance (ou risque) pour des résultats futurs, conditionnellement à des résultats passés. La méthode peut dès lors être considérée comme exacte au niveau de chance β pour le niveau de concentration en question, si l'intervalle de tolérance est inclus dans les limites [-γ, γ] définies a priori en fonction des objectifs de la méthode.

2.2. Relation entre l'intervalle de tolérance et l'erreur totale

L'intervalle de tolérance est toujours construit sur la base de la moyenne et l'écart-type d'un échantillon d'un produit, par exemple. S'il est exprimé par rapport à la cible de la production

d'un médicament ou par rapport à la valeur réelle des analytes dans un échantillon, l'intervalle de tolérance combine donc simultanément les erreurs aléatoires et systématiques d'une procédure analytique. Dans ce cas, la valeur moyenne estimée est remplacée par le biais estimé de la méthode d'analyse ou du processus de production. C'est donc un moyen statistique commode d'exprimer l'erreur totale [25].

3. Etablissement du profil d'exactitude

Le profil d'exactitude est obtenu en reliant entre elles les bornes supérieures puis les bornes inférieures de l'intervalle de tolérance.

Une représentation graphique des résultats en valeurs relatives par rapport à la valeur de référence du niveau est effectuée [28].

On reporte sur l'axe horizontal les valeurs de référence moyennes, et sur l'axe vertical :

- Les limites de tolérance relatives haute et basse ;
- Les taux de recouvrement moyens ;
- Les limites d'acceptabilité relatives haute et basse [28].
- Selon l'équation précédente, les bornes de ces intervalles sont :

$$L_j = \text{biais}(\%)_j - Q_t \left(v ; \frac{1+\beta}{2} \right) \sqrt{1 + \frac{1}{pnB_j^2}} CV_{F,I.,j}$$

$$U_j = \text{biais}(\%)_j + Q_t \left(v ; \frac{1+\beta}{2} \right) \sqrt{1 + \frac{1}{pnB_j^2}} CV_{F,I.,j}$$

Si cet intervalle de tolérance est totalement inclus dans les limites $[-\lambda, +\lambda]$, alors la proportion attendue de résultats dans les limites d'acceptation sera supérieure ou égal à β [26].

4. Interprétation du profil d'exactitude

Pour utiliser le profil d'exactitude en vue de valider une méthode, il faut avoir fixé les deux critères de décision suivants :

- **Les limites d'acceptabilité $\pm\lambda$** : Elles servent à traduire les objectifs pratiques des utilisateurs. Elles délimitent un intervalle autour de la valeur de référence. Le plus souvent, ces limites sont réglementaires. Mais dans le cas où il n'existe pas de référence établie, il convient de prendre en compte les attentes des utilisateurs finaux, comme une LQ donnée [29].
- **La proportion β** : elle représente la proportion des résultats futurs qui, en moyenne, se situeront dans l'intervalle de tolérance. La valeur choisie pour β dépend largement du

champ d'application. De toute évidence, plus le bêta est petit, disons 70%, plus le risque que la méthode produise des résultats non conformes aux spécifications publiées est grand. C'est pourquoi, dans la méthode du profil d'exactitude, ce ratio est fixé à 80 %, au moins [29]

- Aussi longtemps que l'intervalle de tolérance est compris entre les limites d'acceptabilité, la probabilité que la différence entre la valeur Z trouvée par la méthode en routine et la valeur de référence X reste inférieure à la limite d'acceptabilité est supérieure à la valeur β choisie (en général 80%) : la méthode reste valide [28].

5. Choix de la fonction de réponse

Le profil d'exactitude permet de retenir les fonctions de réponse dont l'intervalle de tolérance est inclus dans les limites d'acceptation choisies. De plus, la fonction de réponse la plus simple choisie (Exemple : fonction linéaire simple ou passant par zéro) [30] .

Nous attirons également l'attention sur le fait, que pour l'ensemble de ces modèles, le coefficient de détermination R^2 est toujours supérieur à 0.99 et pas en rapport ici avec la qualité des résultats.

**PARTIE
EXPERIMENTALE**

La validation analytique d'une méthode de dosage du Miconazole est le sujet de notre projet de fin d'études. Cette étude a pour but de valider une méthode de dosage d'un principe actif « Miconazole » dans le gel de DAKTARIN à 2% par chromatographie liquide à haute performance (HPLC) par profil d'exactitude. Ce travail expérimental a été réalisé dans le laboratoire de Chimie Analytique du Département de Pharmacie de Tizi-Ouzou, et ce en conformité avec le protocole de validation analytique détaillé dans les guides de validation publiés par la commission Française des Sciences Techniques et Pharmaceutiques (SFSTP) respectivement en 2006 et 2010.

1. Matériel et méthodes

1.1. Matériel

1.1.1. Matières premières

Le principe Actif utilisé est le Miconazole. Les excipients sont préalablement préparés au sein du laboratoire de Chimie Analytique de Tizi-Ouzou.

1.1.2. Réactifs

Tableau VI. Propriétés physicochimiques et précautions d'emploi des Réactifs

Réactifs	Propriétés physicochimiques	Précautions d'emploi
Acide chlorhydrique 36.5 – 38 %	Formule brute : HCl N° CAS : 7647-01-0 Mr: 36,458 g/mol ρ : 1.19 kg/l	
Acétonitrile	Formule brute : C ₂ H ₃ N N° CAS : 75-05-8 Mr : 41.05 g/mol ρ : 0.786 g.cm ⁻³	
Acide phosphorique	Formule brute : H ₃ PO ₄ N° CAS : 7664-38-2 Mr : 97,994 g/mol ρ : 1,88 g/cm ³	

Ethanol	Formule brute : C_2H_5OH N° CAS : 64-17-5 Mr : 46,07 g/mol ρ : 0.79 kg/l	
Hydroxyde de sodium	Formule brute : NaOH N° CAS : 1310-73-2 Mr : 39,997 g/mol ρ : 2,13 g/cm ³	
Glycerol	Formule brute : C ₃ H ₈ O ₃ N° CAS : 56-81-5 Mr : 92.09 g/mol ρ : 1,26 g/cm ³	Aucune
Eau distillée	Formule brute : H ₂ O N° CAS : 7732-18-5 Mr : 18 g/mol ρ : 1g.cm ⁻³	Aucune



Figure 6. Image représentant les réactifs utilisés

1.1.3. Appareillage et équipements

Les équipements et appareils que nous avons utilisés pour la réalisation de ce travail sont cités dans les tableaux ci-dessous :

Tableau VII. Appareil Chromatographie Liquide Haute Performance SCHIMADZU (LC 20)

Nom	Equipements	Spécifications
HPLC SCHMADZU (LC 20)	Pompe	Le 20 at
	Injecteur automatique	SIL 20 A
	Contrôleur	CBM-20
	Logiciel d'exposition	LC-solution
	Compartiment de la Colonne	CTO-20 A
	Détecteur	Spectrophotomètre UV-Visible



Figure 7. Appareil Chromatographie Liquide Haute Performance SCHIMADZU (LC 20)

Tableau VIII. Les Autres Appareils utilisés

Appareil	Dénomination	Usage
Etuve	MEMMERT	Séchage
Balance Analytique	METTLER-TOLEDO	Pesée
Balance Analytique	KERN	Pesée du principe actif
PH mètre	METTLER-TOLEDO	Mesure et Ajustement du pH



Figure 8. Etuve



Figure 9. Balance analytique

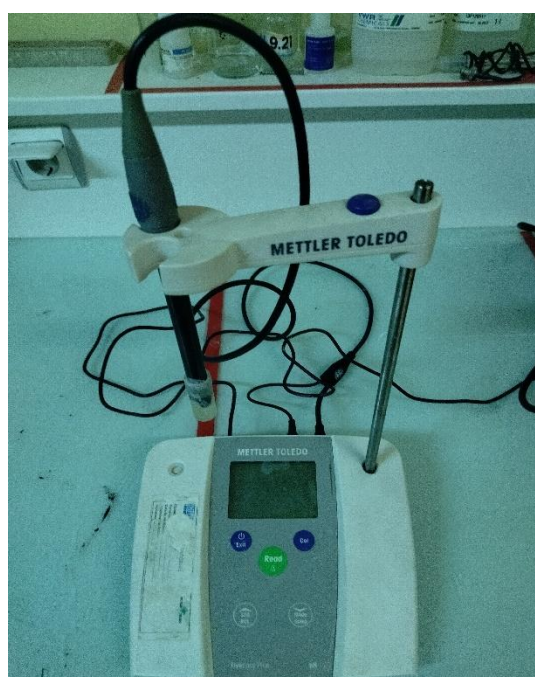


Figure 10. pH mètre

1.1.4. Verreries et Autres

Nous avons fait usage, durant notre travail, de la verrerie procurée par le laboratoire de Chimie Analytique de Tizi-Ouzou.

Tableau IX. La verrerie utilisée

Verrerie
Verre de montre Béchers Eprouvettes de 25ml (classe B) Pipettes jaugées 5ml (classe A) Fioles jaugées 50ml, et 1000ml (classe B) Vials pour HPLC

La classe d'une verrerie rend compte de son degré de précision :

Matériel de classe A : de haute précision ;

Matériel de classe B : de précision courante.



Figure 11. La verrerie utilisée

Autres :

- Pissettes à eau ;
- Poires ;
- Barreaux magnétiques ;
- Pipettes pasteurs.

1.2. Méthodes

1.2.1. Méthodologie de la validation analytique

Ce présent travail est basé sur les recommandations du guide de la commission SFSTP publiées en 2003 complétées en 2006 qui propose un protocole expérimental harmonisé en distinguant notamment les règles de diagnostic et les règles de décision. Ces dernières reposent sur l'utilisation du profil d'exactitude, basé sur la notion d'erreur totale (biais + écart type), permettant de simplifier l'approche de la validation d'une procédure analytique tout en contrôlant le risque associé à son utilisation.

1.2.1.1. Choix du protocole de Validation

Compte tenu de l'absence de l'effet matrice démontré à la suite de la comparaison des chromatogrammes du blanc et du standard, le protocole choisi est le V2 qui consiste à préparer :

- Trois séries du standard d'étalonnage (SE) : Chaque série comporte 5 niveaux de concentration avec deux répétitions par niveau.
- Trois séries du standard de validation (SV) : Chaque série comporte 5 niveaux de concentration avec trois répétitions par niveau.

1.2.1.2. Choix des paramètres de Validation

1.2.1.3. Choix du diluant

Pour dissoudre le MICONAZOLE, la pharmacopée européenne recommande d'utiliser le solvant composé du méthanol, cependant ce dernier reste un produit cher et toxique. Par conséquent nous avons opté pour une solution d'HCl à 0.1 M au sein du laboratoire de Chimie Analytique.

1.2.1.4. Choix de dilution

Nous avons effectué des pesées dans des fioles de 50ml pour chaque niveau de concentration, par la suite on a procédé à des dilutions au 1/10^{ème} dont le but essentiel est de garantir une concentration appropriée égale à 0.04mg/ml pour le niveau de concentration de 100% afin d'assurer la bonne lecture des résultats

1.2.2. Préparation des solutions

1.2.2.1. Diluants

-Diluant : HCl à 0.1M

Préparation de la solution HCl 0.1 M : dilution **de 8ml d'HCL R (36.5 – 38 %)** dans 1L d'eau pure.

Verser une petite quantité d'eau pure dans une fiole de 1000ml, rajouter 8ml d'acide chlorhydrique, puis ajuster le volume final d'eau pure au trait de jauge.

- **Placebo** : Solution saturée d'excipients

1.2.2.2. Préparation des solutions standards

Nous avons effectué des pesées correspondant à chaque niveau de concentration dans des fioles de 50 ml. Les masses théoriques sont indiquées dans le tableau ci-dessous :

Tableau X. Tableau présentant les masses théoriques des niveaux de concentration des principes actifs pesées

Niveaux de concentrations en %	80	90	100	110	120
Masses Théoriques du miconazole	16mg	18mg	20mg	22mg	24mg

a- Solutions standards du MICONAZOLE :

Nous procédons à la préparation des solutions des standards d'étalonnage et de validation, dans des fioles de 50ml, ces solutions mères feront l'objet de dilutions au 1/10ème, 5ml de la solution mère sont prélevés dans des fioles de 50ml, lesquelles on complète jusqu'au trait de jauge avec le diluant (1).

La solution d'excipients (diluant 2) est ajoutée uniquement aux standards de validation. Les étapes suivies pour la préparation des standards d'étalonnage et de validation sont respectivement détaillées dans les tableaux ci-joints.

Tableau XI. Tableau présentant le protocole de la préparation des solutions des standards d'étalonnage

Niveaux de concentrations en %	80%	90%	100%	110%	120%
Protocole	- Peser chaque PE théorique du MICONAZOLE pour Chaque répétition dans une fiole de 50 ml (solution mère) - Ajouter le diluant puis agiter manuellement. - Compléter au trait de jauge avec le diluant pour ainsi obtenir des solutions mères. - A l'aide d'une pipette jaugée, prélever 5ml de la solution mère, verser dans une fiole de 50ml - Compléter au trait de jauge avec le diluant (une dilution 5/50) - Agiter par retournement à chaque fois et remplir les vials				
Solutions à préparer	SE = 5x3x2 = 30 solutions (5 niveaux, 3 séries, 2 répétitions)				

Tableau XII. Tableau présentant le protocole de la préparation des solutions des standards de validation

Niveaux de concentrations en %	80%	90%	100%	110%	120%
Protocole	- Peser chaque PE théorique de MICONAZOLE pour chaque répétition dans une fiole de 50ml - Ajouter le diluant et agiter manuellement - Compléter au trait de jauge avec le diluant pour ainsi obtenir les solutions mères - A l'aide d'une pipette jaugée, prélever 5ml de la solution mère, verser dans une fiole de 50ml - Ajouter un peu de la solution placebo et agiter manuellement - Compléter au trait de jauge avec la même solution (une dilution au 1/10ème) - Agiter par retournement à chaque fois et remplir les vials.				
Solutions à préparer	SV = 5x3x3 = 45 solutions (5 niveaux, 3 séries, 3 répétitions)				

b- Préparation de la phase mobile :

Constituée de 40% de tampon et 60% d'acétonitrile

Préparation de la solution tampon :

Mélange d'acide phosphorique et d'hydroxyde de sodium.

- Préparer une solution d'acide phosphorique à 0.05M
- Préparer une solution de NaOH 0.1 M (4g dans 100ml)

- Ajuster le pH de la solution d'acide phosphorique à 2.5.

1.2.2.3. Préparation de la solution d'excipients

Une solution saturée d'excipients a été préparée au sein du laboratoire.

1.3. Conditions Chromatographiques

Tableau XIII. Colonne et conditions Chromatographique

Colonne	Longueur	15 cm
	Diamètre	4.6 mm
	Taille des particules	5µm
	Phase stationnaire	C18 Gel de silice Octadécyle
Volume Injecté	20µl	
Débit	1ml/min	
Température	Température ambiante	
Détecteur	Spectrophotomètre UV-Visible : longueur d'onde $\lambda=220$ nm	
Mode d'élution de la Phase mobile	Mode isocratique: 60% acétonitrile 40% tampon	

1.4. Préparation de la Feuille de Calcul

Afin de réaliser l'étude statistique nous avons utilisé des feuilles de calcul développées par l'équipe du laboratoire de Chimie Analytique de Tizi Ouzou, à l'aide de logiciel Excel de Microsoft office 2016 enregistré et installé sur le système d'exploitation Windows 10 authentique.

L'ensemble des équations rentrant dans l'étude statistique de la validation et la construction du profil d'exactitude sont introduites dans ce tableau, pour avoir les résultats complets en tableaux et en graphes si nécessaire juste en introduisant les données brutes en termes de prises d'essais et de leurs réponses instrumentales.



Résultats



1. Résultats :

Les chromatogrammes obtenus sont indiqués dans l'annexe III :

1.1. Données brutes :

Dans les tableaux suivants ; sont mentionnées les données brutes obtenues par les standards d'étalonnage et de validation :

Tableau XIV. Données brutes des standards d'étalonnage

DONNEES BRUTES OBTENUES (STANDARD D'ETALONNAGE)							
NIVEAU CONC	Rep	SERIES i					
		Serie 1		Serie 2		Serie 3	
		Quantités introduites (mg)	Réponse instrumentale (Aire du pic)	Quantités introduites (mg)	Réponse instrumentale (Aire du pic)	Quantités introduites (mg)	Réponse instrumentale (Aire du pic)
j	k	X	Y	X	Y	X	y
1	1	16,11	2170617	16,03	2158050	16,28	2192989
	2	16,17	2171821	16,17	2133967	16,49	2197487
2	1	18,05	2409060	18,42	2467043	18,26	2471548
	2	18,02	2368929	18,39	2430368	18,36	2493616
3	1	20,22	2753558	20,02	2602587	20,33	2705364
	2	20,04	2735198	20,24	2647581	20,38	2715299
4	1	22,01	2904157	22,12	2949937	22,13	2925541
	2	22,04	2939742	22,35	2948710	22,19	2920970
5	1	24,03	3152370	24,34	3237373	24,17	3103411
	2	24,06	3152901	24,11	3166920	24,27	3103923

Tableau XV. Données brutes des standards de validation

DONNEES BRUTES OBTENUES (STANDARD DE VALIDATION)							
NIVEAU CONC	Rep	SERIES <i>i</i>					
		Serie 1		Serie 2		Serie 3	
		Quantités introduites (mg)	Réponse instrumentale (Aire du pic)	Quantités introduites (mg)	Réponse instrumentale (Aire du pic)	Quantités introduites (mg)	Réponse instrumentale (Aire du pic)
J	k	X	Y	X	Y	X	y
1	1	16,03	2172719	15,98	2105088	16,28	2205880
	2	16,09	2195364	16,35	2192989	16,49	2248828
	3	16,05	2129798	16,03	2123171	16,48	2197487
2	1	18,00	2410611	18,02	2392146	18,01	2424033
	2	18,05	2443109	18,12	2448022	18,26	2471548
	3	18,29	2485553	18,36	2486077	18,42	2497370
3	1	20,00	2627995	20,03	2628163	20,03	2666773
	2	20,33	2745682	20,05	2685205	20,14	2697401
	3	20,41	2785390	20,38	2764507	20,24	2735897
4	1	22,07	3003681	22,12	2919791	22,13	2918933
	2	22,03	2996823	22,35	2995210	22,19	2957663
	3	22,06	3003681	22,20	2917014	22,33	2996823
5	1	24,00	3166920	24,04	3221176	24,06	3137373
	2	24,06	3133278	24,10	3180767	24,11	3196699
	3	24,10	3171855	24,17	3202758	24,27	3106289

1.1. Spécificité :

L'évaluation de la spécificité et de l'absence de l'effet matrice se fait par deux approches complémentaires :

- une approche empirique reposant sur la comparaison des chromatogrammes ;
- une approche statistique reposant sur la confirmation de la spécificité sur les deux gammes d'étalonnage et de validation.

Approche empirique

L'évaluation de la spécificité est faite par la comparaison du chromatogramme d'un SE et un SV d'un même niveau de concentration (niveau 100%) ainsi que celui des solutions placebo et diluant non chargées de PA.

Les chromatogrammes obtenus sont présentés dans les figures suivantes :

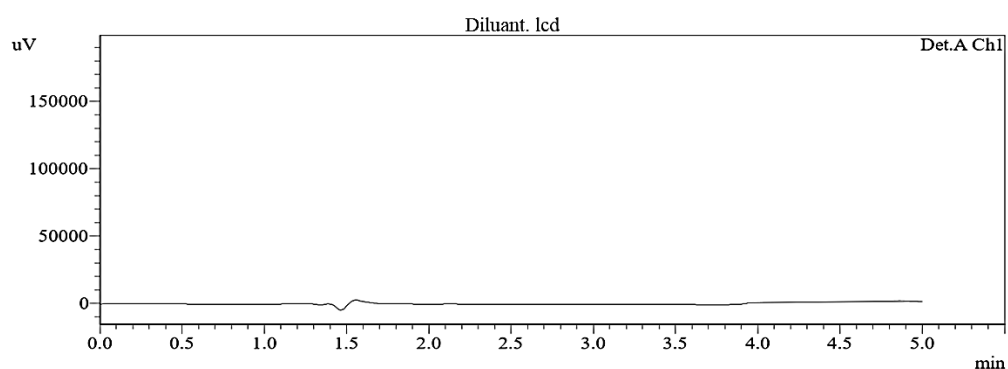


Figure 12. Chromatogramme du Placebo

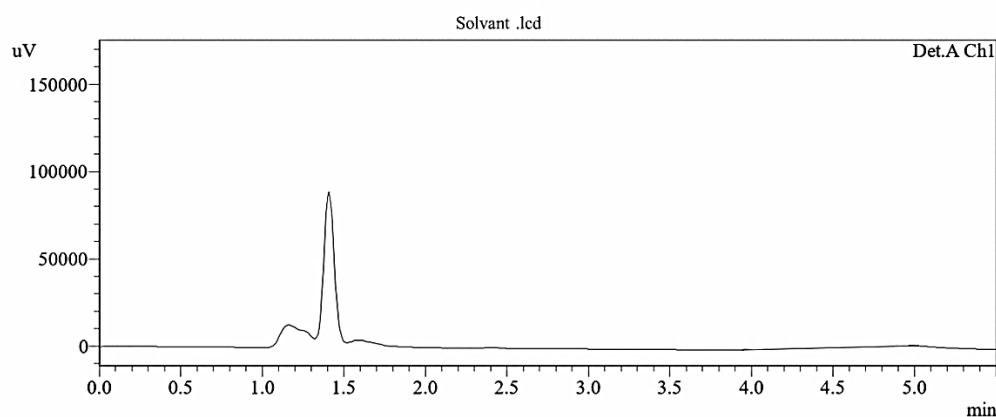


Figure 13. Chromatogramme du blanc

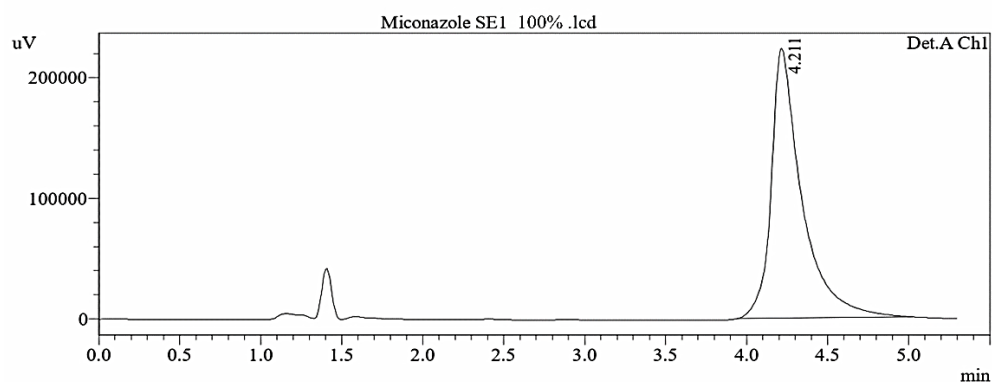


Figure 14. Chromatogramme du SE 100%

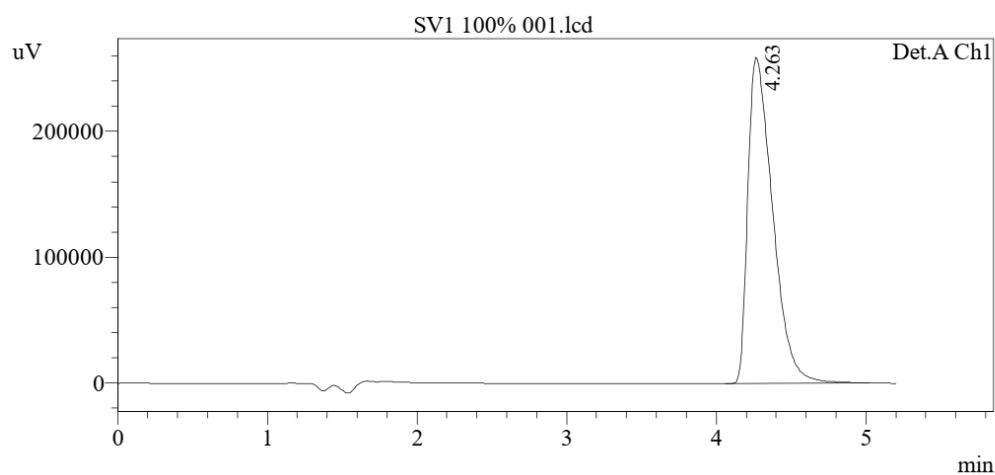


Figure 15. Chromatogramme du SV 100%

Approche statistique

Pour ce qui est de l'approche statistique on a eu recours à l'utilisation d'un test t de student, qui a consisté en une comparaison de deux pentes des deux droites de régression de deux séries SE et SV. Les résultats obtenus sont résumés dans le tableau suivant :

Tableau XVI. Résultats obtenus de l'étude de la spécificité et de l'effet matrice : standards d'étalonnage (sans matrice) du Miconazole

STANDARD D'ETALONNAGE					
NIVEAU CONC	Rep	SERIES i			
		Serie 3			
		Quantités introduites	Réponse instrumentale	$(Y-Y^*)^2$	$(x-\bar{x})^2$
J	k	X	Y		
1		16,28	2192989,00	733828288,9	16,05
		16,49	2197487,00	2195768845	14,41
2		18,26	2471548,00	513446850,7	4,10
		18,36	2493616,00	1100334240	3,71
3		20,33	2705364,00	298063827,9	0,00
		20,38	2715299,00	458880041,2	0,01
4		22,13	2925541,00	866248428,5	3,40
		22,19	2920970,00	321393501,4	3,63
5		24,17	3103411,00	808942706,2	15,09
		24,27	3103923,00	1559143988	15,87
Pente		115560,79			
Ordonnée à l'origine		338748,56			
SD pente		3809,868842			
SD ordonnée à l'origine		77999,87757			

RESULTATS

Tableau XVII. Résultats obtenus de l'étude de la spécificité et de l'effet matrice : standards de validation (avec matrice) du Miconazole

STANDARD DE VALIDATION					
NIVEAU CONC	Rep	SERIES <i>i</i>			
		Serie 3			
		Quantités introduites	Réponse instrumentale	$(Y-Y^*)^2$	$(x-\bar{x})^2$
<i>j</i>	<i>k</i>				
1	1	16,28	2205880,00	190789691,9	15,60
	2	16,49	2248828,00	13995456,86	13,98
	3	16,48	2197487,00	2152096868	14,06
2	1	18,01	2424033,00	23621615,04	4,93
	2	18,26	2471548,00	154343360,6	3,88
	3	18,42	2497370,00	357114494,4	3,27
3	1	20,03	2666773,00	40819954,28	0,04
	2	20,14	2697401,00	119621945,8	0,01
	3	20,24	2735897,00	1394325252	0,00
4	1	22,13	2918933,00	66780037,37	3,61
	2	22,19	2957663,00	543010442,7	3,84
	3	22,33	2996823,00	2073259621	4,41
5	1	24,06	3137373,00	534417991,4	14,67
	2	24,11	3196699,00	909761877,2	15,06
	3	24,27	3106289,00	6335486277	16,33
Pente		120925,17			
Ordonnée à l'origine		251030,91			
SD pente		3176,089875			
SD ordonnée à l'origine		64842,45849			

La comparaison des deux pentes et des ordonnées à l'origine des deux droites de régression obtenues à partir des résultats d'une série de validation est représentée dans le tableau suivant :

Tableau XVIII. Comparaison des deux pentes et des deux ordonnées à l'origine des droites de régression des SE et SV du Miconazole

	Pente	Ordonnée à l'origine
t calculé	0,000218041	8,52578E-06
t° (0,05, 21)	2,079613845	2,079613845
Condition	t calculé < t° (0,05, 21)	
Conclusion	Pentes comparables : absence d'effet matrice	Ordonnées à l'origine comparables : absences d'erreurs systématiques

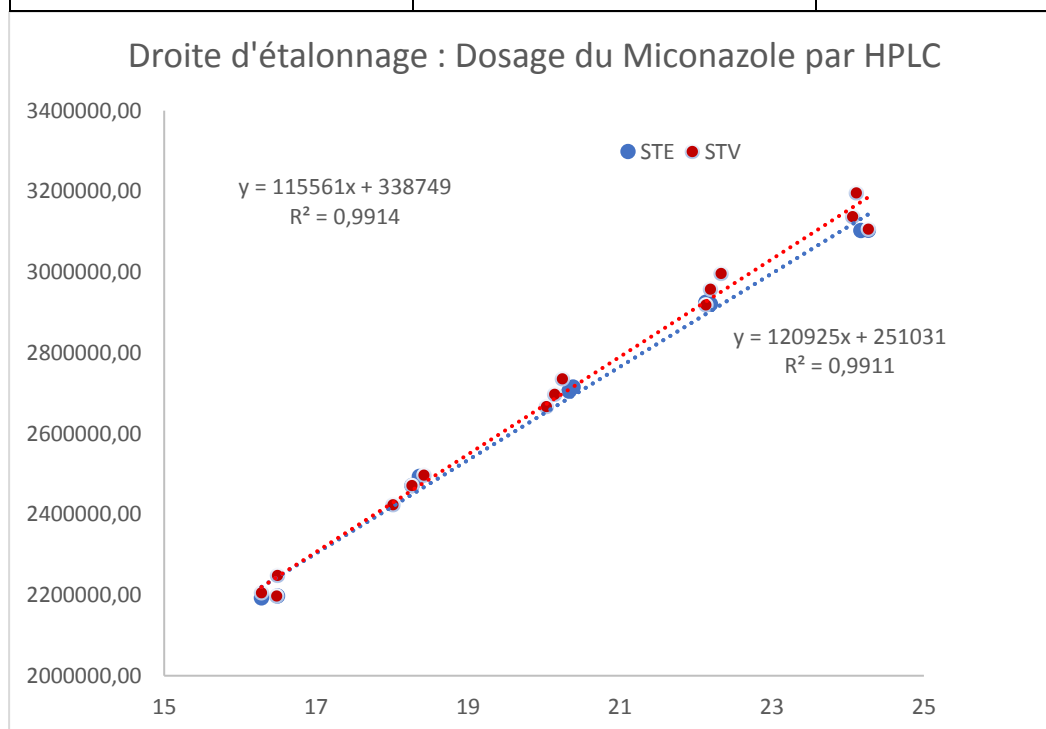


Figure 16. Courbe de spécificité obtenue avec la fonction $ax+b$

2. La fonction $y = ax+b$

2.1. Fonction de réponse :

La corrélation entre la réponse instrumentale (aire du pic) et la masse introduite de la solution de Miconazole obtenue avec 3 séries des SE est représentée pour la fonction mathématique $y = ax + b$ (droite ne passant pas par l'origine) est représentée dans le tableau suivant :

Tableau XIX. Résultats obtenus avec fonction $y = ax+b$

STANDARD D'ETALONNAGE							
NIVEAU CONC	Rep	SERIES <i>i</i>					
		Serie 1		Serie 2		Serie 3	
		Quantités introduite s	Réponse instrumental e	Quantités introduite s	Réponse instrumental e	Quantités introduite s	Réponse instrumental e
J	k	x	Y	X	Y	x	y
1	1	16,11	2170617,00	16,03	2158050,00	16,28	2192989,00
	2	16,17	2171821,00	16,17	2133967,00	16,49	2197487,00
2	1	18,05	2409060,00	18,42	2467043,00	18,26	2471548,00
	2	18,02	2409060,00	18,39	2368929,00	18,36	2493616,00
3	1	20,22	2753558,00	20,02	2602587,00	20,33	2705364,00
	2	20,04	2735198,00	20,24	2647581,00	20,38	2715299,00
4	1	22,01	2904157,00	22,12	2949937,00	22,13	2925541,00
	2	22,04	2939742,00	22,35	2948710,00	22,19	2920970,00
5	1	24,03	3152370,00	24,34	3237373,00	24,17	3103411,00
	2	24,06	3152901,00	24,11	3166920,00	24,27	3103923,00

A partir des données de ce tableau, on trace les courbes d'étalonnage des trois séries de SE

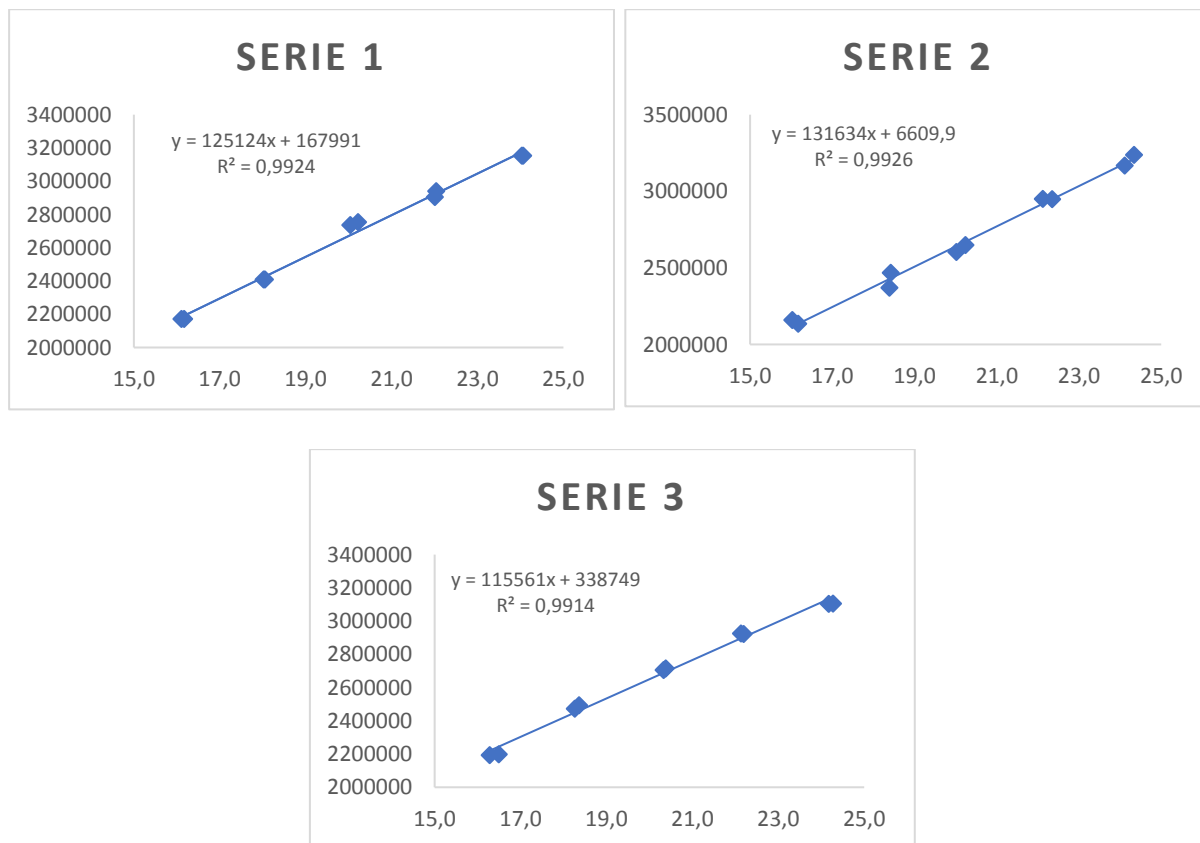


Figure 7 : Courbes d'étalonnage obtenues avec la fonction $y=ax+b$

2.2. Alignement des observations :

Comme les quantités introduites ne sont pas identiques, l'alignement des réponses sur la moyenne des concentrations introduites est exigé et cela pour chaque niveau de concentration.

L'alignement des réponses obtenues avec les échantillons de validation pour la fonction

$y = ax+b$ est résumé dans le tableau suivant :

Tableau XX. Alignement des réponses observées avec les 3 séries des SV en utilisant la fonction $y = ax+b$

SERIES i									Moy Quant Intro	Alignement des répons		
Serie 1		Quan Intro	Serie 2		Quan Intro	Serie 3		Serie 1		Serie 2		
Réponse instrumentale	Moys Quant Intro		Réponse instrumentale	Moys Quant Intro		Réponse instrumentale	Moys Quant Intro					
Y	Mij		y	Mij		y	Mij					
3	2172719	16,06	15,98	2105088	16,12	16,28	2205880	16,20	2176055,63	2123516,70	22	
9	2195364		16,35	2192989		16,49	2248828		2191193,21	2162713,27	22	
5	2129798		16,03	2123171		16,48	2197487		2130632,16	2135018,02	21	
0	2410611	18,11	18,02	2392146	18,17	18,01	2424033	18,17	2424791,68	2411452,26	24	
5	2443109		18,12	2448022		18,26	2471548		2451033,50	2454164,90	24	
9	2485553		18,36	2486077		18,42	2497370		2463447,82	2460627,84	24	
0	2627995	20,25	20,03	2628163	20,15	20,03	2666773	20,18	2658858,84	2644397,81	26	
3	2745682		20,05	2685205		20,14	2697401		2735255,03	2698807,14	26	
1	2785390		20,38	2764507		20,24	2735897		2764953,13	2734670,05	27	
7	3003681	22,05	22,12	2919791	22,22	22,13	2918933	22,16	3001595,61	2933393,14	29	
3	2996823		22,35	2995210		22,19	2957663		2999742,55	2978536,41	29	
6	3003681		22,20	2917014		22,33	2996823		3002846,84	2920085,45	29	
0	3166920	24,05	24,04	3221176	24,10	24,06	3137373	24,10	3173593,26	3229512,79	31	
6	3133278		24,10	3180767		24,11	3196699		3132443,84	3181205,78	32	
0	3171855		24,17	3202758		24,27	3106289		3166015,90	3193982,43	30	

RESULTATS

Pentes des droites d'étalonnage		Ordonnées des droites d'étalonnage
Série 1 : pente =	125123,67	Série 1 : ord. orig =
Série 2 : pente =	131633,6016	Série 2 : ord. orig =
Série 3 : pente =	115560,7925	Série 3 : ord. orig =

2.3. Prédiction inverses :

Les prises d'essai prédites avec la fonction de réponse choisie sont présentées dans le tableau suivant :

Tableau XXI. Prédiction inverses obtenues avec les SV des 3 séries en utilisant la fonction $y = ax + b$

Alignement des réponses			Prédiction inverses $x_{ijk,calc}$			Moy des prédictions inverses			$\mu_{j, calc} = \frac{1}{n} \sum \sum x_{ijk,cal}$
Serie 1	Serie 2	Serie 3	Serie 1	Serie 2	Serie 3	Serie 1	Serie 2	Serie 3	
$Y_{ijk,c}$	$Y_{ijk,c}$	$Y_{ijk,c}$	$x_{ijk,calc}$	$x_{ijk,calc}$	$x_{ijk,calc}$				
2176055,63	2123516,70	2221673,31	16,05	16,08	16,29	15,97	16,21	16,26	16,145
2191193,21	2162713,27	2240353,54	16,17	16,38	16,46				
2130632,16	2135018,02	2190168,15	15,69	16,17	16,02				
2424791,68	2411452,26	2449456,37	18,04	18,27	18,26	18,21	18,50	18,39	18,368
2451033,50	2454164,90	2468081,18	18,25	18,59	18,43				
2463447,82	2460627,84	2475413,45	18,35	18,64	18,49				
2658858,84	2644397,81	2679099,48	19,91	20,04	20,25	20,39	20,41	20,43	20,411
2735255,03	2698807,14	2697015,80	20,52	20,45	20,41				
2764953,13	2734670,05	2723955,72	20,76	20,72	20,64				
3001595,61	2933393,14	2928948,27	22,65	22,23	22,41	22,64	22,31	22,66	22,541
2999742,55	2978536,41	2960744,62	22,63	22,58	22,69				
3002846,84	2920085,45	2983726,11	22,66	22,13	22,89				
3173593,26	3229512,79	3147388,27	24,02	24,48	24,30	23,89	24,27	24,30	24,154
3132443,84	3181205,78	3200936,23	23,69	24,12	24,77				
3166015,90	3193982,43	3092036,50	23,96	24,21	23,83				

2.4. Justesse :

La justesse est exprimée en termes de biais absolu, de biais relatif, et de pourcentage de recouvrement (%) pour chaque niveau de concentration des standards de validation comme indiqué dans le tableau ci-dessous.

Tableau XXII. Justesse calculée pour chaque niveau de concentration des standards de validation en utilisant la fonction $y = ax+b$

NIVEAUX	Répétitions	Biais Absolus	Biais relatifs	% de Recouvrement
80%	1	-0,053	-0,326	99,674
	2			
	3			
90%	1	0,198	1,091	101,091
	2			
	3			
100%	1	0,232	1,148	101,148
	2			
	3			
110%	1	0,377	1,700	101,700
	2			
	3			
120%	1	0,053	0,220	100,220
	2			
	3			

2.5. Fidélité

La fidélité de notre méthode est évaluée dans des conditions de répétabilité et de fidélité intermédiaire. Elle est calculée pour chaque niveau de concentration, exprimée en écart type et termes de coefficients de variations.

Les résultats obtenus avec la fonction $y = ax+b$ sont mentionnés dans le tableau suivant :

Tableau XXIII. Calcul des écarts types, des CV de répétabilité et de fidélité intermédiaire en utilisant la fonction $y = ax+b$

<i>Variance intra-Série $\sigma^2_{w,j}$</i>	<i>Variance inter-Série $\sigma^2_{B,j}$</i>	<i>Ecartype de la répétabilité</i>	<i>Ecartype Intersérie</i>	<i>Ecartype de la fidélité intermédiaire</i>	<i>CV Répétabilité</i>	<i>CV Fidélité intermédiaire</i>
0,045	0,009	0,212	0,095	0,233	1,310	1,435
0,026	0,013	0,163	0,114	0,199	0,896	1,094
0,088	0,000	0,296	0,000	0,296	1,466	1,466
0,037	0,026	0,192	0,162	0,251	0,868	1,134
0,096	0,020	0,310	0,141	0,341	1,287	1,414

2.6. Exactitude

A partir des concentrations prédites, on peut calculer l'exactitude relative par rapport à la concentration introduite. Les tableaux ci-dessous résument les résultats obtenus avec la fonction $y = ax+b$:

Tableau XXIV. Résultats du calcul de l'exactitude relative pour le Miconazole en utilisant la fonction $y = ax+b$

NIVEAUX	Rep	Exactitude relative ijk		
1	1	0,116	0,637	0,085
	2	0,495	0,181	-0,210
	3	-2,270	0,868	-2,784
2	1	0,203	1,383	1,415
	2	1,087	2,614	0,910
	3	0,303	1,540	0,377
3	1	-0,464	0,044	1,109
	2	0,924	2,006	1,326
	3	1,691	1,691	1,978
4	1	2,612	0,517	1,284
	2	2,731	1,017	2,250
	3	2,704	-0,301	2,500
5	1	0,088	1,846	1,016
	2	-1,529	0,070	2,728
	3	-0,579	0,182	-1,832

2.7. Erreur totale et intervalle de tolérance

On a calculé l'erreur totale absolue et relative pour chaque niveau de concentration et les résultats sont résumés dans les tableaux suivants :

Tableau XXV. Calcul de l'erreur totale pour chaque niveau de concentration des standards de validation du Miconazole en utilisant la fonction $y = ax+b$

<i>Niveau</i>	<i>Erreur Totale Absolue</i>	<i>Erreur Totale Relative</i>
1	0,285	1,761
2	0,397	2,185
3	0,528	2,614
4	0,628	2,834
5	0,394	1,634

Tableau XXVI. Intervalle de Tolérance du Miconazole en utilisant la fonction $y = ax+b$

	<i>Moy Intro</i>	<i>R</i>	<i>B</i>	<i>V</i>	<i>Qt</i>	<i>Biais Relatifs</i>	<i>CV FI</i>	<i>LTI L</i>	<i>LTS U</i>
1	16,20	0,201	0,866	6,653	1,94318028	-0,326	1,435	-3,315	2,663
2	18,17	0,492	0,776	5,370	2,01504837	1,091	1,094	-1,308	3,491
3	20,18	0,000	1,000	7,714	1,89457861	1,148	1,466	-1,779	4,076
4	22,16	0,707	0,740	4,736	2,13184679	1,700	1,134	-0,951	4,351
5	24,10	0,207	0,863	6,623	1,94318028	0,220	1,414	-2,726	3,165

3. La fonction $y = ax$

3.1. Fonctions de réponses

Tableau XXVII. Résultats obtenus pour la fonction $y = ax$

STANDARD D'ETALONNAGE							
NIVEAU CONC	Rep	SERIES i					
		Serie 1		Serie 2		Serie 3	
		Quantités introduites	Réponse instrumentale	Quantités introduites	Réponse instrumentale	Quantités introduites	Réponse instrumentale
j	k	x	y	x	y	x	y
1		4,01	1473,30	4,00	1469,03	4,03	1480,87
		4,02	1473,71	4,02	1460,81	4,06	1482,39
2		4,25	1552,11	4,29	1570,68	4,27	1572,12
		4,24	1552,11	4,29	1539,13	4,28	1579,12
3		4,50	1659,38	4,47	1613,25	4,51	1644,80
		4,48	1653,84	4,50	1627,14	4,51	1647,82
4		4,69	1704,16	4,70	1717,54	4,70	1710,42
		4,69	1714,57	4,73	1717,18	4,71	1709,08
5		4,90	1775,49	4,93	1799,27	4,92	1761,65
		4,91	1775,64	4,91	1779,58	4,93	1761,80



Figure 18. Courbes d'étalonnage obtenues avec la fonction $y=ax$

3.2. Alignement des observations

Lorsque les quantités introduites ne sont pas identiques, l'alignement des réponses sur la moyenne des concentrations introduites est exigé et cela pour chaque niveau de concentration.

L'alignement des réponses obtenues avec les échantillons de validation avec la fonction $y = ax$ est résumé dans le tableau suivant :

Tableau XXVIII. Alignement des réponses observées avec les 3 séries des SV en utilisant la fonction $y = ax$

NIVEAU CONC	SERIES <i>i</i>										Moy Quant Intro	Alignement des réponses		
		Quan Intro	Serie 1		Quan Intro	Serie 2		Quan Intro	Serie 3			Serie 1	Serie 2	Serie 3
			Réponse instrumentale	Moys Quant Intro		Réponse instrumentale	Moys Quant Intro		Réponse instrumentale	Moys Quant Intro				
J			y	Mij		y	Mij		Y	Mij	Mj	Yijk,c	Yijk,c	Yijk,c
1	16,03	2172719,00	16,06	15,98	2105088,00	16,12	16,28	2205880,00	16,42	16,20	2176274,52	2123561,58	2223913,93	
	16,09	2195364,00		16,35	2192989,00		16,49	2248828,00			2190919,60	2162639,54	2239151,26	
	16,05	2129798,00		16,03	2123171,00		16,48	2197487,00			2130686,88	2135046,88	2189129,83	
2	18,00	2410611,00	18,11	18,02	2392146,00	18,17	18,01	2424033,00	18,23	18,17	2425721,97	2411499,28	2453063,23	
	18,05	2443109,00		18,12	2448022,00		18,26	2471548,00			2451553,36	2454179,86	2467589,33	
	18,29	2485553,00		18,36	2486077,00		18,42	2497370,00			2461997,67	2460565,86	2472298,44	
3	20,00	2627995,00	20,25	20,03	2628163,00	20,15	20,03	2666773,00	20,14	20,18	2660883,57	2644437,35	2680848,26	
	20,33	2745682,00		20,05	2685205,00		20,14	2697401,00			2734571,00	2698840,27	2696961,15	
	20,41	2785390,00		20,38	2764507,00		20,24	2735897,00			2763612,43	2734597,39	2722261,59	
4	22,07	3003681,00	22,05	22,12	2919791,00	22,22	22,13	2918933,00	22,22	22,16	3001458,80	2933426,27	2930369,15	
	22,03	2996823,00		22,35	2995210,00		22,19	2957663,00			2999934,08	2978495,80	2961181,82	
	22,06	3003681,00		22,20	2917014,00		22,33	2996823,00			3002792,12	2920092,93	2981868,03	
5	24,00	3166920,00	24,05	24,04	3221176,00	24,10	24,06	3137373,00	24,15	24,10	3174031,04	3229533,10	3148809,15	
	24,06	3133278,00		24,10	3180767,00		24,11	3196699,00			3132389,12	3181206,85	3201537,37	
	24,10	3171855,00		24,17	3202758,00		24,27	3106289,00			3165632,84	3193961,05	3090014,48	

Pentes des droites d'étalonnage		Ordonnées des droites d'étalonnage	
Série 1 : pente =	133332,05	Série 1 : ord. orig =	0
Série 2 : pente =	131954,178	Série 2 : ord. orig =	0
Série 3 : pente =	131955,5913	Série 3 : ord. orig =	0

3.3. Prédiction inverses

Les prises d'essai prédites avec la fonction de réponse choisie sont présentées dans le tableau suivant :

Tableau XXIX. Prédiction inverses obtenues avec les SV des 3 séries en utilisant la fonction $y = ax$

<i>Alignement des réponses</i>			<i>Prédiction inverses $x_{ijk,calc}$</i>			<i>Moy des prédictions inverses</i>			<i>Moy des prédictions inverses μ_j</i>
<i>Serie 1</i>	<i>Serie 2</i>	<i>Serie 3</i>	<i>Serie 1</i>	<i>Serie 2</i>	<i>Serie 3</i>	<i>Serie 1</i>	<i>Serie 2</i>	<i>Serie 3</i>	
$Y_{ijk,c}$	$Y_{ijk,c}$	$Y_{ijk,c}$	$x_{ijk,calc}$	$x_{ijk,calc}$	$x_{ijk,calc}$				
2176274,52	2123561,58	2223913,93	16,32	16,09	16,85	16,24	16,22	16,80	16,423
2190919,60	2162639,54	2239151,26	16,43	16,39	16,97				
2130686,88	2135046,88	2189129,81	15,98	16,18	16,59				
2425721,97	2411499,28	2453063,23	18,19	18,28	18,59	18,35	18,51	18,68	18,510
2451553,36	2454179,86	2467589,33	18,39	18,60	18,70				
2461997,67	2460565,86	2472298,44	18,47	18,65	18,74				
2660883,57	2644437,35	2680848,26	19,96	20,04	20,32	20,40	20,41	20,46	20,422
2734571,00	2698840,27	2696961,15	20,51	20,45	20,44				
2763612,43	2734597,39	2722261,59	20,73	20,72	20,63				
3001458,80	2933426,27	2930369,15	22,51	22,23	22,21	22,51	22,31	22,42	22,412
2999934,08	2978495,80	2961181,82	22,50	22,57	22,44				
3002792,12	2920092,93	2981868,03	22,52	22,13	22,60				
3174031,04	3229533,10	3148809,15	23,81	24,47	23,86	23,68	24,26	23,85	23,930
3132389,12	3181206,85	3201537,37	23,49	24,11	24,26				
3165632,84	3193961,05	3090014,48	23,74	24,21	23,42				

3.4. Justesse

La justesse est exprimée en termes de biais absolu, de biais relatif et de taux de recouvrement pour chaque niveau de concentration des standards de validation.

Tableau XXX. Justesse calculée pour chaque niveau de concentration des standards de validation pour le Miconazole en utilisant la fonction $y = ax$

		Biais Absolus	Biais relatifs	% de Recouvrement
NIVEAUX	Répétition			
1	1	0,226	1,392	101,392
	2			
	3			
2	1	0,340	1,873	101,873
	2			
	3			
3	1	0,243	1,204	101,204
	2			
	3			
4	1	0,248	1,118	101,118
	2			
	3			
5	1	-0,171	-0,709	99,291
	2			
	3			

3.5. Fidélité

La fidélité est évaluée pour chaque niveau de concentration, elle est calculée par les écarts types et les coefficients de variation qui estiment la répétabilité et la fidélité intermédiaire, les résultats obtenus avec la fonction $y = ax$ sont résumés dans les tableaux ci-dessous :

Tableau XXXI. Fidélité calculée pour chaque niveau de concentration des standards de validation pour le Miconazole en utilisant la fonction $y = ax$

<i>Fidélité</i>						
<i>Variance intra-Série σ^2w,j</i>	<i>Variance inter-Série σ^2B,j</i>	<i>Ecartype de la répétabilité</i>	<i>Ecartype Intersérie</i>	<i>Ecartype de la fidélité intermédiaire</i>	<i>CV Répétabilité</i>	<i>CV Fidélité intermédiaire</i>
<i>0,039</i>	<i>0,096</i>	<i>0,197</i>	<i>0,310</i>	<i>0,367</i>	<i>1,216</i>	<i>2,267</i>
<i>0,022</i>	<i>0,019</i>	<i>0,149</i>	<i>0,139</i>	<i>0,204</i>	<i>0,818</i>	<i>1,121</i>
<i>0,076</i>	<i>0,000</i>	<i>0,276</i>	<i>0,000</i>	<i>0,276</i>	<i>1,368</i>	<i>1,368</i>
<i>0,031</i>	<i>0,000</i>	<i>0,175</i>	<i>0,000</i>	<i>0,175</i>	<i>0,789</i>	<i>0,789</i>
<i>0,081</i>	<i>0,063</i>	<i>0,284</i>	<i>0,251</i>	<i>0,379</i>	<i>1,179</i>	<i>1,573</i>

3.6. Exactitude

A partir des concentrations prédites, on peut calculer l'exactitude relative par rapport à la concentration introduite. Les tableaux ci-dessous résument les résultats obtenus :

Tableau XXXII. Résultats du calcul de l'exactitude relative pour le Miconazole en utilisant la fonction $y = ax$

NIVEAUX	Rep	Exactitude relative ijk		
1	1	0,116	0,637	0,085
	2	0,495	0,181	-0,210
	3	-2,270	0,868	-2,784
2	1	0,203	1,383	1,415
	2	1,087	2,614	0,910
	3	0,303	1,540	0,377
3	1	-0,464	0,044	1,109
	2	0,924	2,006	1,326
	3	1,691	1,691	1,978
4	1	2,612	0,517	1,284
	2	2,731	1,017	2,250
	3	2,704	-0,301	2,500
5	1	0,088	1,846	1,016
	2	-1,529	0,070	2,728
	3	-0,579	0,182	-1,832

3.7. Erreur totale et intervalle de tolérance

On a calculé l'erreur totale absolue et relative pour chaque niveau de concentration et les résultats sont résumés dans les tableaux suivants :

Tableau XXXIII. Calcul de l'erreur totale pour chaque niveau de concentration des standards de validation du Miconazole en utilisant la fonction $y = ax$

<i>Niveau</i>	<i>Erreur Absolue</i>	<i>Erreur Relative</i>
1	0,593	3,659
2	0,544	2,993
3	0,519	2,571
4	0,423	1,907
5	0,550	2,282

Tableau XXXIV. Intervalle de Tolérance du Miconazole en utilisant la fonction $y = ax$

	<i>Moy Intro</i>	<i>R</i>	<i>B</i>	<i>V</i>	<i>Qt</i>	<i>Biais Relatifs</i>	<i>CV FI</i>	<i>LTI L</i>	<i>LTS U</i>
1	16,20	2,473	0,642	3,007	2,35336343	1,392	2,267	-4,617	7,402
2	18,17	0,877	0,719	4,368	2,13184679	1,873	1,121	-0,761	4,506
3	20,18	0,000	1,000	7,714	1,89457861	1,204	1,368	-1,528	3,935
4	22,16	0,000	1,000	7,714	1,89457861	1,118	0,789	-0,459	2,694
5	24,10	0,781	0,730	4,564	2,13184679	-0,709	1,573	-4,396	2,977

4. La fonction $\sqrt{y} = a\sqrt{x}+b$

4.1. Fonction de réponse

Tableau XXXV. Résultats obtenus pour la fonction $\sqrt{y} = a\sqrt{x}+b$

STANDARD D'ETALONNAGE							
NIVEAU CONC	Rep	SERIES <i>i</i>					
		Serie 1		Serie 2		Serie 3	
		Quantités introduites	Réponse instrumentale	Quantités introduites	Réponse instrumentale	Quantités introduites	Réponse instrumentale
<i>J</i>	<i>k</i>	X	Y	X	Y	x	Y
1		4,01	1473,30	4,00	1469,03	4,03	1480,87
		4,02	1473,71	4,02	1460,81	4,06	1482,39
2		4,25	1552,11	4,29	1570,68	4,27	1572,12
		4,24	1552,11	4,29	1539,13	4,28	1579,12
3		4,50	1659,38	4,47	1613,25	4,51	1644,80
		4,48	1653,84	4,50	1627,14	4,51	1647,82
4		4,69	1704,16	4,70	1717,54	4,70	1710,42
		4,69	1714,57	4,73	1717,18	4,71	1709,08
5		4,90	1775,49	4,93	1799,27	4,92	1761,65
		4,91	1775,64	4,91	1779,58	4,93	1761,80

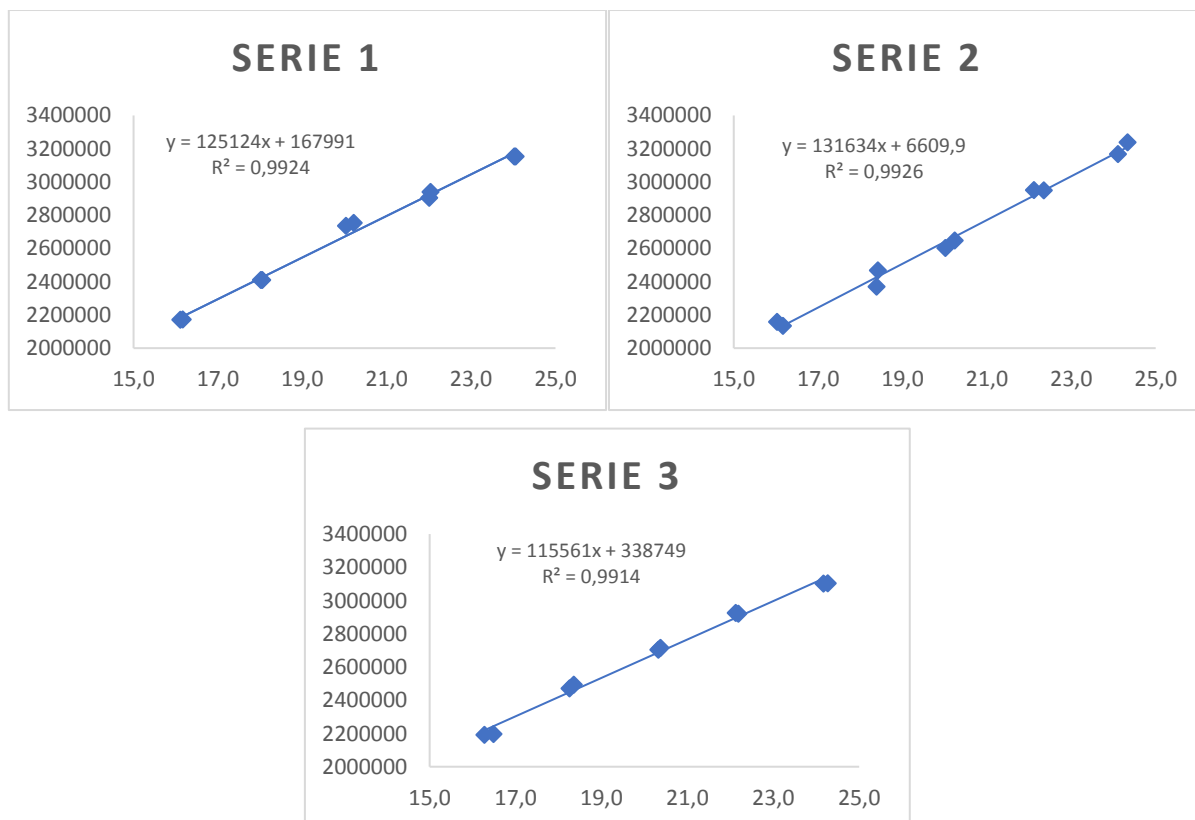


Figure 9 : Courbes d'étalonnage obtenues avec la fonction $\sqrt{y} = a\sqrt{x}+b$

4.2. Alignement des observations :

Lorsque les quantités introduites ne sont pas identiques, l'alignement des réponses sur la moyenne des concentrations introduites est exigé et cela pour chaque niveau de concentration. L'alignement des réponses obtenues avec les échantillons de validation avec la fonction $\sqrt{y} = a\sqrt{x+b}$ est résumé dans le tableau suivant :

RESULTATS

Tableau XXXVI. Alignement des réponses observées avec les 3 séries des SV en utilisant la fonction $\sqrt{y} = a\sqrt{x}+b$

NIVEAU CONC	SERIES i									Moy Quant Intro	Alignement des réponses		
	Quan Intro	Serie 1		Quan Intro	Serie 2		Quan Intro	Serie 3			Serie 1	Serie 2	Serie 3
		Réponse instrumentale	Moys Quant Intro		Réponse instrumentale	Moys Quant Intro		Réponse instrumentale	Moys Quant Intro				
		Y	Mij		y	Mij		y	Mij				
j									Mj	Yijk,c	Yijk,c	Yijk,c	
1	16,03	2172719,00	16,06	15,98	2105088,00	16,12	16,28	2205880,00	16,42	16,20	2176055,63	2123516,70	2221673,31
	16,09	2195364,00		16,35	2192989,00		16,49	2248828,00			2191193,21	2162713,27	2240353,54
	16,05	2129798,00		16,03	2123171,00		16,48	2197487,00			2130632,16	2135018,02	2190168,15
2	18,00	2410611,00	18,11	18,02	2392146,00	18,17	18,01	2424033,00	18,23	18,17	2424791,68	2411452,26	2449456,37
	18,05	2443109,00		18,12	2448022,00		18,26	2471548,00			2451033,50	2454164,90	2468081,18
	18,29	2485553,00		18,36	2486077,00		18,42	2497370,00			2463447,82	2460627,84	2475413,45
3	20,00	2627995,00	20,25	20,03	2628163,00	20,15	20,03	2666773,00	20,14	20,18	2658858,84	2644397,81	2679099,48
	20,33	2745682,00		20,05	2685205,00		20,14	2697401,00			2735255,03	2698807,14	2697015,80
	20,41	2785390,00		20,38	2764507,00		20,24	2735897,00			2764953,13	2734670,05	2723955,72
4	22,07	3003681,00	22,05	22,12	2919791,00	22,22	22,13	2918933,00	22,22	22,16	3001595,61	2933393,14	2928948,27
	22,03	2996823,00		22,35	2995210,00		22,19	2957663,00			2999742,55	2978536,41	2960744,62
	22,06	3003681,00		22,20	2917014,00		22,33	2996823,00			3002846,84	2920085,45	2983726,11
5	24,00	3166920,00	24,05	24,04	3221176,00	24,10	24,06	3137373,00	24,15	24,10	3173593,26	3229512,79	3147388,27
	24,06	3133278,00		24,10	3180767,00		24,11	3196699,00			3132443,84	3181205,78	3200936,23
	24,10	3171855,00		24,17	3202758,00		24,27	3106289,00			3166015,90	3193982,43	3092036,50

Pentes des droites d'étalonnage		Ordonnées des droites d'étalonnage	
Série 1 : pente =	344,00	Série 1 : ord. orig =	95,9351568
Série 2 : pente =	361,0496725	Série 2 : ord. orig =	9,95

RESULTATS

Série 3 : pente =	319,6667719	Série 3 : ord. orig =	198,5967867
-------------------	-------------	-----------------------	-------------

4.3. Prédiction inverses :

Les prises d'essai prédites avec la fonction de réponse choisie sont présentées dans le tableau suivant :

Tableau XXXVII .Prédictions inverses obtenues avec les SV des 3 séries en utilisant la fonction $\sqrt{y} = a\sqrt{x}+b$

Alignement des réponses			Prédictions inverses $x_{ijk,calc}$			Moy des prédictions inverses			Moy des prédictions inverses μ_j
Serie 1	Serie 2	Serie 3	Serie 1	Serie 2	Serie 3	Serie 1	Serie 2	Serie 3	
$Y_{ijk,c}$	$Y_{ijk,c}$	$Y_{ijk,c}$	$x_{ijk,calc}$	$x_{ijk,calc}$	$x_{ijk,calc}$				
1475,16	1457,18	1490,62	16,08	16,07	16,34	16,00	16,20	16,30	16,163
1480,25	1470,55	1496,71	16,19	16,37	16,49				
1459,67	1461,14	1479,89	15,72	16,16	16,07				
1557,19	1552,87	1565,18	18,04	18,26	18,28	18,21	18,50	18,40	18,370
1565,60	1566,58	1570,98	18,25	18,59	18,43				
1569,43	1568,55	1573,20	18,35	18,64	18,49				
1630,55	1626,12	1636,83	19,90	20,04	20,24	20,39	20,40	20,42	20,404
1653,81	1642,81	1642,25	20,51	20,45	20,40				
1662,70	1653,58	1650,38	20,74	20,72	20,63				
1732,50	1712,70	1711,43	22,63	22,24	22,40	22,63	22,32	22,65	22,534
1731,99	1725,82	1720,69	22,62	22,59	22,67				
1732,87	1708,82	1727,29	22,64	22,14	22,87				
1781,46	1797,09	1774,08	24,01	24,50	24,29	23,88	24,29	24,29	24,151

RESULTATS

1769,87	1783,59	1789,12	23,68	24,13	24,76				
1779,33	1787,17	1758,46	23,95	24,23	23,81				

4.4. Justesse

La justesse est exprimée en termes de biais absolu, de biais relatif et de taux de recouvrement pour chaque niveau de concentration des standards de validation.

Tableau XXXVIII. Justesse calculée pour chaque niveau de concentration des standards de validation pour le Miconazole en utilisant la fonction $\sqrt{y} = a\sqrt{x}+b$

NIVEAUX	Rep	Biais Absolus	Biais relatifs	% de Recouvrement
1	1	-0,035	-0,215	99,785
	2			
	3			
2	1	0,200	1,100	101,100
	2			
	3			
3	1	0,225	1,114	101,114
	2			
	3			
4	1	0,369	1,666	101,666
	2			
	3			
5	1	0,050	0,206	100,206
	2			
	3			

4.5. Fidélité

La fidélité est évaluée pour chaque niveau de concentration, elle est calculée par les écarts types et les coefficients de variation qui estiment la répétabilité et la fidélité intermédiaire, les résultats obtenus avec la fonction $\sqrt{y} = a\sqrt{x}+b$ sont résumés dans les tableaux ci-dessous :

Tableau XXXIX. Calcul des écarts types, des CV de répétabilité et de fidélité intermédiaire en utilisant la fonction $\sqrt{y} = a\sqrt{x}+b$

<i>Fidélité</i>						
<i>Variance intra-Série $\sigma^2_{w,j}$</i>	<i>Variance inter-Série $\sigma^2_{B,j}$</i>	<i>Ecartype de la répétabilité</i>	<i>Ecartype Intersérie</i>	<i>Ecartype de la fidélité intermédiaire</i>	<i>CV Répétabilité</i>	<i>CV Fidélité intermédiaire</i>
<i>0,044</i>	<i>0,009</i>	<i>0,209</i>	<i>0,095</i>	<i>0,230</i>	<i>1,293</i>	<i>1,420</i>
<i>0,026</i>	<i>0,012</i>	<i>0,161</i>	<i>0,108</i>	<i>0,194</i>	<i>0,886</i>	<i>1,067</i>
<i>0,087</i>	<i>0,000</i>	<i>0,295</i>	<i>0,000</i>	<i>0,295</i>	<i>1,460</i>	<i>1,460</i>
<i>0,037</i>	<i>0,021</i>	<i>0,192</i>	<i>0,145</i>	<i>0,241</i>	<i>0,868</i>	<i>1,087</i>
<i>0,097</i>	<i>0,023</i>	<i>0,311</i>	<i>0,153</i>	<i>0,347</i>	<i>1,291</i>	<i>1,439</i>

4.6. Exactitude

A partir des concentrations prédites, on peut calculer l'exactitude relative par rapport à la concentration introduite. Les tableaux ci-dessous résument les résultats obtenus :

Tableau XL. Résultats du calcul de l'exactitude relative pour le Miconazole en utilisant la fonction $\sqrt{y} = a\sqrt{x}+b$

		Exactitude relative ijk		
NIVEAUX	Rep			
1	1	301,506	301,934	304,871
	2	303,718	304,735	306,090
	3	292,293	303,507	295,753
2	1	325,311	330,205	330,644
	2	329,621	336,676	331,325
	3	329,024	334,911	330,838
3	1	345,015	347,711	352,294
	2	354,870	356,779	354,469
	3	359,174	359,063	358,459
4	1	381,788	372,906	376,097
	2	381,922	377,746	381,291
	3	382,113	369,904	383,953
5	1	390,062	399,710	395,206
	2	382,747	391,576	404,182
	3	387,815	392,848	383,328

4.7. Erreur totale et intervalle de tolérance

On a calculé l'erreur totale absolue et relative pour chaque niveau de concentration et les résultats sont résumés dans les tableaux suivants :

Tableau XLI. Calcul de l'erreur totale pour chaque niveau de concentration des standards de validation du Miconazole en utilisant la fonction $\sqrt{y} = a\sqrt{x}+b$

<i>Niveau</i>	<i>Erreur Absolue</i>	<i>Erreur Relative</i>
1	0,265	1,635
2	0,394	2,167
3	0,519	2,574
4	0,610	2,753
5	0,396	1,644

Tableau XLII. Intervalle de Tolérance du Miconazole en utilisant la fonction $\sqrt{y} = a\sqrt{x}+b$.

	<i>Moy Intro</i>	<i>R</i>	<i>B</i>	<i>V</i>	<i>Qt</i>	<i>Biais Relatifs</i>	<i>CV FI</i>	<i>LTI L</i>	<i>LTS U</i>
1	16,20	0,20 6	0,86 3	6,62 5	1,94318028	-0,215	1,420	-3,173	2,742
2	18,17	0,45 0	0,78 6	5,52 1	2,01504837	1,100	1,067	-1,235	3,435
3	20,18	0,00 0	1,00 0	7,71 4	1,89457861	1,114	1,460	-1,801	4,029
4	22,16	0,57 1	0,76 1	5,11 0	2,01504837	1,666	1,087	-0,726	4,058
5	24,10	0,24 1	0,84 9	6,44 4	1,94318028	0,206	1,439	-2,798	3,209

5. La fonction $\ln y = a \ln(x) + b$

5.1. Fonction de réponse

Tableau XLIII. Résultats obtenus pour la fonction $\ln y = a \ln(x) + b$

STANDARD D'ETALONNAGE							
NIVEAU CONC	Rep	SERIES <i>i</i>					
		Serie 1		Serie 2		Serie 3	
		Quantités introduites	Réponse instrumentale	Quantités introduites	Réponse instrumentale	Quantités introduites	Réponse instrumentale
<i>J</i>	<i>k</i>	x	Y	X	Y	x	Y
1	1	2,78	14,59	2,77	14,58	2,79	14,60
	2	2,78	14,59	2,78	14,57	2,80	14,60
2	1	2,89	14,69	2,91	14,72	2,90	14,72
	2	2,89	14,69	2,91	14,68	2,91	14,73
3	1	3,01	14,83	3,00	14,77	3,01	14,81
	2	3,00	14,82	3,01	14,79	3,01	14,81
4	1	3,09	14,88	3,10	14,90	3,10	14,89
	2	3,09	14,89	3,11	14,90	3,10	14,89
5	1	3,18	14,96	3,19	14,99	3,19	14,95
	2	3,18	14,96	3,18	14,97	3,19	14,95



Figure 20. Courbes d'étalonnage obtenues avec la fonction $\text{Ln}y = a\text{Ln}(x)+b$

5.2. Alignement des observations :

Lorsque les quantités introduites ne sont pas identiques, l'alignement des réponses sur la moyenne des concentrations introduites est exigé et cela pour chaque niveau de concentration.

L'alignement des réponses obtenues avec les échantillons de validation avec la fonction $\text{ln}y = a\text{ln}(x) + b$ est résumé dans le tableau suivant :

RESULTATS

Tableau XLIV.Alignement des réponses observées avec les 3 séries des SV en utilisant Courbes d'étalonnage obtenues avec la fonction $\text{Ln}y = a\text{Ln}(x)+b$

NIVEAU CONC	SERIES i									Moy Quant Intro	Alignement des réponses		
	Quan Intro	Serie 1		Quan Intro	Serie 2		Quan Intro	Serie 3			Serie 1	Serie 2	Serie 3
		Réponse instrumentale	Moys Quant Intro		Réponse instrumentale	Moys Quant Intro		Réponse instrumentale	Moys Quant Intro				
j		Y	Mij		Y	Mij		Y	Mij	Mj	Yijk,c	Yijk,c	Yijk,c
1	2,77	14,59	2,78	2,77	14,56	2,78	2,79	14,61	2,80	16,20	14,59	14,57	14,61
	2,78	14,60		2,79	14,60		2,80	14,63			14,60	14,59	14,62
	2,78	14,57		2,77	14,57		2,80	14,60			14,57	14,57	14,60
2	2,89	14,70	2,90	2,89	14,69	2,90	2,89	14,70	2,90	18,17	14,70	14,70	14,71
	2,89	14,71		2,90	14,71		2,90	14,72			14,71	14,71	14,72
	2,91	14,73		2,91	14,73		2,91	14,73			14,72	14,72	14,72
3	3,00	14,78	3,01	3,00	14,78	3,00	3,00	14,80	3,00	20,18	14,79	14,79	14,80
	3,01	14,83		3,00	14,80		3,00	14,81			14,82	14,81	14,81
	3,02	14,84		3,01	14,83		3,01	14,82			14,83	14,82	14,82
4	3,09	14,92	3,09	3,10	14,89	3,10	3,10	14,89	3,10	22,16	14,91	14,89	14,89
	3,09	14,91		3,11	14,91		3,10	14,90			14,91	14,91	14,90
	3,09	14,92		3,10	14,89		3,11	14,91			14,92	14,89	14,91
5	3,18	14,97	3,18	3,18	14,99	3,18	3,18	14,96	3,18	24,10	14,97	14,99	14,96
	3,18	14,96		3,18	14,97		3,18	14,98			14,96	14,97	14,98
	3,18	14,97		3,19	14,98		3,19	14,95			14,97	14,98	14,94

RESULTATS

Pentes des droites d'étalonnage		Ordonnées des droites d'étalonnage	
Série 1 : pente =	0,95	Série 1 : ord. orig =	11,9666191
Série 2 : pente =	0,990055181	Série 2 : ord. orig =	11,82
Série 3 : pente =	0,883591909	Série 3 : ord. orig =	12,14386502

5.3. Prédiction inverses :

5.4. Les prises d'essai prédites avec la fonction de réponse choisie sont présentées dans le tableau suivant :

Tableau XLV. **Prédiction inverses obtenues avec les SV des 3 séries en utilisant la fonction $Lny = aLn(x)+b$**

<i>Alignement des réponses</i>			<i>Prédiction inverses $x_{ijk,calc}$</i>			<i>Moy des prédictions inverses</i>			<i>Moy des prédictions inverses μ_j</i>
<i>Serie 1</i>	<i>Serie 2</i>	<i>Serie 3</i>	<i>Serie 1</i>	<i>Serie 2</i>	<i>Serie 3</i>	<i>Serie 1</i>	<i>Serie 2</i>	<i>Serie 3</i>	
$Y_{ijk,c}$	$Y_{ijk,c}$	$Y_{ijk,c}$	$x_{ijk,calc}$	$x_{ijk,calc}$	$x_{ijk,calc}$				
14,59	14,57	14,61	16,10	16,05	16,37	16,02	16,18	16,33	16,178
14,60	14,59	14,62	16,21	16,35	16,52				
14,57	14,57	14,60	15,74	16,14	16,10				
14,70	14,70	14,71	18,05	18,26	18,28	18,22	18,49	18,40	18,370
14,71	14,71	14,72	18,26	18,58	18,43				
14,72	14,72	14,72	18,35	18,63	18,49				
14,79	14,79	14,80	19,90	20,04	20,23	20,38	20,40	20,41	20,397
14,82	14,81	14,81	20,50	20,45	20,38				
14,83	14,82	14,82	20,73	20,72	20,61				
14,91	14,89	14,89	22,62	22,25	22,38	22,62	22,33	22,63	22,526
14,91	14,91	14,90	22,61	22,60	22,65				
14,92	14,89	14,91	22,63	22,15	22,85				
14,97	14,99	14,96	23,99	24,52	24,28	23,87	24,31	24,27	24,148
14,96	14,97	14,98	23,67	24,15	24,74				

RESULTATS

14,97	14,98	14,94	23,93	24,25	23,80				
-------	-------	-------	-------	-------	-------	--	--	--	--

RESULTATS



5.5. Justesse

La justesse est exprimée en termes de biais absolu, de biais relatif et de taux de recouvrement pour chaque niveau de concentration des standards de validation.

Tableau XLVI. Justesse calculée pour chaque niveau de concentration des standards de validation pour le Miconazole en utilisant la fonction $Lny = aLn(x)+b$

NIVEAUX	Rep	Biais Absolus	Biais relatifs	% de Recouvrement
1	1	<i>-0,020</i>	<i>-0,125</i>	<i>99,875</i>
	2			
	3			
2	1	<i>0,200</i>	<i>1,103</i>	<i>101,103</i>
	2			
	3			
3	1	<i>0,218</i>	<i>1,079</i>	<i>101,079</i>
	2			
	3			
4	1	<i>0,362</i>	<i>1,633</i>	<i>101,633</i>
	2			
	3			
5	1	<i>0,047</i>	<i>0,195</i>	<i>100,195</i>
	2			
	3			

5.6. Fidélité

La fidélité est évaluée pour chaque niveau de concentration, elle est calculée par les écarts types et les coefficients de variation qui estiment la répétabilité et la fidélité intermédiaire, les résultats obtenus avec la fonction $\ln y = a \ln(x) + b$ sont résumés dans les tableaux ci-dessous :

Tableau XLVII. Calcul des écarts types, des CV de répétabilité et de fidélité intermédiaire en utilisant la fonction $\ln y = a \ln(x) + b$

<i>Fidélité</i>						
<i>Variance intra-Série $\sigma^2_{w,j}$</i>	<i>Variance inter-Série $\sigma^2_{B,j}$</i>	<i>Ecartype de la répétabilité</i>	<i>Ecartype Intersérie</i>	<i>Ecartype de la fidélité intermédiaire</i>	<i>CV Répétabilité</i>	<i>CV Fidélité intermédiaire</i>
0,043	0,010	0,207	0,102	0,231	1,279	1,425
0,025	0,011	0,159	0,103	0,189	0,877	1,043
0,086	0,000	0,293	0,000	0,293	1,454	1,454
0,037	0,016	0,192	0,127	0,230	0,868	1,040
0,097	0,028	0,312	0,167	0,354	1,296	1,469

5.7. Exactitude

A partir des concentrations prédites, on peut calculer l'exactitude relative par rapport à la concentration introduite. Les tableaux ci-dessous résument les résultats obtenus avec la fonction $\ln y = a \ln(x) + b$:

Tableau XLVIII. Résultats du calcul de l'exactitude relative pour le Miconazole en utilisant la fonction $\ln y = a \ln(x) + b$

NIVEAUX		Exactitude relative ijk		
	Rep			
1	1	480,206	479,272	486,822
	2	483,632	485,213	489,423
	3	467,124	481,820	474,689
2	1	524,511	531,347	532,481
	2	531,061	541,450	534,652
	3	531,350	540,098	534,677
3	1	564,130	568,480	575,026
	2	580,625	582,228	578,832
	3	587,438	587,462	585,268
4	1	631,076	618,566	622,617
	2	631,063	627,298	630,855
	3	631,514	614,456	635,673
5	1	655,021	671,186	663,261
	2	644,092	658,924	677,491
	3	652,144	661,317	646,139

5.8. Erreur totale et intervalle de tolérance

Nous avons calculé l'erreur totale absolue et relative pour chaque niveau de concentration et les résultats sont résumés dans les tableaux suivants :

Tableau XLIX. Calcul de l'erreur totale pour chaque niveau de concentration des standards de validation du Miconazole en utilisant la fonction $Lny = aLn(x)+b$

<i>Niveau</i>	<i>Erreur Absolue</i>	<i>Erreur Relative</i>
1	0,251	1,550
2	0,390	2,146
3	0,511	2,534
4	0,592	2,673
5	0,401	1,664

Tableau L. Intervalle de Tolérance du Miconazole en utilisant la fonction $Lny = aLn(x)+b$

					<i>Qt</i>	<i>Biais Relatifs</i>	<i>CV FI</i>	<i>LTI L</i>	<i>LTS U</i>
	<i>Moy Intro</i>	<i>R</i>	<i>B</i>	<i>V</i>					
1	16,20	0,242	0,848	6,440	1,94318028	-0,125	1,425	-3,100	2,850
2	18,17	0,414	0,794	5,657	2,01504837	1,103	1,043	-1,176	3,382
3	20,18	0,000	1,000	7,714	1,89457861	1,079	1,454	-1,825	3,984
4	22,16	0,436	0,789	5,574	2,01504837	1,633	1,040	-0,642	3,907
5	24,10	0,285	0,832	6,225	1,94318028	0,195	1,469	-2,879	3,270

6. Profils d'exactitude

Après le calcul des critères de validation on collecte toutes les données obtenues pour tracer le profil d'exactitude qui réunit le biais relatif, les deux bornes de l'intervalle de tolérance et celles de l'intervalle d'acceptabilité, dans une courbe qui donne l'exactitude (%) en fonction les niveaux de concentration introduites.

Les profils d'exactitude obtenus en utilisant la fonction choisis sont représentés ci-dessous :

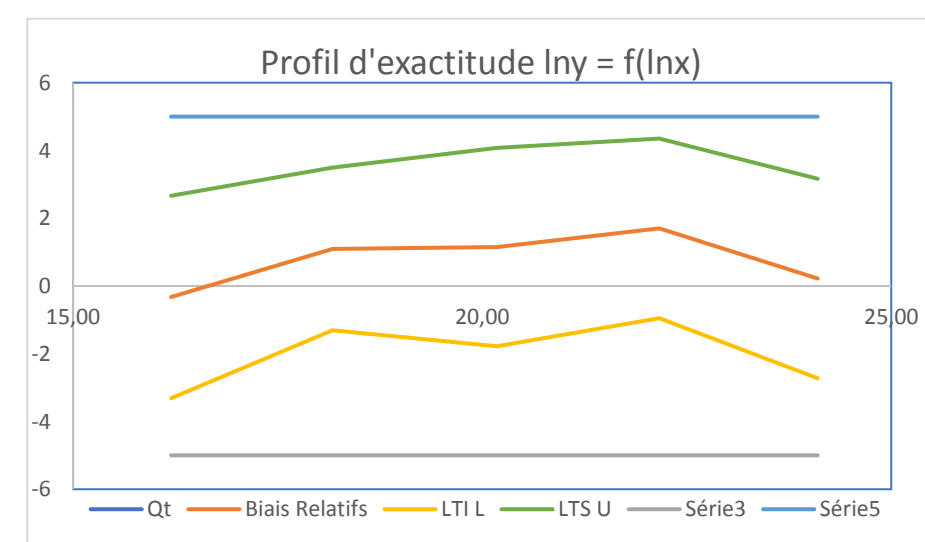
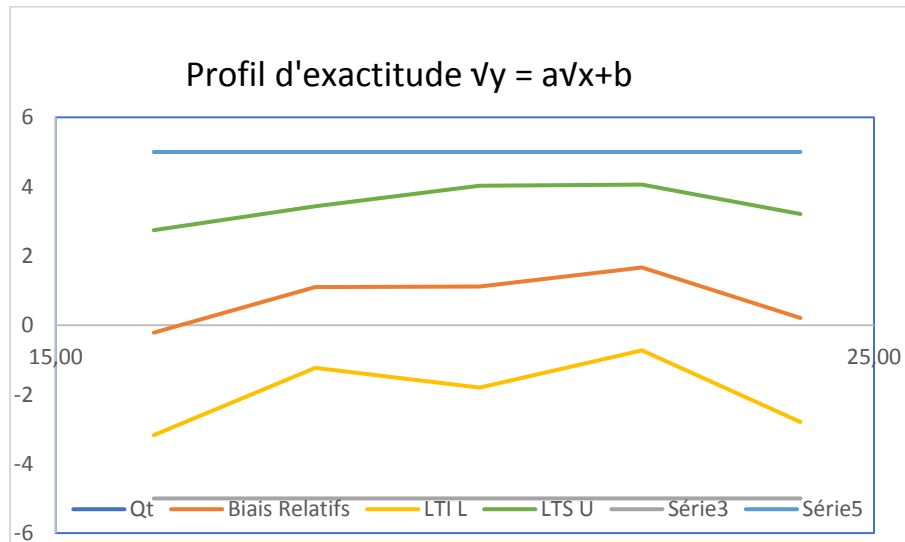
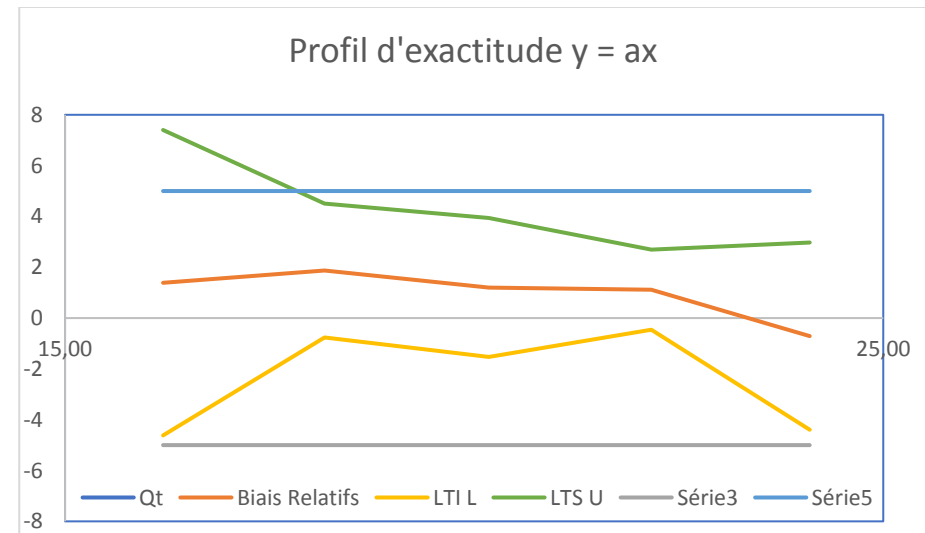
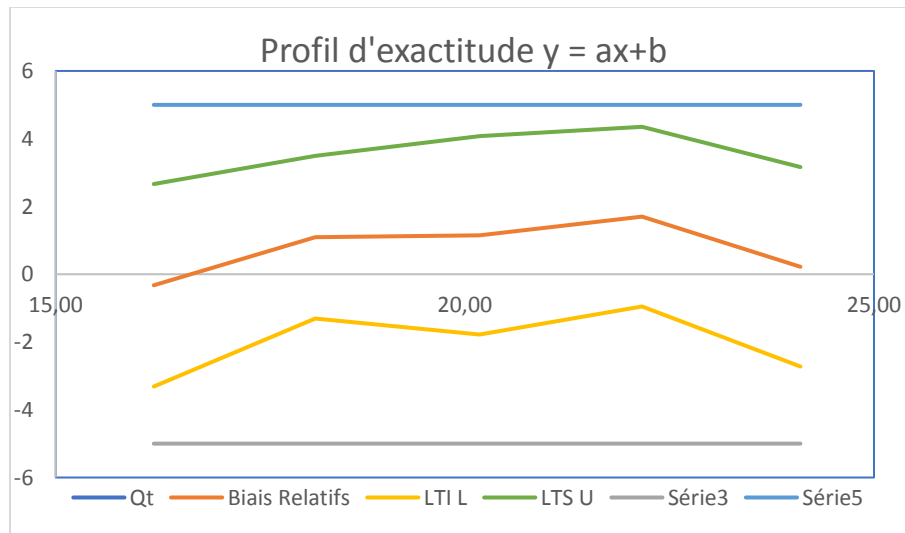


Figure 21. Les différents profils d'exactitude obtenus

7. Linéarité :

La linéarité est, dans un premier temps, évaluée par comparaison visuelle des représentations graphiques des réponses instrumentales Y en fonction des concentrations introduites X selon la fonction $Y = f(X)$.

Un modèle de régression linéaire a été ajusté sur les concentrations calculées en fonction des concentrations introduites dans le but d'obtenir l'équation suivante :

$$y = 1,0193x - 0,227$$

Tableau LI. Masses prédites en fonction des masses introduites

Niveau	Rep	Serie 1		Serie 2		Serie 3	
		Quant intro	Quant Préd	Quant intro	Quant Préd	Quant intro	Quant Préd
1	1	16,03	16,05	15,98	16,08	16,28	16,29
	2	16,09	16,17	16,35	16,38	16,49	16,46
	3	16,05	15,69	16,03	16,17	16,48	16,02
2	1	18,00	18,04	18,02	18,27	18,01	18,26
	2	18,05	18,25	18,12	18,59	18,26	18,43
	3	18,29	18,35	18,36	18,64	18,42	18,49
3	1	20,00	19,91	20,03	20,04	20,03	20,25
	2	20,33	20,52	20,05	20,45	20,14	20,41
	3	20,41	20,76	20,38	20,72	20,24	20,64
4	1	22,07	22,65	22,12	22,23	22,13	22,41
	2	22,03	22,63	22,35	22,58	22,19	22,69
	3	22,06	22,66	22,20	22,13	22,33	22,89
5	1	24,00	24,02	24,04	24,48	24,06	24,30
	2	24,06	23,69	24,10	24,12	24,11	24,77
	3	24,10	23,96	24,17	24,21	24,27	23,83

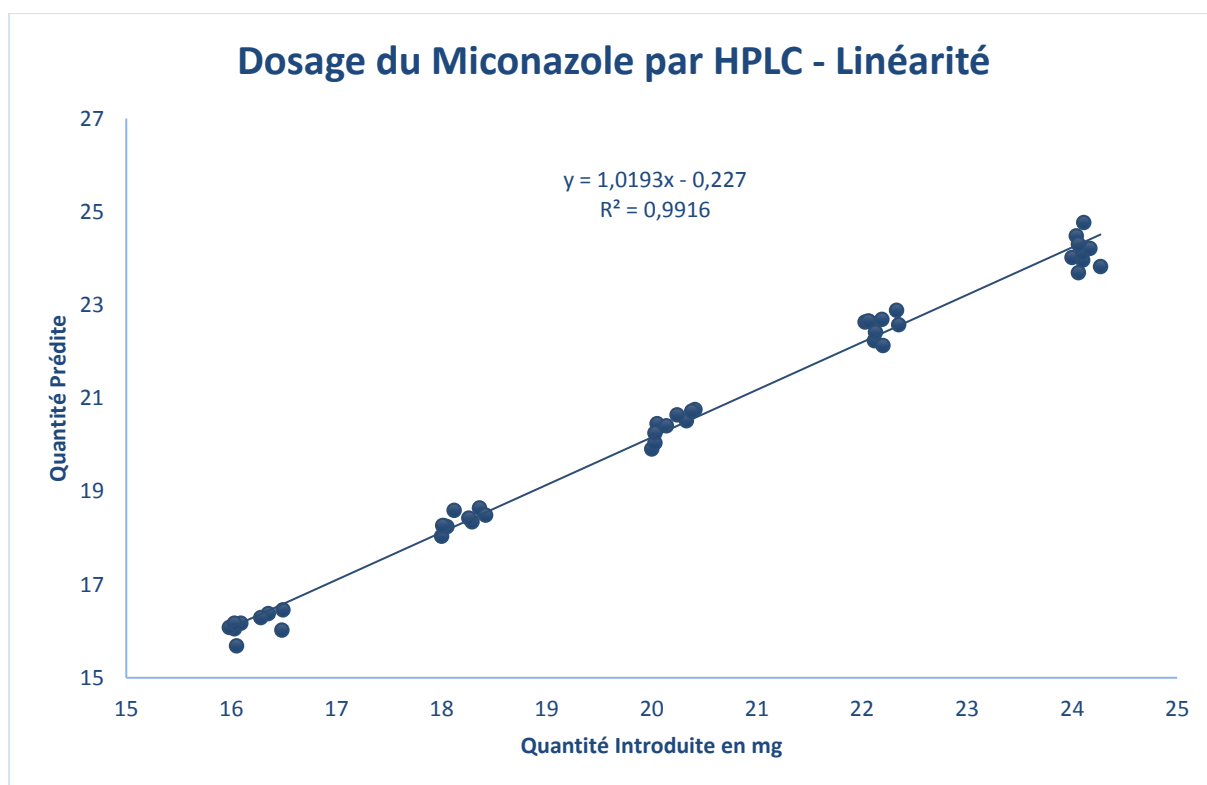


Figure 22 : Courbe de linéarité obtenue avec la fonction $y = ax + b$

Tableau LII. Paramètre de l'équation de de régression de linéarité

Pente	1,0193
Ordonnée à l'origine	-0,227
Erreur pente	0,01431019
Erreur ordonnée à l'origine	0,29130528

Afin de s'assurer que la droite obtenue par la méthode des moindres carré est linéaire, il est judicieux de vérifier la significative de la pente (Test Student), et l'ajustement du modèle (la vérification de l'ajustement est effectuée par la comparaison des pentes (méthode spécifique)).

Les résultats obtenus sont présentés dans le tableau suivant :

Tableau LIII. Résultats du traitement statistique de la linéarité

Comparaison de la pente avec 1	<i>t calculé</i>	1,34594063	Différence non significative
	$t^{\circ}(\alpha ; 43)$	2,0166922	
	<i>Condition</i>	t calculé < $t^{\circ}(\alpha ; 13)$	
Comparaison de l'ordonnée à l'origine avec 0	<i>t calculé</i>	0,77911722	Différence non significative
	$t^{\circ}(\alpha ; 43)$	2,0166922	
	<i>Condition</i>	t calculé < $t^{\circ}(\alpha ; 13)$	



Discussion

Discussion

1. Spécificité

a. Approche empirique :

Après analyses des différents chromatogrammes on déduit :

L'absence des pics aux temps de rétention du Miconazole dans les chromatogrammes obtenus à partir des solutions du diluant et du blanc ;

Les pics aux temps de rétention correspondants au Miconazole obtenus sur les chromatogrammes du SE et du SV d'un même niveau de concentration sont comparables.

Par conséquent la sélectivité de la méthode proposée est prouvée et donc la spécificité est acceptable.

b. Approche statistique :

Nous procédons à la comparaison des deux pentes et des deux ordonnées à l'origine.

- Comparaison des deux pentes :

$$t_{\text{calculé}} = 0,000218041$$

$$t^0(0,05 ; 21) \text{ lu sur la table de Student} = 2,079613845.$$

$t_{\text{calculé}} < t^0(0,05 ; 21)$ donc les deux pentes se sont pas significativement différentes au risque $\alpha = 5\%$ considéré, ce qui explique une absence d'erreur systématique.

La discussion des résultats obtenus est résumée dans le tableau suivant :

Tableau LIV. Signification des résultats des deux pentes et des deux ordonnées à l'origines entre elles

	Pente	Ordonnée à l'origine
t calculé	0,0002	8,52578E-06
t° (0,05, 21)	2,0796	2,079613845
Condition	t calculé < t° (0,05, 21)	
Conclusion	Pentes comparables : absence d'effet matrice	Ordonnées à l'origine comparables : absences d'erreurs systématiques

La spécificité de la méthode est confirmée par l'absence d'effet matrice et d'erreurs systématiques suite à la comparaison des deux pentes et des deux ordonnées à l'origine.

On peut dire que statiquement la méthode est spécifique avec un risque de 5%.

2. Le choix de la fonction de réponse

D'après la **figure 21** représentant les profils d'exactitude, nous sélectionnons l'une des fonctions d'étalonnage suivantes :

- Régression linéaire avec une équation $y = ax + b$.
- Régression linéaire avec une équation $y = ax$.
- Fonction logarithmique népérien $\ln y = \ln(x) + b$.
- Fonction racine carrée $\sqrt{y} = a\sqrt{x} + b$.

Le choix de cette fonction est basé sur l'étendue de l'intervalle de dosage et l'étroitesse de l'intervalle de tolérance, mais également à la simplicité de la fonction. De ce fait, on conclut que la fonction $y = ax + b$ remplit tous ces critères, et nous optons pour son utilisation dans la suite de l'étude

3. Critères de performance de la fonction de réponse choisie

L'estimation de la fidélité et de la justesse ne renseigne pas sur la qualité des résultats et ne permet pas de prendre une décision sur la validité de la méthode mais elle est une étape intermédiaire obligatoire pour pouvoir évaluer si la procédure analytique va vraisemblablement pouvoir ou non quantifier avec une exactitude suffisante chacune des quantités inconnues.

3.1. Justesse

La justesse (ou le biais) de la méthode au niveau de concentration est obtenue en calculant la différence entre la moyenne arithmétique des concentrations introduites et la moyenne des concentrations calculées.

Les biais relatifs des différents niveaux sont inférieurs à 2.5 %, et l'accord entre la valeur de la concentration moyenne prédite obtenue à partir des trois séries de validation et la valeur de la moyenne des concentrations théoriques considérée comme étant la valeur de référence est assez étroit pour tous les niveaux, on dit que la méthode est juste.

3.2. Fidélité

La fidélité de la méthode de dosage est exprimée par le coefficient de variation (% CV) obtenu en effectuant le rapport entre l'écart-type et la moyenne des réponses.

Le CV que nous avons obtenu à partir de la répétabilité et la fidélité intermédiaire de notre méthode, observé à tous les niveaux de concentration en utilisant les modèles d'étalonnage cités précédemment, sont inférieurs à 2.5 %. De ce fait les résultats confèrent à la méthode une bonne fidélité, c'est-à-dire que l'homogénéité des mesures de dosage faites par deux opérateurs distincts est conforme et le dosage reste indépendant de l'opérateur.

4. Critères de décision sur la validité de la méthode

4.1. Erreur totale :

Selon les résultats de l'erreur totale montrés dans le **tableau LV**, on juge que tous les niveaux de concentration sont inclus dans l'intervalle d'acceptabilité.

4.2. Profil d'exactitude :

La vérification de l'exactitude de la méthode est faite par rapport à un écart maximal pour l'intervalle de dosage où il est compris dans les limites d'acceptation fixées a priori 5%.

En se référant au profil d'exactitude élucidé dans la **figure 21**, on considère que la méthode mise au point dans ce présent travail est **valide**, car les limites de tolérance supérieure et inférieure n'interceptent pas avec les limites d'acceptabilité supérieure et inférieure.

Cela signifie que la méthode est capable de produire une proportion de 95% des résultats acceptables et seulement 5% des futures mesures d'échantillons inconnus peuvent être en dehors de ces limites.

Le domaine de validité de la méthode est donc compris entre les niveaux de concentrations 80% et 120%.

4.3.Limite de quantification

Les limites de quantification sont obtenues en calculant la plus petite et la plus grande concentration pour lesquelles les limites d'exactitude, c'est à dire les limites de l'intervalle de

tolérance attendu sont incluses dans la limite d'acceptabilité fixée à $\pm 5\%$. L'intervalle de dosage est l'intervalle compris entre les limites inférieure et supérieure de quantification où la procédure analytique atteint l'exactitude souhaitée.

- Limite inférieure de quantification (LQ Inf.) (mg/ml) = 0,032
- Limite supérieure de quantification (LQ Sup) (mg/ml) = 0,048

Les limites de quantification supérieure et inférieure sont définies ce qui montre que la méthode est validée. En effet, l'exactitude est validée dans les limites d'acceptation fixée à 5%, en conséquence nous pourrions conclure que la méthode est validée.

4.4.Linéarité

La linéarité de la méthode est vérifiée à partir de cinq niveaux de concentration (80%, 90%, 100%, 110%, 120%) avec trois répétitions indépendantes pour chaque niveau (n= 3).

La droite de régression linéaire est obtenue sous la forme $y = 1,0193x - 0,227$ où 1,0193 représente la pente de la droite, -0,227 l'ordonnée à l'origine, y représentant la concentration prédite et x la concentration introduite en mg/ml.

Pour toutes les séries de validation, une droite de régression a été ajustée sur les concentrations calculées par rapport aux concentrations introduites en appliquant le modèle de régression linéaire, pour lequel le coefficient de détermination R^2 vaut 0,9916, ce qui signifie que la variabilité totale de l'aire du pic est expliquée à 99,16% par la variabilité de la concentration de l'échantillon en solution.

La linéarité de la droite : concentrations prédites = f (concentrations introduites) est Confirmée par :

- Un coefficient de détermination acceptable $R^2 = 0,991$;
- Une pente significativement différente de zéro donc il existe une relation linéaire ;
- De plus elle est comparable à 1 au risque de 5% ($a = 1,01$) ;
- Une ordonnée à l'origine comparable à zéro au risque de 5% ($b = -0,22$).

5. Synthèse des résultats

La spécificité, la linéarité et l'exactitude de la méthode de dosage du Miconazole dans le gel à 2% par Chromatographie Liquide à Haute Performance (HPLC) mise au point dans le présent travail sont démontrés dans l'intervalle de dosage [0,032 ; 0,048] mg/ml avec une probabilité de confiance de 95 % dans les limites d'acceptation définies ± 5 %. Cela dit, 95% des futurs résultats fournis par la méthode analytique développée se situeront dans les limites d'acceptabilité et les limites de dosage.

La méthode s'est révélée concluante et valide avec les critères d'acceptation prédéfinis sur l'intervalle décrit.

L'utilisation de l'HPLC avec une détection dans le domaine de l'Ultraviolet comme méthode de dosage a permis d'obtenir des résultats exacts, précis et spécifiques (méthode séparative).



Conclusion



De nos jours, la validation des procédures analytiques est indispensable dans différents domaines qui génèrent des résultats de mesures. Elle figure parmi les mesures reconnues à l'échelle mondiale, comme faisant inévitablement partie d'une structure exhaustive d'assurance qualité.

Pourtant, bien que ce principe soit devenu substantiel à la gestion de la qualité au sein de l'industrie pharmaceutique, son application pratique n'est pas toujours facile.

Les résultats issus des méthodes d'analyse jouent un rôle primordial dans différents domaines, en réponse aux décisions qui sont prises sur leur base, telles que la détermination de la qualité des spécialités pharmaceutiques.

L'objectif de notre étude a été de mettre au point et de valider une méthode de dosage du miconazole dans le gel à 2%, et ce par chromatographie liquide à haute performance en utilisant le profil d'exactitude comme outil de décision.

En premier lieu, nous avons effectué un plan d'étalonnage pour générer un modèle d'étalonnage pour chaque série qui 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.

En troisième lieu, l'établissement des intervalles de tolérance apparié à des limites d'acceptation nous permet de tracer le profil d'exactitude. Le profil d'exactitude tracé à l'issue de ce travail caractérisant la validité de la méthode dans l'intervalle de concentration étudié [0,032 ; 0,048] mg/ml, avec une proportion $\beta=95\%$ de mesures dans les limites d'acceptations ($\pm 5\%$).

Nous convenons donc que les résultats obtenus dans cette étude ont répondu à toutes les exigences et performances spécifiques élaborées dans cette approche harmonisée ; ce qui atteste de la validité de la méthode utilisée et de son aptitude à être appliquée en routine par les laboratoires de contrôle qualité pour le dosage du miconazole dans le gel à 2%.

Après avoir réalisé ce mémoire de fin d'étude, nous pouvons envisager des perspectives potentielles de recherches car les résultats présentés dans le cadre de ce travail sont une petite partie de ce qui pourrait être fait dans le cadre de l'évaluation de la fiabilité des résultats obtenus par des méthodes analytiques. Il faut savoir que la validation de la méthode est le socle d'un système d'assurance qualité intégral. Néanmoins, il existe plusieurs autres questions qui n'ont pas été traitées et qui pourraient sans aucun doute faire l'objet de recherches futures, dont on cite l'étude de la Robustesse et de la Stabilité des solutions afin de compléter notre travail.

Ces travaux pourraient avoir une finalité commune qui est d'améliorer la confiance entre le consommateur et les acteurs économiques concernant les principales décisions prises à l'aide des méthodes analytiques.

A thick black L-shaped line forms a frame around the word 'Bibliographie'. It starts with a vertical line on the left, turns 90 degrees to a horizontal line at the top, and then turns 90 degrees again to a vertical line on the right, which ends with a horizontal line at the bottom.

Bibliographie

Bibliographie

- [1] « <https://go.drugbank.com/drugs/DB01110> ».
- [2] « Anne M. Baldeshwiler History of FDA good laboratory practices Pages: 157-161 29 Juillet 2003 ».
- [3] « The Association, Journal of the Association of Official Analytical Chemists, 1986 l'Université de Californie 12 août 2009 ».
- [4] « Feinberg M, Laurentie M. Validation des méthodes d'analyse quantitative par le profil d'exactitude. Numero special du cahier des techniques de l'Inra. 2010 ».
- [5] PubChem, « Miconazole ». <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/4189> (consulté le 9 juin 2022).
- [6] « Miconazole : substance active à effet thérapeutique », VIDAL. <https://www.vidal.fr/medicaments/substances/miconazole-2376.html> (consulté le 3 août 2022).
- [7] J. A. Davies, « Miconazole », in *xPharm: The Comprehensive Pharmacology Reference*, Elsevier, 2007, p. 1- 3. doi: 10.1016/B978-008055232-3.62184-1.
- [8] J. M. Van Cutsem et D. Thienpont, « Miconazole, a Broad-Spectrum Antimycotic Agent with Antibacterial Activity », *Chemotherapy*, vol. 17, n° 6, p. 392- 404, 1972, doi: 10.1159/000220875.
- [9] « Miconazole - ClinicalKey ». <https://www.clinicalkey.com/#!/content/book/3-s2.0-B9780444537171010829> (consulté le 9 juin 2022).
- [10] « Miconazole (PIM 349) ». <https://incchem.org/documents/pims/pharm/miconazo.htm> (consulté le 9 juin 2022).
- [11] « Emaile. C. qualification d'une ligne de conditionnement. Thèse de doctorat de l'université de Nantes, 2010 ».
- [12] « ISO - ISO/IEC 17025 — Laboratoires d'étalonnages et d'essais », ISO. <https://www.iso.org/fr/ISO-IEC-17025-testing-and-calibration-laboratories.html> (consulté le 10 juin 2022).
- [13] O. of the Commissioner, « U.S. Food and Drug Administration », FDA, 6 janvier 2022. <https://www.fda.gov/home> (consulté le 10 juin 2022).
- [15] « ICH Q2 (R1), Validation of analytical procedures text and methodology, ICH Harmonised Tripartite Guideline, Current Step 4 version, Parent Guideline dated 27 October 1994 (Complementary Guideline on Methodology dated 6 November 1996 incorporated in

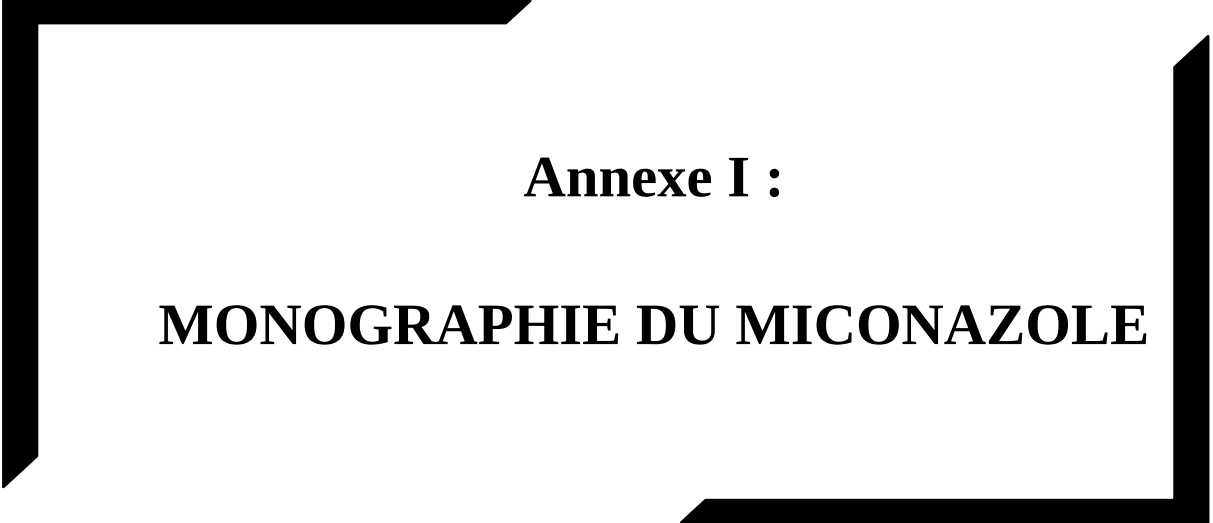
- November 2005) »,
- [16] « STP Pharma pratiques volume 21-N°2 -mars-avril 2011. Analyse des performances d'une méthode analytique, Evaluation des risques lors d'une utilisation en routine - Avantages et inconvénients des différentes approches. << G. de Fontenay, J. Respaud, P. Puig, C. Lemaire »,
- [17] « Guidance for Industry: Bioanalytical Methods Validation for Human Studies (Draft guidance), U.S. Department of Health and Human Services, Food and Drug Administration, Center for Drug Evaluation and Research (CDER), Décembre 1998 ».
- [18] « Hubert, P., 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, et L. Valat (2003). Validation des procédures analytiques quantitatives harmonisation des démarches. STP PHARMA PRATIQUES ».
- [19] « FEINBERG M. Validation des méthodes d'analyse quantitatives au moyen du profil d'exactitude. Dossier TECHNIQUES DE L'INGENIEUR, l'expertise technique et scientifique de référence ».
- [20] « Commission SFSTP, Hubert Ph, Nguyen-Huu J.J, Boulanger E, Chapuzet E, et al.2006. Validation des procédures analytiques quantitatives : Harmonisation des démarches Partie II – Statistiques ».
- [21] « G.De Fontenay, J.Respaud, P.Puig, C.Lemaire , ST Pharmapratique, Analyse des performances d'une méthode analytique, Evaluation des risques lors d'une utilisation en routine Mars-Avril 2011 ».
- [22] « Mimoun N, Sahraoui N. Validation analytique d'une méthode de dosage du diclofénac de sodium dans les suppositoires de 100 mg par HPLC [thèse]. Tizi Ouzou, université Mouloud Mammeri ; 2016 »,
- [23] « Hubert Ph, Nguyen JJ, Boulanger B, Chapuzet E, Chiap P, Cohen N, et al. SFSTP ».
- [24] « Rozet E. Improvement of the predictive character of test results issued from analytical methods life cycle, Thèse présentée en vue de l'obtention du grade de Docteur en Sciences Pharmaceutiques, Université de Liège, 2007-2008 ».
- [25] « Thèse. Présentée en vue d obtenir le diplôme de. DOCTORAT en Sciences Pharmaceutiques. Par. Mr. Abderrahim Bouabidi - PDF Free Download ». <https://docplayer.fr/72475304-These-presentee-en-vue-d-obtenir-le-diplome-de-doctorat-en-sciences-pharmaceutiques-par-mr-abderrahim-bouabidi.html> (consulté le 10 juin 2022).
- [26] « P. Hubert, J.J. Nguyen-Huu, B. Boulanger, E. Chapuzet, N. Cohen, P.A. Compagnon et al, Validation des procédures analytiques quantitatives : Harmonisation des démarches,

Partie II – Statistiques, Commission SFSTP, STP Pharma Pratiques - volume 16 - N° 1 - janvier/février 2006 ».

- [27] « Feinberg.M-LABO-STAT-Guide de validation des méthodes d'analyse; Lavoisier Edition Tec & Doc 2009 ».
- [28] « Isabelle Pinguet. Validation analytique : application de la procédure SFSTP 2003-2006 au domaine de la phytothérapie. Sciences pharmaceutiques. 2015. »
- [29] K. Garmoum, « Validation des méthodes d'analyse quantitative par le profil d'exactitude », Consulté le: 10 juin 2022. [En ligne]. Disponible sur: https://www.academia.edu/25887763/Validation_des_m%C3%A9thodes_danalyse_quantitative_par_le_profil_dexactitude
- [30] « Mamou m, Thèse de doctorat en sciences médicales : Stratégies de validation de nettoyage en industrie pharmaceutique : nouvelles recommandations et applications aux équipements de fabrication dans un site multiproduits, Algérie, université Mouloud Mammeri de tizi Ouzou ».
- [31] « <https://chimieanalytique.com/chromatographie-liquide-haute-performance-hplc/> . »

A large, thick, black L-shaped bracket or frame that encloses the word 'Annexes'. It starts with a vertical line on the left, a horizontal line at the top, and another vertical line on the right, with the bottom horizontal line missing.

Annexes

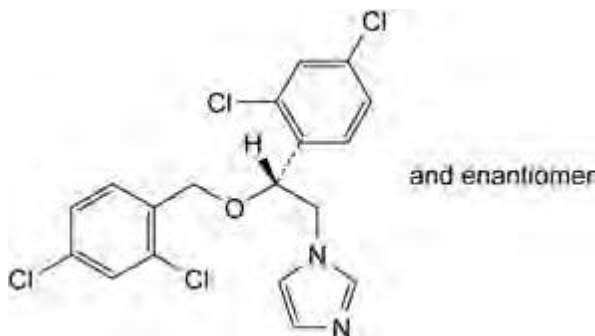


Annexe I :

MONOGRAPHIE DU MICONAZOLE

ANNEXE I : MONOGRAPHIE DU MICONAZOLE

Miconazolum

C₁₈H₁₄Cl₄N₂O

Mr 416.1

[22916-47-8]

1. Definition

1-[(2RS)-2-(2,4-Dichlorophenyl)-2-[[2-(2,4-dichlorophenyl)methoxy]ethyl]-1H-imidazole.

Teneur: 99,0 pour cent à 101,0 pour cent (substance sèche).

2. Caractéristiques

Aspect : poudre blanche ou presque blanche.

Solubilité : très légèrement soluble dans l'eau, librement soluble dans le méthanol, soluble dans l'éthanol (96 pour cent).

Il présente un polymorphisme.

3. Identification

Première identification : A, B.

Deuxième identification : C, D.

A. Point de fusion : 83 °C à 87 °C.

B. Spectrophotométrie d'absorption infrarouge.

Comparaison : miconazole CRS.

C. Point de fusion.

Détermination A : déterminer le point de fusion de la substance à examiner.

Résultat A : 83 °C à 87 °C.

Détermination B : mélanger à parts égales la substance à examiner et le miconazole CRS, et déterminer le point de fusion du mélange.

Résultat B : la différence absolue entre le point de fusion du mélange et la valeur obtenue lors de la détermination A n'est pas supérieure à 2 °C.

D. A 30 mg dans un creuset en porcelaine, ajouter 0,3 g de carbonate de sodium anhydre R. Chauffez à feu nu pendant 10 minutes.

Laissez refroidir. Récupérer le résidu avec 5 mL d'acide nitrique dilué R et filtrer.

A 1 mL du filtrat, ajouter 1 mL d'eau R. La solution donne la réaction (a) des chlorures.

4. Tests

Solution S : Dissoudre 0.1 g dans du méthanol R et diluer à 10 mL avec le même solvant.

Aspect de la solution : La solution S est transparente et n'est pas plus intensément colorée que la solution de référence Y6.

Rotation optique: - 0,10° à + 0,10°, déterminée sur la solution S.

Substances apparentées : Chromatographie en phase liquide.

Solution d'essai : A 0,100 g de la substance à examiner, ajouter 3,0 mL d'acétonitrile R et 3,2 mL de méthanol R et agiter jusqu'à dissolution complète. Diluer ensuite à 10,0 mL avec une solution de 15.8 g/L d'acétate d'ammonium R.

Solution de référence (a) : Dissoudre 2,5 mg de miconazole CRS et 2,5 mg de nitrate d'éconazole CRS dans la phase mobile et diluer à 100 mL avec la phase mobile.

Solution de référence (b) : Diluer 1.0 mL de la solution de test à 100.0 mL avec la phase mobile. Diluer 5.0 mL de cette solution à 20.0 mL avec la phase mobile.

Colonne

- taille : l = 0,10 m, Ø = 4,6 mm ;

- phase stationnaire : gel de silice octadecylsilyl coiffé en bout pour la chromatographie R (3 µm).

Phase mobile : dissoudre 6,0 g d'acétate d'ammonium R dans un mélange de 300 mL d'acétonitrile pour la chromatographie R, 320 mL de méthanol R1 et 380 mL d'eau pour chromatographie R.

Débit : 2 mL/min.

Détection : spectrophotomètre à 235 nm.

Équilibration : avec la phase mobile pendant environ 30 min.

Injection : 10 µL

Temps d'exécution : 1,2 fois le temps de rétention du miconazole.

Temps de rétention : éconazole = environ 10 min ; miconazole = environ 20 min.

Adaptation au système : solution de référence (a) :

- résolution : minimum 10 entre les pics dus à l'éconazole et au miconazole ; si nécessaire, ajuster la composition de la phase mobile.

Limites :

- impuretés A, B, C, D, E, F, G : pour chaque impureté, pas plus que l'aire du pic principal dans le chromatogramme obtenu avec la solution de référence (b) (0,25 pour cent) ;

- total : pas plus de deux fois la surface du pic principal dans le chromatogramme obtenu avec la solution de référence (b) (0,5 pour cent) ;

- limite de non-respect : 0,2 fois la surface du pic principal du chromatogramme obtenu avec la solution de référence (b) (0,05 pour cent).

Perte à la dessiccation : 0,5 pour cent au maximum, déterminé sur 1.000 g par séchage sous vide à 60 °C pendant 4 h.

Cendres sulfatées : 0,1 pour cent au maximum, déterminé sur 1,0 g.

5. Essai

Dissoudre 0,300 g dans 50 ml d'un mélange de 1 volume de d'acide acétique anhydre R et de 7 volumes de méthyl éthyl cétone R.

En utilisant 0,2 mL de solution de naphтолbenzéine R en tant qu'indicateur, titrer avec de l'acide perchlorique 0,1 M jusqu'à ce que la couleur passe du jaune orangé au vert.

1 mL d'acide perchlorique 0.1 M est équivalent à 41.61 mg de C₁₈H₁₄Cl₄N₂O.

6. Stockage

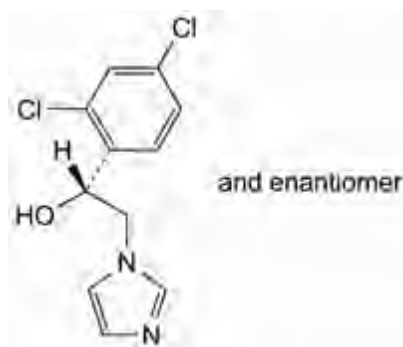
A l'abri de la lumière.

7. Impuretés

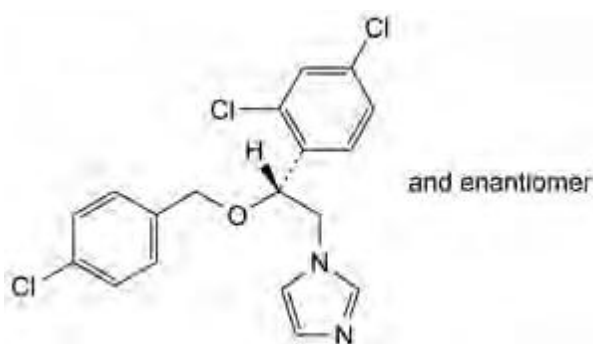
Impuretés spécifiées : A, B, C, D, E, F, G.

Autres impuretés détectables (les substances suivantes seraient, si elles sont présentes à un niveau suffisant, détectées par l'un ou l'autre des tests de la monographie. Elles sont limitées par le critère d'acceptation général pour les impuretés autres/non spécifiées et/ou par la monographie générale Substances à usage pharmaceutique (2034).

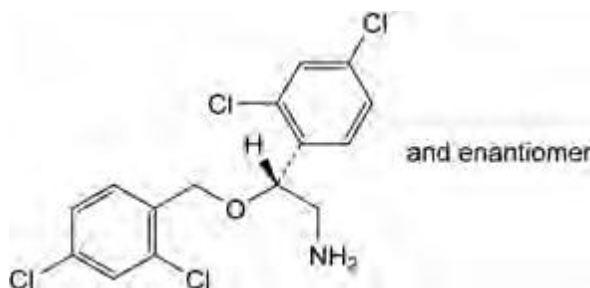
Il n'est donc pas nécessaire d'identifier ces impuretés pour la démonstration de la conformité.



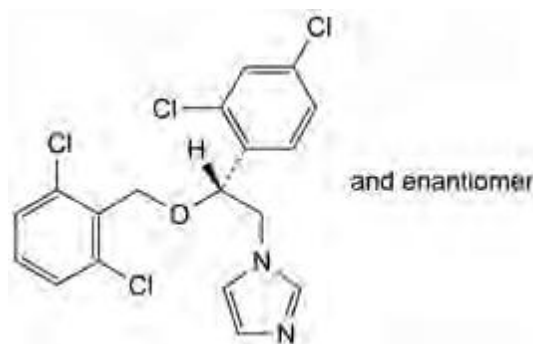
A. (1*RS*)-1-(2,4-dichlorophenyl)-2-(1*H*-imidazol-1-yl)ethan-1-ol,



B. 1-[(2*RS*)-2-[(4-chlorophenyl) methyl]oxy]-2-(2,4-dichlorophenyl)ethyl]-1*H*-imidazole (econazole),

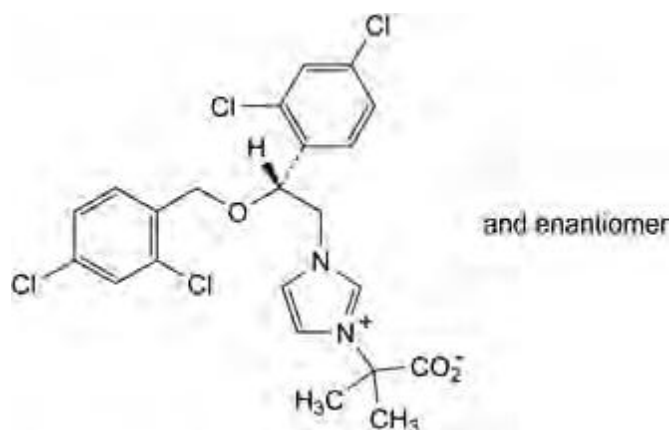


C. (2*RS*)-2-(2,4-dichlorophenyl)-2-[(2,4-dichlorophenyl) methyl]oxyethan-1-amine,

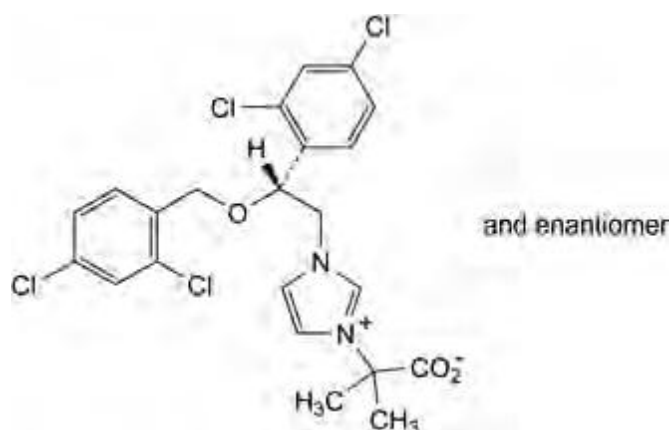


D. 1-[(2*RS*)-2-(2,4-dichlorophenyl)-2-[(2,6-dichlorophenyl)methyl]oxy]ethyl]-1*H*-imidazole

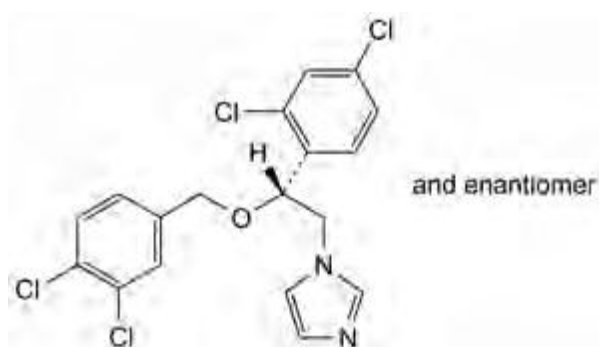
(isoconazole),



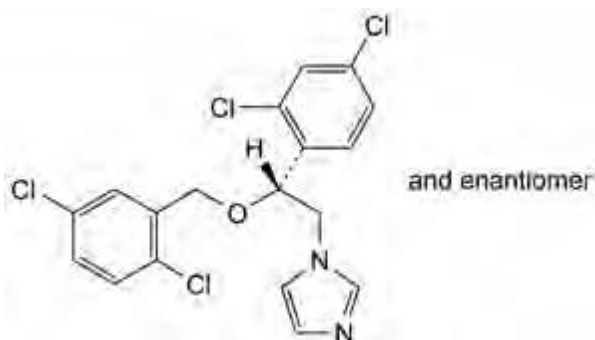
D. 2-[1-[(2*RS*)-2-(2,4-dichlorophenyl)-2-[(2,4-dichlorophenyl)methyl]oxy]ethyl]-1*H*-imidazol-3-ium-3-yl]-2-methylpropanoate,



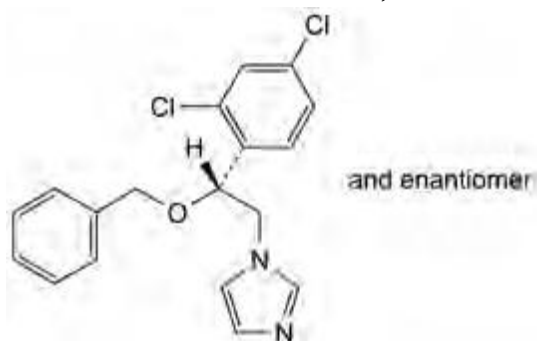
E. 2-[1-[(2*RS*)-2-(2,4-dichlorophenyl)-2-[(2,4-dichlorophenyl)methyl]oxy]ethyl]-1*H*-imidazol-3-ium-3-yl]-2-methylpropanoate,



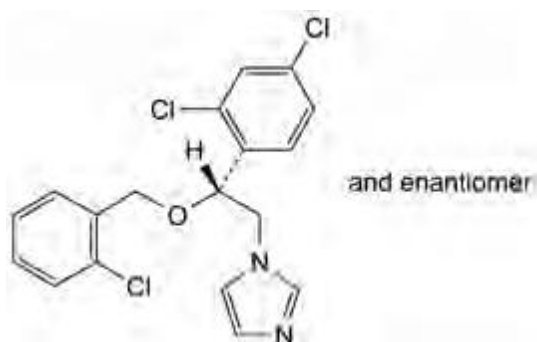
F. 1-[(2*RS*)-2-(2,4-dichlorophenyl)-2-[(3,4-dichlorophenyl)methyl]oxy]ethyl]-1*H*-imidazole,



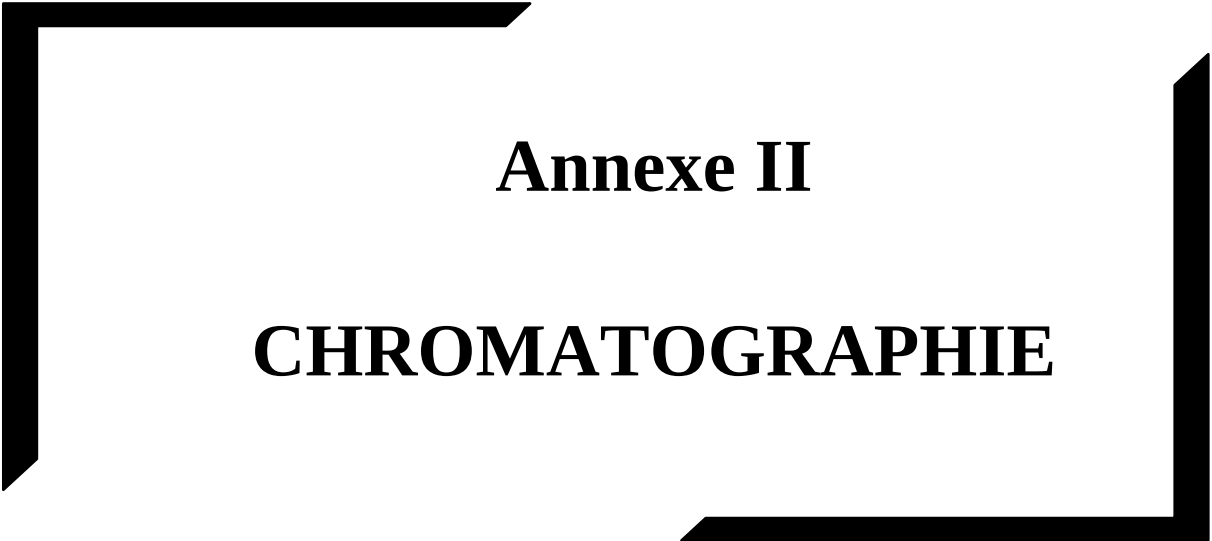
G. 1-[(2*RS*)-2-(2,4-dichlorophenyl)-2-[(2,5-dichlorophenyl)methyl]oxy]ethyl]-1*H*-imidazole,



H. 1-[(2*RS*)-2-(benzyloxy)-2-(2,4-dichlorophenyl)ethyl]-1*H*imidazole,



I. 1-[(2*RS*)-2-[(2-chlorophenyl)methyl]oxy]-2-(2,4-dichlorophenyl)ethyl]-1*H*-imidazole.

A thick black L-shaped frame surrounds the text. It starts with a horizontal line on the left, then a vertical line on the left side, and ends with a horizontal line on the right side.

Annexe II

CHROMATOGRAPHIE

Annexe II : Chromatographie**1. Introduction**

La chromatographie permet la séparation ou la purification d'un ou de plusieurs composés d'un mélange en vue de leur identification et de leur quantification.

La Chromatographie Liquide à Haute Performance (HPLC) est principalement employée dans le domaine de la chimie analytique comme outil scientifique majeur et, elle a permis de réaliser des analyses qui n'étaient auparavant pas possible avec les techniques sur couche mince ou en phase gazeuse.

A l'origine la chromatographie en phase liquide se faisait sur des colonnes en verre. Le liquide traversait la phase stationnaire par gravité ou sous faible pression. Puis pour augmenter le débit, des manipulations ont été réalisées sous pression plus forte. C'est ce que l'on a appelé la chromatographie liquide sous haute pression (HPLC). Très rapidement le P de pression est devenu le P de performance lorsque l'on a optimisé la technique (diminution de la taille de particules de la phase stationnaire, régularité de cette phase...) [31].

2. Principe

Les composés à séparer (solutés) sont mis en solution dans un solvant. Ce mélange est introduit dans la phase mobile liquide (éluant). Suivant la nature des molécules, elles interagissent plus ou moins avec la phase stationnaire dans un tube appelé colonne chromatographique.

La phase mobile poussée par une pompe sous haute pression, parcourt le système chromatographique.

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

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

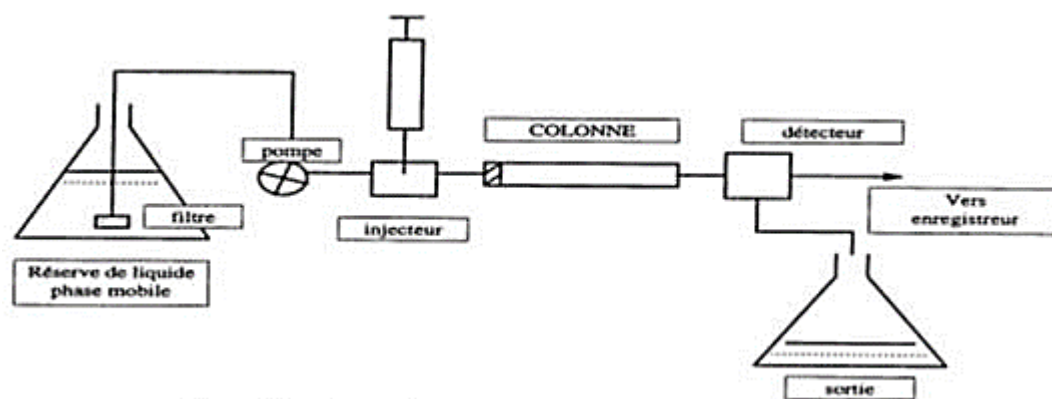


Figure 23. Principe de l'HPLC.

3. Appareillage :

Une installation HPLC comporte divers modules : un réservoir à solvant contenant la phase mobile, un système de pompage permettant d'effectuer des éluions graduées, un injecteur, une colonne, un détecteur et un système d'acquisition des données.

Ces modules sont reliés entre eux par l'intermédiaire de canalisations de très faible diamètre interne (0.1mm) pour permettre l'écoulement de la phase mobile. Elles peuvent être en acier.

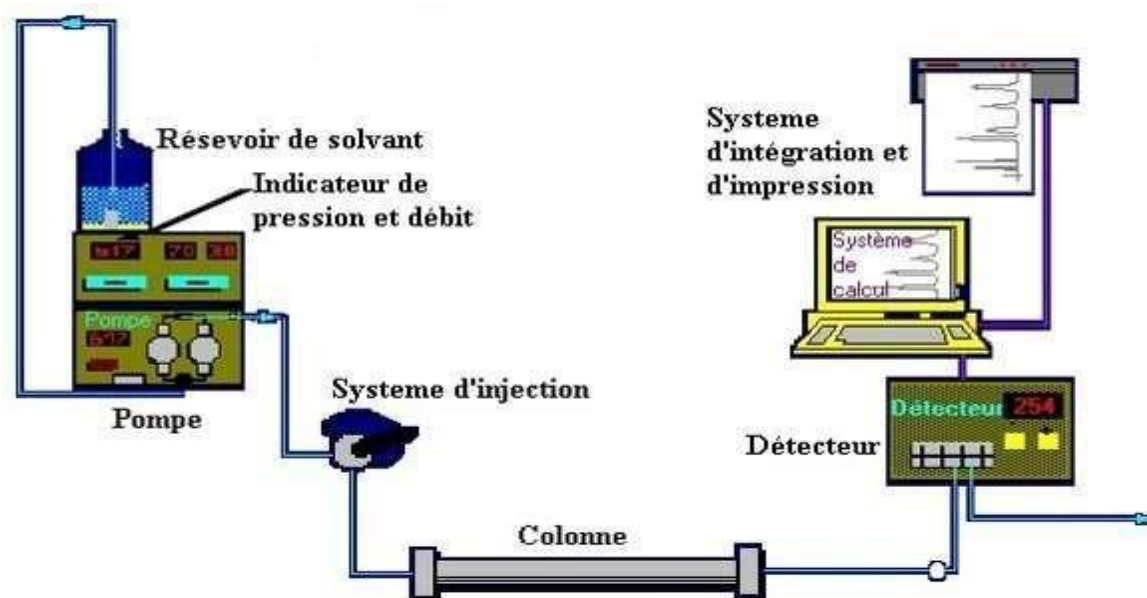


Figure 24. Schéma des principaux modules d'une chaîne HPLC [31]

3.1. Réservoir de la phase mobile (éluant)

C'est un flacon en verre ou acier inoxydable d'un volume de 0.5 à 2L dans lequel plonge un tube avec une extrémité filtrante (éliminer les poussières), il est parfois muni d'un système de dégazage (barbotage de gaz inerte) [31].

3.2. Pompe

Elle délivre en continu la phase mobile. Elle est définie par la pression qu'elle permet d'atteindre dans la colonne, son débit, et la stabilité du flux. Actuellement les paramètres d'une pompe sont :

- Débit : 0,01 à 10 ml/min
- Stabilité < 1% (<0,2% pour des chromatographies d'exclusion diffusion)
- Pression maximale > 350 bars

Certaines sont pilotées par informatique (bien utile lors de l'utilisation de gradient d'élution [31].

3.3. Injecteur

Le type d'injecteur le plus couramment utilisé comporte une vanne à boucle d'échantillonnage d'une capacité fixe (10, 20, 50 µl..). Cette boucle permet d'introduire l'échantillon sans modifier la pression dans la colonne.

Elle possède deux positions : la première permet le remplissage (chargement) de la boucle d'injection de volume fixe, la seconde permet la mise en circulation (injection) de l'échantillon dans le système chromatographique.

Le remplissage de la boucle d'injection se fait à l'aide d'une seringue [31].

3.4. Colonne

En mode analytique, les colonnes en inox ont généralement un diamètre interne de 4,6mm. La longueur est de 5, 10, 15, ou 25cm. Le remplissage (en silice, silice greffée ou particules polymériques) a une granulométrie de 3, 5, ou 10µm. Le diamètre interne d'une colonne est usuellement de 4 ou 4,6 mm. Si des substances pures doivent être collectées en fin de chromatogramme des colonnes de gros diamètre seront nécessaires [31].



Figure 25 : Colonnes d'appareil d'HPLC [31]

3.5. Détecteurs

Le détecteur suit en continu l'apparition des solutés. Pour détecter, on utilise différents phénomènes physico-chimiques. Le signal obtenu est enregistré en fonction du temps.

Le détecteur le plus utilisé en HPLC est un spectrophotomètre d'absorption UV-visible (190- 600 nm) relié à la sortie de colonne.

Il existe d'autres détecteurs :

- Réfractomètre différentiel.
- UV à barrette de diodes.
- Electrochimique.
- Fluorimétrie...

Ainsi que différents types de couplage :

- Spectrométrie infrarouge.
- Spectrométrie de masse.
- Résonance Magnétique Nucléaire... [31].

3.6. Intégrateur

Il s'agit d'un petit ordinateur qui récupère les données issues du détecteur, trace les chromatogrammes et intègre la surface des pics.

La chromatographie est une méthode de séparation utilisée en vue d'un dosage.

Une intégration consiste à mesurer la surface sous un pic mais avant tout chercher à séparer correctement les pics avant de les intégrer.

La détection d'un pic chromatographique par l'intégrateur, dépend de deux paramètres :

- La largeur attendue des pics.
- Le seuil d'intégration (sensibilité).

La largeur de pic est à peu près prévisible en fonctions de la technique d'analyse et des conditions opératoires. Elle détermine la fréquence d'échantillonnage du signal. Le pic est alors découpé en tranches. Le seuil d'intégration est la valeur du signal à partir de laquelle le calculateur repère un début de pic [31].

4. Application de la chromatographie liquide haute performance à l'analyse

Les applications sont innombrables. La méthode permet de séparer des composés de masses molaires variables (de 100 à 200), de nature chimique différentes et même des isomères. L'HPLC est un très bon complément de la chromatographie en phase gazeuse pour :

- Les substances peu volatiles : molécules de masse molaire >300 ;
- Substances thermolabiles : comme le médicament issu de la biotechnologie ou les composés d'origine biologique ;
- Les substances ionisées.

L'HPLC couvre tous les domaines d'application. Citons dans les domaines de l'agro-alimentaire et de la pharmacie [31].

4.1. Analyse des chromatogrammes

Un chromatogramme est un diagramme montrant l'évolution du signal du détecteur (proportionnel à la concentration en soluté) en fonction du temps d'élution (plus rarement du volume d'élution).

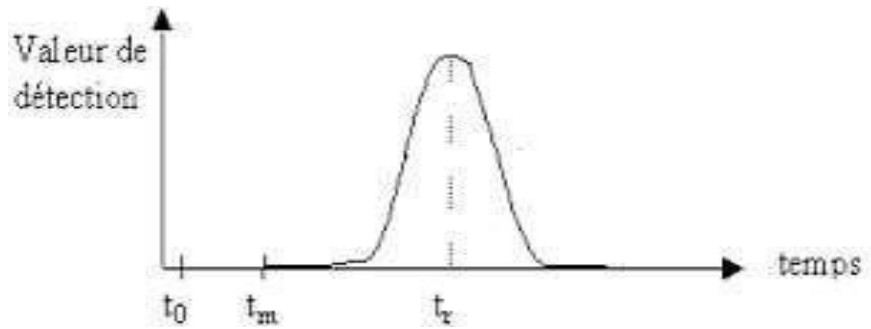


Figure 26. Chromatogramme.

- t_0 : est le temps du début de l'injection [31] ;
- t_m : temps mort ; temps mis par un composé non retenu par la phase stationnaire pour traverser la colonne (temps passé dans la phase mobile) ;
- t_r : temps de rétention; temps mis par un soluté pour traverser la colonne. C'est le temps passé dans la phase stationnaire et dans le volume mort de la colonne. Ce temps est caractéristique d'un soluté dans des conditions d'analyse données. La surface du pic est en fonction de la quantité du constituant dont il est la trace ;
- t_r' : temps de rétention réduit ; temps passé par un soluté dans la phase stationnaire, soit :

$$t_r' = t_r - t_m$$

- $\omega_{1/2}$: la largeur du pic ; mesurée à mi-hauteur : exprimée en unité de temps ;
- La largeur du pic à la base exprimée en unité de temps : déterminée par l'intersection des tangentes au point d'inflexion à la courbe gaussienne et de la ligne de base ;
- h : la hauteur du pic ;
- Ecart type relatif des aires du pic :

$$\sigma = \frac{1}{16} \sum (y_i - y')^2$$

Avec :

y_i est l'air du pic pour l'injection i donné par l'intégration du pic.

$Y' = 1/16 (y_1 + y_2 + \dots + y_6)$ la moyenne des aires du pic.

On peut calculer l'écart type relatif en pourcentage :

$$\% \text{ RSD} = 100\sigma/Y'$$

4.2. Analyse qualitative

- **Coefficient de partage K** : (dans le cas de chromatographie de partage)

A un instant donné, le soluté est à la concentration C_m dans la phase mobile et C_s dans la phase stationnaire. Leur rapport à l'équilibre est appelé coefficient de partage K :

$$K = \frac{C_s}{C_m}$$

Ce coefficient est en fonction de trois types d'affinité :

- Celle entre le soluté et la phase mobile ;
- Celle entre le soluté et la phase stationnaire ;
- Celle entre les phases mobile et stationnaire [31].
- **Le facteur de capacité K'** (ou facteur de rétention)

C'est le rapport entre la quantité du soluté dans la phase stationnaire et la quantité de soluté dans la phase mobile.

$$K' = \frac{C_s \times V_s}{C_m \times V_m} = K \times \frac{V_s}{V_m}$$

V_s : volume de la phase stationnaire

V_m : volume de la phase mobile ou volume mort

K' : est aussi déterminé expérimentalement par le rapport de temps de rétention réduit sur le temps mort :

$$K' = \frac{t_r - t_m}{t_m}$$

4.3. Notion d'efficacité ou performances d'une colonne

La largeur d'un pic est caractéristique de l'efficacité de la séparation : plus le pic est fin plus la chromatographie est efficace. L'efficacité est exprimée par :

- **Le nombre de plateaux théoriques Nth** : contenus dans la colonne (nombre des opérations que subit le soluté pour traverser la colonne chromatographique). Plus N est grande plus la colonne est efficace elle est traduite par la finesse des pics obtenus. Sa détermination est réalisée pour chaque composé par la relation suivante :

$$N_{th} = 5.54 \left(\frac{t_r}{w_{1/2}} \right)^2 = 16 \left(\frac{t'_r}{w} \right)^2$$

t_r : temps de rétention ; $w_{1/2}$: largeur du pic à mi-hauteur ; w : largeur du pic à la base ;

Remarque :

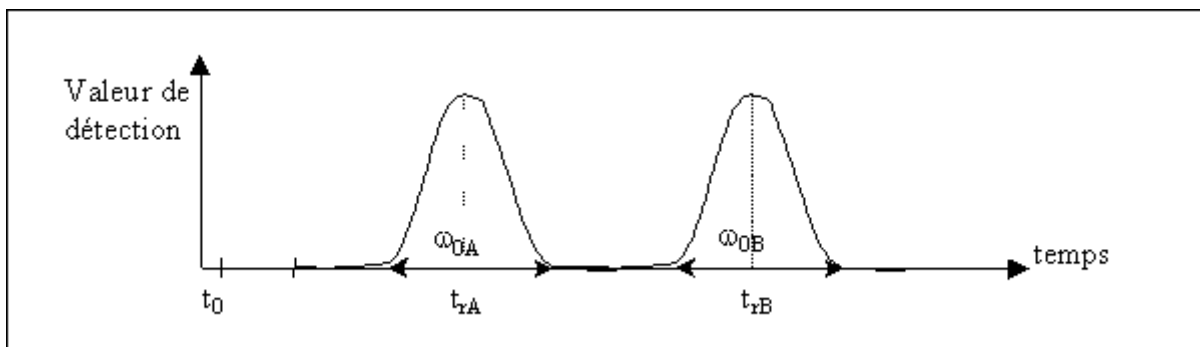
N_{th} est très utilisé en HPLC. Pourtant il serait plus judicieux d'utiliser N_{eff} (nombre de plateaux effectifs) puisqu'il dépend vraiment du temps passé dans la phase stationnaire.

$$N_{eff} = 5.54 \left(\frac{t_r - t_m}{w_{1/2}} \right)^2$$

Expérimentalement il est difficile à déterminer d'où l'utilisation de N_{th} .

- **La hauteur équivalente à un plateau théorique : HEPT**, qui est défini comme :

$$HEPT = \frac{L}{N_{th}}$$



L : Longueur de la colonne

N_{th} : Nombre de plateaux théoriques

4.4. Qualité de la séparation :

La séparation entre les pics chromatographiques se base sur plusieurs critères :

- **La sélectivité (α)** : entre 2 pics A et B, elle mesure la capacité de la colonne à séparer les maximums des pics. Plus elle est supérieure à 1, plus les temps de rétention sont éloignés.

Elle est définie comme le rapport des temps de rétention réduits.

$$\alpha = \frac{t_{rB}}{t_{rA}}$$

En pratique α toujours ≥ 1 car on choisit $t_{rB} > t_{rA}$

$\alpha = 1$ pas de séparation

$\alpha > 1$ séparation plus facile que α augmente

α est toujours supérieur 1 car on choisit ($t'_{rB} > t'_{rA}$). Par convention, on choisit toujours les pics pour que l'on ait un α supérieur à 1.

- **La résolution (R)**

Elle quantifie la qualité de la séparation en caractérisant le fait qu'il y'ai ou non chevauchement de 2 pics contigus.

$$R = \frac{(t'_{rB} - t'_{rA})}{(W_{0B} + W_{0A})}$$

$R < 1$: mauvaise résolution ;

$1 < R < 1,4$: résolution acceptable

$1,4 < R < 1,6$: résolution optimale

$R > 1,6$: résolution trop bonne car le temps d'analyse est rallongé.

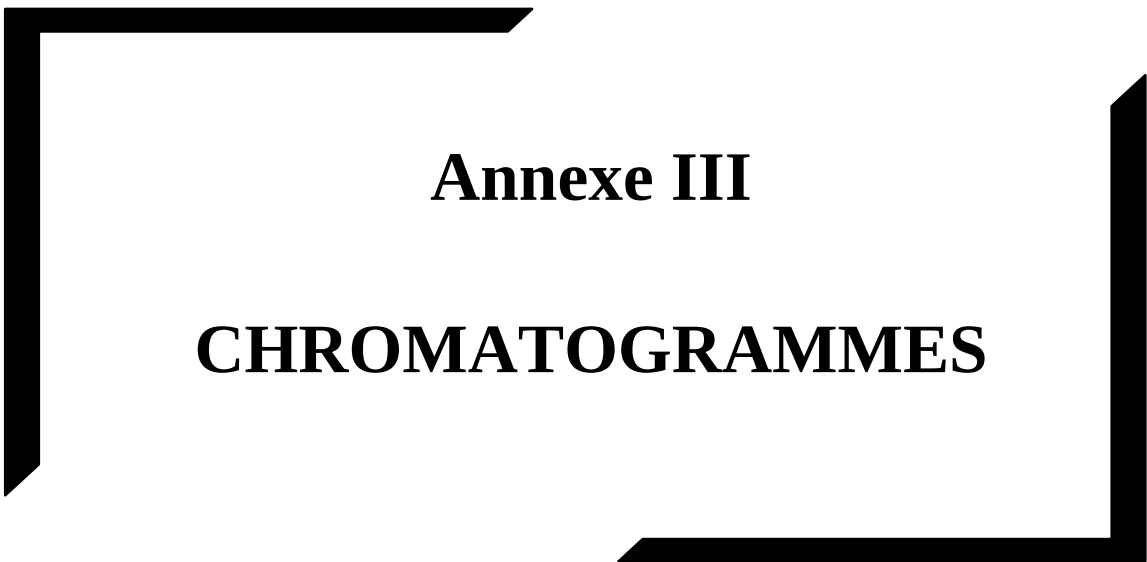
4.5. Notion de pression :

A l'intérieur d'une colonne la phase mobile frotte sur les parois de la colonne mais aussi sur les particules de phase stationnaire. Ces frottements définissent la résistance à l'écoulement.

Les particules de phase stationnaire sont sphériques. Si l'on divise leur diamètre par 10, on diminue leur surface d'un facteur 100 et leur volume d'un facteur 1000. On peut donc placer dans la colonne 1000 fois plus de particules et donc augmenté de 10 fois la surface en contact avec la phase mobile. La résistance à l'écoulement est donc augmentée.

En conséquence, pour maintenir le débit constant dans la colonne il faut augmenter la pression plus la granulométrie de la phase stationnaire est faible.

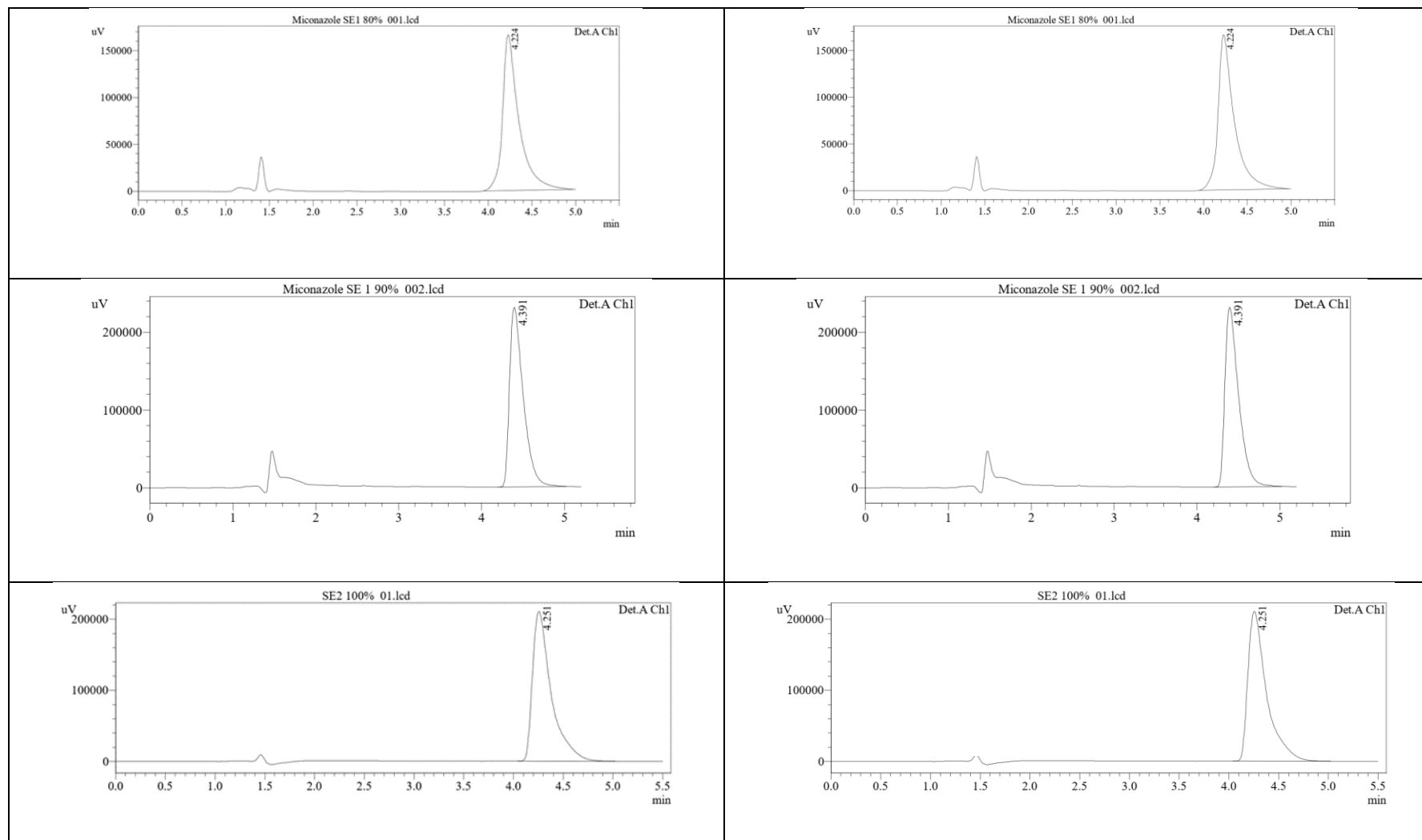
En HPLC on travaille, en tête de colonne, à des pressions entre 20 et 150 bars.

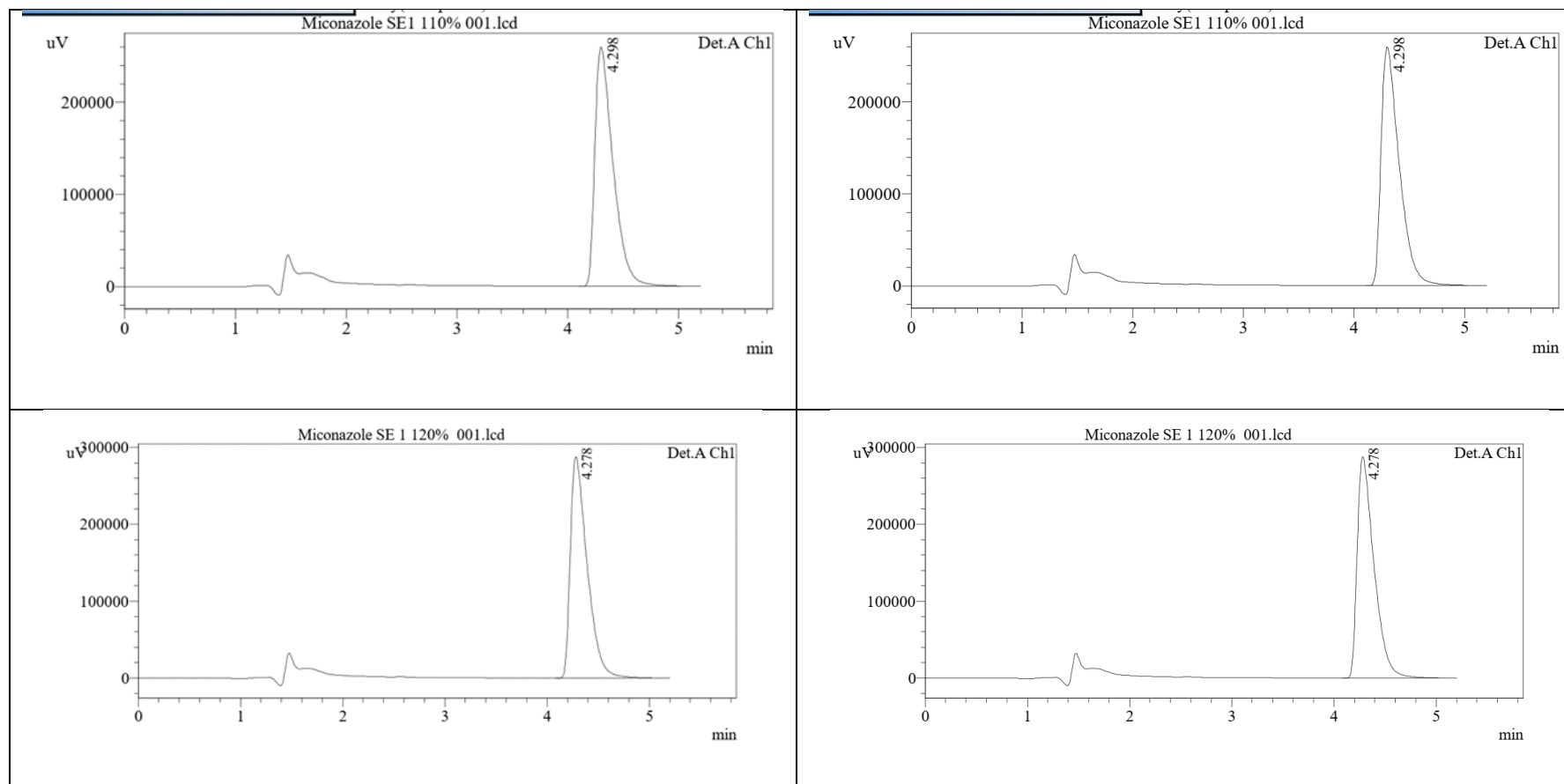
A thick black L-shaped frame surrounds the text. It starts with a vertical line on the left, followed by a horizontal line extending to the right, then a vertical line on the right, and finally a horizontal line extending to the left, closing the frame around the text.

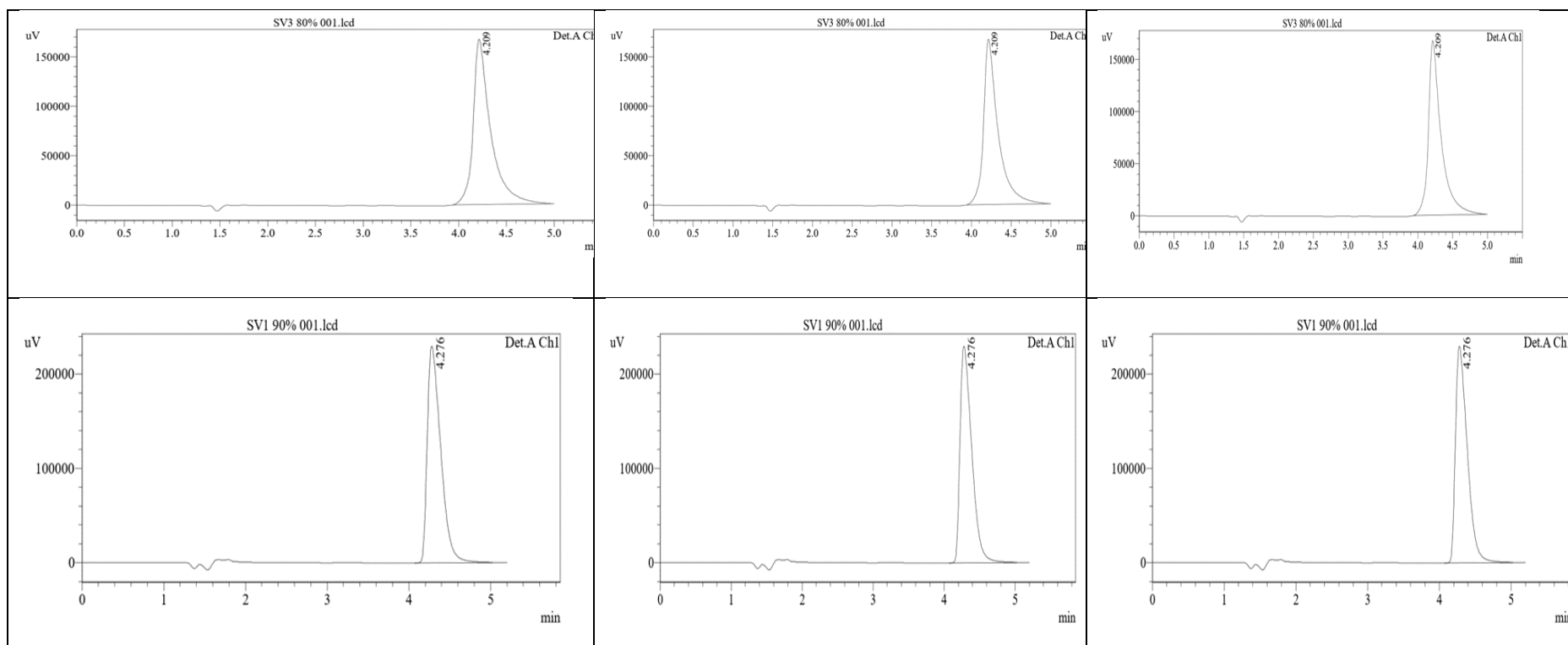
Annexe III

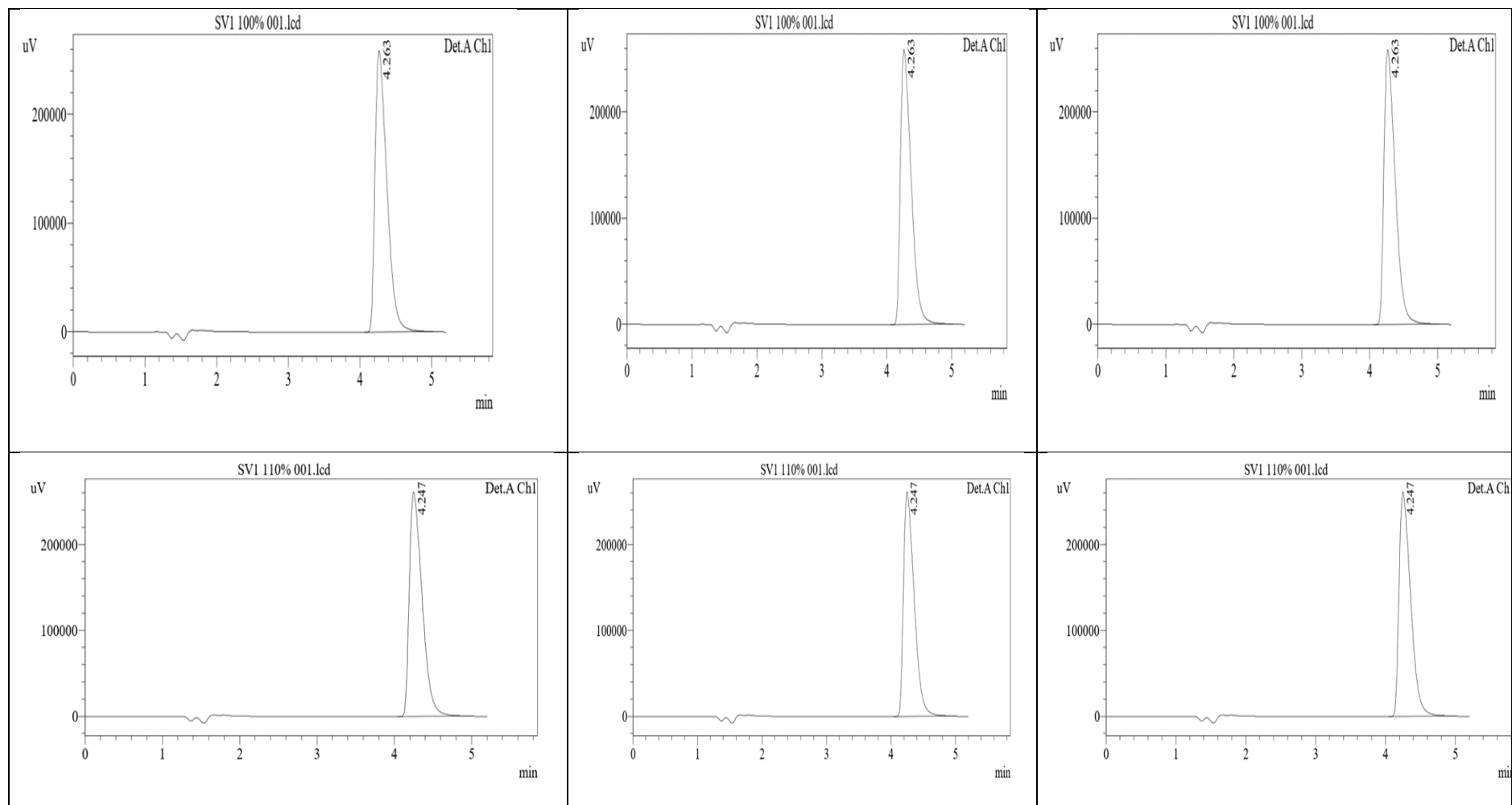
CHROMATOGRAMMES

Série 01



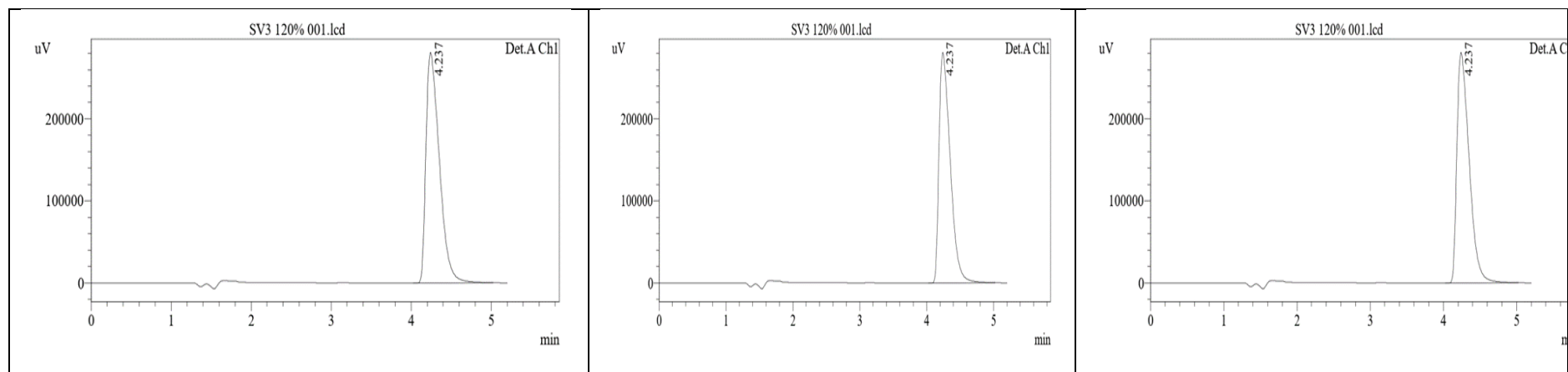




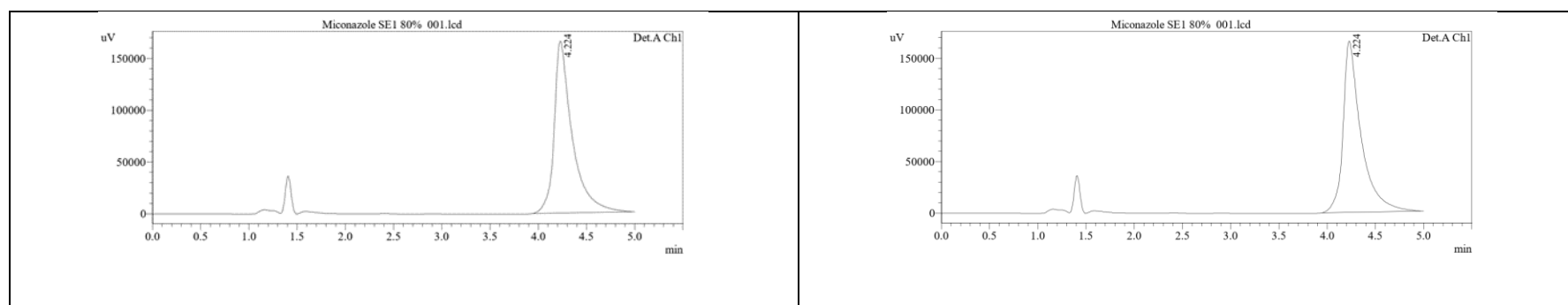


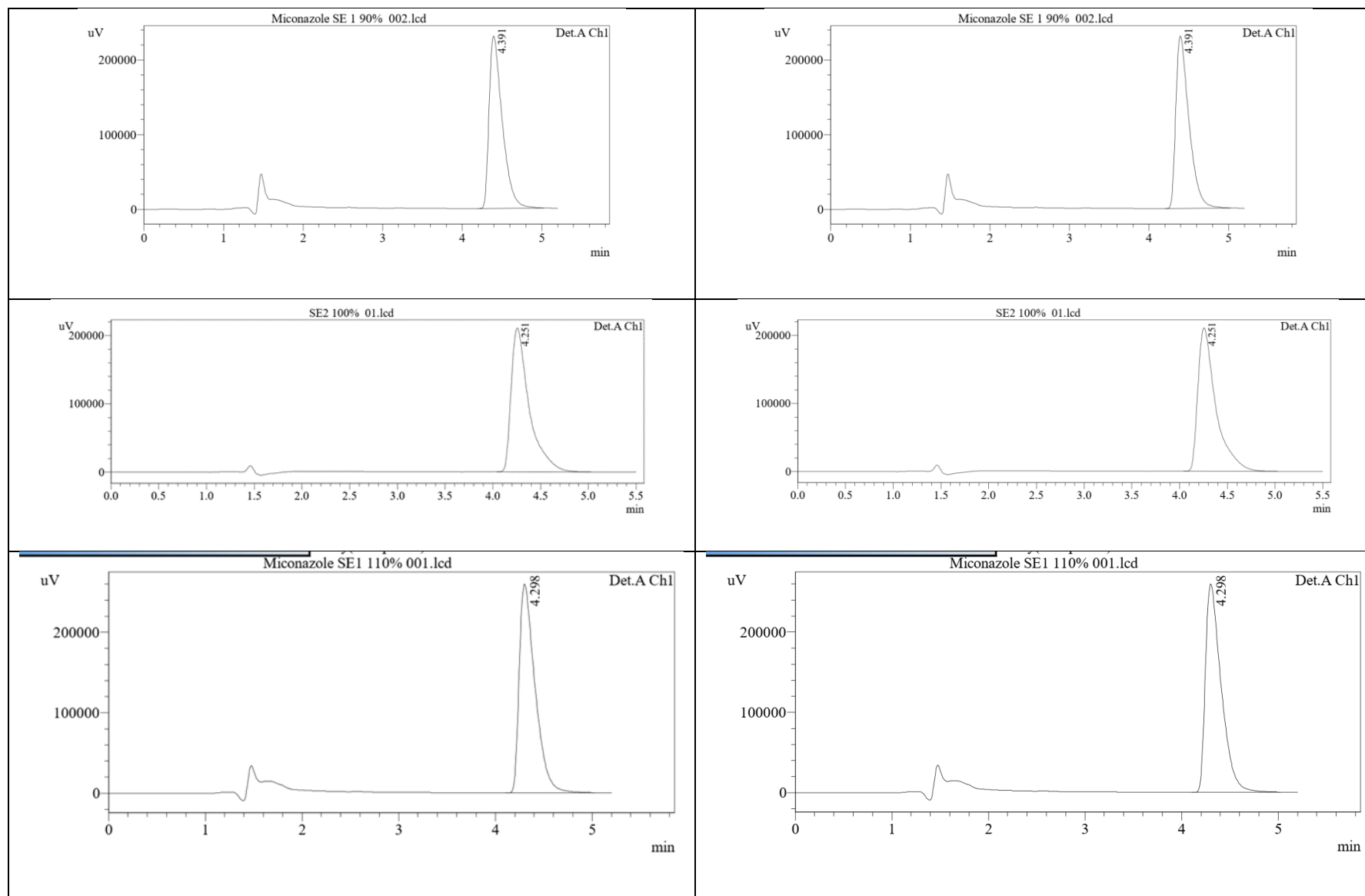
Annexe III

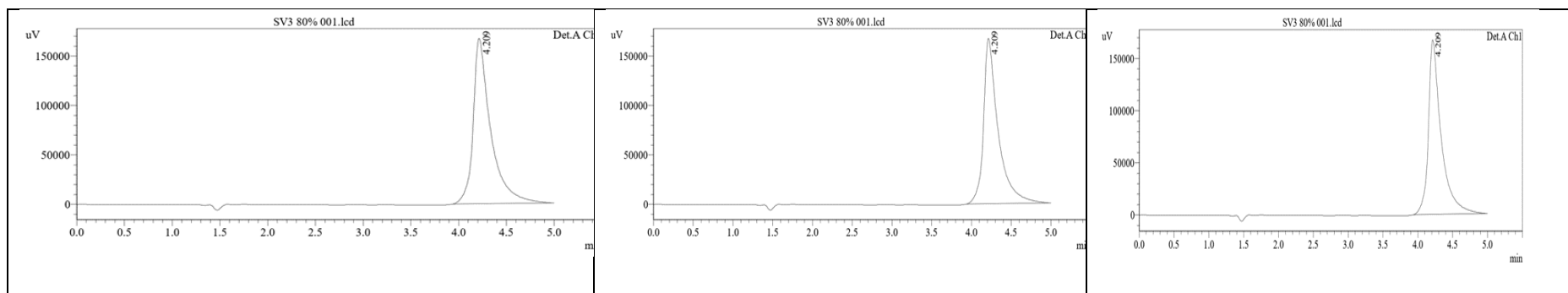
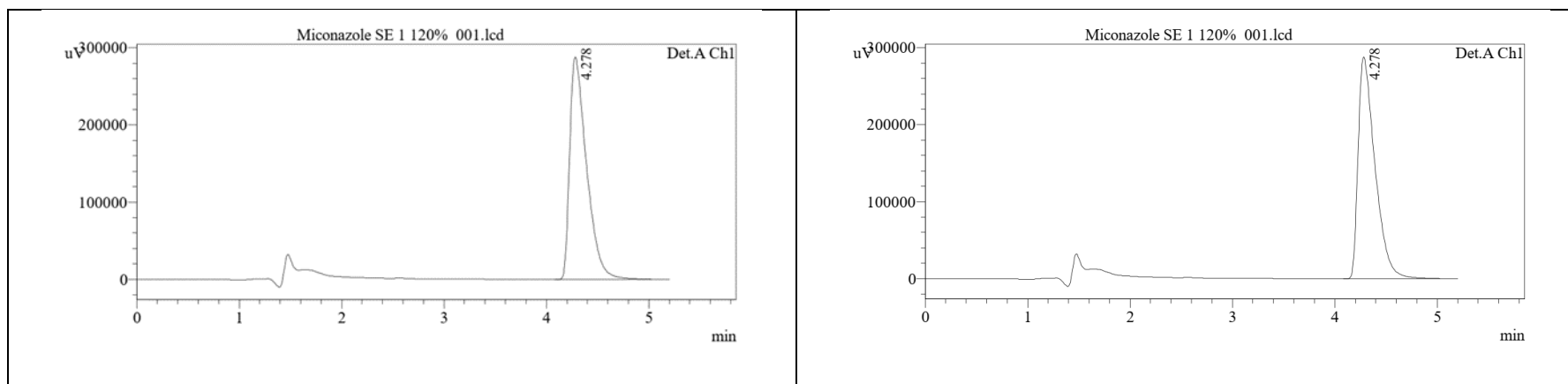
Chromatogrammes

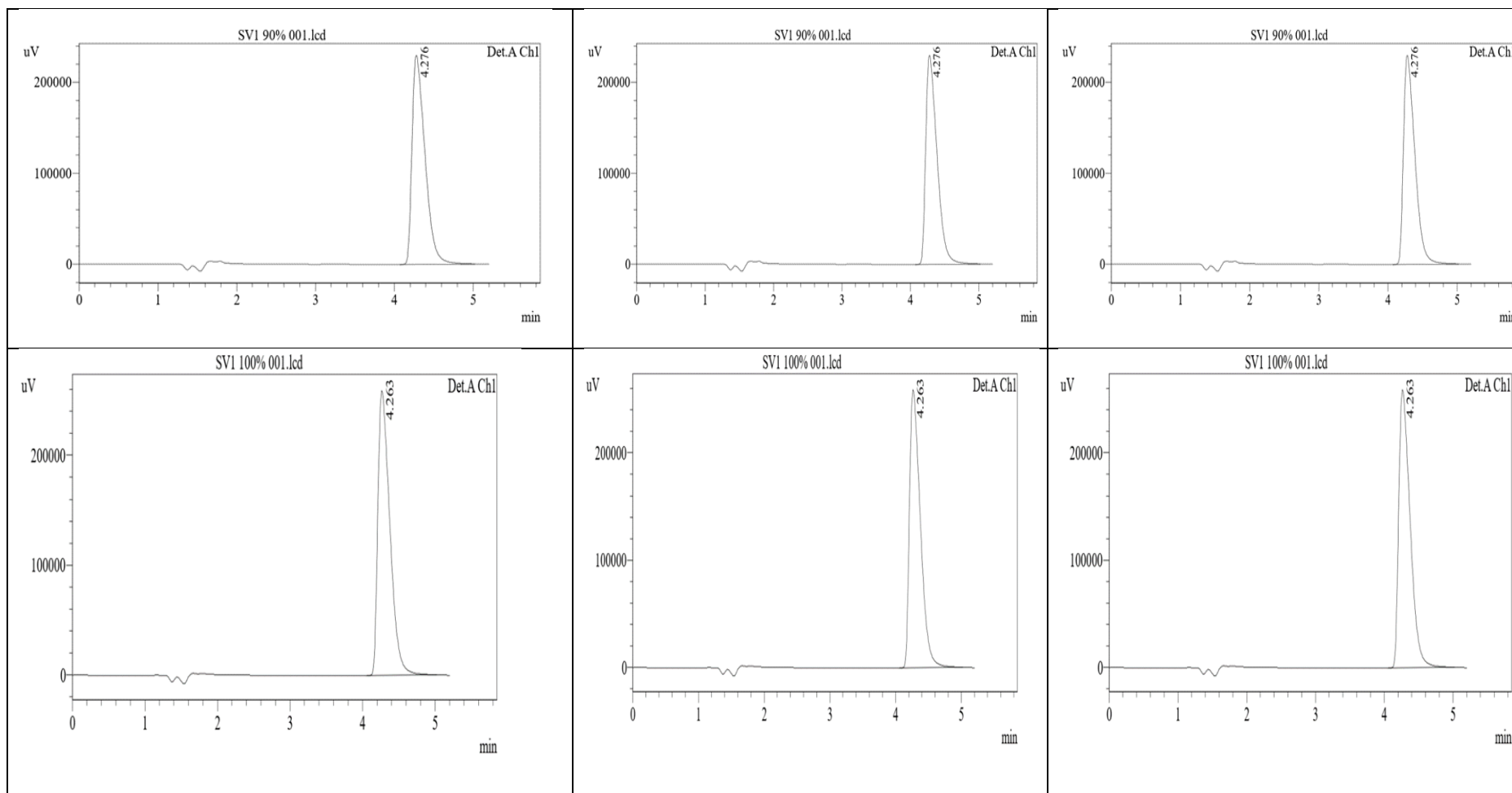


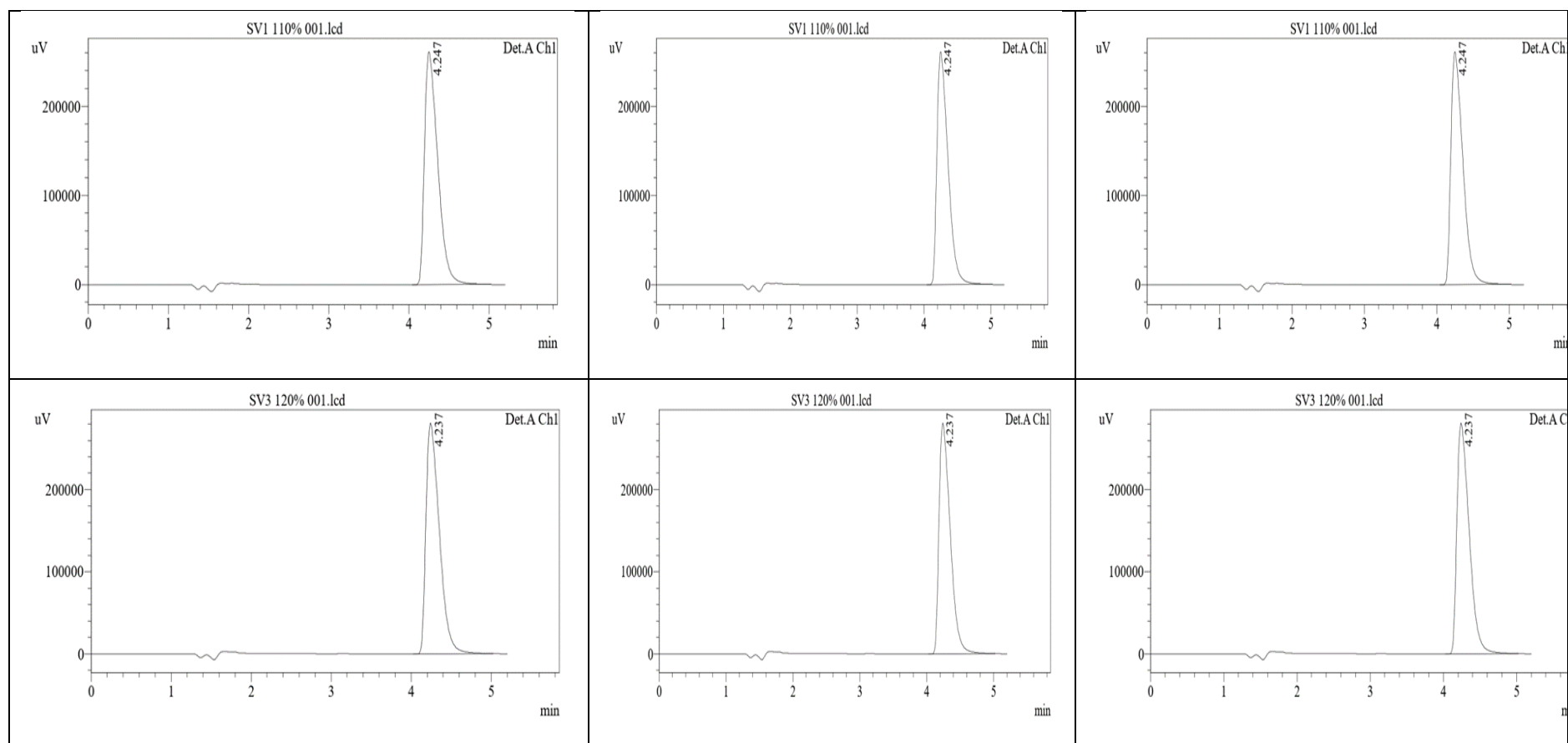
Série 02



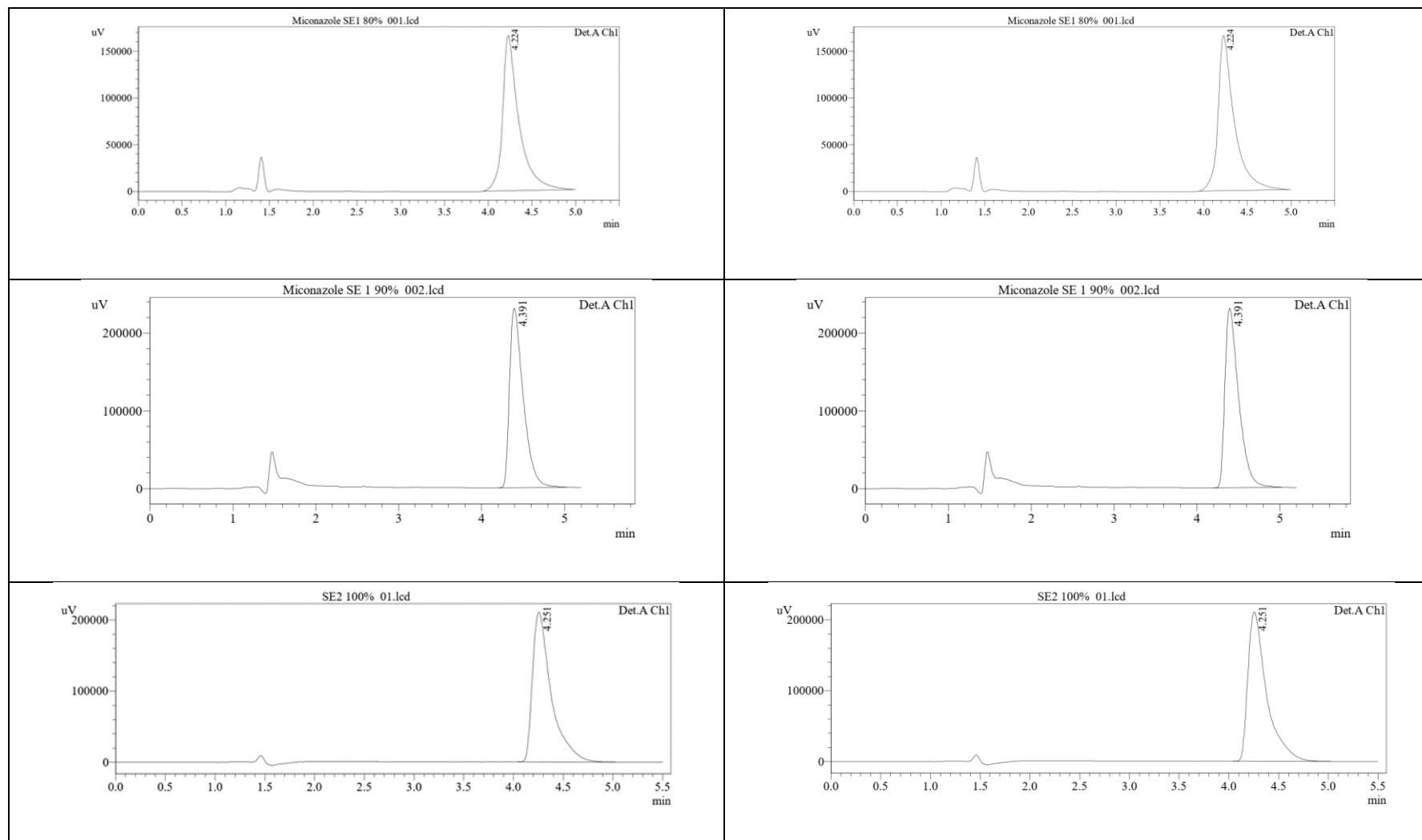


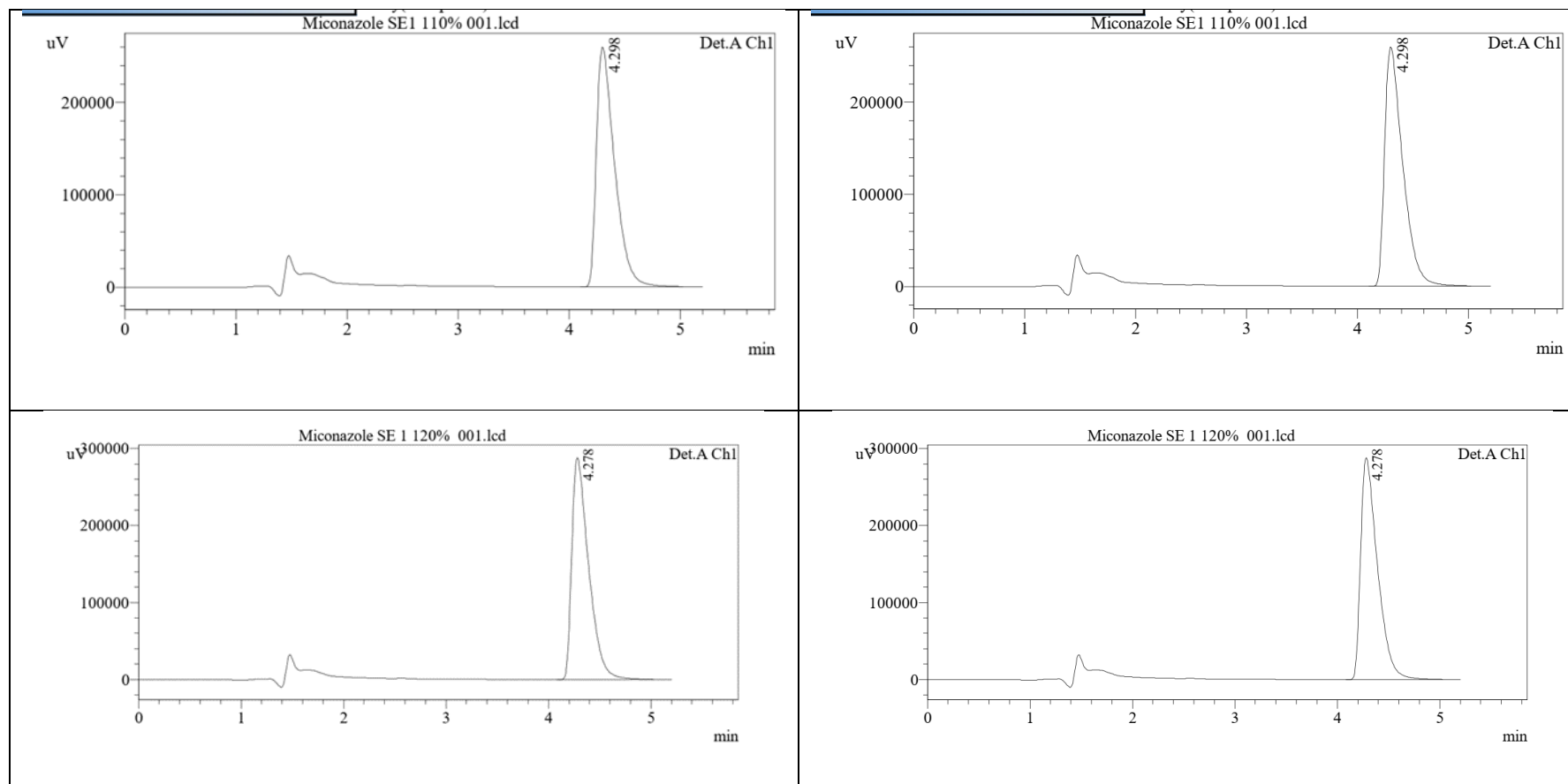


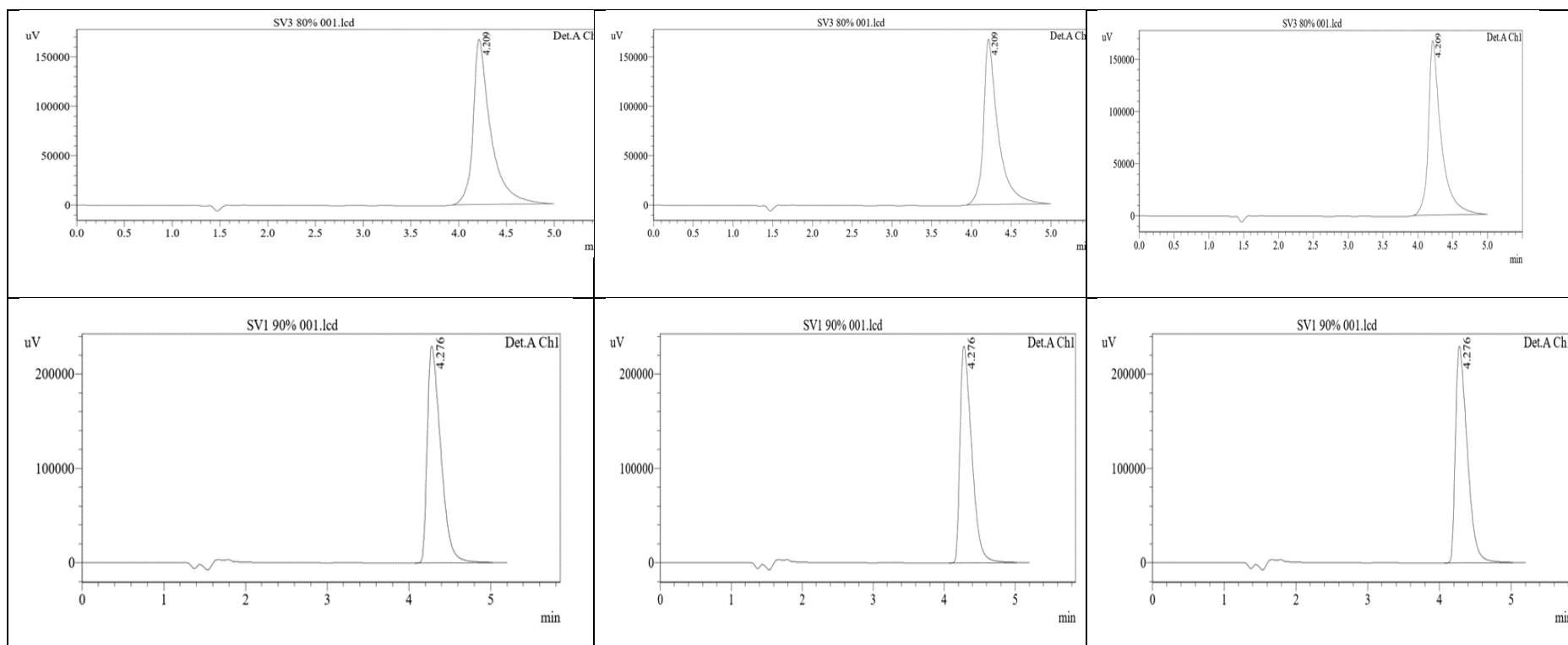


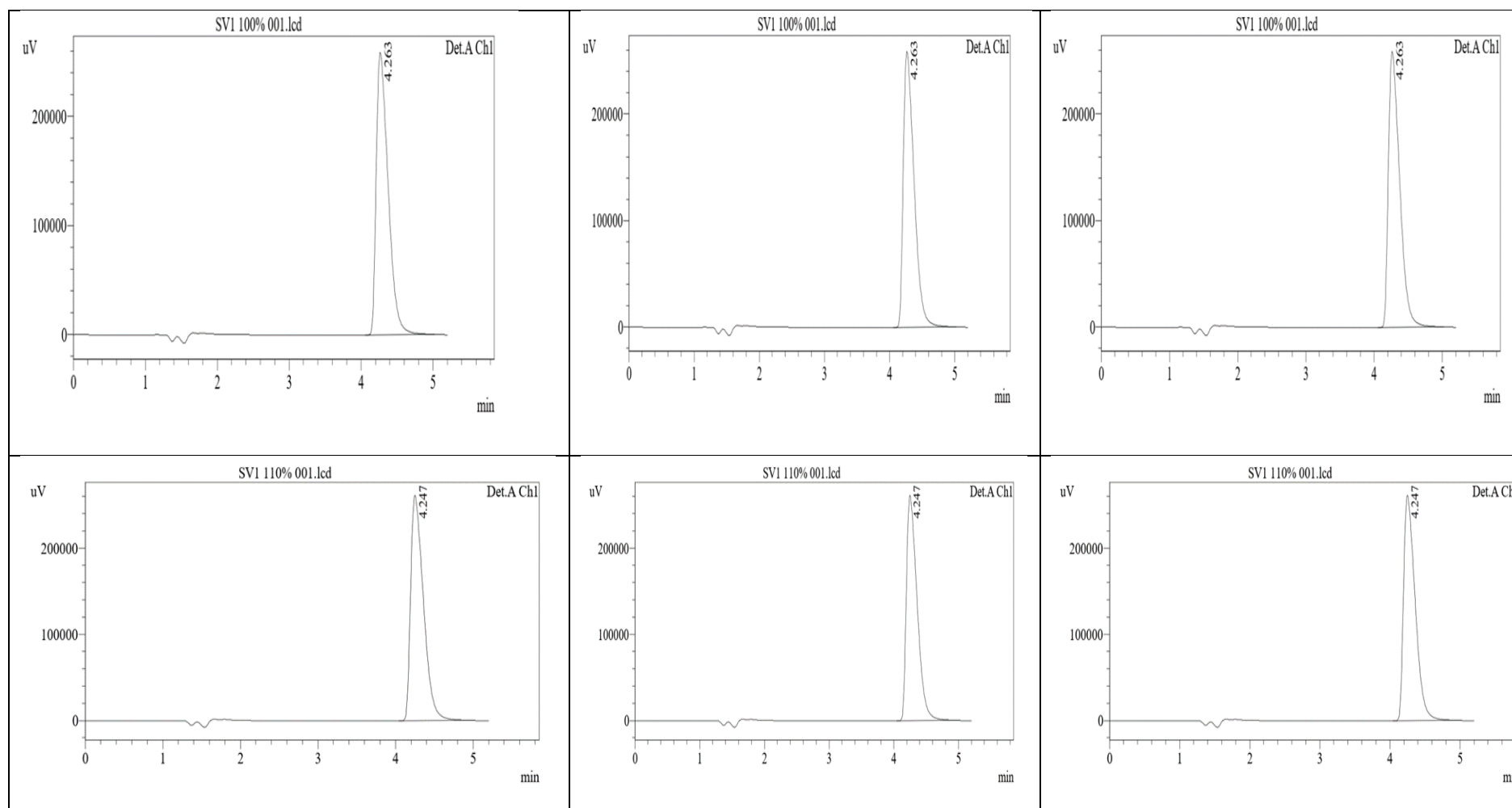


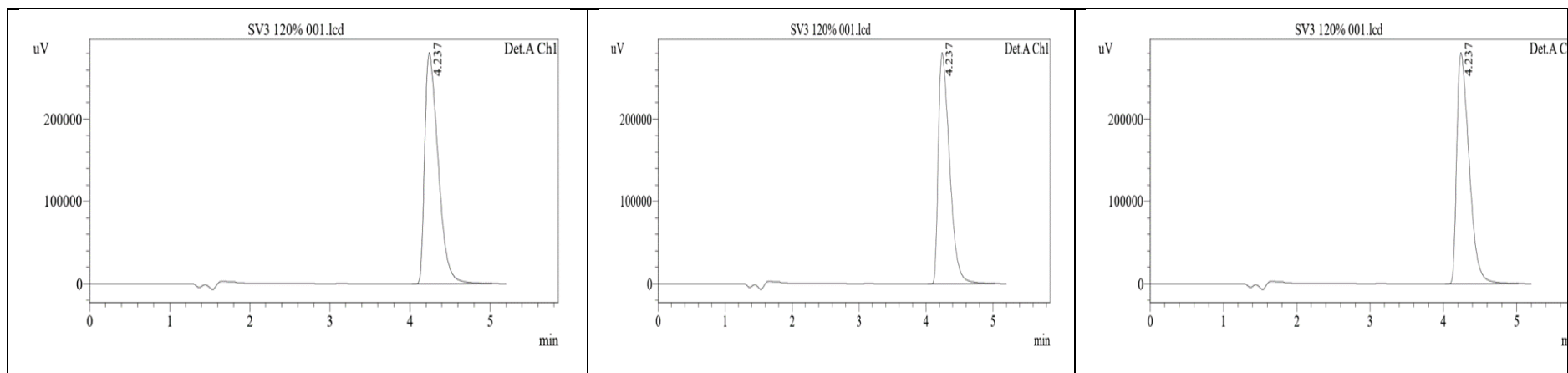
Série 03

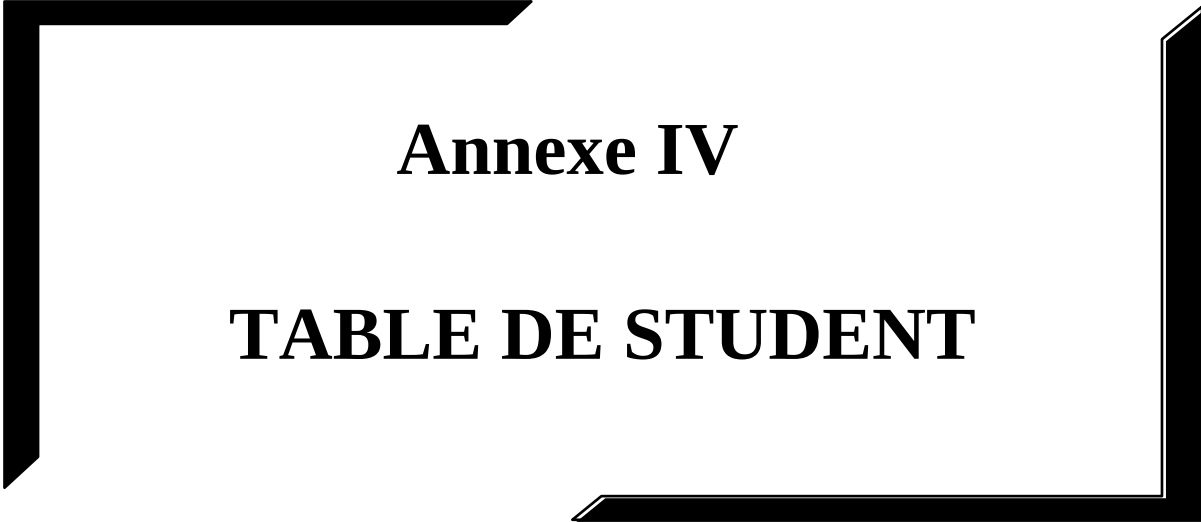










A thick black L-shaped frame surrounds the text. It starts with a horizontal line on the left, then a vertical line on the left side, and ends with a horizontal line on the bottom right.

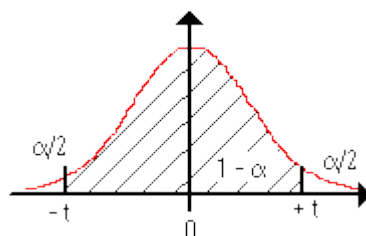
Annexe IV

TABLE DE STUDENT

Table de la loi de Student

Probabilité α d'être dépassée en valeur absolue : $P(-t < T < t) = 1 - \alpha$.

Ou : $P(T < -t) = \alpha / 2 = P(T > t)$



k	γ										
	0.25	0.20	0.15	0.10	0.05	0.025	0.010	0.005	0.0025	0.0010	0.0005
1	1.000	1.376	1.963	3.078	6.314	12.71	31.82	63.66	127.3	318.3	636.6
2	0.816	1.061	1.386	1.886	2.920	4.303	6.965	9.925	14.09	22.33	31.60
3	0.765	0.978	1.250	1.638	2.353	3.182	4.541	5.841	7.453	10.21	12.92
4	0.741	0.941	1.190	1.533	2.132	2.776	3.747	4.604	5.598	7.173	8.610
5	0.727	0.920	1.156	1.476	2.015	2.571	3.365	4.032	4.773	5.893	6.869
6	0.718	0.906	1.134	1.440	1.943	2.447	3.143	3.707	4.317	5.208	5.959
7	0.711	0.896	1.119	1.415	1.895	2.365	2.998	3.499	4.029	4.785	5.408
8	0.706	0.889	1.108	1.397	1.860	2.306	2.896	3.355	3.833	4.501	5.041
9	0.703	0.883	1.100	1.383	1.833	2.262	2.821	3.250	3.690	4.297	4.781
10	0.700	0.879	1.093	1.372	1.812	2.228	2.764	3.169	3.581	4.144	4.587
11	0.697	0.876	1.088	1.363	1.796	2.201	2.718	3.106	3.497	4.025	4.437
12	0.695	0.873	1.083	1.356	1.782	2.179	2.681	3.055	3.428	3.930	4.318
13	0.694	0.870	1.079	1.350	1.771	2.160	2.650	3.012	3.372	3.852	4.221
14	0.692	0.868	1.076	1.345	1.761	2.145	2.624	2.977	3.326	3.787	4.140
15	0.691	0.866	1.074	1.341	1.753	2.131	2.602	2.947	3.286	3.733	4.073
16	0.690	0.865	1.071	1.337	1.746	2.120	2.583	2.921	3.252	3.686	4.015
17	0.689	0.863	1.069	1.333	1.740	2.110	2.567	2.898	3.222	3.646	3.965
18	0.688	0.862	1.067	1.330	1.734	2.101	2.552	2.878	3.197	3.610	3.922
19	0.688	0.861	1.066	1.328	1.729	2.093	2.539	2.861	3.174	3.579	3.883
20	0.687	0.860	1.064	1.325	1.725	2.086	2.528	2.845	3.153	3.552	3.850
21	0.686	0.859	1.063	1.323	1.721	2.080	2.518	2.831	3.135	3.527	3.819
22	0.686	0.858	1.061	1.321	1.717	2.074	2.508	2.819	3.119	3.505	3.792
23	0.685	0.858	1.060	1.319	1.714	2.069	2.500	2.807	3.104	3.485	3.767
24	0.685	0.857	1.059	1.318	1.711	2.064	2.492	2.797	3.091	3.467	3.745
25	0.684	0.856	1.058	1.316	1.708	2.060	2.485	2.787	3.078	3.450	3.725
26	0.684	0.856	1.058	1.315	1.706	2.056	2.479	2.779	3.067	3.435	3.707
27	0.684	0.855	1.057	1.314	1.703	2.052	2.473	2.771	3.057	3.421	3.690
28	0.683	0.855	1.056	1.313	1.701	2.048	2.467	2.763	3.047	3.408	3.674
29	0.683	0.854	1.055	1.311	1.699	2.045	2.462	2.756	3.038	3.396	3.659
30	0.683	0.854	1.055	1.310	1.697	2.042	2.457	2.750	3.030	3.385	3.646
40	0.681	0.851	1.050	1.303	1.684	2.021	2.423	2.704	2.971	3.307	3.551
50	0.679	0.849	1.047	1.299	1.676	2.009	2.403	2.678	2.937	3.261	3.496
60	0.679	0.848	1.045	1.296	1.671	2.000	2.390	2.660	2.915	3.232	3.460
80	0.678	0.846	1.043	1.292	1.664	1.990	2.374	2.639	2.887	3.195	3.416
100	0.677	0.845	1.042	1.290	1.660	1.984	2.364	2.626	2.871	3.174	3.390
120	0.677	0.845	1.041	1.289	1.658	1.980	2.358	2.617	2.860	3.160	3.373
∞	0.674	0.842	1.036	1.282	1.645	1.960	2.326	2.576	2.807	3.090	3.291

Résumé

La validation des méthodes analytiques est une étape basique pour les laboratoires pharmaceutiques pour se soumettre aux exigences réglementaires au cours de la réalisation d'un dossier d'autorisation de mise sur le marché.

Le but du présent travail est de mettre au point et de valider une méthode de dosage du miconazole dans le gel à 2% par chromatographie liquide à haute performance en utilisant le profil d'exactitude comme outil de décision de validation.

Dans un premier temps, on a abordé dans l'étude bibliographique les caractéristiques et les spécificités du principe actif étudié (miconazole) et puis on a mis en lumière l'approche adoptée au cours de la validation de la méthode d'analyse.

Dans la partie pratique, on a été capable d'établir que la technique développée s'est avérée spécifique, linéaire, sensible et exacte dans l'intervalle [0,032 ; 0,048] mg/ml, avec un risque d'avoir au maximum 5% des mesures en dehors des limites d'acceptations fixées à [-5% ; +5%].

Cela atteste donc de la validité de la méthode utilisée et son aptitude à être appliquée en routine par les laboratoires de contrôle qualité pour le dosage du miconazole dans le gel à 2%.

Mots clés : Miconazole, validation analytique, SFSTP, profil d'exactitude, HPLC.

Abstract

Validation of analytical methods is a basic step for pharmaceutical laboratories to comply with regulatory requirements during the completion of a marketing authorization dossier.

The aim of the present work is to develop and validate a method for the determination of miconazole in 2% gel by high performance liquid chromatography using the accuracy profile as a validation decision tool.

In the first part, the characteristics and specificities of the studied active ingredient (miconazole) were discussed in the bibliographic study and then the approach adopted during the validation of the analytical method was highlighted.

In the practical part, we were able to establish that the developed technique proved to be specific, linear, sensitive and accurate in the interval [0.032; 0.048] mg/ml, with a risk of having at most 5% of the measurements outside the limits of acceptances fixed at [-5%; +5%].

This attests to the validity of the method used and its suitability for routine application by quality control laboratories for the determination of miconazole in the 2% gel.

Key words: Miconazole, analytical validation, SFSTP, accuracy profile, HPLC.

